



# DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE PRUEBAS RÁPIDAS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL DENGUE

López Guzmán Sergio <sup>1</sup>, Gaóna Hernández Liliana <sup>2</sup>, Jiménez Fajardo Silvia <sup>3</sup>, Orozco Ortiz Ana Patricia <sup>4</sup>

Laboratorio Estatal De Salud Pública Del Estado De Michoacán<sup>1</sup> [virologialesp@hotmail.com](mailto:virologialesp@hotmail.com)  
Universidad Tecnológica De Morelia<sup>1</sup> [apoo\\_21@hotmail.com](mailto:apoo_21@hotmail.com)

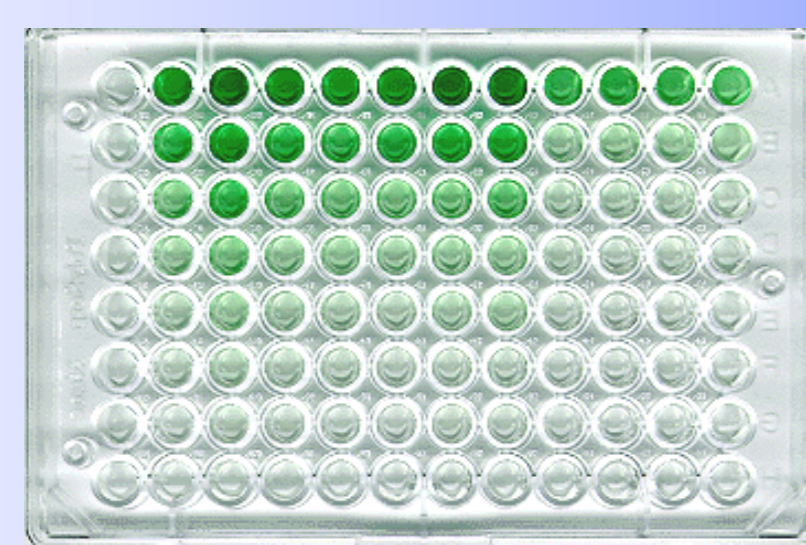
## RESUMEN

El Dengue es una enfermedad febril aguda de origen viral causada por cualquiera de los 4 serotipos del complejo Dengue los cuales se denominan, Dengue 1 (Den-1), Dengue 2 (Den-2), Dengue 3 (Den-3) y Dengue-4 (Den-4). Estos se transmiten al hombre a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, dando lugar a la infección. Se estima que entre 50 y 100 millones de casos de Dengue ocurren cada año en el mundo, de las cuales 250,000-500,000 casos desarrollan el cuadro severo de la enfermedad y alrededor de 25,000 fallecen.



El Virus del Dengue desencadena síntomas que de no ser tratados podría ser mortales o súmamente peligrosos para la salud. El aumento en México en el año 2012 se notó un incremento del 275% a nivel nacional.

Se realizaron las pruebas rápidas para el diagnóstico de Dengue a 100 muestras de suero sanguíneo de pacientes con posible caso de Fiebre por Dengue (FD) y Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD). Estas pruebas fueron confirmadas con inmunoensayos ELISA de captura de anticuerpos IgM e IgG contra Dengue, las cuales concordaban en un 82% mientras que el 18% discrepaban del resultado confirmatorio por el inmunoensayo ELISA de captura.



Los cálculos para la determinación de sensibilidad y especificidad de las pruebas rápidas arrojaron un 77.1% en sensibilidad y otro 87.8% de especificidad que de acuerdo a el Procedimiento para la Aplicación del Nuevo Algoritmo por Laboratorio de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue, que establece el Instituto de Referencia Epidemiológica (InDRE) y la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLS), un porcentaje aceptable para este diagnóstico debe alcanzar 70% de especificidad y sensibilidad.

## INTRODUCCIÓN

El mosquito transmisor del Dengue, *Aedes aegypti*, es un ejemplo de adaptación de una especie al ámbito humano, con criaderos, hábitats, fuente de alimentación y desplazamiento activos y pasivos ligados al entorno domiciliario. El reto principal para la prevención y control del Dengue en México, es hacer más eficientes las acciones anticipatorias en todos los estados del país para evitar la aparición de brotes y en su caso, atenderlos de forma oportuna y evitar su dispersión. Aunque la enfermedad depende de la presencia y abundancia de los mosquitos (vectores). La enfermedad está condicionada en buena medida a la distribución del *Aedes aegypti*, que se reproduce en las viviendas de prácticamente todas las zonas urbanas del área de riesgo en México.



(Larva de mosquito *Aedes aegypti*)



(criadero de mosquitos)

## OBJETIVO

Determinar la sensibilidad y la especificidad de las pruebas rápidas en comparación con los inmunoensayos ELISA de Captura de Anticuerpos IgM e IgG para el diagnóstico del virus del Dengue.

## METODOLOGÍA

### Metodología para ELISA de Captura IgM/IgG Anti-Dengue

1. En una gradilla con tubos de ensayo, depositar 1000 µl de "Sample Diluent" a cada tubo y diluir 10 µl de las muestras y controles respectivamente en cada tubo
2. Tomar 100 µl de las diluciones anteriores de cada tubo y pasar a cada pozo respectivamente en la placa y en orden.
3. Incubar por una hora a 37°C en cámara húmeda.
4. Preparar la Solución Sustrato B: para una tira de pozos se realiza la siguiente preparación, (si se tienen más de una tira hacer los cálculos pertinentes): En un tubo de ensayo depositar 2500 µl de "Antigen Diluent" y adicionar 10 µl de "Dengue Antigen 1-4", mezclar perfectamente. Tomar 500 µl de la solución "Antigen Diluent" + "Dengue Antigen 1-4", y depositar en otro tubo limpio. Tomar el mismo volumen de "MAb trece" y depositar en el tubo con los 500 µl que se han depositado. Mezclar y etiquetar. Esperar a que se cumpla la hora de incubación.
5. Una vez transcurrida la hora de incubación, la placa se lava 6 veces con una solución de lavado "Wash Buffer 20X" para IgM, que está a una concentración de 5%: Agregar a cada uno de los pozos de la placa; 180 µl de la solución de lavado y repetir esta operación hasta completar 6 lavados. Posteriormente se seca con papel absorbente para eliminar el exceso de la solución de lavado, sin tocar dentro de los pozos.
6. Se depositan en cada pozo, 100 µl de "Solution Sustrato B" preparado anteriormente.
7. Se deja incubar por una hora a 37°C en cámara húmeda.
8. Una vez transcurrida la hora, la placa se vuelve a lavar 6 veces, se depositan 180 µl por cada lavado, hasta completar 6 lavados con Solución de Lavado al 5%. Posteriormente se seca con papel absorbente para retirar residuos de la solución de lavado.

9. Se agrega a cada pozo 100 µl de solución "TMB Cromogen" listo para usarse.
10. Se deja incubando 10 minutos en una cámara oscura.
11. Una vez transcurridos los 10 minutos, se adicionan 100 µl de solución de paro "Stop Solution 1M Phosphoric Acid" listo para usar.
12. Se procede a leer en el Lector ELISA a 450 Nanómetros (nm), en los primeros 30 minutos de haber adicionado la solución de paro.
13. Se procede a realizar los cálculos necesarios para obtener el resultado de la prueba. Y la validación del proceso.

### Metodología para Realizar la Prueba Rápida de Inmuncromatografía en Fase Sólida.

Dejar que los componentes y las muestras estén a temperatura ambiente.

Tomar 10 µl de la muestra (plasma sanguíneo o sangre total) y depositarlos en el cuadro marcado con una "S".

Agregar 4 gotas (de 90 a 120 µl) del diluyente de ensayo en el pozo de forma redonda.

Esperar de 15 a 20 minutos para interpretar resultados.

## RESULTADOS

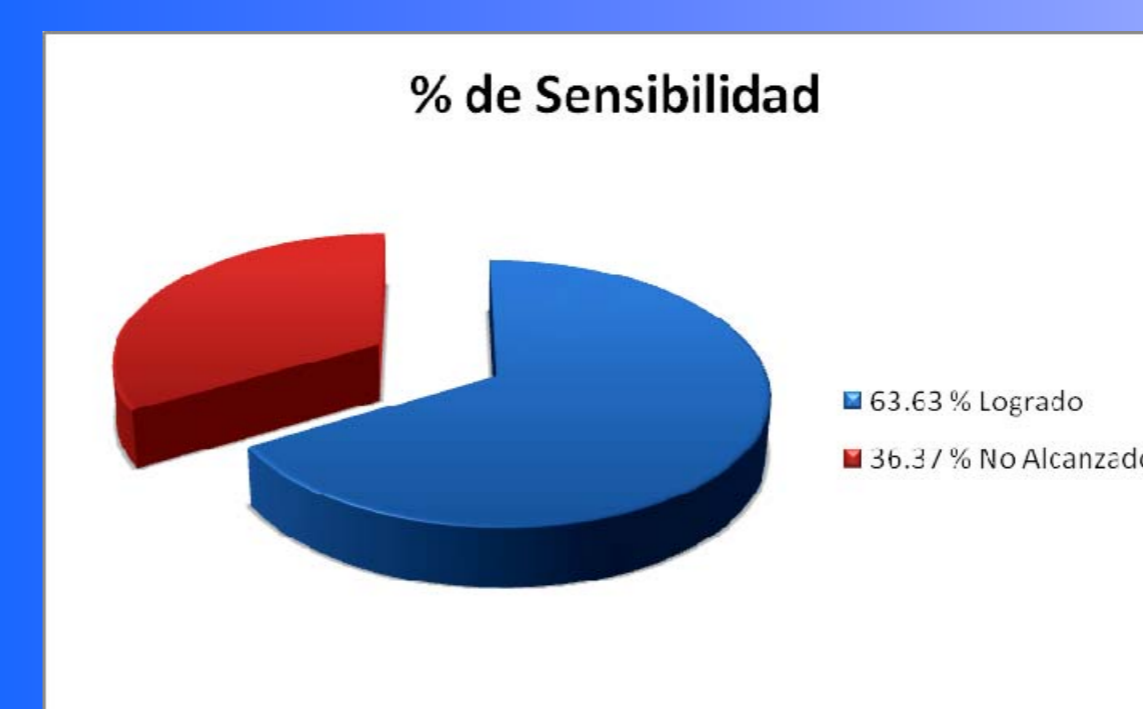
En el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán se procesaron 100 muestras procedentes de las diferentes municipios del estado de Michoacán, de pacientes con posible caso de Dengue, las cuales de acuerdo al algoritmo establecido por la RNLS y el InDRE, se procesaron a IgM e IgG, las cuales dieron resultados positivos y negativos. Posteriormente, estas muestras se procesaron a pruebas rápidas Human Hexagon para comparar sus resultados. Se marcaron la discrepancias entre ambas pruebas ELISA y Human Hexagon, tomando en cuenta que ELISA tiene una alta Sensibilidad y Especificidad (IgM: sensibilidad de 94.7% y especificidad del 97.2%) (IgG: sensibilidad del 94.5% y especificidad del 97.3%), su resultado es el que se tomo en cuenta para dar el diagnóstico a los pacientes.

De todas las muestras procesadas en ELISA y Human Hexagon, para IgM e IgG, a continuación se muestra en la tabla 1, el total de muestras positivas y negativas a los inmunoensayos ELISA y las pruebas rápidas Human Hexagon.

La relación de resultados entre las pruebas ELISA y Human Hexagon es la siguiente:

	ELISA		HUMAN	
	IgM	IgG	IgM	IgG
<b>NEGATIVAS</b>	72	71	81	82
<b>POSITIVAS</b>	27	28	19	18
<b>INDETERMINADAS</b>	1	1		
	100	100	100	100

Tabla de Relación de Casos entre ELISA y Human Hexagon



Esquema Porcentual de Sensibilidad de las Pruebas Rápidas Human Hexagon



Esquema Porcentual de Especificidad de las Pruebas Rápidas Human Hexagon

## CONCLUSIONES

La infección por Dengue puede ser peligrosa si no se trata a tiempo, y puede desarrollar complicaciones como Fiebre Hemorrágica por Dengue y Choque por Dengue. Por tal motivo, su detección oportuna es de vital importancia, puesto que una vez que una persona se diagnostica con la infección y se le da el tratamiento adecuado se puede reducir a menos del 1% la tasa de mortalidad incluso una vez diagnosticada la Fiebre Hemorrágica por Dengue. Por tal motivo las pruebas rápidas resultan ser de vital importancia sobretodo en zonas rurales donde la atención médica no está al alcance de las unidades médicas correspondientes.

Las Pruebas Rápidas empleadas para el desarrollo de este proyecto resultaron ser aceptables en cuanto a su Especificidad, mas no por la Sensibilidad que estas presentan y que no alcanzaron las pruebas rápida, puesto que el Instituto de Referencia Epidemiológica (InDRE) Y la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLS) aceptan un porcentaje de 70% o más de Sensibilidad y Especificidad. En realidad no hay un organismo o norma que regule el porcentaje debido que debe cumplir una prueba rápida para el diagnóstico de Dengue, pues estos estándares son implementados por el mismo laboratorio que los elabora y aceptados por los laboratorios de diagnostico que los emplean.

## BIBLIOGRAFÍA

1. A. Balmaseda. (2011). *Manual de Procedimientos de Técnicas para el Diagnóstico del Dengue*. Republica de Nicaragua: Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Ministerio de Salud.
2. A. Duarte, L. López, V. Tramin, E. Álvarez, W. Basualdo, P. Alfieri. (2009). *Manejo del Síndrome de Shock Dengue (SSD) en una UCIP* Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos. Hospital General Pediátrico "Niños de Acosta Nú" (HGP).
3. C. Ramos, H. García, J.M. Villaseca. (1993). *Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue*. México: Instituto Nacional de Salud Pública.
4. Dantés, S. Ibañez Bernal & H. Gómez (1995). *Vectores del Dengue en México; Una Revisión Crítica*. México: Artículos Originales .
5. Delgado I., Vazquez S., Bravo J.R. y Guzman M.G. (2002). *Predicción del serotipo del Virus del Dengue Mediante la Respuesta de Anticuerpos IgM*. Cuba: Instituto de Medicina Tropical Pedro Courí.
6. Dirección de Epidemiología y Ministerio de Salud de la Nación. (2009). *Enfermedades Infecciosas: Dengue 2da Edición*. Argentina: Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación.
7. J. Gathany. (2006). *Aedes aegypti*. United States of America: Department of Health and Human Services.