



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

Informe final de investigación previo a la obtención del título de Licenciado en Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Título:** Caracterización clínica y de laboratorio en el diagnóstico de dengue en el Ecuador

**Autor:** Grefa Tapuy Melisa Liseth

**Tutor:** Ph.D. Ana Carolina González Romero

**Riobamba – Ecuador**

**2020**

## REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: **Caracterización clínica y de laboratorio en el diagnóstico del dengue en el Ecuador**, presentado por Melisa Liseth Grefa Tapuy, y dirigida por la Dra. Ana Carolina González Romero Ph.D., una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH.

Para constancia de lo expuesto firman:



Mgs. Aida Mercedes  
Balladares Saltos  
DOCENTE  
UNACH  
Firma Digital

Mgs. Aida Mercedes Balladares Saltos  
**Presidenta del tribunal**

---

**Firma**

Mgs. Yisela Carolina Ramos Campi  
**Miembro del tribunal**



Firma válida solo para:  
Yisela Carolina Ramos Campi  
Evaluación Especial

---

**Firma**

MSc. Félix Atair Falconí Ontaneda  
**Miembro del tribunal**



Firma válida solo para:  
Félix Atair Falconí Ontaneda

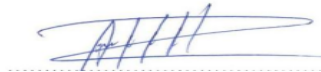
---

**Firma**

## **CERTIFICADO DEL TUTOR**

Yo, Ana Carolina González Romero, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: "Caracterización clínica y de laboratorio en el diagnóstico de Dengue en el Ecuador", propuesto por la señorita Melisa Liseth Grefa Tapuy, egresada de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto..

Riobamba, 28 de septiembre de 2020



.....  
**Ph.D. Ana Carolina González Romero**  
**Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico**

## **AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN**

La responsabilidad del contenido de este trabajo de Graduación, pertenece únicamente a:  
Melisa Liseth Grefa Tapuy y Tutor, Dra. Ana Carolina González Romero Ph.D y el  
patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.



.....  
Melisa Liseth Grefa Tapuy  
CI: 1500951957

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a mi querida Universidad Nacional de Chimborazo, Institución en la cual tuve la oportunidad de alcanzar uno de mis objetivos profesionales, a la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico que más que una profesión se ha convertido en una vocación, a la Dra. Ana Carolina Gonzáles quien brindó su tiempo y conocimientos sin excepción alguna; gracias a todos los docentes por la confianza ofrecida desde que inicie mi vida académica en la facultad.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo en primer lugar a Dios y a mi Virgencita, por guiar mi camino e iluminar mi mente a lo largo de estos años de formación académica. A mi madre Lucila por darme la vida y apoyarme en mi camino estudiantil hasta ahora, gracias a su esfuerzo y sacrificio he logrado todo, siendo mi pilar fundamental. A mis hermanos que gracias a ellos he podido tener inspiración para seguir adelante y ser un ejemplo para su camino. A mi padrastro y abuelos quienes han estado animándome para seguir en superación, me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de esta investigación y profesión, sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito.

A todos, muchas gracias.

## ÍNDICE

<b>ACEPTACIÓN DEL TRIBUNAL</b> .....	I
<b>CERTIFICADO DEL TUTOR</b> .....	II
<b>AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	III
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	IV
<b>DEDICATORIA</b> .....	V
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	VIII
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	X
<b>RESUMEN</b> .....	XI
<b>ABSTRACT</b> .....	XII
<b>Capítulo I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>Vector</b> .....	4
<b>Transmisión de virus del dengue</b> .....	4
<b>Reservorio</b> .....	5
<b>Período de incubación</b> .....	5
<b>Fases del dengue</b> .....	5
Fase febril .....	5
Fase crítica .....	6
Fase de recuperación .....	7
<b>Clasificación del dengue</b> .....	8
1.- Dengue sin signos de alarma: .....	8
2.- Dengue con signos de alarma: .....	8
3.-Dengue grave: .....	8
<b>Manejo del paciente con sospecha de dengue en Ecuador</b> .....	9
<b>Pruebas específicas de diagnóstico</b> .....	11
Métodos de diagnóstico directos .....	11

Métodos de diagnósticos indirectos .....	12
<b>Capítulo II. METODOLOGÍA.....</b>	<b>14</b>
<b>Tipo de investigación. ....</b>	<b>14</b>
<b>Determinación de población y muestra .....</b>	<b>15</b>
<b>Criterios de inclusión y exclusión .....</b>	<b>15</b>
<b>Método de estudio .....</b>	<b>16</b>
<b>Criterios de selección y extracción de datos .....</b>	<b>17</b>
<b>Capítulo III. DESARROLLO.....</b>	<b>19</b>
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>19</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>1</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización clínica del dengue en adultos.....	20
Tabla 2. Caracterización clínica del dengue en pacientes pediátricos.....	23
Tabla 3. Transaminasas elevadas en pacientes con dengue según su clasificación del dengue.....	26
Tabla 4. Sensibilidad y especificidad de las pruebas de laboratorio para el diagnóstico del dengue.....	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de transmisión del virus del dengue .....	4
Figura 2. Curso de enfermedad del dengue .....	7

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Inseto de prueba inmunocromatográfica IgG/IgM dengue.....	2
Anexo 2. Inseto de prueba inmunocromatográfica de Ag-NS1 .....	6
Anexo 3. Inseto ELISA IgM-dengue .....	14
Anexo 4. Inseto ELISA IgG dengue .....	18
Anexo 5. Inseto ELISA NS1 .....	27
Anexo 6. Inseto PCR dengue .....	41

## **RESUMEN**

La presente investigación se realizó bajo la modalidad revisión bibliográfica, que tiene como objetivo recopilar información bibliográfica actualizada sobre la caracterización clínica y de laboratorio en el diagnóstico de dengue en el Ecuador. La metodología aplicada fue de tipo descriptiva, diseño documental, corte transversal y retrospectiva. A pesar de la escasa información, se recabó datos sobre el tema a través de la Guía de atención para enfermos de dengue en la región de las Américas que se encuentra presente en la página oficial del MSP. El presente trabajo investigativo contiene: justificación, metodología, desarrollo y conclusiones, con contenido de conceptos generales sobre el dengue, clasificación de la enfermedad, manejo del paciente y pruebas de laboratorio aplicados en el país. Para la población de estudio se recolectó información a través de fuentes primarias y secundarias, para el muestreo se escogieron 64 publicaciones través de buscadores de revistas científicas y distribuidas de la siguiente manera scielo-6, Redalyc-4, pubmed-6, Mendeley-8, Dialnet-2, medigraphic-2, NCBI-9, Science Direct-3, BMC-1, INSPILIP-1 donde se incluyen páginas webs (1-OMS, 2-OPS, 5-MSP, 1-Hindawi, 1-KJCL), libros en pdf 11. Los resultados obtenidos en esta revisión bibliográfica muestran que la caracterización clínica del dengue es de sintomatología variada, presentándose compromiso de órganos, hemorragias o hasta la mortalidad del paciente la misma que es corroborado por varios autores de diferentes países y las pruebas aplicadas en el país son Elisa con captura de NS1 y detección de anticuerpos a través de prueba serológica cualitativa, ELISA con captura de IgM e IgG, RT-PCR.

**Palabras clave:** dengue, OMS, MSP, serológica, anticuerpos.

## **ABSTRACT**

This research was carried out under the bibliographic review modality, which aims to collect updated bibliographic information on the clinical and laboratory characterization in the diagnosis of dengue in Ecuador. The methodology applied was descriptive, documentary design, cross-sectional, and retrospective. Despite the scant information, data was collected through the Guide to care for dengue patients in the Americas region, present on the MSP's official website. The current investigation contains justification, work methodology, development, and conclusions, with general concepts about dengue, classification of the disease, patient management, and laboratory tests applied in the country. For the study population, information was collected through primary and secondary sources. For the sampling, 64 publications were chosen through search engines for scientific journals and distributed as follows: scielo-6, Redalyc-4, PubMed-6, Mendeley- 8, Dialnet-2, medigraphic-2, NCBI-9, Science Direct-3, BMC-1, INSPILIP-1 including web pages (1-OMS, 2-OPS, 5-MSP, 1-Hindawi, 1- KJCL), books in pdf 11. The results obtained in this bibliographical review show that dengue's clinical characterization is a symptom's variety. Presenting organ involvement, bleeding, or even patient mortality corroborated by several authors from different countries. The tests applied in the country are Elisa with the capture of NS1 and detection of antibodies through a qualitative serological test, ELISA with the capture of IgM and IgG, RT-PCR.

**Keywords:** dengue, WHO, MPH, serological, antibodies.

## **SIGNATURE**

Reviewed by:

Ms.C. Ana Maldonado León

ENGLISH PROFESSOR

C.I.0601975980

## Capítulo I. INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad infecciosa producida por el virus del dengue (DENV), pertenece al género flavivirus, de la familia Flaviviridae que a la vez pertenece al grupo de Arbovirus (virus transmitidos por artrópodos). Hay cuatro serotipos del virus del dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Las partículas virales contienen ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple, se encuentran envueltas y miden aproximadamente de 40-50 nm de diámetro, se transmiten por la picadura del mosquito *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Su prevalencia está estrechamente relacionada con los climas tropicales, precipitaciones y la urbanización que no ha tenido previa planificación. Existen dos tipos de dengue, el clásico y el grave (antes conocido como dengue hemorrágico) <sup>1-4</sup>.

Ante el avance de las enfermedades arbovirales cuyo principal vector es *A. aegypti* es necesario la revisión de objetivos y la estructura de los programas de control, como también el diagnóstico de la misma, indagar saberes entomológicos para comprender la complejidad o la heterogeneidad de los ciclos de transmisión. La detección del virus y la conversión serológica han sido los objetivos primordiales de la evaluación diagnóstica durante muchos años. A pesar de los avances de métodos de diagnóstico, todavía existen desafíos primordiales en el manejo clínico de pacientes infectados con dengue, principalmente debido a la ausencia de biomarcadores en las que emita resultados confiables como pronóstico efectivo de la progresión de la enfermedad <sup>3,5</sup>.

En Brasil, durante la semana epidemiológica 1 y la 52 del año 2019, hubo un reporte de 2.226.865 casos de dengue, en donde se incluye 789 defunciones. Del total de pacientes reportados se obtuvieron 1.594.663 como casos probables, 1.244.082 fueron confirmados por laboratorio y dentro de los que se encuentran en proceso de investigación corresponde a 30.074 casos. Del total de casos confirmados, fueron clasificados 19.187 como dengue con signos de alarma (DCSA) y 1.453 casos como dengue grave (DG) notificados <sup>6</sup>.

En Ecuador, durante el año 2018 se reportaron 3.094 casos y en el año 2019 se informaron 8.416 casos de los cuales 6.660 (79.13%) casos fueron dengue sin signos de alarma, 1718 (20,47%) casos correspondían a dengue con signos de alarma (DCSA) y 38 (0,49%) casos fueron por dengue grave (DG), identificándose la circulación de los serotipos DENV-1 y DENV-2. Hasta la semana epidemiológica 14 de año 2020 se notificaron 6.941 casos <sup>7</sup>.

En la provincia de Chimborazo no se han encontrado publicaciones de bases de datos sobre el tema debido a que el dengue no es endémico en la provincia. Sin embargo, en el parte epidemiológico emitido por el Ministerio de Salud Pública se reportaron 7 casos de dengue en la semana epidemiológica 01-03-2020, de los cuales 6 se diagnosticaron como dengue sin complicaciones y un caso de dengue con signos de alarma <sup>7</sup>.

En el país todo caso de dengue con signos de alarma y dengue grave, deben ser confirmados por pruebas de laboratorio como: detección de antígenos proteína no estructural 1 (NS1) mediante pruebas serológicas cuantitativas-Elisa con captura de NS1 y detección de anticuerpos a través de prueba serológica cuantitativa – ELISA con captura de IgM e IgG y RT-PCR <sup>8</sup>.

El dengue es una enfermedad emergente de importancia mundial debido al creciente número de casos reportados en regiones endémicas y su expansión a nuevas regiones, convirtiéndose en una amenaza para muchos países. En Ecuador el dengue representa un importante problema de salud pública en el contexto de las enfermedades transmitidas por vectores, desde su aparición a finales del año 1988 ha tenido un comportamiento endemo-epidémico. Se han registrado varios ciclos epidémicos, adicional a esta información, existe una condición de hiper endemicidad viral, puesto que el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) antes Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Leopoldo Izquieta Pérez (INHMT) ha reportado la circulación de los 4 serotipos del virus del dengue en el país <sup>9,10</sup>.

La transmisión del dengue se mantiene de manera endémica durante todo el año y los ciclos epidémicos generalmente coinciden con la temporada de lluvias, época donde se dan las condiciones adecuadas para la masiva reproducción de *A. aegypti*, los sitios de cría de este mosquito son fundamentalmente artificiales como: objetos que se encuentran en casa o alrededor con contenido de agua sin recorrido; otra causa significativa es la falta de mallas protectoras en ventanas y puertas que impidan el ingreso de los mosquitos al interior de las casas y adicionalmente la no utilización de mosquiteros durante los horarios de descanso <sup>11,12</sup>.

La sintomatología asociada al dengue clásico se caracteriza por la aparición de fiebre alta, dolor de cabeza, dolor retro-orbitario, mialgias, náuseas, vómito y erupción maculopapular poco frecuente, dolores musculares, articulares, ganglios linfáticos agrandados y sarpullido, otra característica que de vez en cuando no suele tomarse en cuenta es que el virus puede

afectar órganos internos, siendo así que los síntomas llegan a ser menos agresivos en niños que en adultos y el tratamiento se centra en la mejora de los síntomas en el paciente <sup>(5,13,14)</sup>.

Según Organización Panamericana de la Salud (OPS), en nuestro país se ha reportado que la enfermedad a nivel nacional se encuentra presente en aproximadamente 8416 casos, con 6 defunciones. En el año 2020 se han registrado 327 casos, los cuales se distribuyen de la siguiente manera: Guayas con 84 casos, se encontró como la provincia más afectada, seguido por Manabí con 63 casos; Santo domingo de Tsáchilas con 49 casos; Los Ríos con 35 casos y finalmente Esmeraldas con 25 casos <sup>15</sup>.

Resulta difícil determinar cuál grupo progresa de la forma no grave a la grave debido a la variabilidad clínica, que está relacionada con la respuesta inmunológica del huésped, la comorbilidad, exposición previa a la enfermedad y la virulencia de la cepa viral, lo que genera una gran preocupación, pues el tratamiento apropiado puede contribuir que no se desarrollen condiciones clínicas más graves y salvar la vida de los pacientes <sup>16</sup>.

Si bien se conoce los cuatro serotipos del virus del dengue, la identificación es complicada debido a que existen muchos virus, bacterias y parásitos que pueden producir las mismas sintomatologías, además, existen en la misma área geográfica e incluso coinfección por ende los avances en genómica han proporcionado a los biólogos moleculares y genetistas una gran cantidad de información con el fin de generar soluciones novedosas para reducir y diagnosticar beneficiosamente las poblaciones vectoriales. Se han desarrollado pruebas de laboratorio directas e indirectas para identificar el virus o parte de su estructura, estas técnicas se utilizan para diagnóstico, estudios epidemiológicos, monitoreo, evaluación y producción de vacunas y antivirales <sup>17,18</sup>.

Por lo antes descrito, surge el planteamiento de la siguiente pregunta ¿Aporta la web información suficiente para obtener datos actualizados y de utilidad sobre la caracterización clínica y de laboratorio en el diagnóstico de dengue en el Ecuador?

Por lo tanto, se pretende como objetivo con esta investigación, realizar la recopilación de información bibliográfica actualizada sobre la caracterización clínica y de laboratorio en el diagnóstico de dengue en el Ecuador a través de artículos científicos, páginas web y libros.



El dengue se caracteriza por ser endémica en zonas tropicales y subtropicales, la temperatura, el aumento de los niveles de infestación debido a la lluvia se refleja en las tasas de incidencia de la enfermedad, entre otros factores, que pueden ejecutar una considerable influencia en la capacidad vectorial, ya que impacta en la dinámica de la población del mosquito, el movimiento del ciclo biológico, la respuesta inmunológica frente al virus del dengue. De la misma forma gracias a la implementación de programas para el manejo del vector emitidas por las correspondientes instituciones de salud y nuevas pruebas de laboratorio para un rápido diagnóstico, es posible proveer un adecuado manejo, además que la letalidad por la enfermedad vaya disminuyendo <sup>19,20,21,22</sup>.

## Vector

El principal vector es el mosquito *A. aegypti*, enfermedad arboviral más común en todo el mundo, y en países principalmente asiáticos se ha identificado como vector principal al *A. albopictus* <sup>22,23</sup>.

## Transmisión de virus del dengue

La transmisión de los cuatro serotipos del virus del dengue se mantiene mediante transferencia horizontal en un ciclo *Aedes aegypti*-humano, la infección por mosquitos comienza cuando las hembras ingieren sangre contaminada de un huésped humano infectado. Después de sobrevivir a un período de incubación extrínseco de 7 a 14 días los vectores se vuelven infecciosos y pueden transmitir el virus por picadura, en los humanos la incubación del virus es de 3 a 15 días (normalmente de 4 a 7 días). El virus se replica en el intestino del mosquito y desde ahí migra hacia sus glándulas salivales en las que queda disponible para infectar a través de una nueva picadura manteniendo la cadena persona infectada-vector-persona susceptible <sup>24,25</sup>.

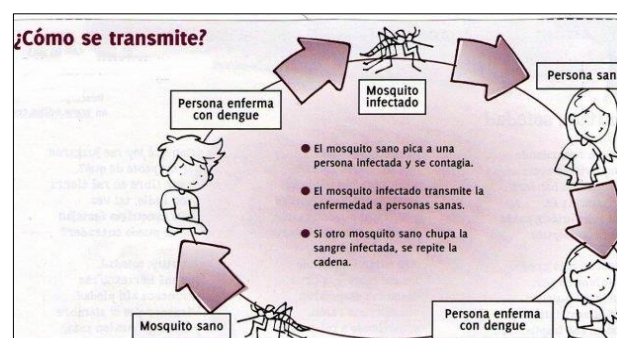


Figura 1 Ciclo de transmisión del virus del dengue

Fuente: <https://okdiario.com/img/2017/03/02/como-se-transmite-dengue-contagio-620x349.jpg>

## **Reservorio**

El virus se mantiene en zonas urbanas de clima tropical y subtropical en un ciclo entre el ser humano y el mosquito del género *Aedes*, esto se debe al aumento de temperatura climática conjuntamente con el aumento de las precipitaciones que propician el desarrollo de los mosquitos desde la etapa larvaria hasta la etapa adulta y sus poblaciones pueden aumentar de manera drástica afectando a la población <sup>23,26</sup>.

## **Período de incubación**

Después de una picadura de mosquito infeccioso hay un período de incubación de hasta 2 semanas después (comúnmente 5-7 días), después del cual el individuo desarrolla síntomas típicos de la enfermedad el cual atraviesa por tres fases: fase de incubación el cual tiene una duración de tres a diez días, seguida por la fase febril con duración de dos a siete días, la fase crítica en el tercer y séptimo día de la fiebre en el que hay fuga plasmática y finalmente la fase de recuperación comprendida entre el séptimo y décimo día en donde se reabsorben los líquidos. Esta variabilidad clínica está relacionada con la respuesta inmunológica del huésped a la infección. Los mosquitos infectados permanecen infecciosos el resto de su vida, que es de 25 días, pero puede sobrevivir hasta 42 días dependiendo de las condiciones ambientales, por ende, para asegurar un buen resultado de esta enfermedad dinámica y multifacética, es importante que los médicos estén conscientes de la variedad de problemas clínicos que pueden surgir durante las diferentes fases de la enfermedad <sup>27,28</sup>.

## **Fases del dengue**

### **Fase febril**

Por lo general, los pacientes tienden a tener fiebre alta repentinamente. El período de fiebre aguda suele durar de 2 a 7 días y se acompaña de enrojecimiento facial, eritema, dolores generales, mialgias, artralgias, dolores de cabeza y dolor detrás de los ojos. Algunos pacientes tienen dificultad para tragar y congestión en la faringe. Las enfermedades gastrointestinales incluyen anorexia, náuseas, vómitos y heces líquidas que son muy comunes en esta etapa <sup>29</sup>.

En la etapa inicial de la fiebre, el dengue puede ser difícil de distinguir clínicamente de otras enfermedades febriles agudas, como también una prueba de torniquete (PT) positiva indica que el paciente tiene más probabilidades de tener dengue. Unos días después del inicio de la enfermedad puede haber una pequeña cantidad de sangrado, como petequias y equimosis en

la piel. Así mismo, el tamaño del hígado puede aumentar y puede ser doloroso a la palpación. Los valores obtenidos en las pruebas de laboratorio son de enzimas hepáticas elevadas como el aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT)  $\geq 1000$  unidades/litro (U/L), esta alteración ocurre en la etapa temprana de la enfermedad y puede ser un marcador de la enfermedad por dengue grave, pero no se ha determinado el valor de laboratorio específico que puede distinguir mejor entre los tipos de dengue <sup>25,30</sup>.

La primera anomalía en el cuadro sanguíneo es la trombocitopenia por debajo de  $100.000/\text{mm}^3$ , con una duración media de 6-4 días. Hay también presencia de leucopenia el mismo que su valor de recuento de menos de  $5.000$  células/ $\text{mm}^3$ , que suele ser un hallazgo común en aproximadamente el 68,4% de los pacientes. La fórmula diferencial puede ir acompañada de células en banda y linfocitos atípicos. Sin embargo, el recuento de glóbulos blancos superior a  $6000$  células/ $\text{mm}^3$  está relacionado con el desarrollo del síndrome de choque por dengue. Teniendo en cuenta la alta posibilidad de infección por dengue, el hematocrito elevado suele ser la primera anomalía causada por la extravación de plasma. La bradicardia relativa es común en esta etapa porque la fiebre no aumenta significativamente la frecuencia cardíaca <sup>29,31</sup>.

### **Fase crítica**

En algunos pacientes sucede durante los primeros 3 a 7 días de la enfermedad, la temperatura desciende y se mantiene en  $37^\circ\text{C}$  o menos, y habitualmente la permeabilidad capilar puede aumentar, al mismo tiempo aumenta el nivel del hematocrito, esto se debe a que la secreción de plasma suele durar de 4 a 48 horas y puede estar relacionada con hemorragias de mucosas nasales (epixtasis) y de las encías (gingivorragia), así como como sagrado transvaginal en mujeres de edad fértil (metrorragia o hipermenorrea). Si el volumen de sangre no se restaura de manera oportuna y correcta dentro de un cierto período de tiempo, estos pacientes pueden mostrar signos de hipoperfusión y shock hipovolémico. En los niños, además de la taquicardia, es más importante determinar cambios en el estado mental (irritabilidad y somnolencia) y dificultad para respirar <sup>29</sup>.

El mecanismo específico del dengue hemorrágico no está claro, pero hay muchas razones: la pérdida de plasma es un signo de manifestaciones hemorrágicas del dengue hemorrágico, los pacientes que se infectan repetidamente con cepas del virus del dengue que tienen una causa diferente a la primera infección, de modo que aquellos pacientes tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar dengue hemorrágico <sup>32</sup>.

Algunos pacientes con dengue pueden tener varios órganos afectados a partir de las fases tempranas de la infección por acción directa del virus, por apoptosis y por otros mecanismos, que pueden causar encefalitis, hepatitis, miocarditis y nefritis; anteriormente esos se describían como casos atípicos; estos casos pueden presentar daño grave de órganos. Los riñones, pulmones e intestinos también pueden resultar dañados por la misma causa al igual que el páncreas. La enfermedad renal no es infrecuente y no se informa, pero se lo hace cuando se encuentran hematuria microscópica, proteinuria, alteraciones electrolíticas o incluso lesión renal aguda y según Vachvanichsanong P, et al<sup>35</sup> encontraron tras un estudio, que la lesión viral directa y el depósito del complejo antígeno-anticuerpo en el glomérulo eran posibles causas de trastornos renales en la infección por dengue. La prevalencia de alteraciones electrolíticas o afectación renal informada en los estudios varían ampliamente según el país y depende principalmente de la gravedad de la enfermedad y la edad de los pacientes <sup>29,33,34,35</sup>.

### Fase de recuperación

Cuando el paciente sobrevive a la fase crítica, entra en fase de recuperación donde se resuelve la extravación del plasma con la reabsorción de líquidos, puede durar 48 a 72 horas, después de las cuales el paciente mejora el estado general, restablece el apetito, mejora los síntomas gastrointestinales, estabiliza el estado hemodinámico y aumenta la diuresis, y también es una etapa en la que el hematocrito se estabiliza o restaura. Estudios previos han demostrado que al comparar pacientes con choque séptico bacteriano y choque por dengue, la frecuencia cardíaca de este último es menor que la de los bacterianos <sup>29</sup>.

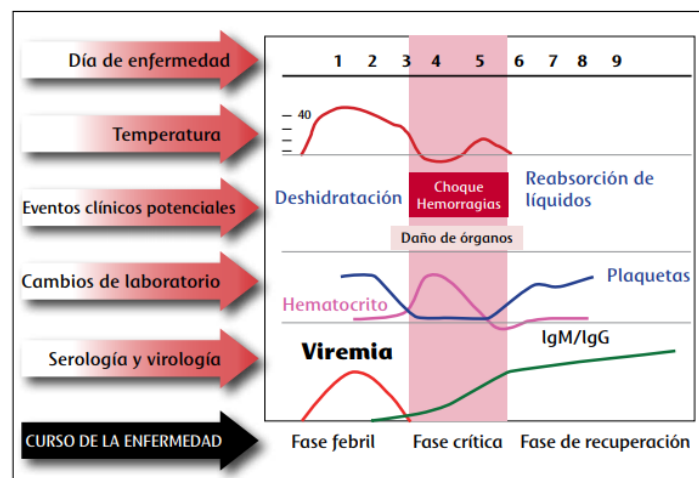


Figura 2. Curso de enfermedad del dengue

Fuente: OPS, guías para la atención de enfermos en la región de las américas

## Clasificación del dengue

1.- Dengue sin signos de alarma: esta condición clínica es muy común en los adultos, quienes pueden presentar los síntomas durante varios días (por lo general, una semana) y pasar luego a una fase de convalecencia que puede durar varias semanas e incluso meses en algunos casos (síndrome post dengue) <sup>29</sup>.

- Molestias y dolores (cefalea, dolor muscular o articular, dolor retro orbitario)
- Náuseas y vómitos
- Exantema (erupción cutánea)
- Prueba de torniquete positiva
- Leucopenia <sup>13</sup>.

2.- Dengue con signos de alarma: Para los pacientes con signos de alarma debido al dengue, los niveles de plaquetas (trombocitopenia) disminuyen al quinto día de la enfermedad y el requerimiento de expansiones para dolor abdominal como también el signo temprano de shock que permiten identificar si un paciente se encuentra próximo a evolucionar en próximas horas a un estado grave <sup>29</sup>.

- Dolor abdominal intenso y continuo o abdomen doloroso a la palpación, o distensión abdominal
- Sangrado de mucosas
- Laboratorio: aumento del hematocrito igual o superior al 20% por encima del promedio de edad, sexo y población, concurrente con rápida disminución del número de plaquetas <sup>13,37</sup>.

3.-Dengue grave: los pacientes que padecen dengue severo son clasificados por sus instituciones médicas como de la siguiente manera: a) está en peligro de muerte inminente b) presenta síntomas y signos de complicaciones, que pueden ser fatales o poco convencionales si no se trata adecuadamente y c) existe otra condición que determina su gravedad <sup>29, 38</sup>.

- Extravasación importante del plasma que lleva a:
  - Choque (Síndrome de Choque por Dengue)
  - Acumulación de líquidos en pulmón y disnea
- Compromiso/daño orgánico grave en/de:

- Hígado: valores elevados de (Aspartato aminotransferasa) AST o (Alanina aminotransferasa) ALT.
- Sistema Nervioso Central: alteraciones sensitivas (alteración de la conciencia) <sup>13</sup>.

## **Manejo del paciente con sospecha de dengue en Ecuador**

### Paso 1. Evaluación general

#### Anamnesis.

- Fecha de inicio de la fiebre o enfermedad
- Cantidad de ingesta por vía oral
- Búsqueda de ingesta por vía oral
- Trastornos gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea, gastritis)
- Cambios del estado de conciencia: irritabilidad, somnolencia, letargo, lipotimia, mareo, convulsiones y vértigo
- Diuresis (frecuencia en las últimas 24 horas, volumen y hora de la última micción) <sup>29</sup>.

### Paso 2. Historia clínica, que incluye síntomas, antecedentes epidemiológicos, familiares y personales.

- Miembros de la familia con dengue o dengue en la comunidad, o antecedentes de viajes recientes a áreas endémicas de dengue.
- Otras características básicas, como: lactantes menores de 29 días hasta menores de 6 meses, adultos mayores de 65 años, embarazo, obesidad, asma, diabetes o hipertensión arterial, etc.
- Caminar en áreas boscosas o bañarse en ríos o presas contaminados
- La infección por chikungunya debe tratarse como un diagnóstico diferencial si se produce un dolor articular debilitante <sup>29</sup>.

### Paso 3. Examen físico completo, que incluya un examen neurológico

- Tomar y registrar signos vitales (temperatura, calidad del pulso, frecuencia cardíaca, presión arterial, presión de pulso, presión arterial media y frecuencia respiratoria).
- Evaluar el estado de conciencia
- Determinar el estado de hidratación

- Evaluar el estado hemodinámico (pulso y presión arterial, determinar la presión arterial media y la presión diferencia, relleno capilar)
- Determinar la presencia de derrames pleurales, taquipnea, respiración de Kussmaul caracterizada por ser profusa y forzada
- Comprobar la presencia de dolor abdominal, ascitis, hepatomegalia
- Investigar la presencia de exantema, petequias o signo de Hernan (mar rojo con islas blancas).
- Buscar manifestaciones hemorrágicas espontáneas o provocadas (prueba del torniquete, el mismo que es negativo en personas obesas y pacientes en choque) <sup>29</sup>.

#### Paso 4. Laboratorio

Debido al aumento en la incidencia y muerte de los casos de dengue, su diagnóstico es importante para los países endémicos y varía el rendimiento de las pruebas de laboratorio existentes. Cada país tiene sus propios desafíos de antecedentes epidemiológicos y organizacionales, que requieren una documentación adecuada <sup>36,37</sup>.

- Para las pruebas de dengue de laboratorio actuales y específicas ( RT-PCR, NS1, IgG/IgM), según disponibilidad, la investigación se realiza en el momento exacto de la enfermedad para la cual se debe recolectar cada muestra, y otras pruebas complementarias para excluir otras enfermedades virales o bacterias, estas pruebas no son para iniciar el manejo del paciente <sup>29</sup>.

#### Paso 5. Diagnóstico, evaluación y clasificación de la fase de la enfermedad

- Si se dispone de capacidad para determinar la carga viral (RT-PCR, NS1) se realiza en los primeros cuatro días después de la fiebre; la serología IgM / IgG se realizará al quinto día después de la infección, dependiendo del departamento de salud de cada lugar <sup>29</sup>.

#### Paso 6. Tratamiento.

Decisión del tratamiento según manifestaciones clínicas y otras circunstancias, los pacientes pueden recibir la siguiente atención:

- Recibir tratamiento ambulatorio
- Ser emitidos para observación y tratamiento oral o intravenoso a las unidades de dengue
- Ser enviados para tratamiento intravenoso a las unidades de dengue a hospitales de segundo nivel
- El paciente necesita tratamiento urgente en el lugar de diagnóstico o durante el traslado y derivación urgente a hospitales más complejos <sup>29</sup>.

### Pruebas específicas de diagnóstico



Figura 3. Métodos de diagnóstico

Fuente: OPS, guías para la atención de enfermos en la región de las américas

### Métodos de diagnóstico directos

Los métodos de diagnóstico directos incluyen el aislamiento del virus y la detección de ARN viral por RT-PCR es más eficiente durante los primeros 4-5 días después del inicio de síntomas <sup>39</sup>.

#### Aislamiento viral

El método diagnóstico más utilizado en la práctica para el aislamiento del agente es la inoculación de células de mosquitos *Aedes albopictus* C6/36 acompañado de la identificación viral mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, que utiliza anticuerpos monoclonales específicos a cada serotipo. La inoculación intratorácica de mosquitos y la inoculación de larvas de mosquitos son los métodos más sensibles para el aislamiento de este agente, aunque no son los más utilizados en la práctica diaria. El aislamiento viral se considera “prueba de oro”, debido a que, de ser positivo constituye una prueba específica e inequívoca de la presencia y viabilidad del virus <sup>39</sup>.



### **Detección genómica**

El ARN de DENV se puede extraer del suero o plasma, así como de sangre completa, sangre leucocitos, tejidos frescos o incluidos en parafina, mosquitos, etc. La detección del ARN amplificado es lograda por electro quimioluminiscencia o en tiempo real con etiqueta fluorescente sondas de baliza molecular <sup>40</sup>.

### **Detección de antígeno**

NS1 es una proteína de superficie celular asociada a la célula, la cantidad de NS1 en el suero (sNS1) se correlaciona directamente con la viremia, la misma que es un marcador de la replicación viral que se detecta en el suero y el plasma estando ya en la etapa aguda de la enfermedad. Recientemente se han producido varios estuches en formato de ELISA y tiras inmunocromatográficas, que facilita hacer un diagnóstico temprano y específico del dengue, ya que puede detectar la replicación viral antes del desarrollo de los anticuerpos IgM. Los resultados negativos de pacientes en la fase aguda pueden confirmarse por RT-PCR, también se ha informado que el antígeno NS1 puede ser detectado en el líquido cefalorraquídeo y en tejidos recolectados post-mortem. La concentración de sNS1 en plasma es más alto durante la fase aguda de la infección (desde el día 1 hasta el día 2-4 después del inicio de la fiebre) y luego disminuye y generalmente no se detecta después del día 14. La respuesta NS1 medido depende del serotipo infeccioso y varios informes sugieren, por ejemplo, que las infecciones por DENV-1 están asociadas con concentraciones más altas de NS1 y /o rendimiento de las pruebas de diagnóstico de las pruebas de diagnóstico de NS1 <sup>39</sup>.

### **Métodos de diagnósticos indirectos**

Los métodos serológicos son ampliamente usados en el diagnóstico habitual del dengue, pero son más útiles cuando la muestra se obtiene luego de tres o cuatro días de los síntomas o si a la vez se trata de muestras subsiguientes a aquellas con resultados negativos. Estos métodos sirven para confirmar la infección o sospechar que hubo una infección reciente, aunque varios estudios han sugerido la utilidad de detectar anticuerpos IgA e IgE del dengue, el marcador de infección más utilizado frecuentemente es el IgM, en el que normalmente se puede detectar la fase de convalecencia temprana de la enfermedad, aunque en algunos casos se puede detectar durante la fase aguda. La prueba de ELISA (MAC-ELISA) para detección de anticuerpos IgM es más sencilla y rápida, ya que solo requiere una muestra de suero y se utiliza ampliamente en el diagnóstico. Estas pruebas serológicas para detección de

anticuerpos contra el virus del dengue a través del ensayo ELISA (IgG, IgM) se considera sensibles y específicas para la infección primaria y secundaria por DENV <sup>41</sup>.

Si existen anticuerpos IgG en el suero es muestra de infección pasada, sin embargo, si muestra altos títulos de anticuerpos IgM en un suero o incrementa de cuatro a más veces el título, indica infección reciente o infección confirmada. Ese criterio podría ser de gran utilidad en los casos de infecciones secundarias que no muestren niveles detectables de anticuerpos IgM. Las infecciones agudas por DENV están indicados serológicamente por la presencia de IgM específica, seroconversión o un aumento de cuatro veces o más en el título de IgG <sup>39,42</sup>.

## **Capítulo II. METODOLOGÍA**

La investigación se llevó a cabo a través de la modalidad revisión bibliográfica para la Caracterización clínica y de laboratorio en el diagnóstico de dengue en el Ecuador. Se investigó en diferentes bases de datos como scielo, redalyc, pubmed, Mendeley, Dialnet, Elsevier, Medigraphic, NCBI, Science direct, Elsevier, BMC, INSPILIP en ellas localizaron artículos científicos, descripciones, estudios de casos, experiencias desarrolladas por expertos, también se ha procurado que la información sea actualizada de modo que al tratarse de información de artículos y revistas científicas no sobrepasen el tiempo de 5 años atrás desde el presente año y en el caso de libros éstos deben cumplir con estándar de 10 años atrás desde el presente año. La mínima información extraída para este trabajo de investigación fue recolectada en diferentes revistas digitales de alto impacto, las que registran muchos artículos e investigaciones comprobadas por profesionales e investigadores del mundo.

### **Tipo de investigación.**

#### **Descriptiva**

Debido a que describe la situación o evento con información de interés, la misma que se recolectó de literatura de carácter científico, explorando los criterios más actuales sobre el tema de investigación realizados por expertos y profesionales que investigan el dengue.

#### **Diseño documental**

Debido a que el proyecto se realiza través de la consulta de documentos bibliográficos en donde no existe la manipulación de variables, por ende, no afectará ni alterará las condiciones existentes ya establecidas.

#### **Cohorte transversal**

El presente proyecto está planeado en un solo momento es decir que su desarrollo se realiza en un periodo de tiempo ya determinado y un solo bloque de resultados que corresponde al periodo académico mayo – octubre 2020.

#### **Retrospectivo**

Debido a que el presente proyecto se trabajó con diversas fuentes bibliográficas o archivos ya existentes, que sirven para recabar información en la investigación del tema.

## **Determinación de población y muestra**

### **Población**

La población de estudio que se utilizaron fueron las fuentes primarias y secundarias de información. Con una totalidad de 64 publicaciones en los que se aborda el tema de caracterización clínica y de laboratorio del dengue publicados en revistas indexadas en bases regionales y de impacto mundial entre las que se ubican Scielo, Redalyc, Pubmed, Mendeley, Dialnet, Elsevier, Medigraphic, NCBI, Science direct, BMC, INPILIP divulgados durante el periodo comprendido entre el año 2015 y 2020, además se incluyen páginas web que varían en contenidos y libros en formato pdf, en lo fundamental de la OMS, OPS y MSP, dando un total 22 de sitios web consultados.

### **Muestra**

Para la selección de la muestra se siguió un muestreo basado en diferentes fuentes de información mediante el cual se escogieron 64 publicaciones, donde se incluyen páginas webs (1 de OMS, 2-OPS, 5-MSP, 1-Hindawi, 1-KJCL), libros y folletos en pdf (11), los 42 restantes se encontraron a través de buscadores de revistas científicas los que se ubican de la siguiente manera scielo 6, redalyc 4, pubmed 6, Mendeley 8, Dialnet 2, medigraphic 2, NCBI 9, Science Direct 3, BMC 1, INSPILIP 1, selección que se realizó tomando en consideración los criterios de inclusión siguientes.

### **Criterios de inclusión y exclusión**

#### Criterios de inclusión

- Información de estudios con fecha de publicación desde el año 2015 al 2020
- Información de libros con fecha de publicación desde el año 2010
- Artículos científicos referente al tema publicados en el Ecuador
- Artículos científicos que incluyen pacientes con dengue
- Artículos científicos con referente al dengue que incluyen estudios de laboratorio
- Artículos científicos con estudios clínicos del dengue

### **Criterios de exclusión**

- Artículos con información de estudios con más de cinco años de publicación
- Artículos duplicados, no completados o mal documentados
- Artículos sin autoría
- Artículos con datos que no contienen información referente al tema de estudio

### **Método de estudio**

El método que se empleó en este proyecto es teórico, ya que se pretende realizar un análisis y síntesis de documentos científicos que tengan relación con el tema, como también el método deductivo porque va de lo general a lo específico, se estudia el asunto de forma global para saber si la caracterización clínica y de laboratorio coincide con los datos obtenidos en nuestro país.

### **Técnicas y procedimientos**

1. Se empezó el proyecto de investigación luego de la aprobación del tema
2. La investigación se realizó a través de la recolección y selección de artículos científicos sobre la caracterización clínica y de laboratorio en el diagnóstico del dengue en el Ecuador a través de buscadores como como Google Académico, PubMed, scielo, redalyc, Mendeley, Dialnet, elsevier, medigraphic, NCBI, BNC, INSPILIP
3. Se realizó la selección de diversas fuentes de información de carácter científico aplicando diferentes criterios de inclusión como el año de publicación, la entidad o revista que publica el documento, entre otros.
4. Otra técnica utilizada fue la observación directa que se enfocó en observar estudios clínicos que fueron realizados y comprobados con otros autores.

### **Procesamiento estadístico**

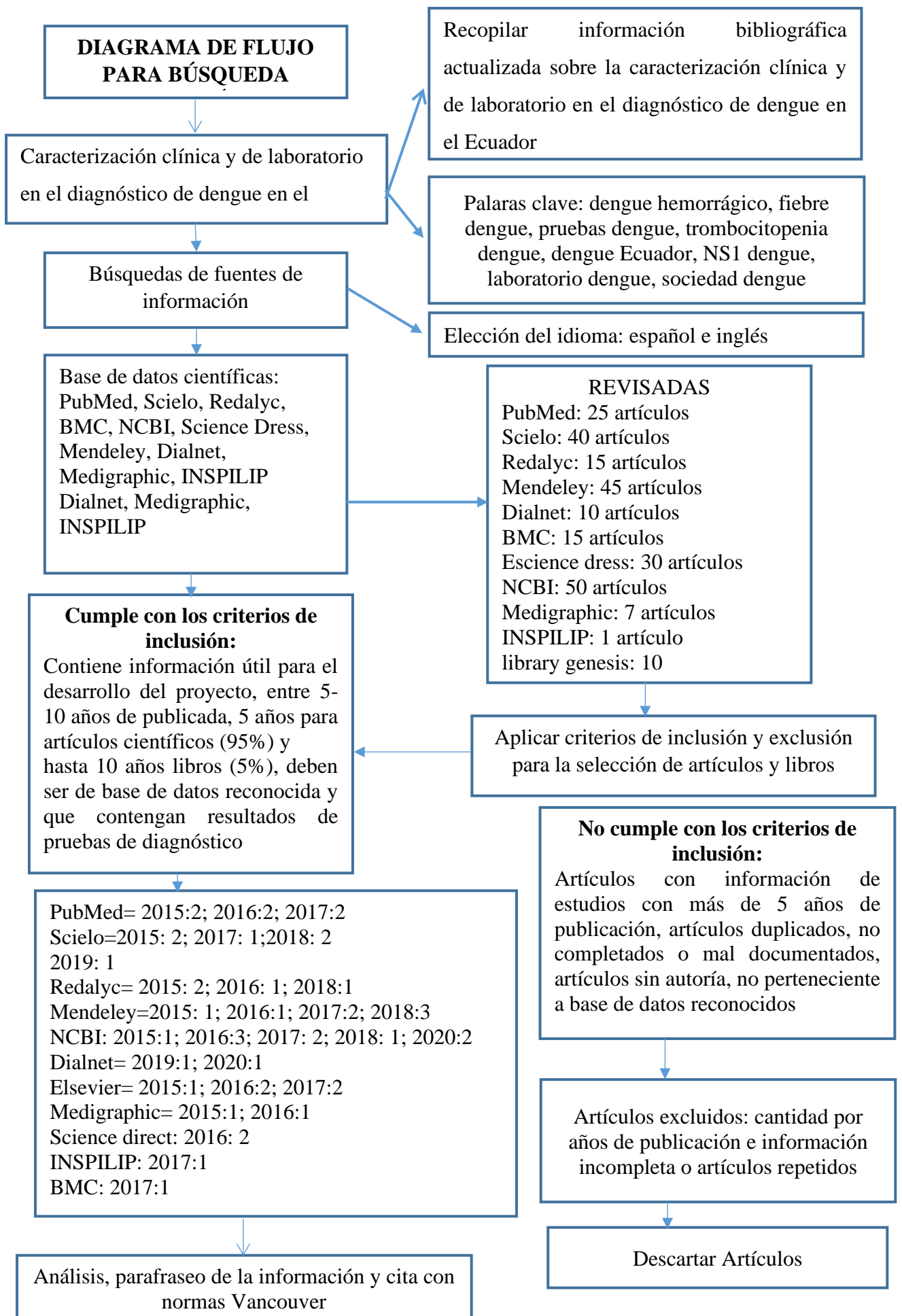
El presente proyecto pretende recolectar datos cualitativos por lo cual para recopilar la información se realizará un análisis de los contenidos seleccionados para así solo incorporar la información que sea de utilidad para el proyecto.

## **Consideraciones éticas**

El presente proyecto cumple con los estándares éticos para su elaboración, al ser de carácter de revisión bibliográfica no afectará ni pondrá en peligro la integridad del ser humano además no afecta hacia la flora y fauna del entorno o el medio ambiente, por lo cual no habrá repercusiones bioéticas.

## **Criterios de selección y extracción de datos**

La búsqueda de información se realizó a través de buscadores de revistas científicas las mismas que se encontraron en idiomas español e inglés, también se aplicó criterios de inclusión y exclusión, dentro de los criterios de inclusión se encuentra que para artículos científicos deben cumplir una norma en vigencia de 5 años y hasta 10 años en caso de ser libros, artículos científicos que incluyen pacientes con dengue, artículos científicos referente al tema publicados en el Ecuador y los criterios de exclusión como: artículos con información de estudios con más de cinco años de publicación, artículos duplicados, no completados o mal documentados, artículos sin autoría y artículos con datos que no contienen información referente al tema de estudio. Las palabras estratégicas de búsqueda fueron: “dengue”, “clínica del dengue”, “dengue ecuador”, “clínica del dengue”, “fases del dengue”, “fiebre del dengue”, “AST dengue”, “ALT dengue”, “trombocitopenia dengue”, “dengue sin signos de alarma”, “dengue en pediátricos” “NS1 dengue”, “Pruebas dengue”. Los artículos encontrados a través de la exploración fueron evaluados mediante los lineamientos emitidos por la carrera de manera que se obtuvieron datos de buscadores de revistas científicas PubMed ( 2015:2; 2016:2; 2017:2), Scielo (2015: 2; 2017: 1;2018: 2; 2019: 1), Redalyc (2015: 2; 2016: 1; 2018:1), Mendeley (2015: 1; 2016:1; 2017:2; 2018:3) NCBI (2015:1; 2016:3; 2017: 2; 2018: 1; 2020:2), Dialnet (2019:1; 2020:1), Elsevier (2015:1; 2016:2; 2017:2), Medigraphic (2015:1; 2016:1), Science direct (2016: 2), INSPILIP (2017:1) y BNC: (2017:1), cumpliendo los criterios de búsqueda, obteniendo múltiples artículos y estudios realizados sobre la temática de estudio. En el siguiente diagrama se detalla la búsqueda realizada para el presente trabajo.



## **Capítulo III. DESARROLLO**

### **Resultados y discusión**

El presente proyecto se ha desarrollado con base a consulta bibliográfica en diferentes bases de datos para la obtención de documentos de carácter científico tales como: scielo, redalyc, pubmed, Mendeley, Dialnet, medigraphic, NCBI, science drees, INSPILIP, BMC.

### **Interpretación y análisis**

En la tabla 1 se presenta una comparación de los signos y síntomas de la clasificación del dengue según la OMS y presente en la Guía de atención para enfermos de dengue en la región de las Américas, los mismos que son aplicados en las unidades de salud de nuestro país. El dengue al ser un virus puede afectar a toda población sin distinción de género o edad, siendo su huésped el humano, la infección por cualquiera de los serotipos virales puede causar una sintomatología variada, de forma que, el paciente puede pasar de una situación estable a una grave con compromiso de órganos llegando a ser mortal, por ende, la importancia de la aplicación de la clasificación del dengue para el control y tratamiento del paciente.

En el dengue sin signos de alarma se caracteriza por la presencia de fiebre, náuseas y vómitos, cefalea, artralgia, mialgias, dolor de ojos, presencia de rash, petequias, siendo situaciones controlables y tratables, mientras que el dengue con signos de alarma se presenta en una situación en donde el paciente presenta síntomas mucho más complicadas como el sangrado nasal (epistaxis), dolor abdominal, estado de somnolencia (letargia), gingivorragia.

El estado del dengue grave se caracteriza por la extravación del plasma por permeabilidad vascular y una homeostasis anormal, lo que resulta en la pérdida de plasma en diversas cavidades serosas del cuerpo, incluyendo la pleura, pericardio y cavidades peritoneales; así también, se tiene como signo grave la hemorragia vaginal, la rectorragia el cual es el sangrado por el ano, también manifestaciones neurológicas.



Tabla 1. Caracterización clínica del dengue en adultos

<b>Signos y síntomas presentes en la enfermedad según la clasificación del dengue</b>
<p>Dengue sin signos de alarma: fiebre 100%, náuseas y vómitos 57,30%, diarrea 20,70%, cefalea 73,20%, artralgia 76,80%, mialgias 70,70%, dolor de ojos 53,20%, rash 9,80%, Petequias 7,30%</p> <p>Dengue con signos de alarma: epistaxis 8,50%, dolor abdominal 78%, letargia 2,40%, gingivorragia 4,90%, escalofríos 19,50%</p> <p>Dengue grave: hemorragia vaginal 4,90%, hematemesis 4,40%, melena 1,20%, choque 1,20%: extremidades frías, sudor frío, húmedo.</p> <p>Cotto J, <i>et al</i><sup>43</sup></p>
<p>Dengue sin signos de alarma: Fiebre 100%, cefalea 100%, mialgia 99%, artralgia 99%, tos 87%, vómitos 86%, exantema cutáneo 83%, dolor retro orbitario 76%, diarrea 55%</p> <p>Dengue con signos de alarma: epistaxis 48%, equimosis 26%, gingivorragia 21%, vómitos continuos 86%, hepatomegalia 23%, dolor abdominal 80%,</p> <p>Dengue grave: derrame ceroso 63%</p> <p>Céspedes M, <i>et al</i><sup>44</sup></p>
<p>Dengue sin signos de alarma: fiebre 100%, mialgias 78% y cefalea 64%</p> <p>Dengue con signos de alarma: gingivorragia y epistaxis 34,0%</p> <p>Dengue grave: manifestaciones neurológicas 1,4%</p> <p>Matta L, <i>et al</i><sup>45</sup></p>
<p>Dengue con signos de alarma: gingivorragia 12,5% %, epistaxis 9,6%, vómitos profusos 19,3%, diarreas frecuentes 8,2%, dolor abdominal 26,1%</p> <p>Dengue grave: Hipotensión 32,4%, postración excesiva 17,9%, derrames serosos 11,6%, hipotermia 10,1%, sangrado vaginal 15,4% %, rectorragia 7,2%</p> <p>Carrión G, <i>et al</i><sup>46</sup></p>

<p>Dengue sin signos de alarma: dolor de cabeza 15%, conciencia alterada 20%, artralgia/mialgia 30%, fiebre 40%, náuseas 45%, vómitos 30%</p> <p>Dengue con signos de alarma: mareos posturales 55%, hepatomegalia 5%, oliguria 40%, deshidratación 20%, conmoción 35%, diarrea 10%, dolor abdominal 30%, sensibilidad abdominal 55%</p> <p>Dengue grave: sangrado 45%, derrame pleural 45%, ascitis 30%</p> <p>Medagama A, <i>et al</i> <sup>47</sup></p>
<p>Dengue sin signos de alarma: fiebre 100% y cefalea 100, malestar general 98,4%, artralgias 93,2%, mialgias 83,2%, dolor retro orbital 80,6%, rash cutáneo 29,9%, petequias 4,7%</p> <p>Dengue con signos de alarma: diarreas y vómitos constantes 1%</p> <p>Dengue grave: sangramientos 1%</p> <p>Mateo B <i>et al</i> <sup>47</sup></p>

Fuente: Revisión Bibliográfica

Realizado por: Melisa Grefa

## Discusión

Según la Guía para la atención de enfermos en la región de las Américas utilizada en las unidades de salud de Ecuador, el dengue se clasifica de la siguiente manera: dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave, de acuerdo a esta clasificación en las revistas científicas se encontró un estudio realizado en Ecuador por Cotto J *et al* <sup>43</sup>, sobre la caracterización clínica del dengue, en hospitales de Guayaquil, donde se reporta que las características clínicas más frecuentes en el dengue sin signos de alarma fue la fiebre, artralgias, cefaleas, mialgias, náuseas y vómitos, dolor retro orbital, coincidiendo con resultados obtenidos en otros trabajos llevado a cabo en países como Bolivia por Céspedes M *et al* <sup>44</sup>, Colombia por Carrión G *et al* <sup>46</sup>, Sri Lanka, India por Medagma A *et al* <sup>47</sup> y Venezuela por Mateo B *et al* <sup>48</sup>.

En el dengue con signos de alarma en pacientes hospitalizados puede haber expansiones por dolor abdominal como también el signo temprano de shock que permiten identificar si un paciente se encuentra próximo a evolucionar a un estado grave <sup>29</sup>. Los estudios realizados Matta L *et al* <sup>45</sup> no reporta pacientes con dengue sin signos de alarma debido a que su estudio se centra en pacientes con signos de alarma y grave, coincidiendo dichos resultados clínicos

con lo reportado en investigaciones realizadas por Cotto J *et al*<sup>43</sup>, Céspedes M *et al*<sup>44</sup> *et al.*, Carrión G *et al*<sup>46</sup> y Medagma A *et al*<sup>47</sup>, en donde los signos y síntomas clínicos, con mayor frecuencia fueron: epistaxis, dolor abdominal, letargia, hepatomegalia, gingivorragia, mientras que los menos frecuentes: oliguria, deshidratación, conmoción, diarrea y la equimosis, cada uno de estos síntomas con diferente porcentaje de incidencia debido a que la cantidad de población estudiada es variada como es el caso de Mateo B *et al*<sup>48</sup> en donde la población estudiada es escasa y los casos de diarreas y vómitos constantes representa el 1%.

En el caso del dengue grave los síntomas frecuentes descritos por los autores Cotto J *et al*<sup>43</sup>, Carrión G *et al*<sup>46</sup>, Medagma A *et al*<sup>47</sup> y Mateo B *et al*<sup>48</sup> corresponde al sangrado relacionado con hemorragia vaginal, rectorragia, como también al derrame seroso ascítico o pleural, y siendo menos frecuentes los síntomas clínicos como hematemesis, melena, hipotensión, postración excesiva, hipotermia.

Por otro lado, como único reporte de manifestaciones neurológicas se encuentra el realizado por Matta L *et al*<sup>45</sup> donde informa casos de pacientes con dengue grave que presentaron manifestaciones neurológicas, a diferencia del estudio en Ecuador realizado por Cotto J *et al*<sup>43</sup> donde no se han reportado casos de manifestaciones neurológicas en pacientes con dengue grave.

Por consiguiente, el virus del dengue puede causar lesiones en varios órganos desde las fases tempranas de la infección por apoptosis y otros mecanismos originando cuadros clínicos que conllevan al dengue grave, con signos y síntomas clínicos como la encefalitis, bradicardia, hepatitis, miocarditis y nefritis<sup>29</sup>. Así en los estudios llevados a cabo por Medagama *et al*<sup>47</sup> y Godoy *et.al*<sup>49</sup> reportan que el mayor número de casos de bradicardia se presentan en pacientes con dengue grave y que esta situación acompañada de inestabilidad cardiorrespiratoria aumenta el riesgo de muerte por dengue.

## Interpretación y análisis

En la tabla 2 se presenta un análisis comparativo de los signos y síntomas de la clasificación del dengue en la población pediátrica. El dengue tiene un alto espectro de presentaciones clínicas, en el caso de la población pediátrica se presenta un mayor número de complicaciones clínicas que en la adulta.

El dengue sin signos de alarma representa sintomatología controlable, debido a que la enfermedad tiene alto espectro de presentaciones clínicas, es el caso en la población pediátrica en donde presenta mayor número de complicaciones clínicas que en la población adulta como se presenta en la tabla con síntomas como la cefalea, artralgia, mialgias, dolor de ojos, presencia de rash, petequias, mucosas secas, erupción, prurito generalizado, tos, dolor de garganta.

En el dengue con signos de alarma de igual forma los pacientes presentan mayor número de características clínicas como la epistaxis, dolor abdominal, letargia, escalofríos, diarrea, hemorragia gingival, agitación, ictericia denotando el daño hepático. Mientras que el estado del dengue grave se caracteriza por la extravasación del plasma debido a una permeabilidad vascular y una homeostasis anormal.

Tabla 2. Caracterización clínica del dengue en pacientes pediátricos

<b>Signos y síntomas presentes en la enfermedad según la clasificación del dengue</b>
Dengue sin signos de alarma: fiebre 100%, náuseas o vómitos 70,90%, cefalea 53,20%, artralgia 62%, mialgias 58,20%, dolor de ojos 12,70%, rash 24,10%, petequias 12,70%, mucosas secas 49,40%, erupción 26,60%, prurito generalizado 26,60%, tos 16,50%, dolor de garganta 15,20%
Dengue con signos de alarma: epistaxis 16,50%, dolor abdominal 68,40%, letargia 2,40%, escalofríos 19,50%, diarrea 24,10%, hemorragia gingival 10,10%, agitación 7,60%, ictericia 1,30%
Dengue grave: hemorragia vaginal 4,90%, Líquido libre en cavidad abdominal 10,10% hematemesis 4,40%, melena 1,20%, hepatomegalia 19%, choque 1,30%: extremidades frías, sudor frío, húmedo
Cotto J, <i>et al</i> <sup>43</sup>

<p>Dengue sin signos de alarma: fiebre 100%, cefalea 89%</p> <p>Dengue con signos de alarma: dolor abdominal intenso y mantenido 38%, vómitos repetidos con periodo corto de 3 o más de 4 horas en 34,3%, diarreas 11,4%, palidez excesiva y lipomas en 6,8%</p> <p>Dengue grave: cavidades cubiertas por serosas fue hallado en 42,2%, ascitis 50% y hepatomegalia 12%</p> <p>Izquierdo A <i>et al</i><sup>50</sup></p>
<p>Dengue sin signos de alarma: fiebre 100%, cefalea 50%, exantema 56,5%, dolor retro orbital 31,5%</p> <p>Dengue con signos de alarma: PLP 29,9%, diarreas 15,2%, dolor abdominal 45%</p> <p>Dengue grave: artromialgia 28,8%</p> <p>Montero D, <i>et al</i><sup>51</sup></p>
<p>Dengue sin signos de alarma: fiebre 99%, náuseas 21%, vómitos 78,9%, dolor de ojos 29,8% %, exantema 7%, faringe congestiva 1,7%, petequias 5,2%,</p> <p>Dengue con signos de alarma: alteración de la conciencia 1,7%, dolor abdominal intenso 66,6%, vómitos persistentes 50,8%,</p> <p>Dengue grave: hepatomegalia 1,7%</p> <p>Luego S <i>et al</i><sup>52</sup></p>

Fuente: Revisión Bibliográfica

Realizado por: Melisa Grefa

## Discusión

Cotto J, *et al*<sup>43</sup> informan en su estudio sobre caracterización clínica del dengue, en hospitales de Guayaquil, que la sintomatología más frecuente en la población pediátrica con DSSA fue la fiebre, náuseas o vómito, dolor abdominal, cefaleas, letargia, rash, dolor retro orbital lo que coincide con lo reportado por Izquierdo A, *et al*<sup>50</sup>, Montero D, *et al*<sup>51</sup>, Luego S *et al*<sup>52</sup>. Mientras que los síntomas clínicos menos comunes fueron artralgias, mialgias, mucosas secas, tos, dolor de garganta, faringe congestiva; de igual manera, las manifestaciones dérmicas como petequias, rash, exantema, erupción y prurito generalizado.

En el caso del dengue con signos de alarma, en los estudios realizados por Cotto J, *et al*<sup>43</sup> A, Luego S *et al*<sup>52</sup> y Montero D *et al*<sup>51</sup> los síntomas más frecuentes manifestados en los pacientes fue el dolor abdominal con porcentajes similares. Sin embargo, Izquierdo A, *et al*<sup>50</sup> reportan un menor porcentaje en relación a este síntoma en sus pacientes seguido de diarrea al igual a lo informado en los estudios de Cotto J, *et al*<sup>43</sup> y Montero D *et al*<sup>51</sup>. En relación a las sintomatologías clínicas menos frecuentes reportada en los cuatro estudios coinciden con manifestaciones clínicas como letargia, escalofríos, hemorragia gingival, agitación, ictericia, palidez excesiva, lipoma, y la alteración de la conciencia los cuales representan baja incidencia en los pacientes.

En el caso del dengue grave los estudios de Cotto J, *et al*<sup>43</sup> y Izquierdo A, *et al*<sup>50</sup> señalan que los pacientes presentaron extravasación del plasma en abdomen y ascitis con porcentaje de incidencias similares. La hepatomegalia también es otra manifestación clínica que se ha reportado en esta fase del dengue<sup>43,52</sup>

### **Interpretación y análisis**

En la tabla 3 se realiza la comparación sobre la elevación de enzimas hepáticas, teniendo en cuenta que en los casos de infección por el virus del dengue el paciente puede presentar manifestaciones clínicas variadas, uno de ellas es la alteración de la función hepática lo cual se manifiesta con la elevación de las enzimas hepáticas o transaminasas como la AST Y  $ALT \geq 1000$  unidades/litro (U/L).

Se describe el aumento de las concentraciones séricas de las transaminasas según dos autores basándose en los criterios de clasificación de dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave donde se observó que el mayor porcentaje de elevación de las enzimas se encuentra en los casos de dengue grave y de menor porcentaje en los casos de DSSA y DCSSA.

Tabla 3. Transaminasas elevadas en pacientes con dengue según su clasificación del dengue.

	<b>N° de pacientes</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Transaminasas elevadas en DSSA	115	71,9
Transaminasas elevadas en DCSA	135	89,95
Transaminasas elevadas en dengue grave	149	100
Rodríguez C <i>et al</i> <sup>53</sup>		
Transaminasas elevadas en DCSA	5	13.2
Transaminasas elevadas en DSSA	3	7,9
Transaminasa en dengue grave	4	10.5
Donayre J <sup>54</sup>		

Fuente: Revisión Bibliográfica

Realizado por: Melisa Grefa

## Discusión

La alteración de la función hepática en la infección por el virus de Dengue se manifiesta con la elevación sérica de las transaminasas lo que ocurren en la etapa temprana de la infección y pueden servir como marcadores del dengue grave, por lo tanto, es un parámetro de estudio químico sanguíneo fundamental para la evaluación clínica y clasificación de gravedad de la enfermedad en el paciente <sup>25,30</sup>.

Rodríguez C *et al* <sup>53</sup> informan que en su estudio 115 (71,9%) pacientes con dengue sin signos de alarma presentaron las enzimas hepáticas elevadas, a diferencia de lo reportado en un trabajo realizado por Donayre J <sup>54</sup> donde se observó elevación de las enzimas hepáticas en

pacientes con dengue con signos de alarma, denotando que puede haber complicaciones hepáticas en cualquiera de los estadios de la enfermedad.

En el caso de dengue con signos de alarma, Rodríguez C *et al*<sup>53</sup> reportan en 135 pacientes elevación sérica de las enzimas hepáticas con incidencia del 89,95 %, valor alto que hace referencia a la gravedad de números de pacientes que presentan la enfermedad al contrario al porcentaje de incidencia informado por Donayre J<sup>54</sup> en pacientes con dengue con signos de alarma donde se observó un aumento sérico de transaminasas en 7,9% de los casos.

Los valores de transaminasas en pacientes con dengue grave son más altos representando así que la elevación y gravedad hepática se da con mayor incidencia en pacientes en este estadio de la enfermedad<sup>53,54</sup>.

### **Interpretación y análisis**

En la tabla 4 se presenta el análisis comparativo de la sensibilidad y especificidad de algunos métodos convencionales para la detección del dengue en los laboratorios utilizados en Ecuador según la guía de atención para enfermos de dengue en la región de las Américas. Debido a que el diagnóstico de la enfermedad no solo depende de la valoración clínica sino también del diagnóstico de laboratorio, razón fundamental para tomar en cuenta la sensibilidad y la especificidad de las pruebas empleadas para la detección.

Cabe mencionar que la sensibilidad de una prueba permite detectar la enfermedad en personas enfermas, mientras que la especificidad es la capacidad que poseen las pruebas para detectar el virus en personas que no padecen sintomatología, como también que las pruebas detectan anticuerpo producidas en el paciente llamadas también inmunoglobulinas como la IgM que hace referencia a infecciones adquiridas recientemente y activos, mientras que los resultados obtenidos con anticuerpos IgG, hace referencia a infección no reciente en el paciente y ya no se encuentra en el pico de infección.

De modo que según la tabla la prueba de RT-PCR es la que más alto nivel de sensibilidad y especificidad presenta. Sin embargo, la detección serológica por ELISA NS1, IgM/IgG y las pruebas inmunocromatográficas también ofrecen altos porcentajes de sensibilidad y especificidad que son de gran utilidad para diferente equipamiento y nivel de laboratorio.



Tabla 4. Sensibilidad y especificidad de las pruebas de laboratorio para el diagnóstico del dengue

<b>Pruebas</b>	<b>Sensibilidad</b> %	<b>Especificidad</b> %
inmunocromatográfica NS1 <i>Mata V et al</i> <sup>55</sup>	82	100
inmunocromatográfica IgG/IgM <i>Valdez J et al</i> <sup>56</sup>	96	98,36
ELISA NS1 <i>Ambrose J et al</i> <sup>57</sup>	64,3	100
Elisa IgG <i>Muhammad Z et al</i> <sup>58</sup>	59,7	40,2
Elisa IgM <i>Muhammad Z et al</i> <sup>58</sup>	79,8	20,1
RT-PCR <i>Akmalina T et al</i> <sup>59</sup>	90,3	100

Fuente: Revisión Bibliográfica

Realizado por: Melisa Grefa

## Discusión

Las pruebas rápidas para la proteína no estructural 1 del dengue (NS1) han sido de utilidad para el diagnóstico de dengue en fase aguda obteniéndose un buen rendimiento en los diagnósticos. *Mata V et al*<sup>55</sup> en su estudio reportan utilizando este método una sensibilidad del 82% y especificidad del 100% para el diagnóstico de DENV-1 en sus pacientes.

Los estudios obtenidos por *Ambrose J et al*<sup>57</sup> y *Mata V et al*<sup>55</sup> destacan la confiabilidad y factibilidad utilizando cualquiera de los dos métodos ELISA o inmunocromatográfica para la detección de la proteína NS1 debido a que ambos presentan altos porcentajes de sensibilidad y especificidad en la detección de Dengue.

*Valdez J et al*<sup>56</sup> reportan altos porcentajes de sensibilidad de 96% y especificidad del 98,36% para la prueba de inmunocromatográfica IgG/IgM. Sin embargo, *Muhammad Z et al*<sup>58</sup> en su estudio encontró niveles inferiores de sensibilidad de 50,2% y especificidad de 49,7% para la detección de anticuerpos IgG.

Ambrose J *et al*<sup>57</sup> en su estudio, señalan que los resultados obtenidos empleando la prueba ELISA NS1 mostró una sensibilidad de 64,3% y especificidad de 100%. Sin embargo, Noriega *et al*<sup>60</sup> recomiendan la utilización de calor disociado para aumentar la sensibilidad de la prueba para ELISA NS1, probándolo obtuvo los siguientes resultados de sensibilidad: no disociado del 47,8% y con calor disociado del 57,7%, obteniendo una diferencia de sensibilidad significativa, a pesar de que se necesita invertir más tiempo, puede ser una alternativa para el mejor diagnóstico del dengue.

Manoor A *et al*<sup>61</sup> realizó un estudio comparativo del método de inmunocromatográfica NS1 y RT-PCR para el diagnóstico precoz del dengue serotipo DENV-4, describiendo los siguientes resultados para RT-PCR la sensibilidad fue del 96,8% y especificidad del 53,3%. Mientras, que para la tira inmunocromatográfica los resultados de sensibilidad fueron del 57,8% y especificidad baja del 44,5%, resultado que coincide con los bajos porcentajes de sensibilidad reportados por Pal S *et al*<sup>62</sup> en donde aplicó pruebas rápidas para la detección del virus de diferentes serotipos, obtuvo como resultado que la sensibilidad fue mayor para DENV-, con sensibilidad de 91,4% y 95,2% y la sensibilidad para en DEN-2 Y DENV-3 tuvo variación del 69,2% y 87,5%, por otro lado, para la detección del DENV-4 hubo pérdida de sensibilidad con promedio de 44,2% a 51,8% de debido al serotipo.

Akmalina T *et al*<sup>57</sup> Utilizó en su trabajo para la detección de dengue la prueba RT-PCR obteniendo altos niveles de sensibilidad (90,3%) y especificidad (100%). Por otro lado, en un trabajo llevado a cabo por Silvestri C *et al*<sup>63</sup> en donde, se empleó para la detección de dengue la prueba RT-PCR multiplex informan niveles óptimos de sensibilidad (100%) y especificidad (100%) superiores a los obtenidos por la PCR convencional.

Las pruebas moleculares ofrecen mayor sensibilidad y especificidad que cualquier otra técnica, pero en Ecuador debido a que no todas las unidades de salud cuentan con el espacio y la capacidad para realizar este tipo de pruebas no resulta factible su aplicación. A pesar de que la RT-PCR no se encuentra disponible para todas las unidades de salud, es de fundamental utilidad ya que ayuda al diagnóstico del dengue con reconocimiento del serotipo, pudiendo identificarse desde el DENV-1 al DENV-4.

En el estudio realizado por Muhammad Z *et al*<sup>58</sup> el cual compara la sensibilidad y la especificidad de la prueba rápida y cap-ELISA, obtuvo como resultado para la prueba rápida IgG la sensibilidad del 59,7% y especificidad del 40,2%, mientras que la prueba cap-ELISA IgM se obtuvo sensibilidad del 79,8% y especificidad del 20,1% respectivamente obteniendo resultados inferiores a al estudio con la inmunocromatográfica IgG/IgM realizado por Valdez J *et al*<sup>56</sup>.

Entre los métodos utilizados para la detección del dengue los moleculares son los más sensibles y específicos pero como se trata de un método de biología molecular, esta técnica no se encuentra disponible para todos las unidades de salud, siendo el más factible las pruebas inmunocromatográficas debido a su alto porcentaje de sensibilidad y especificidad, además el tiempo en el cual los resultados son emitidos, pudiendo ayudar al diagnóstico del dengue en zonas endémicas en donde las condiciones socioeconómicas y geográficas no permiten la utilización de los métodos como ELISA y RT-PCR.

## CONCLUSIONES

- A pesar de que Ecuador es endémico en relación a la enfermedad del dengue, existen escasos estudios y publicaciones en revistas científicas sobre la situación de la enfermedad, en las mismas se describe la caracterización clínica de sintomatología variada, presentándose compromiso de órganos, hemorragias o hasta la mortalidad del paciente, concordando con lo reportado por varios autores de diferentes países.
- Las principales pruebas aplicadas para el diagnóstico del dengue en Ecuador según la Guía de atención para enfermos de dengue en la región de las Américas es la detección con Elisa con captura de NS1 y detección de anticuerpos a través de prueba serológica cualitativa, ELISA con captura de IgM e IgG, RT-PCR, los mismos que dependen del tiempo de recolección de muestra del paciente, corroborando el diagnóstico de forma temprana en prevención de la mortalidad del paciente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Dengue y dengue grave. [Internet]. who.int; 2019[actualizado 24 junio 2020; citado 28 de junio 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue#>
2. MSP. Subsistema de vigilancia Sistema Integrado de Vigilancia Exterior (SIVE)-ALERTA enfermedades transmitidas por vectores ecuador. [Internet]. Ecuador: msp; 2015 [revisado 20 de agosto de 2019; citado 28 de junio 2020]. Disponible en: [https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/09/GACETA\\_SE33\\_ETV-COMBINADO\\_2019.pdf](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/09/GACETA_SE33_ETV-COMBINADO_2019.pdf)
3. Álvarez M, Álvarez A, Semper A, et al. Dengue, chikungunya, Virus de Zika. Determinantes sociales. Rev. Med. [Internet]. 2018 [consultado 28 Jun 2020]; 40(1): 1-11. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1684-18242018000100013&lng=es/](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242018000100013&lng=es/)
4. James N, Parker M. El oficial libro de fuentes del paciente sobre el dengue. San Diego USA: James N, Parker M.D, 2012 [consultado 7 de agosto 2020]. Disponible en: [file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/The%20Official%20Patients%20Sourcebook%20on%20Dengue%20A%20Revised%20and%20Updated%20Directory%20for%20the%20Internet%20Age%20by%20Icon%20Health%20Publications%20\(z-lib.org\).pdf](file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/The%20Official%20Patients%20Sourcebook%20on%20Dengue%20A%20Revised%20and%20Updated%20Directory%20for%20the%20Internet%20Age%20by%20Icon%20Health%20Publications%20(z-lib.org).pdf)
5. Arbo A. Dengue: la amenaza constante. Pediatría. [Internet]. 2018 [consultado 10 de agosto 2020]; 45(2): 113–114. Disponible en: <https://www.mendeley.com/catalogue/cef747c0-5222-3e10-ae6b-3fe6114c8f97/>
6. OPS. Actualización Epidemiológica dengue. [Internet]. Américas: ops; 2020 [revisado 7 febrero 2020; citado 28 de junio 2020]. Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=dengue-2158&alias=51692-7-de-febrero-de-2020-dengue-actualizacion-epidemiologica-1&Itemid=270&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2158&alias=51692-7-de-febrero-de-2020-dengue-actualizacion-epidemiologica-1&Itemid=270&lang=es)
7. MSP. Enfermedades transmitidas por vectores dengue. Ecuador. [Internet]. Ecuador: msp; 2020 [revisado 13 enero 2020; citado 28 de junio 2020]. Disponible en: [https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/04/DENGUE-SE\\_14\\_2020\\_GACETA.pdf](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/04/DENGUE-SE_14_2020_GACETA.pdf)

8. MSP. Sistema integrado de vigilancia epidemiológica. [Internet] Ecuador: Printed in Ecuador; 2016 [consultado 4 julio 2020]. Disponible en: <https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dn n/archivos/MANUAL%20DE%20PROCEDIMIENTOS%2016%20de%20Octubre%20de%202014.pdf>
9. Burgos BY, Loaiza DG, Solórzano MS, Vásconez LG. Fisiopatología del dengue. Rev. CIC. [Internet]. 2019. [consultado 28 de junio 2020]; 3(3): 622-642. Disponible en: Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7402240>
10. MSP. Boletín epidemiológico No. 39 de la situación de Dengue. [Internet]. Ecuador: msp; 2013 [actualizado 20 de agosto de 2019; citado 28 de junio 2020]. Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/boletin-epidemiologico-no-39-de-la-situacion-de-dengue-en-el-ecuador-2013/>
11. MSP. Instructivo para la transferencia del talento humano, activos fijos y metodología técnica del SNEM a las entidades operativas desconcentradas del ministerio de salud pública. [Internet]. Ecuador: msp; 2017 [citado 28 de junio 2020]. Disponible en: [https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/sigobito/tareas\\_seguimiento/1756/instructivo\\_26\\_de\\_enero\\_2015.pdf](https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/sigobito/tareas_seguimiento/1756/instructivo_26_de_enero_2015.pdf)
12. Maxwell J. Control genético de malaria y dengue [Internet]. USA: Fralin Life Science Institute and Department of Entomology; 2016 [consultado 12 de agosto 2020]. Disponible en: [file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/Genetic%20Control%20of%20Malaria%20and%20Dengue%20by%20Adelman,%20Zach%20N%20\(z-lib.org\).pdf](file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/Genetic%20Control%20of%20Malaria%20and%20Dengue%20by%20Adelman,%20Zach%20N%20(z-lib.org).pdf)
13. Alvarado V, Ramírez E, Paredes S, Legorreta J, et al. Caracterización clínica del dengue y variables predictoras de gravedad en pacientes pediátricos en un hospital de segundo nivel en Chilpacingo, Guerrero, México: serie de casos. Bol Med Hosp Infant Mex [Internet]. 2016 [consultado 11 de agosto 2020]; 73(4): 237-242. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1665114616300703>
14. Muller DA, Depelsenaire AC, Young PR. Diagnóstico clínico y de laboratorio de la infección por el virus del dengue. J Infect Dis. [Internet]. 2017 [consultado 28 de junio 2020]; 215 (2): 89–95. Disponible en: <pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28403441/>

15. OPS. Alerta regional por dengue, eliminación de la malaria y movilidad humana, temas clave abordados en la reunión con la viceministra de Gobernanza y Vigilancia de la Salud. [Internet]. [citado 28 de junio 2020]. Disponible: [https://www.paho.org/ecu/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2256:alerta-regional-por-dengue-eliminacion-de-la-malaria-y-movilidad-humana-temas-clave-abordados-en-la-reunion-con-la-viceministra-de-gobernanza-y-vigilancia-de-la-salud&Itemid=360](https://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=2256:alerta-regional-por-dengue-eliminacion-de-la-malaria-y-movilidad-humana-temas-clave-abordados-en-la-reunion-con-la-viceministra-de-gobernanza-y-vigilancia-de-la-salud&Itemid=360)
16. Consejo de Salubridad General. Manejo del dengue no grave y el dengue grave. GPC. [Internet]. 2016 [consultado 13 agosto 2020]; 13(1): 1-13. Disponible en: <https://www.mendeley.com/catalogue/c84b417f-e822-3879-8430-5b42931ea81d/>
17. Juan Samuel Sulca Herencia. Pruebas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico y la investigación del virus del dengue: presente y futuro Ecuador. [Internet]. Lima, Perú: 2018 [revisado 26 julio 2018; consultado 28 de junio 2020]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/dengue-fever-a-resilient-threat-in-the-face-of-innovation/laboratory-tests-used-in-the-diagnostic-and-research-of-dengue-virus-present-and-future>
18. Overcash J, Adelman Z.N. Progreso en la edición de genes Genoma de la transgénesis Manipulación en mosquitos [Internet]. London: Hannah Colford; 2016 año [revisión 2010-2012; consultado 14 agosto 2020]. Disponible en: [file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/Progress%20in%20Mosquito%20Research%20by%20Alexander%20S.%20Raikhel%20\(Eds.\)%20\(z-lib.org\).pdf](file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/Progress%20in%20Mosquito%20Research%20by%20Alexander%20S.%20Raikhel%20(Eds.)%20(z-lib.org).pdf)
19. Delgado ME, Marrero SA. Estudio estocástico con el uso de cadenas de Markov para la transmisión del dengue. Uniciencia. [Internet]. 2018 [consultado 2 Julio 2020]; 32(1): 108. Disponible en: <https://www.mendeley.com/catalogue/8ccc6050-64c7-39d5-9684-f261e80e2bfd/>
20. Herreira, A, Neto F, Mondini A. Dengue en Araraquara, SP: epidemiología, clima e infestação por *Aedes aegypti*. Revista de Saude Publica. [Internet]. 2018 [consultado 2 Julio 2020]; 52(1): 1-10 Disponible en: <https://www.mendeley.com/catalogue/b73b4641-4aef-3a6f-8f45-70239d1ee54a/>.
21. Márquez BY, Monroy CK, Martínez ME, et al. Influencia de la temperatura ambiental en el mosquito *Aedes spp* y la transmisión del virus del dengue. Ces

- Medicina. [Internet]. 2019 [consultado 2 Julio 2020]; 33(1): 42-50. Disponible en: <https://www.mendeley.com/catalogue/590cc1a9-99ec-32c3-86ec-4d9ab31bec28/>
22. Baldi MG, Hernández RS, Gómez LR. Actualización de la fiebre del Dengue. Rev Méd Sinergia [Internet]. 2020 [consultado 30 de junio 2020]; 32(1):1-13. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7399386/7>
  23. Ye YH, Chenoweth SF, Carrasco AM, et al. Potencial evolutivo del período de incubación extrínseca del virus del dengue en *Aedes Aegypti*. Evolution [Internet]. 2016 [consultado 2 de julio de 2020]; 70(11): 2459-2469. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27530960/>
  24. Eiman M, Introini VM, Ripoll C, et al. Directrices para la prevención y control de *Aedes aegypti*. [Internet]. Argentina: 2016 [revisado 01 de diciembre 2016; citado 30 de junio 2020]. Disponible en: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000235cnt-01-directrices-dengue-2016.pdf>
  25. Suman M. Paranjape and Eva Harris. Control de la traducción y replicación del virus del dengue [Internet]. London New York. Dr. Alan L. Rothman; 2012 [consultado 15 agosto 2020]. Disponible en: [file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/\(Current%20Topics%20in%20Microbiology%20and%20Immunology%20338\)%20Timothy%20P.%20Endy,%20In-Kyu%20Yoon,%20Mammen%20P%20Mammen%20\(auth.\),%20Alan%20L.%20Rothman%20\(eds.\)%20-%20Dengue%20Virus-Springer-Verlag%20Berlin%20Heidelberg%20\(2010\).pdf](file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/(Current%20Topics%20in%20Microbiology%20and%20Immunology%20338)%20Timothy%20P.%20Endy,%20In-Kyu%20Yoon,%20Mammen%20P%20Mammen%20(auth.),%20Alan%20L.%20Rothman%20(eds.)%20-%20Dengue%20Virus-Springer-Verlag%20Berlin%20Heidelberg%20(2010).pdf)
  26. Venegas J, Rivera O.D, Vergara C, Lapierre Acevedo L. Dengue una enfermedad emergente y re-emergente en América. Av en Ciencias. [Internet]. 2017 [consultado 2 de julio de 2020]; 27(2): 1-12 Disponible en: <https://www.mendeley.com/catalogue/09211253-2b95-379e-84ee-0dde6b53a29f/>
  27. Castro P, María C, Ocazone R, Stashenko E, Olivero Jesús. Interacción potencial de los componentes de los aceites esenciales con dengue proteínas del virus. Blacpma. [Internet]. 2015; 14 (3): 141-155. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85638535001>
  28. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolo de vigilancia de dengue. [Internet]. 2019 [revisado 26 de julio de 2019; citado 30 de junio 2020]. Disponible en: [file:///D:/TESIS/articulos/PROTOCOLO%20DENGUE\\_20190726.pdf](file:///D:/TESIS/articulos/PROTOCOLO%20DENGUE_20190726.pdf)



29. OPS. Guías para la atención de enfermos en la región de las Américas. [Internet]. Segunda edición. Washington: OPS, OMS; 2015 [consultado 30 de junio 2020]. Disponible en: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28232/9789275318904\\_esp.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28232/9789275318904_esp.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
30. Lee L, Gan V, Lee V, et al. Relevancia clínica y valor discriminatorio de los niveles elevados de aminotransferasas hepáticas para la gravedad del dengue. *PLoS*. [Internet]. 2015 [consultado 16 de agosto de 2020]; 6 (6): 3-15. Disponible en: <https://www.mendeley.com/catalogue/934f1052-69e9-3e6c-a0ff-d4adecf43520/>
31. Araya LC, Salazar EW. Dengue hallazgos hematológicos y de imagen. *Revista médica de Costa Rica y Centro América* [Internet]. 2016 [citado 28 de junio 2020]; 5: 1-4. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2016/rmc163at.pdf>
32. Muacevic A, Adler J. Un caso de fiebre del dengue con manifestaciones hemorrágicas. *Cureus* [Internet]. 12 de junio de 2020 [consultado 17 de agosto 2020]; 12 (6): 1-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7358921/>
33. Vachvanichsanong P, McNeil E. Electrolyte disturbance and kidney dysfunction in dengue viral infection. *Med Public Health*. [Internet]. 2015 [consultado 18 de agosto 2020]; 46 (1): 108-117. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26506736/>
34. Mallhi TH, Sarriff A, Adnan AS, et al. Lesión renal aguda inducida por el dengue (DAKI): una complicación desatendida y fatal de la infección viral del dengue: una revisión sistemática. *J Coll Physicians Surg Pak*. [Internet]. 2015 [consultado 19 de agosto 2020]; 25(11): 828-834. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26577971/>
35. Vachvanichsanong P, Thisyakorn U, Thisyakorn C. El dengue hemorrágico y el riñón. *Arch Virol*. [Internet]. 2016 [consultado 18 de agosto 2020]; 161(4): 771-778. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26699788/>
36. Lugo S, Pavlicich V. Indicadores tempranos de dengue grave en pacientes hospitalizados. *Soc.chil de pediatría*. [Internet]. 2016 [consultado 19 de agosto 2020]; 87(4): 326-327. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0370410616300547>
37. Farrar Jeremy. Características clínicas del dengue. [Internet]. Imperial College London, UK; 2011 [consultado 20 agosto 2020]. Disponible en:

- file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/(Tropical%20Medicine%20Science%20and%20Practice)%20Scott%20B.%20Halstead%20-%20Dengue-Imperial%20College%20Press%20(2008).pdf
38. Pizarro Torres Daniel. Dengue con extravasación grave de plasma: un nuevo abordaje de evaluación. Acta Médica Costarricense. [Internet]. 2016 [consultado 20 de agosto 2020]; 58(3): 115-121. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/434/43448497005.pdf>
  39. Hilgenfeld S.R, Vasudevan G. Dengue y Zika: Control y Antiviral Estrategias de tratamiento [Internet].Germany: Institute of Biochemistry University of Lübeck Lübeck, 2018 [consultado 21 agosto 2020]. Disponible en: file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/Dengue%20and%20Zika%20Control%20and%20Antiviral%20Treatment%20Strategies%20by%20Rolf%20Hilgenfeld,%20Subhash%20G.%20Vasudevan%20(z-lib.org).pdf
  40. Padmanabhan R, Subhash G. Métodos en biología molecular. [Internet]. Washington: John M. Walker, 2014 [consultado 21 agosto 2020]. Disponible en: file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/(Methods%20in%20Molecular%20Biology%201138)%20Radhakrishnan%20Padmanabhan,%20Subhash%20G.%20Vasudevan%20(eds.)%20-%20Dengue\_%20Methods%20and%20Protocols-Humana%20Press%20(2014).pdf
  41. Guzman M, Buchy P, Enria D, Vazques S. Dengue y fiebre hemorrágica del dengue: diagnóstico de laboratorio [Internet]. London, UK: Duane J, 2014 [consultado 21 agosto 2020]. Disponible en: file:///D:/TESIS/libros%20y%20articulos/Duane%20J.%20Gubler,%20Eng%20Eong%20Ooi,%20Subhash%20Vasudevan,%20Jeremy%20Farrar%20-%20Dengue%20and%20Dengue%20Hemorrhagic%20Fever-CABI%20(2014).pdf
  42. David A, Alexandra C, Depelsenair I. et al. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. J Infect Dis [Internet] 2017 [consultado 28 de junio 2020]; 215: 89–95. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28403441/>
  43. Cotto J, Ronceros S, Gómez M, Robi A, Ordoñez J. Caracterización clínica del dengue con signos de alarma y grave, en Hospitales de Guayaquil. Rev. INSPILIP. [Internet]. 2017 [consultado 22 de agosto 2020]; 54(1): 3-9. Disponible en: [https://www.inspilip.gob.ec/wp-content/uploads/2019/06/NUMERO\\_EN\\_PDF\\_1.pdf](https://www.inspilip.gob.ec/wp-content/uploads/2019/06/NUMERO_EN_PDF_1.pdf)

44. Céspedes M, Díez M, Faissal T, Tereba I. Dengue: manifestaciones clínicas y de laboratorio más frecuentes durante las epidemias en Trinidad-Bolivia. *Rev de la Sociedad Boliviana de pediatría*. [Internet]. 2015 [consultado 23 de agosto 2020]; 54(1): 3-9. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1024-06752015000100002](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-06752015000100002)
45. Matta L, Barbosa M, Morales C. Caracterización clínica de pacientes que consultaron por dengue en un hospital de tercer nivel en Cali, Colombia. *Rev INS*. [Internet]. 2015 [consultado 27 de agosto 2020]; 89(2): 5-21. Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/843/84344266014/index.html>
46. Carrión G, Bell J, García M, George María de Jesús. Aspectos clínico-epidemiológicos en pacientes con dengue y signos de alarma. *MEDISAN* [Internet]. 2018 [consultado 1 de septiembre 2020]; 22(7):540-551. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=368456827005>
47. Medagama A, Dalugama C, Meivalakan G, Lakmaji D. Factores de riesgo asociados con el dengue hemorrágico fatal en adultos. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. [Internet]. 2020 [consultado 23 de agosto 2020]; 13(1): 1-13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7222550/>
48. Mateo B, Torres G, Manet L, et al. Comportamiento clínico epidemiológico del dengue en colaboradores cubanos en el estado Bolívar, Venezuela. *CCM*. [Internet]. 2017 [consultado 10 de septiembre 2020]; 21(1): 1560-4381. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ccm/v21n1/ccm02117.pdf>
49. Godoy L, Arce M, Pavlicich V, Mesquita M. Dengue y Bradicardia: caracterización clínica y evolución. *Pediatría*. [Internet]. 2018 [consultado 28 de agosto 2020]; 46(1): 108-117. Disponible en: [http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1683-98032018000200115&lng=pt&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1683-98032018000200115&lng=pt&nrm=iso&tlng=es)
50. Izquierdo-Estévez A, Martínez-Torres E. Utilidad de la identificación de los signos de alarma en niños y adolescentes con dengue. *Rev de Pediatría*. [Internet]. 2019 [consultado 25 de agosto 2020]; 91(2): 2-13. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ped/v91n2/1561-3119-ped-91-02-e644.pdf>
51. Montero D, Acosta J, Oller J, et al. Combinaciones más frecuentes y características y de estudios complementarios de pacientes pediátricos con dengue. *Rev de*

- Pediatría. [Internet]. 2017 [consultado 27 de agosto 2020]; 89(2): 5-21. Disponible en: <http://www.revpediatria.sld.cu/index.php/ped/article/view/190/118>
52. Lugo S, Morilla L, Bejarano M, et al. El dengue con signos de alarma ¿podemos predecir evolución a grave desde la emergencia. Rev. Sociedad Boliviana Pediátrica. [Internet]. 2015 [consultado 9 de septiembre 2020]; 54(1): 1-10. Disponible en: [http://scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1024-06752015000100007](http://scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-06752015000100007)
53. Rodriguez C, Recalde D, Gonzáles M, et al. Manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio de una serie de casos febriles agudos con diagnóstico presuntivo de infección por el virus dengue. [Internet]. 2016 [consultado 12 de septiembre 2020]; 54(1): 1-10. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0123939215000909>
54. Donayre J. Perfil clínico epidemiológico del dengue en embarazadas hospitalizadas en el servicio gineco-obstetricia del hospital Cayetano Heredia -Piura. [Internet]. Piura. 2017. [consultado 13 de septiembre 2020]. Disponible en: <http://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/1179/CIE-DON-FER-18.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
55. Mata V, Lambert S, Marques Y. Precisión y confiabilidad de una prueba inmunocromatográfica rápida NS1 para el diagnóstico de DENV-1 en el punto de atención y en el laboratorio. Biomed central. [Internet]. 2017 [consultado 2 de septiembre 2020]; 17(6): 710. Disponible en: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2679-z>
56. Valdez J, Ruiz A, Vázquez R, et al. Evaluación del sistema diagnóstico SD Dengue Duo para la detección de la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG anti-dengue. Rev Cubana Med Trop. [Internet]. 2015 [consultado 8 de septiembre 2020]; 64(1):27-34. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=34327>
57. Ambrose J, Sekaran S, Azizan A. Proteína NS1 del virus del dengue como marcador de diagnóstico: ELISA disponible comercialmente y comparación con QRT-PCR y ensayos de diagnóstico serológico utilizados actualmente por el estado de Florida. J Trop Med. [Internet]. 2017 [consultado 4 de septiembre 2020]; 2017(2017): 2046864. doi: 10.1155 / 2017/8072491. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5504952/>
58. Muhammad Z, Haji B, Salah U, Sumaira N. Comparación de sensibilidad de los ensayos de inmunodiagnóstico para diagnosticar la fiebre del dengue. CoreanoJ Clin

- Lab. [Internet]. 2016 [consultado 8 de septiembre 2020]; 48(4): 275-279. Disponible en: <http://www.kjcls.org/journal/view.html?doi=10.15324/kjcls.2016.48.4.275>
59. Akmalina T, Rafidah H. Evaluación del rendimiento de las pruebas de diagnóstico comerciales del dengue para la detección temprana del dengue en muestras clínicas. *Rev. De medicina tropical India* [Internet]. 2017 [consultado 5 de septiembre 2020]; 2017(4): 1-15. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jtm/2017/4687182/#abstract>
60. Nogueira S, Barreto dos Santos F, Paiva R, et al. Mayor sensibilidad de NS1 ELISA por disociación por calor en casos de dengue agudo. *Infectar dis.* [Internet]. 2017 [consultado 2 de septiembre 2020]; 17(2): 204. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5346260/#CR7>
61. Manoor A, Sistla S, Dhodapkar R, et al. Evaluación de la detección del antígeno NS1 para el diagnóstico temprano del dengue en un hospital terciario del sur de la India. *J Clin Diagn Res.* [Internet]. 2016 [consultado 5 de septiembre 2020]; 17(2): 204. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4866096/>
62. Pal S, Dauner A, Mitra I. Evaluación de pruebas rápidas de antígeno NS1 del dengue y kits ELISA utilizando muestras clínicas. *PLoS One.* [Internet]. 2016 [consultado 8 de septiembre 2020]; 9(11): e113411. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4239072/>
63. Silvestri C, Kakade M, Alagarasu K, et al. Desarrollo de un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección simultánea de los virus del dengue y chikungunya. *Arch virol.* [Internet]. 2015 [consultado 5 de septiembre 2020]; 160(1): 323-327. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25233940/>
64. Luo S, Cui W, Chan L, et al. Seroprevalencia de anticuerpos IgG contra el dengue en individuos sintomáticos y asintomáticos tres años después de un brote en la provincia de Zhejiang, China. *BMC Infect Dis.* [Internet]. 2018 [consultado 28 de agosto 2020]; 92(18): 10-18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5824482/>

# ANEXOS

# SD BIO LINE Dengue IgG / IgM

## Explicación de la prueba

**[INTRODUCCIÓN]** Los virus de Dengue, transmitidos por el mosquito *Aedes aegypti* y los mosquitos *Aedes albopictus*, se encuentran ampliamente diseminados por todas las áreas tropicales y sub tropicales del mundo. Se conocen cuatro serotipos distintos (virus de dengue 1, 2, 3 y 4). En los niños la infección suele ser sub clínica o causar enfermedad febril autolimitada. Sin embargo, si el paciente es infectado por segunda vez con un serotipo diferente, es mucho más probable que ocurra una enfermedad más severa, fiebre de dengue hemorrágico o síndrome de shock por dengue. El dengue es considerado la enfermedad viral más importante portada por artrópodos, debido a la morbilidad y mortalidad que causa. Tradicionalmente, el diagnóstico serológico de una infección aguda por virus de dengue se ha avanzado en demostrar una elevación de 4 veces o más de anticuerpos de virus anti-dengue entre la fase aguda y la fase convalescente de suero de un paciente. La prueba de inhibición de hemoaglutinación es el ensayo que más comúnmente se ha utilizado para el diagnóstico del dengue.

Para el manejo del paciente con infecciones primarias y secundarias de dengue son esenciales pruebas rápidas y confiables. La infección primaria de dengue se caracteriza por fiebre entre moderada y alta, dolor de cabeza, dolor muscular y erupción cutánea. La respuesta inmune incluye la producción de anticuerpos de IgM hacia el quinto día de los síntomas, y persiste por 30-60 días. Los IgG aparecen el día 14 y persisten por toda la vida. Las infecciones secundarias suelen producir fiebre alta y en algunos casos eventos hemorrágicos y falla circulatoria. Las infecciones secundarias presentan una elevación de los IgG dentro de los 1-2 días subsiguientes a la aparición de los síntomas e inducen respuesta de IgM después de 20 días de haberse adquirido la infección.

**[FINALIDAD DE USO]** La prueba rápida DENGUE IgG/ IgM SD BIOLINE es un ensayo inmunocromatográfico de fase sólida para rápida detección cualitativa y diferencial de anticuerpos de IgG e IgM contra el virus del dengue en suero, plasma y sangre total. La finalidad de esta pruebas es servir de ayuda profesional en el diagnóstico presuntivo entre la infección primaria y secundaria de dengue, por lo cual es solamente una prueba preliminar. En consecuencia, deben realizarse pruebas de aislamiento de virus, detección en tejidos fijos, RT-PCR y serológicas como la de hemaglutinación – inhibición, y se deben emplear métodos alternos de diagnósticos más específicos para confirmar la existencia de infección por virus de dengue.

**[PRINCIPIO]** La prueba rápida de IgG/IgM de dengue esta diseñada para detectar y diferenciar simultáneamente anticuerpos de IgG/IgM contra virus de dengue en suero, plasma y sangre total humana. Con esta prueba también se pueden detectar 4 serotipos de dengue si se emplea una mezcla de proteínas envueltas de dengue recombinante. La superficie de la tira de pruebas SD BIOLINE de IgG/IgM de dengue lleva tres líneas pre-recubiertas: línea "G"

(línea de prueba de IgG de dengue), la línea "M" (línea de pruebas de IgM de dengue) y la línea "C" línea de control. Las tres líneas se hacen visibles en la ventana de resultados si se ejecuta adecuadamente el procedimiento de prueba y si los reactivos de la línea de control de prueba están actuando. Las líneas "G" y "M" de color púrpura se hacen visibles en la ventana de resultados si hay suficientes anticuerpos de IgG/IgM contra virus de dengue en la muestra. Si no hay anticuerpos de IgG/IgM contra virus de dengue en la muestra, no aparece color en "G" y/o "M". Cuando se adiciona la muestra al pozo de muestra, los IgG e IgM anti dengue reaccionan con proteínas envueltas de virus de dengue recombinante de conjugados dorados coloidales y forma un complejo de anticuerpos y conjugados dorados coloidales. A medida que la mezcla emigra a lo largo de la tira de prueba por acción capilar, el complejo de IgG o IgM de anti-dengue es captado por el respectivo IgG antihumano o IgM antihumano inmovilizado en dos líneas a lo largo de la tira de pruebas y genera una línea de color.

## Materiales suministrados /ingredientes activos de los componentes principales (25 pruebas /kit)

- El kit de Dengue IgG/IgM de SD BIOLINE contiene los siguientes componentes para realizar el ensayo.
1. Dispositivo de prueba Dengue IgG/IgM SD BIOLINE envuelto en la bolsa de aluminio con un desecante. Cada tira de pruebas contiene Conjugado dorado (como componente principal) : de envoltura proteínica del virus dengue recombinante - colóide dorado ( $1 \pm 0.2 \mu\text{g}$ ) Línea de prueba "G" (como componente principal) : anti IgG humana monoclonal de ratón ( $5 \pm 1 \mu\text{g}$ ), Línea de prueba M (como componente principal) : anti IgM humana monoclonal de ratón ( $5 \pm 1 \mu\text{g}$ ), Línea de Control (como componente principal) : anti- Dengue IgG de conejo ( $2.5 \pm 0.5 \mu\text{g}$ )
  2. 2) Diluyente del ensayo : 100 mM Buffer Fosfato (5mL), Azida de Sodio (0.01% p/p)
  3. 3) Pipeta capilar 10  $\mu\text{l}$ .
  4. 4) Inserto del Kit

## Precaución / Almacenamiento y estabilidad del kit

1. Para obtener los mejores resultados es necesario seguir estrictamente las instrucciones
2. Todos los especímenes deben manejarse como elementos potencialmente infecciosos.
3. El dispositivo de prueba debe ser almacenado a temperatura ambiente. No almacene en refrigerador
4. El dispositivo de prueba es sensible a la humedad y al calor.
5. Solamente abra la bolsa sellada y extraiga la tira de prueba inmediatamente antes de utilizarla
6. No use los reactivos si la fecha de expiración está vencida. La vida útil del kit está indicada en la etiqueta externa del empaque
7. No use el kit si la bolsa está dañada o el sello roto.
8. Los componentes de este kit (dispositivo de prueba y diluyente del ensayo) han sido sometidos a prueba de control de calidad como unidad estándar de lote. No mezcle los componentes de diferentes números de lote
9. El diluyente del ensayo contiene baja concentración de azida de sodio como preservativo. La azida de sodio es tóxica y debe manejarse con sumo cuidado para evitar ingerirlo y tener contacto de él con la piel.

## Advertencias

1. Para uso de diagnóstico in-Vitro solamente. No re-utilizar el cassette.
2. Las instrucciones deben seguirse exactamente para obtener resultados precisos. Cualquier persona que realice este ensayo debe estar entrenada en su uso y debe tener experiencia en procedimientos de laboratorio.
3. No ingerir alimentos ni fumar mientras se manipulan las muestras
4. Utilizar guantes protectores mientras se manejan las muestras. Lavarse las manos completamente después de

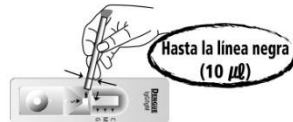
## Procedimiento de la prueba

- 1 Usando una Micropipeta, adicionar 10  $\mu\text{l}$  de suero, plasma o sangre total dentro del pozo de muestra marcadocomo "S".

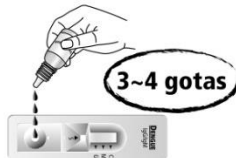


0

- 0 Usando el capilar suministrado, adicione 10  $\mu\text{l}$  de suero, plasma o sangre total dentro del pozo de muestra marcadocomo "S".



- 2 Colocar 3~4 gotas de diluyente del ensayo dentro del la forma redonda.



- 3 Interprete los resultados de prueba en 15~20 minutos.



**No leer los resultados despues de 20 minutos. Las lecturas tardías pueden dar falsos resultados.**

## Interpretación

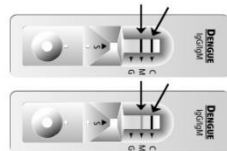
### Negativo

(No hay infección de Dengue)  
Una línea rosada "C" en la parte derecha de la ventana de resultados.

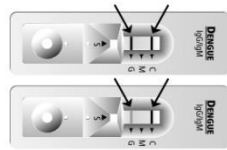


### Positivo

1. IgM positivo  
Infección primaria de Dengue.  
Pueden aparecer dos líneas "C" y "M" en la ventana de resultados.



2. IgG positivo  
Infección secundaria o pasada de Dengue.  
Dos líneas rosadas "C" y "G" en la ventana de resultados.



3. IgG e IgM Positivo  
Infección secundaria temprana de Dengue o primaria tardía.  
Tres líneas rosadas "C, M y G" en la ventana de resultados.



### No válido

No hay línea control en la ventana de resultados.  
Se recomienda analizar nuevamente la muestra.



- la manipulación de muestras
- Evitar salpicaduras y formación de aerosoles
- Limpiar los derrames totalmente utilizando un desinfectante adecuado
- Descartar y manejar todas las muestras, kit de reacción y materiales potencialmente contaminados, como si fuese desechos infecciosos, todo dentro de un recipiente de Bioseguridad.
- No mezclar o intercambiar muestras diferentes.

#### Recolección de la muestra, Almacenamiento y Precauciones

##### Recolección y almacenamiento de muestras

- Con esta prueba se pueden emplear muestras de suero, plasma o sangre total.

##### 2. Sangre total

[Recolección por Punción venosa]

- Recolectar la sangre total en el tubo de recolección (que contenga anticoagulantes tales como heparina, EDTA y Citrato de sodio) por punción venosa.
- Si las muestras de sangre no son analizadas inmediatamente, deben ser almacenadas de 2-8°C.
- Cuando las muestras de sangre se almacenan de 2-8°C se debe ser usada dentro de 3 días.
- Para almacenamiento por periodos de tiempo superior a 3 días, se recomienda congelar. Se deben llevar las muestras a temperatura ambiente antes de su uso.
- El uso de muestras de sangre almacenadas por periodos largos, mayores a 3 días puede causar una reacción no específica.

[Recolección usando una lanceta]

- Limpie el área a ser pinchada con un algodón humedecido con alcohol.
- Presione la yema de los dedos y pincha con la lanceta estéril suministrada.
- Tome la pipeta capilar suministrada de 10 µl, sumerja la punta abierta en la gota de sangre y deje de presionar para llenar la pipeta capilar hasta la línea negra.

##### 3. Suero o Plasma

[Suero] Recolectar la sangre total en el tubo de recolección (que NO contenga anticoagulantes tales como heparina, EDTA y Citrato de sodio) por punción venosa, dejar reposar por 30 minutos para permitir la coagulación sanguínea y luego centrifugue la sangre total para obtener la muestra de suero sobrenadante.

[Plasma] Recolectar la muestra de sangre en un tubo de recolección (que contenga anticoagulantes como heparina, EDTA y Citrato de sodio) luego centrifugue la sangre total para obtener la muestra de plasma sobrenadante.

- Si no se puede realizar inmediatamente prueba de los especímenes de suero o de plasma, deben mantenerse refrigerados a 2-8°C. En caso de que se requiera mantenerlos almacenados por más de 2 semanas, se recomienda congelar. Las muestras deben alcanzar temperatura ambiente antes de su uso.
- Es posible que los especímenes que contengan precipitado arrojen pruebas inconsistentes. Por ello deben clarificarse antes del ensayo.

##### Precauciones

- Anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato no afectan los resultados de la prueba
- Use separadamente la pipeta capilar o las puntas de las pipetas desechables para cada muestra con el fin de evitar la contaminación cruzada y podría causar resultados erróneos

#### Procedimiento de la prueba (Ver la Figura 1)

- Permita que los componentes del kit y la muestra alcancen temperatura ambiente antes de realizar la prueba
  - Retire el dispositivo de prueba de su bolsa, sitúelo en una superficie plana y seca.
  - [Usando una pipeta capilar]** Con una pipeta capilar de 10 µl, adicione 10 µl de suero, plasma o sangre total hasta la línea negra en el pozo de muestra marcado como "S" o **[Usando una micropipeta]** Adicione 10 µl de muestra de plasma, suero o sangre total dentro del pozo de muestra S.
  - Añada 3-4 gotas (acera de 90-120 µl) del diluyente del ensayo en el pozo para diluyente del ensayo de forma redonda.
  - Interprete los resultados entre 15-20 minutos.
- PRECAUCIÓN:** No lea los resultados de la prueba después de los 20 minutos. Lecturas después de los 20 minutos pueden dar falsos resultados.

#### Interpretación de la prueba (Ver la figura)

- Negativo**  
Solamente es visible la línea de control en el dispositivo de prueba. No se detecta anticuerpo alguno de IgG y de IgM. Repita la prueba dentro de 3 a 5 días si se sospecha la existencia de infección por dengue.
- IgM Positivo**  
La línea de control (C) y la línea de IgM (M) se hacen visibles en el dispositivo de prueba. Esto indica resultado positivo para anticuerpos de IgM contra el virus del dengue. Esta es señal de infección primaria de dengue.
- IgG Positivo**  
La línea de control (C) y la línea de IgG (G) se hacen visibles en el dispositivo de prueba. Esto indica resultado positivo para anticuerpos de IgG. Esta es señal de infección secundaria o pasada de dengue.
- Positivo de IgG e IgM**  
La línea de control (C), la línea (M) y la línea (G) de IgG se hacen visibles en el dispositivo de pruebas. Esto indica resultado positivo para los anticuerpos de IgM e IgG. Esto es señal de infección tardía primaria de dengue o secundaria temprana de dengue.
- No válido**  
No se hace visible la línea de control. Las causas más probables de que no aparezca la línea de control son insuficiencia del volumen de muestra o inadecuadas técnicas de procedimiento. Repita la prueba empleando un nuevo dispositivo de prueba.

#### Limitación de la prueba

- Esta prueba detecta la presencia de anticuerpos contra el dengue en la muestra y no se debe emplear como criterio único para diagnosticar infección de virus de dengue
- En infecciones tempranas y en algunas infecciones secundarias, es posible que los niveles detectables de anticuerpos de IgM sean bajos. Es posible que algunos pacientes no produzcan niveles detectables de anticuerpos de los primeros 7 a 10 días después de la infección. En caso de que persista los síntomas, debe realizarse pruebas a los pacientes dentro de los 3 – 4 días después de la prueba de la primera muestra.
- Es común reactividad cruzada serológica en el grupo Flavivirus (virus de dengue, encefalitis de San Luis, encefalitis japonesa, Virus del Nilo occidental y fiebre amarilla).
- Como en todas las pruebas de diagnóstico, los resultados deben sopesarse junto con la demás información clínica de que disponga el médico.
- Si el resultado de la prueba es negativo y persiste los síntomas clínicos, se recomiendan realizar pruebas adicionales de seguimiento empleando otros métodos clínicos. Los resultados negativos no excluyen la posibilidad de una infección temprana por virus de dengue.
- El procedimiento de la prueba, las precauciones e interpretación de los resultados para esta prueba deben ser seguidos estrictamente durante el procedimiento.

#### Control de Calidad Interno

La línea de control es empelada como control del procedimiento. La línea de control debe aparecer siempre si el procedimiento de prueba se ha realizado adecuadamente y los reactivos de prueba de la línea de control están funcionando. Esto confirma que el volumen de muestra es suficiente y la técnica del procedimiento es correcta. Además se requiere que el fondo sea claro.

#### Valores esperados

El dengue se caracteriza por la presencia de IgM detectable a los 3-5 días después de la aparición de la infección. El dengue secundario se caracteriza por elevación de IgG específico a los 1-2 días después de la aparición de la infección, y en la mayoría de casos esto va acompañado por una elevación de IgM.

#### Características de desempeño

- Sensibilidad y Especificidad  
Comparación de la prueba rápida SD BIOLINE de IgG/IgM de dengue con la prueba de inhibición de la Hemaglutinación.

La comparación de la prueba rápida SD BIOLINE de IgG/IgM de dengue presentó buena correlación con la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

SD BIOLINE Dengue IgG/IgM	102 muestras positivas para Dengue IgM/IgG (Prueba de Referencia: Prueba HI)		Sensibilidad
	No de Positivos	No. de Negativos	
	93	9	93/102 x100%=91.2%

SD BIOLINE Dengue IgG/IgM	200 muestras negativas para Dengue IgM/IgG (Prueba de Referencia: Prueba HI)		Sensibilidad
	No de Positivos	No. de Negativos	
	20	180	180/200 x100%=90%

- La sensibilidad de la prueba SD BIOLINE Dengue IgG/IgM con muestras tomadas al momento de darse de alta del hospital.

Ensayo de Referencia	Índice del ensayo	Tiempo o grupo de recolección de muestra	Estado de la Infección	Tp	Fp	Fn	Tn
Prueba HI	Dengue IgG/IgM	Agudo temp	Primario	23		5	
		Agudo temp	Secundario	70		4	
		Grupo Negativo	No hay infección de Dengue		20		180

#Tp= Verdaderos Positivos Fp= Falsos positivos Fn= Falsos negativos Tn= Verdaderos negativos

- La Prueba de reactividad cruzada con otros Flavivirus mediado y mosquitos transmisores de enfermedades infecciosas La prueba rápida Dengue IgG/IgM SD BIOLINE no mostró reactividad cruzada con otras enfermedades mediadas por Flavivirus y Enfermedades infecciosas por mosquito como Malaria.

Enfermedad	Total de especímenes Dengue IgM negativo	Total de especímenes Dengue IgG negativo
Encefalitis Japonesa	25/25	25/25
Fiebre amarilla	25/25	25/25
Malaria P. falciparum	25/25	25/25
Malaria P. vivax	25/25	25/25
Total	100/100	100/100

- La precisión al interior de la aplicación de la prueba y entre las distintas aplicaciones de la prueba se determinaron ensayando 10 muestras 3 veces: Cuatro negativas, dos débil positivas y dos positivas media y dos fuerte positivas. Todas las muestras se identificaron correctamente al 100% de las veces.
- Para evaluar la interferencia de la prueba rápida Dengue IgG/IgM SD BIOLINE con muestras con interferencia relevante, muestras hemolizadas, que contienen factor reumatoides, lipémicas e ictericas fueron investigadas. En estos estudios estas muestras no hicieron interferencia con el kit de prueba.
- Sensibilidad Analítica: límite de detección; la cantidad mas pequeña del objetivo del mercado que puede ser determinado en forma precisa; ha sido igual o superior a las pruebas rápidas para detección de Dengue líder a nivel comercial.

#### Bibliografía de lecturas sugeridas.

- Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. WHO 2nd Edition 1997.
- Songee L. ranch and Paul N. Levett. Evaluation of four methods form detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. Clin. Diagn. Lab. Immunol. Vol 6(4) p 555-577, 1999
- Jan Green et al. Evaluation of six immunossays for detection of dengue-virus steric immunoglobulin M and G Antibodies. Clin. Diagn. Lab Immunol. Vol 7(6) p. 867-871, 2000

Fecha de elaboración: 20.10.06  
11FK20-Sp-0

 **STANDARD DIAGNOSTICS, INC.**  
156-68 Hagal-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Kyonggi-do, Korea  
Tel : 82-31-899-9700 Fax : 82-31-899-9740 http://www.standardia.com



 Authorized Representative  
**MT Promed Consulting GmbH**  
Altenhofstrasse 80 D-66386 St. Ingbert Germany  
Phone : +49 6894 581020, Fax : +49 6894 581021

## Anexo 1. Inserto de prueba inmunocromatográfica IgG/IgM dengue

Fuente: <http://www.biosystemsantioquia.com.co/images/docs/reactivos/enfermedades-infecciosas/dengue/11fk20-dengue-igg-igm-wb-d-ins-sp.pdf>



# NADAL<sup>®</sup> Dengue NS1 Ag Test (test cassette)

REF 532012N-25



<b>DE</b> Gebrauchsanweisung	2	<b>NO</b> Bruksanvisning	20
<b>EN</b> Instructions for use	5	Symbols	23
<b>FR</b> Instructions d'utilisation	8	Our Teams	24
<b>ES</b> Instrucciones de uso	11		
<b>IT</b> Istruzioni per l'uso	14		
<b>PT</b> Instruções de Utilização	17		



nal von minden GmbH

Carl-Zeiss-Strasse 12  
47445 Moers  
Germany

Moers  
Tel: +49 (2841) 99820-0  
Fax: +49 (2841) 99820-1

Regensburg  
Tel: +49 941 29010-0  
Fax: +49 941 29010-50

[www.nal-vonminden.com](http://www.nal-vonminden.com)  
[info@nal-vonminden.com](mailto:info@nal-vonminden.com)

Directors:  
Sandra von Minden  
Roland Meißner  
Thomas Zander

Commercial reg. Kieve  
HRB 5679  
Steuer-Nr. 244/133/00130  
UST-ID-Nr. DE 189 016 086

Version 1.0, 2015-10-20

### 1. Uso previsto

El test NADAL® Dengue NS1 Ag es un inmunoensayo cromatográfico rápido para la detección cualitativa de antígenos NS1 del virus del Dengue en muestras humanas de sangre, suero o plasma. Este test sirve para ayudar en el diagnóstico de infecciones por Dengue y solo está indicado para el uso profesional.

### 2. Introducción y significado clínico

El Dengue es un flavivirus, transmitido por mosquitos tigre *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Está ampliamente distribuido a lo largo de áreas tropicales y subtropicales, causando anualmente hasta 390 millones de infecciones.<sup>3</sup> La infección clásica por Dengue está caracterizada por la aparición repentina de fiebre, intenso dolor de cabeza, mialgia, artralgia y erupciones. La NS1 es una de las 7 proteínas no estructurales del virus del Dengue, que se cree que participan en la replicación viral. La NS1 existe como monómero en su forma inmadura, pero se procesa rápidamente en el retículo endoplasmático hasta formar un dímero estable. Una pequeña cantidad de NS1 se une con organelas intracelulares, que participan en la replicación viral. El resto de NS1 se une a la membrana plasmática o se secreta como hexadímero soluble. La NS1 es esencial para la viabilidad viral pero se desconoce su función biológica precisa. Los anticuerpos producidos en respuesta al NS1 en infecciones virales pueden provocar reacciones cruzadas con antígenos de superficie en las células epiteliales y en las plaquetas. Esto tiene implicaciones en el desarrollo de la fiebre hemorrágica del dengue.

El test NADAL® Dengue NS1 Ag es un ensayo rápido que utiliza una combinación de anticuerpos anti-Dengue recubiertos y anticuerpos unidos a partículas coloreadas para la detección de antígenos NS1 del Dengue en muestras humanas de sangre, suero o plasma.

### 3. Principio del test

El test NADAL® Dengue NS1 Ag es un inmunoensayo cualitativo basado en una membrana para la detección de antígenos NS1 de Dengue en muestras humanas de sangre completa, suero o plasma. Durante la prueba, la muestra reacciona con conjugados de anticuerpos anti-Dengue en la membrana de la tira interna del test. Los anticuerpos conjugados con oro se unen a los antígenos del Dengue en la muestra, que, a su vez, están unidos a los anticuerpos NS1 anti-Dengue que recubren la membrana. Cuando la mezcla se mueve a lo largo de la membrana, los anticuerpos NS1 anti-Dengue se unen al complejo antígeno-anticuerpo, produciendo una línea de color rosa pálido u oscuro en la región de test (T) de la membrana. La intensidad del color de las líneas puede variar dependiendo de la cantidad de antígenos presentes en la muestra. La aparición de una línea rosa en la región de test (T) se debe considerar como resultado positivo.

La línea coloreada que aparece en la región de control (C) sirve como control del procedimiento, indicando que el volumen de muestra añadido ha sido suficiente y que la membrana ha reaccionado correctamente.

### 4. Reactivos y materiales provistos

- 25 casetes de test NADAL® Dengue NS1 Ag
- 25 pipetas desechables
- 1 búfer "Buffer" (3 ml)
- 1 manual de instrucciones

### 5. Materiales adicionales

- Recipiente para recolectar la muestra
- Centrifugadora (para suero/plasma)
- Cronómetro
- Una lanceta (solo para sangre completa obtenida por punción digital)
- Tubos capilares desechables heparinizados y goteros dispensadores (solo para sangre completa obtenida por punción digital).

### 6. Almacenamiento y conservación

Almacene el dispositivo de test a 2-30°C y utilícelo antes de la fecha de caducidad impresa en el envase. El test se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada. La tira de test debe permanecer en su envase sellado hasta su momento de uso. No congele los test. No utilice los kits después de su fecha de caducidad.

### 7. Advertencias y precauciones

- Solo apto para el uso profesional de diagnóstico *in-vitro*.
- Lea atentamente todo el procedimiento del test antes de comenzar la prueba.
- No utilice el test después de la fecha de caducidad indicada en el envase.
- No debe utilizar el dispositivo si el envase está dañado.
- No reutilice los test.
- No añada la muestra al área de reacción (región de resultados).
- Evite tocar el área de reacción (región de resultados), a fin de evitar posibles contaminaciones.
- Evite la contaminación cruzada de las muestras utilizando un nuevo recipiente recolector para cada una.
- No coma, beba o fume durante la manipulación de las muestras y la realización del test.
- Utilice ropa protectora, como bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección, mientras manipule las muestras.
- Manipule las muestras como si contuviesen agentes infecciosos. Siga durante todo el procedimiento las precauciones establecidas para riesgos microbiológicos, y las directrices estándar para la eliminación de las muestras.
- Este test contiene productos de origen animal. El conocimiento certificado del origen y/o estado sanitario de los animales no garantiza completamente la ausencia de agentes patógenos transmisibles. Por eso, se recomienda tratar este producto como potencialmente infeccioso y seguir las precauciones habituales durante su manipulación (p.ej. no ingerir ni inhalar).
- La humedad y la temperatura puede afectar negativamente a los resultados del test.
- La eliminación de los materiales utilizados debe realizarse de acuerdo con las regulaciones locales.

**8. Recolección de muestras y preparación**

El test NADAL® Dengue NS1 Ag se puede realizar con sangre completa, suero o plasma.

**Para muestras de sangre completa obtenida por punción digital:**

- Lave la mano del paciente con jabón y agua caliente, o límpiela con un hisopo con alcohol. Déjela secar.
- Realice un suave masaje en la mano, sin tocar el lugar de la punción, frotándola en dirección a la punta del dedo medio o anular.
- Puncie la piel con una lanceta estéril y limpie la primera gota de sangre.
- Presione la mano desde la palma hasta el dedo para producir una gota redonda de sangre en la zona de la punción.

Para evitar la hemólisis, separe el suero o plasma de la sangre por centrifugación lo antes posible. Utilice solo muestras no hemolizadas.

El test se debe realizar inmediatamente después de la recolección de la muestra. No deje las muestras a temperatura ambiente durante periodos de tiempo prolongados. Las muestras de suero o plasma se pueden almacenar a 2-8°C hasta 3 días. Si desea almacenarlas durante más tiempo, debe congelarlas a -20°C. La sangre completa recolectada por punción venosa se debe almacenar a 2-8°C siempre que el test se realice en los 2 días siguientes a la recolección. No congele las muestras de sangre completa. Si la sangre completa se ha obtenido por punción digital se debe realizar la prueba inmediatamente. Lleve las muestras a temperatura ambiente antes de realizar la prueba. Si se han congelado las muestras, debe descongelarlas y mezclarlas bien antes de realizar el test. Evite los ciclos repetidos de congelado y descongelado. Si las muestras se van a transportar, se deben empaquetar de acuerdo con las regulaciones estatutarias para el transporte de agentes etiológicos.

**9. Procedimiento del test**

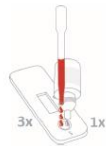
Lleve los test, las muestras, los reactivos y/o controles a temperatura ambiente (15-30°C) antes de realizar la prueba.

1. Retire el casete de test de su envase sellado y sitúelo sobre una superficie limpia y plana. El casete de test debe utilizarse inmediatamente después de abrir el envase sellado. Etiquete el casete de test con la identificación del paciente o de control.

2. **a) Para muestras de suero o plasma:** Sujetando el gotero verticalmente, añada 3 gotas (aprox. 75 µL) de suero o plasma al pocillo para la muestra del casete de test (S).



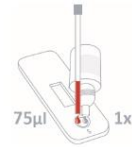
- b) Para muestras de sangre obtenida por punción venosa:** Sujetando el gotero verticalmente, añada 3 gotas (aprox. 75 µL) de suero o plasma al pocillo para la muestra del casete de test (S). Añada 1 gota de búfer (aprox. 40 µL) al pocillo para la muestra (S).



**c) Para muestras de sangre completa obtenida por punción digital:**

**I. Con un tubo capilar:**

Coloque el extremo del tubo capilar sobre la sangre para llenarlo con aproximadamente 75 µL. Evite la formación de burbujas. Coloque el gotero dispensador en el extremo del tubo capilar, y a continuación, apriete el gotero para dispensar la muestra de sangre completa en el pocillo correspondiente (S) del casete de test. Añada 1 gota de búfer (aprox. 40 µL) en dicho pocillo (S).



**II. Mediante gotas colgantes:**

Posicione el dedo del paciente de forma que la gota de sangre caiga exactamente sobre el pocillo para la muestra (S) del casete de test. Deje caer 3 gotas colgantes (aprox. 75 µL) de sangre completa de la punta del dedo en el centro del pocillo para la muestra (S) del casete de test, o mueva el dedo del paciente de forma que la gota colgante toque el centro del pocillo para la muestra (S). Añada 1 gota de búfer (aprox. 40 µL) al pocillo para la muestra (S).



3. Active el cronómetro.
4. Espere a que aparezca la línea/s coloreada/s. Lea los resultados del test a los 10 minutos. No interprete los resultados después de más de 20 minutos.



**10. Interpretación del resultado**

**Positivo:**

Aparecen dos líneas coloreadas en la membrana. Una de ellas aparece en el área de control (C) y la otra en el área de test (T).



**Negativo:**

Aparece una línea coloreada en la región de control (C). No aparece la línea coloreada en el área de test (T).



**No válido:**

No aparece la línea de control. Si la línea de control no aparece dentro del tiempo de lectura especificado, los resultados del test no son válidos y se deben descartar. Si esto sucede, revise el procedimiento y repita la prueba con un nuevo casete de test. Si el problema persiste, deje de usar el kit inmediatamente y contacte con su distribuidor local.



**Nota:**

La intensidad de la línea en el área de test (T) puede variar en función de la concentración de antígenos de Dengue NS1 presentes en la muestra. Por eso, cualquier sombra coloreada en la región de la línea de test se debe considerar positiva.

Las causas más frecuentes de que no aparezca la línea de control son un volumen de muestra insuficiente, un procedimiento incorrecto o que el dispositivo esté caducado.

**11. Control de calidad**

El casete contiene un control interno del procedimiento, que consiste en una línea coloreada que aparece en la región de control (C). Esta línea confirma que el volumen de muestra ha sido suficiente, que la membrana ha reaccionado correctamente y que la técnica del procedimiento ha sido adecuada.

Las *buenas prácticas de laboratorio (BLP)* recomiendan el uso de materiales de control para asegurar que el funcionamiento del test es correcto.

**12. Limitaciones**

- Siga atentamente las indicaciones del "Procedimiento del test" e "Interpretación del resultado" durante la realización del test para detectar la presencia de Dengue Ag en sangre completa, suero o plasma para sujetos individuales. En caso contrario, se pueden producir resultados incorrectos.
- El test NADAL® Dengue NS1 Ag se limita a la detección cualitativa de antígenos del Dengue en muestras humanas de sangre completa, suero o plasma. La intensidad de la línea de test no tiene correlación lineal con la cantidad de antígenos del Dengue en la muestra.
- Un resultado negativo de test no excluye la posibilidad de exposición al virus o infección por Dengue.
- Pueden producirse resultados negativos si la cantidad de antígenos del Dengue presentes en la muestra está por debajo del límite de detección del test, o si el Dengue detectado no estaba presente durante la etapa de la enfermedad en la que se recolectó la muestra.
- Las muestras que contienen cantidades inusualmente altas de anticuerpos heterófilos o factor reumatoide pueden afectar a los resultados esperados.
- Si los síntomas persisten, mientras que el resultado obtenido con el test NADAL® Dengue NS1 Ag es negativo o no reactivo, se recomienda repetir la prueba unos pocos días después o con métodos alternativos de test, como PCR o ELISA.
- Los resultados obtenidos con este test solo se deben interpretar junto con otros procedimientos de diagnóstico y hallazgos clínicos.

**13. Características del rendimiento****Sensibilidad y especificidad**

Se analizó un panel de seroconversión con muestras clínicas utilizando el test NADAL® Dengue NS1 Ag y un ELISA Dengue Ag disponible comercialmente.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

		Dengue Ag ELISA		
		+	-	Total
Test NADAL® Dengue NS1 Ag	+	137	8	145
	-	6	200	206
Total		143	208	351

Sensibilidad relativa:  $137/143 \times 100\% = 95.8\%$  (95%CI\*: 91,1%~98,4%);

Especificidad relativa:  $200/208 \times 100\% = 96.1\%$  (95%CI\*: 92,6%~98,4%);

Precisión:  $(137+208)/(137+6+8+200) \times 100\% = 96.0\%$  (95%CI\*: 93,4%~97,8%)

\*Intervalos de confianza

**14. Referencias**

1. Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.
2. Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481
3. Samir Bhatt, Peter W. Gething, Oliver J. Brady u. a.: *The global distribution and burden of dengue*. In: Nature. Nr. 496, 25. April 2013, S. 504-507

Rev. 0, 2015-10-20 MP

# Dengue virus IgM ELISA

Inmunoensayo enzimático para la determinación cualitativa de los anticuerpos IgM contra Dengue-virus en suero o plasma humanos.

**REF**    **RE58681**

    **96**

      **2-8°C**

EU: **IVD** 



**IBL INTERNATIONAL GMBH**

Flughafenstrasse 52a  
D-22335 Hamburg, Germany

Phone: +49 (0)40-53 28 91-0  
Fax: +49 (0)40-53 28 91-11

IBL@IBL-International.com  
www.IBL-International.com

## 1. Introducción

El Dengue virus es un virus de A.R.N. de cadena simple de un diámetro de 50 nm perteneciente a la familia de los Flaviviridae. Se distinguen 4 tipos serológicos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4). La infección con un serotipo no produce inmunidad contra los otros. El virus se extiende por todo el mundo y aparece de forma endémica en sur y centro américa, en el oeste de África, en el sureste de Asia y en la región oeste del océano pacífico. El depósito de germen patógeno es el hombre. El *Aedes aegypti* constituye el vector principal de esta enfermedad, siendo un mosquito esencialmente doméstico de aguas limpias. Se distinguen tres imágenes clínicas:

-El dengue que se manifiesta después de un período de incubación de 1 a 2 semanas con escalofríos (fiebre hasta 40°), dolores de cabeza, de los miembros y de los músculos. Este tipo es benigno.

-El dengue hemorrágico que se manifiesta con hemorragias cutáneas y en los órganos es mucho más grave. Los síntomas clínicos son petequias, fuertes hemorragias de la nariz, vómito de sangre, melena y hematuria. Una agravación de la enfermedad deriva en:

-El síndrome de shock. Se producen fuertes hemorragias en los órganos y también en el cerebro siendo frecuentemente letal (de 10 % al 40 %).

Por causa de la evolución variada, el tazo de la letalidad difiere bastante, el promedio es del 1 al 3 %. Este puede aumentar hasta el 80 % en los cursos graves. Ni una terapia causal, ni una profilaxis existen.

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
Dengue virus	Fiebre de dengue, Dengue hemorrágico e Síndrome de shock por dengue	La aparición súbita de fiebre, dolor de cabeza severo, dolor retro orbital, mialgias y artralgias leucopenia, trombocitopenia y manifestaciones hemorrágicas	La transmisión por los mosquitos vectores infectados ( <i>Aedes albopictus</i> ; <i>Aedes aegypti</i> )

Detección de infecciones o de agentes patógenos de:

- PCR
- Serología: p. ej. ELISA

## 2. Uso previsto

El inmunoensayo enzimático Dengue virus IgM ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra Dengue Virus en suero o plasma (citrito, heparina) humano.

## 3. Principio del ensayo

La determinación inmunoenzimático cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las microplacas están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unido, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. Se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un lector de microplacas ELISA.

#### 4. Materiales

##### 4.1. Reactivos suministrados

- **[MTP] Dengue Virus IgM microplaca recubierta:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Dengue Virus, en bolsa de aluminio.
- **[SAMPLEDIL] Diluyente para IgM de la muestra:** 1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; anti-humana IgG (RF Absorbente); color verde; listo para ser utilizado; tapa blanca.
- **[TMB STOP] Solución de parada:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **[WASHBUF CONC] Tampón de lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; tapa blanca.
- **[ENZCONJ] Conjugado Dengue Virus anti-IgM:** 1 botella de 20 mL de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color rojo; tapa negra; listo para ser utilizado.
- **[TMB SUBS] Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla; < 5 % NMP.
- **[CONTROL +] Control positivo Dengue Virus IgM:** 1 botella de 2 mL control (suero o plasma humano); color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado.
- **[CONTROL CO] Control cut-off Dengue Virus IgM** 1 botella de 3 mL control (suero o plasma humano); color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado.
- **[CONTROL -] Control negativo Dengue Virus IgM:** 1 botella de 2 mL control (suero o plasma humano); color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

##### 4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

##### 4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de microplaca con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37°C
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas para uso de (10-1000 µL)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

#### 5. Estabilidad y almacenaje

Almacene el kit a 2 - 8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2 - 8 °C.

#### 6. Preparación de los reactivos

Es muy importante llevar a todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20 - 25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

##### 6.1. Microplaca recubierta

As tiras rompibles están recubiertas con antígeno de Dengue Virus. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2 - 8 °C.

##### 6.2. Tampón de lavado (20x conc.)

Diluir la Tampón de lavado 1+19; por ejemplo. 10 mL de la Tampón de lavado + 190 mL de agua destilada. La muestra de tampón diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Caso de aparecer cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

### 6.3. Solución de sustrato de TMB

La solución está lista para su uso y debe almacenarse a 2 - 8 °C, protegida de la luz. La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizada en el ensayo.

## 7. Toma y preparación de las muestras

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2 - 8 °C, en caso contrario deben ser guardadas en alícuotas y almacenadas congeladas (-70 para -20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

### 7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el tampón de dilución para la muestra de IgM, p. e. 10 µL de la muestra con 1 mL de tampón IgM, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

## 8. Procedimiento

### 8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de Tampón de lavado de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (recomienda determinar en doble) en el esquema de la placa. Usar la cantidad necesaria de tiras o pozos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a  $37 \pm 1$  °C.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h  $\pm$  5 min a  $37 \pm 1$  °C.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µL de la Tampón de lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.  
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetear 100 µL de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco sustrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20 - 25 °C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso número 4.
8. Pipetear 100 µL de Solución de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20 - 25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el Solución de sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.



**8.2. Medición**

Ajustar el lector de microplaca (fotómetro) Elisa **al cero** utilizando el **Blanco**.

Si por razones técnicas el lector de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de éste debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en el **esquema de la placa**.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el **promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

**9. Calculo de los resultados****9.1. Criterios de validez del ensayo**

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción **< 0,100**
- **Control negativo:** valor de la extinción **< 0,200 y < Cut-off**
- **Control cut-off:** valor de la extinción **0,150 – 1,300**
- **Control positivo:** valor de la extinción **> Cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

**9.2. Calculo del valor de la medición**

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de los dos Controles cut-off.

Ejemplo:  $0,42 \text{ OD Control cut-off} + 0,44 \text{ OD Control cut-off} = 0,86:2 = 0,43$   
Cut-off = 0,43

**9.2.1. Resultados en unidades [U]**

$\frac{\text{Promedio valor de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-off}} = \text{ [unidades = U]}$

Ejemplo:  $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ U}$

**9.3. Interpretación de los resultados**

Cut-off	10 U	-
Positivo	> 11 U	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 U	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como <b>negativa</b> .
Negativo	< 9 U	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.
El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.		

**9.3.1. Isotipos de anticuerpo y Estado de la Infección**

Serología	Significado
IgM	Característica de la respuesta primaria del anticuerpo Alto título de IgM con bajo título de IgG → sugieren una infección muy reciente o aguda Raras: → persistente IgM
IgG	Característica de la respuesta secundario del anticuerpo Pueden persistir por varios años El alto título de IgG con bajo título de IgM: → pueden indicar una infección pasada

**10. Características del ensayo**

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

No se han probado muestras de personas vacunadas.

Para obtener más información sobre las características del ensayo, por favor, entre en contacto IBL International GmbH.

**10.1. Precisión**

<b>Intra ensayo</b>	<b>n</b>	<b>Promedio (E)</b>	<b>CV (%)</b>
#1	24	0,572	3,28
#2	24	1,036	1,17
#3	24	0,501	4,42
<b>Inter ensayo</b>	<b>n</b>	<b>Promedio (U)</b>	<b>CV (%)</b>
#1	12	21,28	7,66
#2	12	12,42	12,85
#3	12	3,94	12,23

**10.2. Especificidad diagnóstica**

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico. Es 96,59% (95% Intervalo de confianza: 92,73% - 98,74%).

**10.3. Sensibilidad de diagnóstico**

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es 91,84% (95% Intervalo de confianza: 80,4% - 97,73%).

**10.4. Interferencias**

Las muestras lipémicas, ictericas e hemolíticas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/mL para triglicéridos, de 0,5 mg/mL para bilirrubina y de 10 mg/mL hemoglobina.

**10.5. Reactividad cruzada**

Pruebas realizadas con un panel de muestras con distinta actividad de anticuerpos para estudiar parámetros de reactividad no dieron falsos positivos debidos a reactividad cruzada. La reactividad cruzada con otros flavivirus no se puede excluir y debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

**11. Limitaciones del ensayo**

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

## 12. Precauciones y advertencias

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos, sin salpicar.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

### 12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación está sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

## 13. Informaciones para pedidos

N° del producto: RE58681 Dengue virus IgM ELISA

**14. LITERATUR**

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía/ Bibliografia

CDC (1994): Dengue fever among U.S. military personnel--Haiti, September-November, 1994. In MMWR. Morbidity and mortality weekly report 43 (46), pp. 845–848.

CDC (1995): Imported dengue--United States, 1993-1994. In MMWR. Morbidity and mortality weekly report 44 (18), pp. 353–356. DOI: 10.1001/jama.1995.03530020029013.

Gubler, Duane J. (2006): Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 813–822.

Hayes, Edward B.; Gubler, Duane J. (1992): Dengue and dengue hemorrhagic fever. In The Pediatric Infectious Disease Journal 11 (4), pp. 311–317.

Mansfield, Karen L.; Horton, Daniel L.; Johnson, Nicholas; Li, Li; Barrett, Alan D. T.; Smith, Derek J. et al. (2011): Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. In The Journal of general virology 92 (Pt 12), pp. 2821–2829. DOI: 10.1099/vir.0.031641-0.

Rigau-Perez, Jose G.; Gubler, Duane J.; Vorndam, A. Vance; Clark, Gary G. (1994): Dengue surveillance--United States, 1986-1992. In MMWR. CDC surveillance summaries : Morbidity and mortality weekly report. CDC surveillance summaries 43 (2), pp. 7–19.

Sharp, Trueman W.; Wallace, Mark R.; Hayes, Curtis G.; Sanchez, Jose L.; DeFraités, Robert F.; Arthur, Ray R. et al. (1995): Dengue fever in U.S. troops during Operation Restore Hope, Somalia, 1992-1993. In The American journal of tropical medicine and hygiene 53 (1), pp. 89–94.

**ABKÜRZUNGEN**

NMP	N-Methyl-2-pyrrolidone
-----	------------------------

## Anexo 3. Inseto ELISA IgM-dengue

Fuente: [https://www.ibl-](https://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE58681_IFU_EU_es_Dengue_virus_IgM_ELISA_VN_2017-07_sym4.pdf)

[international.com/media/catalog/product/R/E/RE58681\\_IFU\\_EU\\_es\\_Dengue\\_virus\\_IgM\\_ELISA\\_VN\\_2017-07\\_sym4.pdf](https://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE58681_IFU_EU_es_Dengue_virus_IgM_ELISA_VN_2017-07_sym4.pdf)

## DENGUE ELISA IgG

### Producto para diagnóstico *in vitro*

**G1018:** Prueba inmunoenzimática indirecta para determinar anticuerpos IgG frente al virus del dengue en suero/plasma humano. 96 tests.

#### INTRODUCCIÓN:

El dengue (DF) y la fiebre hemorrágica por dengue (DHF) son causados por uno de los 4 serotipos del virus del género *Flavivirus* que aunque muy relacionados son antigénicamente distintos (DEN-1, DEN-2, DEN-3, y DEN-4). DF y DHF son enfermedades de áreas principalmente tropicales y subtropicales. Los 4 serotipos de dengue se mantienen en un ciclo que implica a humanos y al mosquito *Aedes*. Las infecciones producen un espectro de enfermedad clínica que va desde síndrome viral inespecífico a enfermedad hemorrágica severa y fatal. Las manifestaciones clínicas incluyen erupción, repentino comienzo de fiebre, escalofríos, dolores de cabeza severos, náuseas, mialgias y artralgias, leucopenia, trombocitopenia y manifestaciones hemorrágicas. Ocasionalmente produce shock y hemorragia causando la muerte. Un importante factor de riesgo para DHF es la cepa del virus que produzca la infección, así como la edad y especialmente la historia de infecciones previas por dengue del paciente.

La viremia por dengue parece ser universal en pacientes febriles con dengue; ocurre previo al comienzo de la fiebre y los síntomas y tiene un pico de 2-3 días tras el comienzo de la enfermedad. Un diagnóstico de infección aguda con el virus dengue puede realizarse aislando el virus o por detección del genoma viral o el antígeno. Serológicamente, una infección primaria con dengue resulta en niveles detectables de anticuerpos IgM hacia el tercer día de infección sin fiebre. Estos anticuerpos IgM persisten durante 1-2 meses tras la infección. Los anticuerpos IgG son detectados aproximadamente 14 días tras el comienzo de la infección primaria. Las infecciones secundarias con el virus dengue, se caracterizan por un rápido incremento de los niveles de anticuerpos IgG. Debido al incremento relativamente tardío de los niveles de anticuerpos hasta una concentración que pueda ser detectada diagnósticamente, un resultado negativo de un test de detección de anticuerpos temprano en el curso de la enfermedad no es definitivo. Las muestras deberían ser recogidas al menos 7 días tras el comienzo de los síntomas para excluir la posibilidad de una infección aguda por virus dengue.

La serología es la técnica más ampliamente empleada en diagnóstico de rutina. Tradicionalmente se han usado los test de inhibición de la hemaglutinación y neutralización de virus. Los ELISAs para anticuerpos IgM e IgG son los standards para el análisis serológico de las infecciones del virus dengue, ya que son simples y permiten testar una gran cantidad de muestras.

#### FUNDAMENTO DEL MÉTODO:

Método de ELISA basado en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior la globulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo, y la que no se une es eliminada por los lavados, la

unida reacciona con el sustrato (TMB), para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

#### CARACTERÍSTICAS:

Todos los reactivos a excepción de la solución de lavado vienen listos para su uso.

Las soluciones de dilución de muestras y de conjugado están coloreadas como ayuda a la realización de la técnica.

No se precisa dilución previa de la muestra.

Los pocillos son individuales, por lo que solo se consumen tantos pocillos como pruebas se van a realizar.

#### CONTENIDO DEL KIT:

- 1 VIRCELL DENGUE PLATE: 1 placa con 96 pocillos recubiertos con antígenos de virus dengue tipo 1 cepa Hawai, tipo 2 cepa New guinea C, tipo 3 cepa H87 y tipo 4 cepa H241.
- 2 VIRCELL SERUM DILUENT: 25 ml de diluyente para sueros: tampón fosfatos con estabilizante de proteínas, con Neolone y Bronidox y coloreado de azul. Listo para su uso.
- 3 VIRCELL IgG POSITIVE CONTROL: 500 µl de suero control positivo con Neolone y Bronidox.
- 4 VIRCELL IgG CUT OFF CONTROL: 500 µl de suero cut off con Neolone y Bronidox.
- 5 VIRCELL IgG NEGATIVE CONTROL: 500 µl de suero control negativo con Neolone y Bronidox.
- 6 VIRCELL IgG CONJUGATE: 15 ml de una dilución de globulina anti-IgG humana conjugada con peroxidasa, con Neolone y Bronidox y coloreada de naranja. Lista para su uso.
- 7 VIRCELL TMB SUBSTRATE SOLUTION: 15 ml de solución de sustrato: tetrametilbenzidina (TMB). Listo para su uso.
- 8 VIRCELL STOP REAGENT: 15 ml de solución de parada: ácido sulfúrico 0,5 M.
- 9 VIRCELL WASH BUFFER: 50 ml de solución de lavado (concentrado 20x): tampón fosfatos con Tween<sup>R</sup>-20 y con Proclín 300.

Conservar entre 2 y 8°C y comprobar la fecha de caducidad.

#### Material necesario no contenido en el kit:

- Pipeta de precisión para dispensar 5 y 100 µl.
- Pipeta multicanal de precisión para dispensar 100 µl.
- Lavador de placas de ELISA.
- Incubador/baño termostatzado.
- Espectrofotómetro de placas de ELISA con filtro de 450 nm y filtro de referencia de 620 nm.
- Agua destilada.
- Alternativamente procesador automático de ELISA.

#### CONSERVACIÓN:

Conservar entre 2 y 8°C. No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad. La caducidad indicada será válida siempre que los componentes se mantengan cerrados y conservados entre 2 y 8°C.

#### CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES UNA VEZ ABIERTOS:

Componente	Estabilidad
Solución de lavado diluida (1x)	4 meses a 2-8°C
Resto de componentes	Fecha indicada en envase a 2-8°C



**ESTABILIDAD Y USO DE LOS REACTIVOS:**

Usar todos los reactivos en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas.

No permitir el secado de la placa entre los lavados y la adición de los reactivos.

La solución de sustrato es fotosensible. Evitar la exposición directa a la luz y desechar si presenta coloración azul. La solución de sustrato no debe entrar en contacto con oxidantes como soluciones de hipoclorito ni con algunos metales. Evitar el contacto con partes metálicas o componentes metálicos de equipos o instrumentos sin antes haber comprobado su compatibilidad.

Utilizar solo la cantidad de solución de lavado, sustrato, diluyente de sueros y conjugado necesarias para la realización de la prueba. No devolver a los viales el exceso sobrante.

VIRCELL, S.L. no se responsabiliza de la inadecuada utilización de los reactivos contenidos en el kit.

**RECOMENDACIONES Y PRECAUCIONES:**

- Este producto es solo para diagnóstico *in vitro* y está destinado al uso por personal sanitario cualificado.
- Usar solo componentes del kit. No mezclar los componentes de diferentes kits o fabricantes. Solo las soluciones de lavado, sustrato, parada y diluyente de sueros son compatibles con los equivalentes en otras referencias y lotes de ELISA VIRCELL.
- Utilizar puntas de pipeta diferentes y limpias para cada fase del ensayo. Utilizar solo material limpio y preferentemente desechable.
- No utilizar en caso de deterioro del envase.
- No pipetear con la boca.
- El diluyente para sueros, placa, conjugados y controles de este equipo contienen material de origen animal. Los controles contienen además material de origen humano. Aunque los sueros control del equipo son sometidos a controles de ausencia de HBsAg y anticuerpos frente a VIH y Hepatitis C, es necesario manejar los controles y muestras del paciente como potencialmente patógenos. Los pocillos contienen antígeno inactivado, no obstante, deben manejarse con precaución. Ningún método actual puede asegurar por completo la ausencia de éstos u otros agentes infecciosos. Todo el material debe ser manipulado y desechado como potencialmente infeccioso. Observe la regulación local en materia de residuos clínicos.
- Para la utilización del producto en sistemas automáticos de análisis se recomienda una evaluación previa. VIRCELL dispone de juegos de muestras para su ensayo en paralelo con el método manual. Estos juegos pueden ser solicitados con tal finalidad. Asimismo, es posible la consulta de un listado de sistemas automatizados aprobados para su utilización con la gama de productos ELISA VIRCELL.
- Durante los períodos de incubación, un adecuado sellado de las placas con la lámina adhesiva que se suministra evita la desecación de la muestra y garantiza la repetitividad de la muestra.
- Evitar el contacto de la solución de parada (ácido sulfúrico 0,5 M) con la piel o los ojos. En caso de contacto, lavar la zona inmediatamente con agua.
- Proclin 300 está incluido como conservante en la solución de lavado. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. En caso de contacto con la piel lavar con agua y jabón abundantes. Para más información, solicite la hoja de información del producto.

**TOMA DE MUESTRA:**

La sangre debe extraerse en condiciones asépticas mediante técnicas de venipuntura por personal experimentado. Se recomienda el uso de técnicas asépticas o estériles para evitar la contaminación de la muestra. Los sueros/plasmas deben mantenerse refrigerados entre 2 y 8°C si se van a procesar dentro de los 7 días siguientes a la toma, pero si el procesamiento se va a prolongar deben congelarse a -20°C, evitando las congelaciones y descongelaciones innecesarias. No utilizar muestras hiperlipémicas, hemolizadas o contaminadas. Las muestras que presenten partículas pueden ser clarificadas por centrifugación. Pueden utilizarse muestras de suero o plasma indistintamente.

**PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:**

El único reactivo que es necesario preparar con antelación a la realización de la prueba es la solución de lavado. Para ello completar hasta 1 litro con agua destilada un vial de 50 ml de solución de lavado concentrada (20x). Si aparecen cristales durante la conservación de la solución concentrada, calentar a 37°C antes de diluirlo. Una vez preparada conservar entre 2 y 8°C.

**PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO:**

- Ajustar una estufa/baño de agua a 37±1°C.
- Sacar todos los reactivos 1 hora antes de la realización del test para que alcancen la temperatura ambiente, evitando sacar la placa del envase.
- Agitar todos los componentes.
- Sacar el número de pocillos **1** necesarios para el número de muestras que se van a procesar, más otros cuatro pocillos, uno para el control positivo, uno para el control negativo y dos para el suero cut off. Colocar el resto de los pocillos en el sobre y volver a cerrarlo.
- Añadir 100 µl de diluyente de muestras **2** a todos los pocillos que se vayan a emplear. Añadir 5 µl de las muestras, 5 µl del control positivo **3**, 5 µl del suero cut off **4** (en duplicado), y 5 µl del control negativo **5** en los pocillos correspondientes. En el caso de la realización manual del método, se agitará la placa en un agitador (2 minutos) para garantizar una mezcla homogénea de los reactivos. Si no es posible asegurar esta agitación, debe hacerse una predilución de la muestra en tubo o placa añadiendo el doble del volumen de diluyente de muestras **2** y de muestra. Homogenizar con la pipeta y trasvasar seguidamente 105 µl de cada muestra ya diluida a los pocillos **1**.
- Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 45 minutos a 37±1°C.
- Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado **6**, asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.
- Añadir inmediatamente 100 µl de conjugado IgG **7** a todos los pocillos.
- Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 30 min. a 37±1°C.
- Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado **6**, asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.
- Añadir inmediatamente 100 µl de solución de sustrato **8** a todos los pocillos.



12. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, en la oscuridad.
13. Añadir inmediatamente 50 µl de solución de parada  $\otimes$  a todos los pocillos.
14. Valorar espectrofotométricamente a 450/620 nm, antes de 1 hora de acabado el ensayo.

#### CONTROL DE CALIDAD INTERNO:

Cada lote se somete a control de calidad interno antes de su liberación asegurando el cumplimiento del protocolo de validación por el usuario mediante especificaciones más estrictas. Los resultados de control final de cada lote están disponibles.

La correlación del material de control se asegura mediante ensayos paralelos frente a paneles de sueros de referencia internamente validados.

#### PROTOCOLO DE VALIDACIÓN POR EL USUARIO:

Cada ensayo debe utilizar control positivo, negativo y cut off. Su utilización permite la validación de la prueba y el equipo. Las densidades ópticas (D.O.) de los controles deben estar en los rangos siguientes. En caso contrario se desechará la prueba.

Control	D.O.
Control positivo	>0,9
Control negativo	<0,5
Control cut off	>0,55
	<1,5

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Calcular la media de las D.O. del suero cut off.

**Índice de anticuerpos= (D.O. de la muestra / media de D.O. del suero cut off) x10**

Índice	Interpretación
<9	Negativo
9-11	Dudoso
>11	Positivo

Las muestras con resultados dudosos, deben ser vueltas a analizar y/o solicitar una nueva muestra para confirmación de los resultados.

Las muestras con índices inferiores a 9 se considera que no tienen anticuerpos específicos frente a virus dengue de tipo IgG.

Las muestras con índices superiores a 11 se considera que tienen anticuerpos específicos frente a virus dengue de tipo IgG.

#### LIMITACIONES DEL MÉTODO:

1. Este método está diseñado para ser utilizado con suero/plasma humano.
2. El uso de este kit requiere la cuidadosa lectura y comprensión del folleto de instrucciones. Es necesario seguir estrictamente el protocolo para obtener resultados fiables, en particular el correcto pipeteo de muestras y reactivos, lavados y tiempos de incubación.
3. Los resultados de las muestras deben ser valorados junto con la sintomatología clínica y otros procedimientos diagnósticos. El diagnóstico definitivo debe realizarse mediante técnicas de aislamiento.
4. El test no indica el lugar de la infección. No pretende sustituir al aislamiento.
5. La ausencia de un aumento significativo en el nivel de anticuerpos no excluye la posibilidad de infección.
6. Las muestras recogidas muy pronto en el transcurso de una infección pueden no tener niveles detectables de IgG. En esos casos se recomienda realizar un ensayo para determinación de IgM u obtener una segunda muestra transcurridos entre 14 y 21 días, para ser ensayado en paralelo con la muestra original con el fin de determinar una seroconversión.
7. Los resultados obtenidos en la detección de IgG en neonatos deben ser interpretados con precaución, ya que las IgG maternas son transferidas pasivamente de la madre al feto antes del nacimiento. La determinación de IgM es mejor indicador de infección en niños menores de 6 meses.
8. Los resultados de determinación de anticuerpos de una muestra única no deben ser usados para el diagnóstico de una infección reciente. Se deben recoger muestras pareadas (aguda y convaleciente) para ser ensayadas paralelamente y determinar seroconversión o un incremento significativo en el nivel de anticuerpos.
9. Los resultados de prestaciones incluidos corresponden a estudios comparativos con equipos de referencia comerciales en una muestra poblacional definida. Pueden encontrarse pequeñas variaciones en poblaciones diferentes o con equipos de referencia distintos.

#### PRESTACIONES:

##### • SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD:

Se ensayaron 169 muestras de suero/plasma con DENGUE ELISA IgG frente a otro equipo ELISA comercial, obteniendo los siguientes resultados:

	Nº muestras	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
IgG	169	98	100
95% C.I.		93-99	94-100

C.I. Intervalo de confianza

Los valores indeterminados fueron excluidos de los cálculos finales.

##### • PRECISIÓN INTRAENSAYO:

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente 10 veces cada uno en un único ensayo realizado por el mismo operador en condiciones de trabajo idénticas, obteniendo los resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	2,20
CN	10	26,68
CO	10	4,56

C.V. Coeficiente de variación



• **PRECISIÓN INTERENSAYO:**

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente durante 5 días consecutivos y por 2 operadores diferentes, obteniendo los siguientes resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	15,59
CN	10	10,29
CO	10	1,93

C.V. Coeficiente de variación

• **REACCIÓN CRUZADA E INTERFERENCIAS:**

Se ensayaron 11 muestras caracterizadas positivas frente a otros microorganismos (cytomegalovirus, *Coxiella burnetii*, Epstein-Barr virus y Brucella).

Las muestras ensayadas dieron resultados negativos, demostrando la reacción específica del ensayo sin reacción cruzada o interferencias ocasionadas por los agentes descritos.

**SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL PRODUCTO:**

	Producto para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fecha de caducidad
	Conservar entre x-y°C
	Contiene suficiente para <n> pruebas
	Lote
	Referencia (catálogo)
	Consultar instrucciones de uso
	<X> pocillos

**BIBLIOGRAFÍA:**

- Alcon, S., A. Talarmin, M. Debruyne, A. Falconar, V. Deubel, and M. Flamand. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol* 40.
- Falconar, A. K., E. de Plata, and C. M. Romero-Vivas. 2006. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clin Vaccine Immunol* 13.

3. Matheus, S., X. Deparis, B. Labeau, J. Lelarge, J. Morvan, and P. Dussart. 2005. Use of four dengue virus antigens for determination of dengue immune status by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol* 43.

4. Wichmann, O., K. Stark, P. Y. Shu, M. Niedrig, C. Frank, J. H. Huang, and T. Jelinek. 2006. Clinical features and pitfalls in the laboratory diagnosis of dengue in travellers. *BMC Infect Dis* 6.

5. Ocazionez RE, Cortes FM, Villar LA, Gomez SY. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Nov;101(7):725-31.

6. Videá E, Coloma MJ, Dos Santos FB, Balmaseda A, Harris E. Immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant polypeptides for diagnosis of dengue. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005 Jul;12(7):882-4.

7. Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, Dussart P. Discrimination between primary and secondary dengue virus infection by an immunoglobulin G avidity test using a single acute-phase serum sample. *J Clin Microbiol*. 2005 Jun;43(6):2793-7.

8. Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 Jul;11(4):642-50.

9. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Jul;10(4):622-30.

10. Dengue diagnostics: proceedings of a joint TDR/WHO and PDVI workshop. 4-6 October 2004 | WHO/TDR | Geneva, Switzerland

11. Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. Infectious Disease Information by the National Center for Infectious Diseases, CDC. (<http://www.cdc.gov/ncidod/>)

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:

[customerservice@vircell.com](mailto:customerservice@vircell.com)

REVISADO: 2019-02-18  
L-G1018-ES-02

## Anexo 4. Inserto ELISA IgG dengue

Fuente: [https://www.vircell.com/media/INSERTS/DENGUE%20ELISA%20IgG\\_G1018\\_ES.pdf](https://www.vircell.com/media/INSERTS/DENGUE%20ELISA%20IgG_G1018_ES.pdf)





## DENV Detect™ NS1 ELISA

Para uso diagnóstico in vitro

### USO PREVISTO

El DENV Detect™ NS1 ELISA es para la detección temprana del antígeno NS1 del virus del Dengue (DENV) en suero humano. Esta prueba es para el diagnóstico de laboratorio clínico presuntivo de la infección por el virus del Dengue. Este ensayo está diseñado para su uso en pacientes con síntomas clínicos compatibles con fiebre del Dengue o fiebre hemorrágica del Dengue. Las muestras recolectadas de pacientes dentro de los siete (7) días posteriores al inicio de los síntomas clínicos deben ser evaluadas con este ensayo (día 0 a día 7). Los resultados negativos obtenidos con esta prueba no excluyen el diagnóstico de Dengue y no deben utilizarse como la única base para el tratamiento u otra decisión de manejo del paciente.

Este ensayo no está aprobado por la Administración Federal de Alimentos y Drogas de los E.E.U.U. (FDA) ni aprobado para analizar donantes de sangre o plasma.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La Fiebre del Dengue (FD) es una enfermedad viral aguda del hombre que se transmite por los mosquitos *Aedes aegypti*. La FD se caracteriza clínicamente por fiebre bifásica, erupción cutánea y depresión hematopoyética, y por síntomas constitucionales tales como malestar general, artralgia, mialgia y cefalea (1). Raramente se observa una enfermedad más grave, la que se manifiesta por fiebre hemorrágica que puede progresar a un shock letal (2, 3). Es endémica en los trópicos y subtropicales en todo el mundo, donde se producen anualmente unos 100.000.000 de casos (4). Se ha estimado que aproximadamente 50 a 100 millones de casos de FD ocurren cada año con aproximadamente 250.000 a 500.000 casos de Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD). Durante 2002, más de 30 países Latinoamericanos reportaron más de 10.000.000 de casos de FD con un gran número de casos de FHD. Esto ha sido seguido por extensas epidemias de FHD en varias partes de la India durante el período 2003-2005. En las Américas, la incidencia informada se ha más que triplicado de 1996 a 2002. La incidencia de brotes de Dengue ha sido informada en Hawái (5) y en Laredo, Texas. La proteína Dengue NS1 (no estructural) es una proteína secretada y se cree que desempeña un papel en la replicación del ARN viral. NS1 es fuertemente inmunogénico, provocando anticuerpos con actividad de fijación de los complementos. El antígeno NS1 se puede detectar en la sangre circulante durante la infección aguda por Dengue (6) (7). El DENV Detect™ NS1 ELISA puede detectar el antígeno NS1 en muestras de suero de 1 a 2 días después de la infección.

### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El DENV Detect™ NS1 ELISA es un inmunoensayo de tipo sándwich de "dos pasos" amplificado enzimáticamente para detectar niveles bajos de NS1 en el suero. En este ensayo, controles y muestras de suero desconocidas son diluidos en un tampón de dilución de muestra que contiene anticuerpos secundarios y son incubados en pocillos de microtitulación. Estos pocillos han sido recubiertos con un anticuerpo NS1 altamente efectivo y luego bloqueados. Los antígenos NS1 presentes en las muestras se "emparedan" entre los anticuerpos de captura y secundarios. La presencia del antígeno NS1 se confirma por la

respuesta colorimétrica obtenida utilizando un conjugado anticuerpo-HRP y un sustrato líquido 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (TMB). Una vez que se detiene la reacción utilizando una solución ácida, se determina el recambio enzimático del sustrato por medición de absorbancia a 450 nanómetros. Los valores obtenidos para los controles del kit sirven como pautas para determinar si una muestra contiene antígeno NS1.

### MATERIALES SUMINISTRADOS

El kit DENV Detect™ NS1 ELISA contiene suficientes reactivos para una placa de 96 pocillos (12 x 8 tiras) cada una.

**Advertencia: No utilice ningún reactivo en el que se haya producido daño en el embalaje.**

**Materiales suministrados para DENV Detect™ NS1 ELISA:**

- 1. Tiras de microtitulación recubiertas para DENV Detect NS1 ELISA:** Portatiras ELISA en una bolsa de aluminio con cierre de cremallera con desecante, que contiene 96 pocillos de microtitulación de poliestireno recubiertos con anticuerpo anti-NS1 en cada pocillo. Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
- 2. Control negativo para DENV Detect NS1 ELISA:** Un vial de 300 µl que contiene suero de control negativo inactivado por calor. El control negativo ayudará a verificar la validez del kit. Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad del kit.
- 3. Control positivo para DENV Detect NS1 ELISA:** Un vial de 300 µl que contiene NS1 recombinante en un tampón a base de fosfato con Proclin-300 al 0.05%. El control positivo ayudará a verificar la validez del kit. Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
- 4. Control de corte para DENV Detect NS1 ELISA:** Un vial de 300 µl que contiene NS1 recombinante en un tampón a base de fosfato con Proclin-300 al 0.05%. El control de corte ayudará a determinar el valor de corte para el ELISA. Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
- 5. Muestra de tampón de dilución para DENV Detect NS1 ELISA:** Una botella de 15 ml que contiene el anticuerpo secundario en un tampón basado en Tris con 0.02% -0.05% Proclin-300. Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
- 6. Conjugado 100X para DENV Detect NS1 ELISA:** Un vial de 150 µl que contiene anticuerpo policlonal marcado con peroxidasa de rábano picante en un tampón basado en Tris con Proclin-300 al 0.03% - 0.05%. Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
- 7. Diluyente conjugado para DENV Detect NS1 ELISA:** Una botella de 12 ml. Este contiene la solución diluyente para el conjugado 100X en un tampón basado en Tris con 0.01% de timerosal como conservante. El conjugado 100X es diluido directamente en esta solución. Después de diluir el conjugado 100X en esta solución, el conjugado listo para usar ahora se puede almacenar hasta 2 semanas a 2-8°C antes de desecharse. Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
- 8. Tampón de lavado 10X:** Una botella de 120 ml. Solución salina tamponada con fosfato concentrado 10X con Tween 20 (pH 6.8-7.0). Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
- 9. Sustrato TMB líquido:** Una botella de 12 ml lista para usar. Contiene 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno en un tampón de ácido cítrico.

citrato (pH 3.3-3.8). Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.

*Nota:* El sustrato debe siempre almacenarse en la botella protegida contra la luz provista.

10. **Solución de parada:** Una botella de 6 ml lista para usar ácido sulfúrico 1N. Se utiliza para detener la reacción. Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.

*Advertencia:* Ácido fuerte. Use guantes protectores, máscara y gafas de seguridad. Deseche todos los materiales de acuerdo con todas las normas y reglamentos de seguridad aplicables.

---

### MATERIALES Y EQUIPOS REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

---

- Espectrofotómetro ELISA capaz de medir la absorbancia a 450 nm
- Agua biológica o de alto grado.
- Vasos de precipitado de tamaño adecuado y barras agitadoras
- Bomba aspiradora
- Lavadora automática de placas
- Incubador a 37°C *sin suministro de CO<sub>2</sub>*
- Pipetas de canal simple de 1-10 µL, pipetas de canal simple y multicanal de 50-200 µL
- Tubos de polipropileno o placas de dilución de 96 pocillos.
- Parafilm o cubierta de placa de plástico
- Minutero
- Vórtice

---

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

---

**PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*** Es necesario comprender a fondo este prospecto para el uso exitoso del producto. Solo se obtendrán resultados confiables utilizando técnicas de laboratorio precisas y siguiendo exactamente el prospecto.

#### PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Todos los materiales de origen humano utilizados en la preparación del control negativo han resultado ser negativos para anticuerpos contra el VIH 1 y 2, la hepatitis C y el antígeno de superficie de la hepatitis B. Sin embargo, ningún método de prueba puede garantizar el 100% de eficiencia. Por lo tanto, todos los controles humanos y el antígeno deben manejarse como material potencialmente infeccioso. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades y los Institutos Nacionales de Salud recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos sean manejados en el Nivel 2 de Bioseguridad.
- Deseche los materiales peligrosos o biológicamente contaminados de acuerdo con las prácticas de su institución. Deseche todos los materiales de manera segura y aceptable y de conformidad con los requisitos reglamentarios vigentes.
- Use ropa protectora, protección ocular y guantes desechables mientras realiza el ensayo. Lávese bien las manos después.
- No coma, beba, fume o aplique cosméticos en el laboratorio donde se manipulan materiales de inmunodiagnóstico.
- No pipete con la boca.

#### PRECAUCIONES TÉCNICAS

- Esta prueba debe realizarse únicamente en suero humano. El uso de sangre entera, plasma u otras matrices de muestras no ha sido validado.

- No mezcle varios lotes de cualquier componente del kit dentro de un ensayo individual.
- **No inactivo por calor los sueros de prueba.**
- Todos los reactivos deben estar equilibrados a temperatura ambiente (20-25°C) antes de comenzar el ensayo. El ensayo se verá afectado por los cambios de temperatura.
- Evite la congelación y descongelación repetidas de las muestras de suero a evaluar.
- Dispense los reactivos directamente de las botellas utilizando puntas de pipeta limpias. La transferencia de reactivos puede resultar en contaminación.
- Los pocillos de microtitulación que no se utilicen se deben volver a sellar inmediatamente en la bolsa de aluminio con el desecante provisto. De lo contrario, se pueden producir resultados erróneos con los micropocillos no utilizados.
- No utilice ningún componente después de la fecha de vencimiento que aparece en su etiqueta.
- Evite la exposición de los reactivos al calor excesivo o a la luz solar directa durante el almacenamiento y la incubación.
- Algunos reactivos pueden formar un ligero precipitado, mezclar suavemente antes de usar.
- El lavado incompleto afectará negativamente el resultado y el rendimiento del ensayo.
- Para minimizar la posible desviación del ensayo debido a la variación en el tiempo de incubación del sustrato, se debe tener cuidado de agregar la solución de parada en los pocillos en el mismo orden y velocidad utilizados para agregar la solución TMB.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos.
- Evite la contaminación de la solución de sustrato TMB con la solución de conjugado. La solución de sustrato TMB debe ser clara en color; un cambio de color azul antes de su uso puede indicar que se ha producido contaminación.
- Use una punta de pipeta desechable limpia para cada reactivo, estándar, control o muestra.
- Cubra el área de trabajo con papel absorbente desechable.

---

### ADVERTENCIA: POTENCIAL DE MATERIAL BIOPELIGROSO

---

Este kit contiene reactivos hechos con suero o plasma humano. El suero o plasma utilizados han sido inactivados por calor a menos que se indique lo contrario. Manipule todos los sueros y kits utilizados como si contuvieran agentes infecciosos. Observe las precauciones establecidas contra los peligros microbiológicos mientras realiza todos los procedimientos y siga los procedimientos estándar para la eliminación adecuada de las muestras.

---

### PELIGRO QUÍMICO

---

Hay hojas de datos de seguridad (SDS) disponibles para todos los componentes de este kit. Revise todas las SDS apropiadas antes de realizar este ensayo. Evite todo contacto entre manos y ojos o membranas mucosas durante la prueba. Si se produce contacto, consulte la SDS correspondiente para obtener el tratamiento adecuado.

## RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Solo se debe usar suero humano para este ensayo, y se deben observar las precauciones habituales para la venopunción. La sangre obtenida por venopunción debe dejarse coagular a temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 a 60 minutos y luego centrifugarse de acuerdo con el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Directrices aprobadas por el CLSI - Procedimientos para el manejo y procesamiento de muestras de sangre para pruebas de laboratorio comunes; GP44).
- Las pruebas deben realizarse tan pronto como sea posible después de la recolección. No deje los sueros a temperatura ambiente durante períodos prolongados. El suero separado debe permanecer a 20-25°C durante no más de 8 horas. Si los ensayos no se completan en 8 horas, el suero debe refrigerarse a 2-8°C. Si los ensayos no se completan en 48 horas, o si el suero separado se va a almacenar más de 48 horas, el suero se debe congelar a -20°C o menos.
- Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras más de cuatro veces, ya que esto puede causar el deterioro del analito. Los congeladores sin escarcha no son adecuados para el almacenamiento de muestras.
- Las muestras congeladas deben descongelarse a temperatura ambiente y mezclarse bien con un remolineo suave o inversión antes de usarlas. Siempre dar un giro rápido antes de usar.
- Si los sueros deben enviarse, se deben empaquetar de acuerdo con las Regulaciones Federales que cubren el transporte de agentes infecciosos.
- No utilice sueros si se observa algún indicio de crecimiento microbiano.

## PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

**PRECAUCIÓN:** El procedimiento de prueba debe seguirse estrictamente. Cualquier desviación del procedimiento puede producir resultados erróneos. Lleve todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente (~25°C) antes de usar. Mediante una inversión suave, mezcle completamente los reactivos y las muestras antes de usarlos. **NOTA:** Para el almacenamiento a largo plazo, las muestras de suero no deben descongelarse y congelarse repetidamente más de cuatro veces. Los sueros deben dividirse en pequeñas alícuotas y almacenarse a -20°C o menos.

InBios no ha optimizado este kit para su uso con un sistema de procesamiento ELISA automatizado específico. El uso con un sistema de procesamiento ELISA automatizado requerirá una validación adecuada para garantizar que los resultados sean equivalentes a las expectativas descritas en este prospecto.

### Preparación de reactivos:

- **Preparación de tampón de lavado 1X**  
Diluya el tampón de lavado 10X a 1X utilizando agua biológica o de alto grado. Para preparar una solución de tampón de lavado 1X, mezcle 120 ml de tampón de lavado 10X con 1080 ml de agua destilada (o agua desionizada). Mezcle bien para asegurar que cualquier precipitado se disuelva y que la solución sea uniforme. Una vez diluida a 1X, la solución se puede almacenar a temperatura ambiente hasta por 6 meses. Etiquete adecuadamente la solución de tampón de lavado 1X y anote cuidadosamente la fecha de caducidad en la etiqueta. Compruebe si hay contaminación antes de usar. Deseche si se sospecha de contaminación.

- **Pocillos de tira de microtitulación**  
Seleccione el número de pocillos recubiertos necesarios para el ensayo. Los pocillos restantes sin usar se deben reempaquetar de inmediato con el desecante suministrado y almacenar a 2-8°C hasta que estén listos para usar o caduquen.
- **Preparación de la solución de conjugado**  
Agregue 120µL de conjugado 100x para el ELISA NS1 Dengue directamente a la botella de 12 ml de Diluyente conjugado NS1 para Dengue (1 parte: 100 partes). Alternativamente, use una pipeta limpia para eliminar el volumen requerido de Diluyente de conjugado y agregue el volumen necesario de Conjugado 100x para ELISA NS1 para Dengue en un tubo de ensayo de polipropileno limpio para mantener la relación 1:100. Mezcle invirtiendo la solución varias veces. *Esta solución se puede almacenar hasta 2 semanas si se almacena a 2-8°C. Después de 2 semanas, esta solución de conjugado debe desecharse y ya no debe utilizarse en este ensayo.*

### Procedimiento de ensayo:

1. Los controles positivos, negativos y de corte deben analizarse por duplicado (y ejecutarse en cada placa, cada vez que se realice un ensayo). Se pueden analizar muestras de suero desconocidas en singlete. (Sin embargo, se recomienda realizar muestras por duplicado hasta que el operador esté familiarizado con el ensayo). Se pueden analizar hasta noventa muestras de prueba en singlete con una placa completa. Vuelva a colocar inmediatamente los pocillos de la placa ELISA sin usar en el empaque original con el desecante provisto, selle adecuadamente y almacene a 2-8°C.
2. Con un pipeteador monocanal o multicanal, ponga una alícuota de 50 µL de muestra de tampón de dilución para el DENV Detect™ NS1 ELISA en cada uno de los pocillos requeridos.
3. Agregue 50µL de cada suero sin diluir (muestras de prueba y muestras de control) directamente al centro de los pocillos que contienen el tampón de dilución de la muestra. Use una punta de pipeta desechable limpia para cada muestra de control o prueba. Agite suavemente la placa con la mano 5 veces de forma lateral para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
4. Cubra la parte superior de la placa con parafilm (o cubierta de placa de plástico) y retire el exceso de parafilm de los bordes de la placa.

## CONTROL DE CALIDAD

Cada kit contiene controles positivos, negativos y de corte. Se debe obtener una capacidad de discriminación aceptable ( $R_{PCNC}$ ) para garantizar la validez del ensayo.

Los controles negativo y positivo están diseñados para monitorear si hay una falla sustancial de los reactivos. El control positivo no garantizará la precisión en el corte del ensayo. La prueba no es válida y debe repetirse si el valor ( $R_{PCNC}$ ) es demasiado bajo o si las muestras de control no cumplen con las especificaciones. Si la prueba no es válida, no se pueden utilizar los resultados. Los requisitos de control de calidad (QC) deben realizarse de conformidad con las regulaciones locales, estatales y/o federales o los requisitos de acreditación y los procedimientos estándar de control de calidad de su laboratorio. Se recomienda que el usuario consulte CLSI C24 y 42 CFR 493.1256 para obtener orientación sobre las prácticas adecuadas de control de calidad. Los resultados a continuación se proporcionan estrictamente solo con fines orientativos y aplicables únicamente para lecturas espectrofotométricas.

Primero, calcule los valores de control bruto negativo (promedio), positivo y de corte de OD<sub>450</sub> como se muestra en los siguientes ejemplos.

### *Ejemplo 1: Control Negativo NS1 Dengue*

OD <sub>450</sub>	
Replicado 1	0.108
Replicado 2	0.084
Suma	0.192

$$\text{Control negativo promedio} = 0.192 \div 2 = 0.096$$

### *Ejemplo 2: Control Positivo NS1 Dengue*

OD <sub>450</sub>	
Replicado 1	1.205
Replicado 2	1.311
Suma	2.516

$$\text{Control positivo promedio} = 2.516 \div 2 = 1.258$$

### *Ejemplo 3: Control de corte de NS1 Dengue*

OD <sub>450</sub>	
Replicado 1	0.146
Replicado 2	0.128
Suma	0.274

$$\text{Valor de corte} = \text{Promedio de Control de corte} = 0.274 \div 2 = 0.137$$

A continuación, calcule la proporción entre los controles positivo y negativo como se muestra en el siguiente ejemplo.

**Ejemplo 4: Calcule la relación de control positivo a negativo ( $R_{PCNC}$ )**

$R_{PCNC}$  = Promedio de Control Positivo ÷ Promedio Control negativo

$$R_{PCNC} = 1.258 \div 0.096 = 13.10$$

Finalmente, verifique que se cumplan los requisitos de control de calidad, que se enumeran en la tabla a continuación.

**Requisitos de control de calidad**

Control	Requisito
Control positivo	OD $\geq$ 0.5
Control negativo	OD $<$ 0.2
Control de corte	OD $>$ Control negativo
$R_{PCNC}$	$\geq$ 8.00

**Resumen:**

Se deben obtener los resultados en la tabla anterior para que el ensayo se considere válido. El incumplimiento de estos criterios es una indicación de deterioro de los reactivos o un error en el procedimiento de prueba y el ensayo debe repetirse.

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

El valor de corte del ensayo se determinó probando ciento cuarenta y tres muestras de (143) Dengue positivo y treinta y siete (37) muestras de Dengue negativo mediante RT-PCR con el DENV *Detect*<sup>TM</sup> NS1 ELISA. Los valores de OD en bruto y el estado de la muestra se utilizaron para generar las curvas ROC. El corte de ISR óptimo se definió de modo que se asignara la misma ponderación tanto a la especificidad como a la sensibilidad. Se aplicó un método de arranque rudimentario para minimizar el sesgo por cualquier posible valor atípico en el conjunto de muestra.

El estado de la muestra desconocida se determinó calculando primero el corte del ensayo (que se muestra arriba en el Ejemplo 3), y luego calculando la relación de la densidad óptica (OD<sub>450</sub>) dividida por el corte.

**Calcular la relación de estado inmune (ISR):** La relación de estado inmune (ISR) se calcula a partir de la relación de la densidad óptica (OD) obtenida con la muestra de prueba dividida por el valor de corte calculado. Calcule el ISR para cada muestra de prueba. Si las muestras desconocidas se analizaron por duplicado, calcule la densidad óptica promedio (OD<sub>450</sub>) antes de dividir por el corte para determinar el ISR.

**Ejemplo 5: Calcule el ISR para una muestra**

OD<sub>450</sub>

Muestra Desconocida #1	0.431
------------------------	-------

Valor ISR = OD<sub>450</sub> bruto ÷ Valor de corte

$$\text{Valor ISR} = 0.431 \div 0.137 = 3.15$$

**TABLA DE INTERPRETACIÓN DE MUESTRA**

<u>Valor ISR</u>	<u>Resultados</u>	<u>Interpretación</u>
$\geq 1$	Positivo	Presencia de antígeno detectable NS1 del Dengue. Los resultados deben ser confirmados por RT-PCR o por un ensayo serológico. Consulte las pautas más recientes del CDC para el diagnóstico de esta enfermedad.
0.9-1.1	Volver a probar	Si se prueban en singlete, los sueros con valores de OD cercanos al valor de corte ( $0.9 < \text{ISR} < 1.1$ ) deben repetirse por duplicado junto con los controles para verificar el estado de la muestra. Si el valor ISR promedio de la prueba de repetición por duplicado es $\geq 1$ , la muestra debe considerarse positiva para el antígeno NS1 del Dengue. Si el valor ISR promedio de la prueba duplicada es $< 1$ , la muestra debe considerarse negativa para el antígeno NS1 del Dengue.
$< 1$	Negativo	No hay antígeno detectable NS1 de Dengue y el individuo no parece estar infectado recientemente con el virus del Dengue. El resultado no descarta la posibilidad de infección por el virus del Dengue. La muestra debe analizarse con RT-PCR u otros ensayos serológicos si se dispone de muestras pareadas (agudas/convalecientes).

---

**LIMITACIONES**

---

- Todas las muestras reactivas deben confirmarse mediante PCR o un ensayo serológico. Revise la información más reciente sobre el diagnóstico en el sitio web del CDC: [www.cdc.gov/dengue/clinicalLab/laboratory.html](http://www.cdc.gov/dengue/clinicalLab/laboratory.html).
- La reactividad cruzada con malaria y sífilis no se ha evaluado con este ensayo.
- Las características de rendimiento del ensayo no se han establecido para la determinación del resultado visual.
- Las características de rendimiento del ensayo no se han establecido para matrices distintas del suero.
- No se han establecido las características de rendimiento del ensayo para la prueba de sangre del cordón umbilical, la prueba de neonatos, la detección prenatal o la detección de la población general.
- Pueden surgir falsos negativos de pacientes coinfectados con hepatitis B o con VIH.
- Para el análisis con este ensayo deben evitarse muestras que contengan niveles altos de triglicéridos o muestras hemolizadas.
- HAMA no muestra los resultados positivos falsos, pero puede reducir los valores de ISR para muestras positivas.
- Los resultados de pacientes inmunodeprimidos deben interpretarse con cautela.
- Los resultados del ensayo deben interpretarse solo en el contexto de otros resultados de laboratorio y el estado clínico total del paciente.

---

---

**VALORES ESPERADOS**

---

---

**Población endémica**

Se recolectaron prospectivamente muestras de suero de 505 pacientes que mostraban signos y síntomas característicos de infecciones por Dengue en Colombia, Argentina y Sri Lanka. Estas muestras se recolectaron dentro de los 7 días (inclusive) después del inicio de los síntomas clínicos. Las reactividades del DENV *Detect*<sup>TM</sup> NS1 ELISA con esta población endémica se muestran en la Tabla 1 a continuación.

**Tabla 1:** Resultados esperados de una región endémica con individuos que muestran síntomas de Dengue

Resultados DENV <i>Detect</i> <sup>TM</sup> NS1 ELISA					
<i>Edad (años)</i>	<i># Masculino</i>	<i># Femenino</i>	<i>No reactivo</i>	<i>Reactivo</i>	<i>% Reactivo</i>
<i>0-10</i>	68	60	109	19	14.8%
<i>11-20</i>	45	37	50	32	39.0%
<i>21-30</i>	36	38	48	26	35.1%
<i>31-40</i>	47	42	51	38	42.7%
<i>41-50</i>	22	28	26	24	48.0%
<i>51-60</i>	14	31	26	19	42.2%
<i>61-70</i>	9	16	15	10	40.0%
<i>71-80</i>	4	5	9	0	0.0%
<i>81-90</i>	1	1	1	1	50.0%
<i>91-100</i>	0	1	1	0	0.0%
<i>Total</i>	246	259	336	169	33.5%

#### Estudio de interferencia microbiana

Las muestras fueron evaluadas para estimar la interferencia microbiana en presencia del virus del Dengue. Se evaluaron cincuenta y ocho muestras positivas con carga viral que dieron positivo para otros patógenos cruzados potencialmente reactivos, así como cuarenta y dos muestras artificiales que consistían de microorganismos cultivados diluidos en sueros humanos normales. Las muestras fueron luego enriquecidas con el virus del Dengue cultivado (ISR 2.0-3.2) justo antes de las pruebas con DENV *Detect*<sup>TM</sup> NS1 ELISA. Las tablas a continuación brindan un resumen de los resultados de este estudio.

**Tabla 8:** Interferencia microbiana de DENV *Detect*<sup>TM</sup> NS1 ELISA con especímenes clínicos positivos

Enfermedad	# Muestras	# Positivo	# Negativo
Virus del Nilo Occidental	18	18	0
VHB	10	7	3
VHC	10	10	0
VIH (Carga Viral +)	10	8	2
EIA VIH positivo	5	5	0
Lupus eritematoso sistémico (LES)	5	5	0
Total	58	53	5

**Tabla 9:** Interferencia microbiana de DENV *Detect*<sup>TM</sup> NS1 ELISA con muestras enriquecidas

Enfermedad	# Muestras	# Positivo	# Negativo
Virus del Nilo Occidental	3	3	0
Virus de la encefalitis japonesa	3	3	0
Virus del Zika	3	3	0
Virus de la fiebre amarilla	3	3	0
Virus del Chikungunya	3	3	0
HSV-1 y -2	6	6	0
Rubéola	3	3	0
EBV	6	6	0
CMV	3	3	0
VZV	3	3	0
Leptospira	3	3	0
<i>Borrelia burgdorferi</i> (Lyme)	3	3	0
Total	42	42	0

#### Estudio de sustancias interferentes

La interferencia por sustancias endógenas en la prueba DENV *Detect*<sup>TM</sup> NS1 ELISA se evaluó utilizando un panel de cuatro especímenes clínicos simulados (un espécimen fuertemente positivo, dos especímenes débilmente positivos y un espécimen negativo). Las sustancias interferentes en los niveles indicados se analizaron como se describe en CLSI EP07-A2. No hubo inhibición en las siguientes concentraciones de interferentes que fueron probados.

**Tabla 10:** Estudio de sustancias interferentes endógenas

Interferente	Concentraciones probadas
Bilirubina	0.02 mg/ml
Triglicéridos	30 mg/ml
Hemoglobina	0.16 mg/ml
Colesterol	5 mg/ml
HAMA	46 ng/ml



---

## REFERENCIAS

---

1. Monath T.P., Flaviviruses. En: Fields, B. N. et al. Fields Virology, 2nd ed. Vol 1, New York: Raven Press, 1990, p. 763-814.
2. Dongmei, H., Biao, D., Xixia, D., Yadi, W., Yue, C., Yuxian, P., Xiaoyan, C. (2011). Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in Dengue type 1 primary infection. *Virology*, 8, 47.
3. Effler, P., y Halstead, S. (1982). Immune enhancement of viral infection. *Progress in Allergy*, 31, 301-64.
4. Gubler, D. (1998). Dengue and Dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*, 11, 480.
5. Halstead, S. (2003). Neutralisation and antibody-dependent enhancement of Dengue viruses. *Advances in Virus Research*, 60, 421-67.
6. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. (2002). High circulating levels of the Dengue virus nonstructural protein NS1 early in Dengue illness correlate with the development of Dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.*, 186(8), 1165-8.
7. Pang, L., Kitsutani, P., Vorndam, V., Nakata, M., Ayers, T., Elm, J., Gubler, D. (2005). Equipo de investigación de brotes de Dengue en Hawaii. *Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. Emerg Infect Dis*, 11(5), 742-9.



InBios International, Inc.  
307 Westlake Ave. North, Suite 300  
Seattle, WA 98109 USA  
Teléfono gratuito EE.UU.- 1-866-INBIOS1  
206-344-5821 (Internacional)  
[www.inbios.com](http://www.inbios.com)

REF Cat. No.: DNS1-1  
Inserto Parte No.: 900230-00  
Fecha efectiva: 11/21/2018



CEpartner4U  
Esdoornlaan 13, 3951 DB Maarn.  
Países Bajos.  
[www.cepartner4u.eu](http://www.cepartner4u.eu)

IVD

*Este producto está cubierto por uno o más de los Nos. de Patente de EE.UU. 6,870,032 y 7,282,341, usado bajo licencia del Institut Pasteur.*



### Anexo 5. Inserto ELISA NS1

Fuente: <http://i8sit3w4v3z1h99oi1gmr61-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2016/05/LBL-0096-00-IVD-DENV-Detect-NS1-ELISA-Product-insert-Spanish.pdf>



## Instrucciones de uso

**RealStar®**

**Dengue RT-PCR Kit 2.0**

01/2017 ES

**RealStar®**

# RealStar®

## Dengue RT-PCR Kit 2.0

Para utilizar con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)  
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)  
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)  
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)  
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)  
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)  
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)  
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

CE

IVD

REF 282013

Σ 96

01 2017

altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

MAN-282010-ES-301

**Contenido**

1. <b>Uso indicado</b> .....	6
2. <b>Componentes del kit</b> .....	6
3. <b>Almacenamiento</b> .....	6
4. <b>Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados</b> .....	7
5. <b>Información general</b> .....	8
6. <b>Descripción del producto</b> .....	9
6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real.....	11
7. <b>Advertencias y precauciones</b> .....	11
8. <b>Procedimiento</b> .....	13
8.1 Preparación de las muestras .....	13
8.2 Preparación de la Master Mix .....	14
8.3 Preparación de la reacción .....	16
9. <b>Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real</b> .....	17
9.1 Configuración .....	17
9.2 Detectores de fluorescencia .....	17
9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia .....	18
10. <b>Análisis de datos</b> .....	18
10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas .....	18
10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas .....	18
10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas .....	19
10.2 Interpretación de los resultados .....	19
10.2.1 Análisis cualitativo.....	19

11. <b>Evaluación de rendimiento</b> .....	20
11.1 Sensibilidad analítica .....	20
11.2 Especificidad analítica.....	22
11.3 Precisión .....	23
12. <b>Limitaciones</b> .....	24
13. <b>Control de calidad</b> .....	25
14. <b>Servicio técnico</b> .....	25
15. <b>Bibliografía</b> .....	25
16. <b>Marcas comerciales e información legal</b> .....	26
17. <b>Explicación de los símbolos</b> .....	27

### 1. Uso indicado

El RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa del ARN específico del virus del dengue (DEN).

### 2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen [µl/vial]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	Positive Control	1	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

### 3. Almacenamiento

- El RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deben llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento del producto. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

6

### 4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento adecuado de PCR en tiempo real (ver capítulo 6.1, Instrumentos de PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico adecuados
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Centrífuga con rotor para placas de microtitulación, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos adecuadas o tubos de reacción con el material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtro (desechables)
- Guantes sin talco (desechables)

#### NOTA

**i**

Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

**i**

Se recomienda encarecidamente utilizar el rotor de 72 pocillos con los tubos de reacción de 0,1 ml adecuados, si se utiliza el Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o el Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

7

## 5. Información general

El virus del dengue (DEN) pertenece a la familia *Flaviviridae*. Se conocen cuatro serotipos (DEN 1-4). El genoma del ARN del DEN es monocatenario y tiene polaridad positiva [(+)ARNss, por sus siglas en inglés]. Los genes se encuentran todos en un solo segmento de unos 11 kb de longitud. Los extremos 5' y 3' del genoma contienen secuencias específicas que permiten la síntesis de proteína y la traslación directa por ribosomas huéspedes sin adición de caperuza (conocido también por su término en inglés: capping). Los flavivirus son virus con envoltura con un diámetro de unos 50 nm. La proteína E de la envoltura viral media en la unión de receptores y es el principal antígeno reconocido por el sistema inmunológico del huésped. Tras la entrada de la partícula vírica en la célula, tienen lugar la replicación y la transcripción en el citoplasma de la célula huésped sin fases intermitentes dentro del núcleo. Durante este proceso, se producen tres proteínas estructurales (E, M y C) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). La liberación de las partículas víricas maduras se realiza tras el ensamblaje con el retículo endoplásmico y se transporta a través del complejo de Golgi hacia la superficie celular.

El virus del dengue se transmite por vectores artrópodos (principalmente *Aedes aegypti* y *A. albopictus*). Hay un ciclo de vida urbano y uno selvático. El primero implica únicamente a humanos y mosquitos; el segundo, a animales salvajes y mosquitos, principalmente. Rara vez se dan infecciones humanas a través de cepas de ciclos selváticos. Los cuatro serotipos pueden encontrarse en regiones tropicales de todo el mundo en las que esté presente el vector. Tras la infección por DEN el período de incubación es de 3 a 14 días. La enfermedad comienza con fiebre, malestar general y dolor en músculos y articulaciones. El 80 % de las infecciones son bastante leves y el transcurso no suele presentar complicaciones. En algunos pacientes, la enfermedad es más grave y en ocasiones puede amenazar la vida. El huésped humano desarrolla inmunidad protectora al serotipo que provocó la infección. En contraste, las infecciones secundarias con otros serotipos pueden provocar una enfermedad más grave. Una posible explicación mecanicista de este fenómeno podría ser la entrada mejorada mediada de anticuerpos en células inmunes en las que el virus puede replicarse.

Esto hace que desarrollar una vacuna resulte particularmente complicado y, hasta el momento, ninguna vacuna experimental ha superado todos los ensayos clínicos. No se dispone de medicación específica y el cuidado del paciente se centra en el tratamiento de los síntomas. La detección directa de los virus es posible en la mayoría de pacientes durante la primera semana desde la aparición de los síntomas. RT-PCR en tiempo real y detección de antígenos (NS1) son métodos sensibles. Siguiendo la fase virémica, podrán detectarse IgM e IgG. En muchos países, la fiebre del dengue es una enfermedad de notificación obligatoria y debe registrarse ante la autoridad responsable.

### NOTA



**Debido a la evolución molecular relativamente rápida de los virus de ARN, hay un riesgo inherente para cualquier sistema de análisis basado en RT-PCR de que la acumulación de mutaciones con el tiempo pueda provocar resultados de falsos negativos.**

## 6. Descripción del producto

El RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa del ARN específico del virus del dengue (DEN). El test incluye un sistema de amplificación heterólogo (Control interno) para identificar una posible inhibición de RT-PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología de RT-PCR utiliza la transcriptasa inversa (RT) para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias diana específicas y sondas específicas para detectar el ADN amplificado. Las sondas están marcadas con fluorocromos (reporter) y captore de fluorescencia (quencher)

Las sondas específicas para el ARN de DEN están marcadas con el fluorocromo FAM™. La sonda específica para el Control interno está marcada con el fluorocromo JOE™.

El uso de sondas unidas a diferentes fluorocromos permite la detección paralela del ARN específico de DEN y del Control interno en los canales de detección correspondientes del instrumento de PCR en tiempo real.

El cebador y las sondas del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se basan en alineamientos de secuencias actuales (2010) de los 4 subtipos del virus del dengue (1-4), lo que permite la detección de ARN (análisis) de esos subtipos, pero no la diferenciación (tipificación) de esos subtipos.

Pero, debido a la alta sensibilidad de la prueba diagnóstica *in vitro* del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0, las muestras con positivo muy bajo podrían no contener suficiente ARN para la subtipificación.

El test consta de tres procesos en un solo tubo:

- Transcripción inversa del ARN diana y del Control interno en ADNc
- Amplificación de PCR de objetivo y Control interno en ADNc
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se compone de:

- Dos reactivos Master (Master A y Master B)
- Control interno
- Control positivo
- Agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, transcriptasa inversa, ADN polimerasa, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la transcripción inversa, la amplificación mediante la PCR y la detección del ARN específico de DEN, y el Control interno en una configuración de reacción.

## 6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se desarrolló y se validó para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

## 7. Advertencias y precauciones

Lea las instrucciones de uso detenidamente antes de utilizar el producto.

- Antes del primer uso, compruebe los siguientes puntos respecto al producto y sus componentes:
  - Integridad
  - Si está completo en cuanto a número, tipo y volumen (ver capítulo 2. Componentes del kit)
  - Etiquetaje correcto
  - Si está congelado al llegar
- El uso de este producto está limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras deben tratarse siempre como si fueran infecciosas o biopeligrosas conforme a los procedimientos de seguridad en el laboratorio.

- Utilice guantes protectores desechables sin talco, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (DNasas/RNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de DNasas/RNasas con barreras de aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin talco cuando manipule los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas para (i) la preparación de las muestras, (ii) la configuración de reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de manera unidireccional. Utilice siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de acceder a un área distinta.
- Utilice suministros y equipamiento en cada área de trabajo separada y no los translade de un área a otra.
- Almacene el material positivo o presuntamente positivo separadamente de todos los demás componentes del kit.
- No abra los tubos o placas de reacción después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- Pueden utilizarse controles adicionales utilizando de acuerdo con las pautas o requisitos de las regulaciones locales, estatales y/o federales, o de organizaciones de acreditación.
- No esterilice en el autoclave los tubos de reacción después de la PCR, ya que no degradará el ácido nucleico amplificado y conllevará el riesgo de contaminar la zona del laboratorio.
- No utilice componentes del kit cuya fecha de caducidad.
- Descarte muestras y residuos del test conforme a las regulaciones locales de seguridad.

## 8. Procedimiento

### 8.1 Preparación de las muestras

El ARN extraído es el material inicial para el RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0.

La calidad del ARN extraído tiene una repercusión fundamental en el rendimiento del test. Debe garantizarse que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología de PCR en tiempo real. Los siguientes kits y sistemas son adecuados para la extracción de ácido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

También pueden resultar adecuados sistemas alternativos de extracción de ácido nucleico.

La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 debe validarla el usuario.

Si utiliza un procedimiento de preparación de muestras basado en centrifugación (spin column, en inglés) que incluya tampones de lavado que contengan etanol, se recomienda encarecidamente seguir un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17 000 x g (~13 000 rpm), utilizando un tubo de recogida nuevo, antes de la elución del ácido nucleico.



**PRECAUCIÓN**

*Si su sistema de preparación de pruebas utiliza tampones de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor de la PCR en tiempo real.*



*El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.*

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de muestras, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

**8.2 Preparación de la Master Mix**

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse completamente, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 contiene un Control interno heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de RT-PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de RT-PCR.

- ▶ Si se utiliza el Control interno como control de inhibición de RT-PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de muestras, prepare la Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (Control interno)	1 µl	12 µl
<b>Volumen de Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- ▶ Si se utiliza el Control interno como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de RT-PCR, añada el Control interno durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el Control interno **no debe** añadirse directamente a la muestra. El Control interno debe añadirse siempre a la mezcla de muestra y tampón de lisis. El volumen del Control interno que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de tampón de elución o agua, deberán añadirse 6 µl de Control interno por muestra a la mezcla de muestra/tampón de lisis.
- ▶ Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación de muestras, configure la Master Mix conforme al siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
<b>Volumen de Master Mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

**PRECAUCIÓN**

*Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación, al menos el control negativo debe incluir el Control interno.*



*Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el Control interno directamente a la muestra.*

### 8.3 Preparación de la reacción

- ▶ Pipetee 20 µl de la Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos o un tubo de reacción óptica.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
<b>Volumen total</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Asegúrese de que al menos se utilicen un control positivo y uno negativo por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las muestras y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una lámina adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrífuga con un rotor de placa de microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

### 9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real

Para obtener información básica sobre la preparación y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para obtener instrucciones detalladas para la programación en relación con el uso del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 en instrumentos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

#### 9.1 Configuración

- ▶ Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	Ninguno

#### 9.2 Detectores de fluorescencia

- ▶ Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
ARN específico de DEN	DEN	FAM™	(Ninguno)
Internal Control (Control interno)	IC	JOE™	(Ninguno)

### 9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

► Defina el perfil de temperatura y la detección de fluorescencia:

	Fase	Ciclo Repeticio-nes	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturalización	Retención	1	-	95	02:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	0:15
			sí	55	0:45
			-	72	0:15

## 10. Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 en diferentes instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

### 10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

#### 10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas

Para que una serie de pruebas diagnósticas sea **válida**, deben cumplirse las siguientes condiciones de control:

Id. de control	Canal de detección	
	FAM™	JOE™
Control positivo	+	+/-*
Control negativo	-	+

\* La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ no es relevante para la validez de la prueba.

#### 10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas

Una serie de pruebas diagnósticas es **no válida**(i) si la serie no se ha completado o (ii) si no se cumple cualquiera de las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas **válida**.

En caso de que obtenga una serie de pruebas diagnósticas **no válida**, repita las pruebas utilizando el resto de ácidos nucleicos purificados o empiece de nuevo con las muestras originales.

## 10.2 Interpretación de los resultados

### 10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección		Interpretación del resultado
FAM™	JOE™	
+	+*	Se ha detectado ARN específico de DEN.
-	+	No se ha detectado ARN específico de DEN. La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico de DEN.
-	-	Inhibición de la RT-PCR o fallo del reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.

\* La detección del Control interno en el canal de detección JOE™ no es necesaria para resultados positivos en el canal de detección FAM™. Una carga alta de ARN de DEN en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

## 11. Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se realizó utilizando una serie de ARN transcrito cuantificado *in-vitro*.

### 11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (límite de detección; en inglés Limit of Detection, LoD) del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se define como la concentración (copias por  $\mu$ l del eluido) de moléculas de ARN específico de DEN que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de la serie de diluciones de ARN cuantificado transcrito *in vitro*.

Tabla 1: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ARN de DEN serotipo 1

Conc. [copias/ $\mu$ l]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,622	12	12	100
10,000	18	18	100
3,162	18	17	94
1,000	18	7	39
0,500	18	4	22
0,316	18	6	33
0,100	18	0	0
0,032	18	1	6

Tabla 2: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ARN de DEN serotipo 4

Conc. [copias/ $\mu$ l]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
10,000	18	18	100
3,162	18	18	100
1,000	18	18	100
0,500	18	14	78
0,316	18	16	89
0,100	18	9	50
0,032	18	1	6
0,010	12	0	0
0,003	12	0	0

La sensibilidad analítica del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ARN de DEN serotipo 1 de, la sensibilidad analítica es de 4,7 copias/ $\mu$ l [95 % de intervalo de confianza (CI): 2,76 - 13,55 copias/ $\mu$ l]
- Para la detección de ARN de DEN serotipo 4, la sensibilidad analítica es de 0,7 copias/ $\mu$ l [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,44 - 1,48 copias/ $\mu$ l]

## 11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se garantiza mediante la selección exhaustiva de los oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se comprobaron mediante un análisis de comparación con secuencias disponibles públicamente para asegurar que se detectarán todos los genotipos relevantes de DEN.

La especificidad analítica del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se evaluó probando diferentes ADN/ARN genómicos extraídos de otros flavivirus, otros patógenos de transmisión sanguínea y patógenos que provocan síntomas similares.

El RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Virus de la hepatitis A
- Virus de la hepatitis C
- Virus de la hepatitis E
- Virus del Nilo Occidental
- Virus de la fiebre amarilla
- Virus Usutu
- Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
- Virus de la encefalitis del valle del Murray
- Virus de la encefalitis japonesa
- Virus del Zika

## 11.3 Precisión

La precisión para el RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se determinó como variabilidad de intratest (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad de intertest (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). La variabilidad total se calculó combinando los tres análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación, basándose en valores de ciclo de umbral de ( $C_t$ ). Se analizaron al menos seis replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote.

Tabla 3: Datos de precisión para la detección específica del ARN de DEN

DEN	Ciclo de umbral medio ( $C_t$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	35,89	0,16	0,44
Variabilidad intertest	35,88	0,15	0,40
Variabilidad interlote	35,59	0,33	0,93
Variabilidad total	35,69	0,31	0,88

Tabla 4: Datos de precisión para la detección del Control interno

Control interno	Ciclo de umbral medio ( $C_t$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	29,66	0,14	0,47
Variabilidad intertest	30,38	0,77	2,52
Variabilidad interlote	30,43	0,71	2,34
Variabilidad total	30,17	0,69	2,29

## 12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se limita a personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que esta test tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que esta prueba tenga un rendimiento óptimo.
- Esta el test no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben llevarse a cabo métodos adecuados de extracción de ácido nucleico antes de utilizar esta prueba de valoración.
- La presencia de inhibidores de la RT-PCR (p.ej. heparina) puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones diana del genoma de DEN cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar fallos al detectar la presencia del patógeno.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

## 13. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

## 14. Servicio técnico

Si necesita asesoramiento técnico, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico:

E-mail: [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)  
Teléfono: +49-(0)40-5480676-0

## 15. Bibliografía

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise y David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10.ª edición. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G. y Steven M. Opal. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.

## 16. Marcas comerciales e información legal

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIAasymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

No debe considerarse que los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso aunque no se marquen específicamente como tales, carecen de protección legal.

El RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.

Producto sin licencia con Health Canada y sin autorización ni aprobación de la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; reservados todos los derechos.

## 17. Explicación de los símbolos

	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de producto
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

## Anexo 6. Inserto PCR dengue

Fuente: [https://www.altona-diagnostics.com/files/public/Content%20Homepage/-%2002%20RealStar/MAN%20-%20CE%20-%20ES/RealStar%20Dengue%20RT-PCR%20Kit%202.0\\_WEB\\_CE\\_ES-S01.pdf](https://www.altona-diagnostics.com/files/public/Content%20Homepage/-%2002%20RealStar/MAN%20-%20CE%20-%20ES/RealStar%20Dengue%20RT-PCR%20Kit%202.0_WEB_CE_ES-S01.pdf)