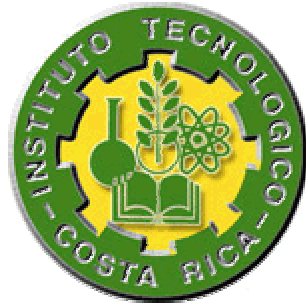


INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud
(INCIENSA)**

**“Validación del Procedimiento de determinación de IgM – Captura (Mac -
ELISA) para el Diagnóstico del Dengue Utilizado por el INCIENSA”**

**Informe de Práctica de Especialidad para optar por el grado de Bachiller en
Ingeniería en Biotecnología**

Jenny Muñoz Valverde

Cartago, Julio de 2002

Resumen

Existen diversas técnicas para el diagnóstico de Dengue, pero la técnica de determinación de anticuerpos IgM – Captura (MAC – ELISA) para el diagnóstico de dengue ha sido la más útil debido a su costo, facilidad de ejecución y a su alta sensibilidad y especificidad.

Este trabajo tuvo como objetivo general la validación del procedimiento de determinación de IgM – captura (MAC – ELISA) para el diagnóstico de dengue de acuerdo a: incertidumbre y a los parámetros de sensibilidad y especificidad.

Para la validación de este procedimiento se comparó con el procedimiento recomendado por el CDC. Se utilizaron veinte muestras positivas por dengue para analizar la estabilidad del anticuerpo, sensibilidad y especificidad y 45 muestras indeterminadas por dengue para analizar la sensibilidad del procedimiento del CDC.

En cuanto a la degradación de esta muestra, ésta no pudo haberse dado para ninguno de los dos procedimientos. Para ver exactamente esta degradación se debió de usar muestras con concentraciones conocidas de anticuerpos y someterlas al procedimiento de Inhibición de la hemaglutinación. Para la sensibilidad, la técnica del CDC detectó más pequeñas cantidades de anticuerpos que la del Inciensa. Para la especificidad se encontró que ambas técnicas presentan un 95% de especificidad. No se realizó el cálculo de la incertidumbre debido a que los dos procedimientos son afectados por las variables de la incertidumbre (técnica de pipeteo de la muestra, inestabilidad de la muestra y fluctuaciones en el suministro de energía eléctrica), por lo que analizar la incertidumbre de cada variable es un proceso largo y difícil de realizar.

El procedimiento del Inciensa tiene buena sensibilidad y especificidad, aunque el procedimiento CDC es más sensible, las muestras indeterminadas pueden ser afectadas, sin embargo la Institución soluciona esto solicitando segundas muestras y diluyendo el suero del paciente en 1:40.

Palabras Clave: dengue, validación, degradación, incertidumbre, sensibilidad, especificidad.

Abstract

There are some techniques for diagnosis of dengue, but the antibody determination technique IgM – capture (MAC – ELISA) has proved to be the most useful, due to its costs, ease of execution and its high sensibility and specificity.

The purpose of this work was the validation of the IgM – capture (MAC – ELISA) determination procedure for dengue diagnosis, according to uncertainty and parameters of sensibility and specificity.

For the validation of this procedure, it was compared to the procedure recommended by CDC. 20 dengue positive samples were used to analyze the antibody stability, sensibility and specificity. 45 undetermined samples were used also to analyze sensibility of CDC procedure.

Degradation of samples could not have happened in any of the two procedures. To observe this degradation, they were used samples with known concentration of antibodies and put them under hemagglutination inhibition procedure. As for its sensibility, CDC procedure detected more small quantities of antibodies than Inciensa procedure. As for specificity, it was found in both techniques a 95% of specificity. Uncertainty was not calculated because both procedures are affected by uncertainty variables, as a result, uncertainty determination is a long, difficult to do process.

Procedure used by Inciensa has good sensibility and specificity, although CDC procedure is more sensitive, undetermined samples may be affected, but the institution solves this problem by requesting second samples and diluting the patient's serum at 1:40.

Keywords: dengue, validation, degradation, uncertainty, sensibility, specificity.

Dedicatoria

A Dios todo poderoso, por darme las fuerzas para continuar peleando en la batalla, por darme a conocer que Él es mi único Señor y Salvador, por guiarme en todo lo que Él quiere que yo haga y sobre todo por amarme tanto.

A mi Padre por permitir que mis estudios se hicieran realidad y por amarme siempre.

A mi Madre, por siempre preocuparse por mí, por su amor y su bondad.

A mi Hermano Alberto por todo su cariño.

A mi mejor amiga Karla Valerín.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por todo su amor, porque sin Él todo lo que he alcanzado hasta ahora en la vida no tuviera sentido o no se hubiese realizado, gracias por llevarme de tu mano y por guiarme en el camino hacia Ti. Gracias por decirme en cada día de mi vida que estas aquí conmigo y me tomas de mi mano.

A mi profesora guía: Virginia Montero, por toda la ayuda que me brindó en la realización de este trabajo, gracias por aconsejarme y guiarme.

A la Doctora Jenny Lara por asesorarme en el Laboratorio de Dengue del Inciensa y por todas las enseñanzas y consejos que me brindó.

A Dora Vargas, por todas las pruebas que realizó para la elaboración de este trabajo si ella esto no hubiera sido posible. Gracias por tu gentileza y amabilidad.

A la Ingeniera Stella Stradi, por ser mi asesora en el Inciensa

A todo el personal del Centro Nacional de Referencia de Enfermedades Febriles y Dengue del Inciensa,

A todos mis hermanos de CEM por tenerme presente en sus oraciones y apoyarme en mis buenos y malos momentos.

A Oscar M Vargas, Laura Ureña y a Karla Valerín, por la ayuda que me brindaron.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES DEL INCIENSA	2
2.1. Antecedentes de la Institución	2
2.2. Definición	2
2.3. Campos de acción de la Institución	2
3. JUSTIFICACIÓN	4
4. OBJETIVOS	5
4.1. Objetivo General	5
4.2. Objetivos Específicos.....	5
5. MARCO TEÓRICO.....	6
5.1. Generalidades de la enfermedad del dengue	6
5.1.1. Historia.....	6
5.1.2. Distribución	6
5.1.3. Agente etiológico.....	7
5.1.4. Aspectos epidemiológicos.....	8
5.1.5. Modo de transmisión de la enfermedad.....	9
5.1.6. Periodo de transmisibilidad.....	9
5.1.7. Susceptibilidad e inmunidad.....	11
5.1.8. Clasificación	11
5.1.9. Diagnóstico.....	12
5.1.10. Métodos de Control.....	14
5.1.11. Control de las epidemias de dengue.....	14
5.1.12. Situación de dengue en Costa Rica.....	15
5.2. Diagnóstico de dengue por ELISA de Captura de IgM	15
5.2.1. Inmunoglobulinas.....	16
5.2.2. Enzyme Linked Inmunoabsorvent Assay (ELISA).....	18
5.2.3. Determinación de IgM – Captura (MAC - ELISA) para Diagnóstico de dengue utilizado en el Inciensa.....	19
5.2.4. Procedimiento de ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC - ELISA) para Diagnóstico de dengue utilizado por el CDC.....	23
CDC	25
5.3. Validación de Métodos.....	26
5.3.1. Parámetros a determinar para la validación de métodos.....	28
5.4. Validación de métodos inmunológicos.....	29
5.4.1. Especificidad	29
5.4.2. Sensibilidad	29

5.4.3. Estimación de la Incertidumbre	30
6. PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN.	30
6.1. Preparación del PBS - BSA y el PBS –SNH	31
6.2. Selección de las muestras	32
6.3. Estabilidad del anticuerpo	32
6.4. Determinación de los parámetros de sensibilidad y especificidad.	33
6.4.1. Sensibilidad.	34
6.4.2. Especificidad.	36
7. RESULTADOS	37
7.1. Estabilidad del anticuerpo	38
7.2. Sensibilidad y especificidad	45
7.2.1 Sensibilidad	45
7.2.2. Especificidad	49
8. DISCUSIÓN.	52
8.1. Incertidumbre	53
8.2. Estabilidad del anticuerpo.	57
8.3. Sensibilidad y especificidad.	58
8.3.1. Sensibilidad	58
8.3.2. Especificidad	59
8.4. Otras consideraciones	60
9. CONCLUSIONES.....	61
10. RECOMENDACIONES	63
11. BIBLIOGRAFIA	64
12. ANEXOS	68
12.1. Anexo 1. ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC-ELISA) para el Diagnóstico de Dengue CDC Laboratorio de Dengue San Juan, Puerto Rico...	68
12.2. Anexo 2. Determinación de IgM-captura para diagnóstico del dengue utilizado por el INCIENSA.....	74
12.3 Anexo 3 Otras Definiciones de validación de métodos.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 5.1 Distribución en el mundo del virus de dengue y del mosquito Aedes aegypti, en el año 2000. Según Centro para el Control de Enfermedades (CDC),2001.....</u>	<u>7</u>
<u>Figura 5.2 Mosquito de Aedes aegypti.....</u>	<u>8</u>
<u>Figura 5.3. Esquema de transmisión del virus de dengue por Aedes aegypti.....</u>	<u>10</u>
<u>Figura 5.4. Fundamento del procedimiento determinación de IgM - Captura para el diagnóstico de dengue.....</u>	<u>22</u>
<u>Figura 7.1 DO vs Muestra del ensayo 1 y 2 con el procedimiento del Inciensa.....</u>	<u>41</u>
<u>Figura 7.2 DO vs Muestra del ensayo 1 y 2 con el procedimiento del CDC.....</u>	<u>41</u>
<u>Figura 7.3 DO vs Muestra del ensayo 2 y 3 a 72 h para el procedimiento del Inciensa.....</u>	<u>43</u>
<u>Figura 7.4 DO vs Muestra (ensayo 2 y 3) a 72 h para el procedimiento del CDC.....</u>	<u>43</u>
<u>Figura 7.5 Diferencias de DO entre el ensayo 1 y el ensayo 3 obtenidos con el procedimiento del Inciensa.....</u>	<u>44</u>
<u>Figura 7.6 Diferencia de DO entre el ensayo 1 y el ensayo 3 obtenida con el procedimiento del CDC.....</u>	<u>44</u>
<u>Figura 7.7 Comparación de DO de muestras indeterminadas por el procedimiento del Inciensa vs el de los CDC.....</u>	<u>47.</u>

ÍNDICE DE CUADROS

<u>Cuadro 5.1. Diagnóstico en Laboratorio de dengue.....</u>	<u>14</u>
<u>Cuadro 5.2. Propiedades de las inmunoglobulinas humanas.....</u>	<u>17</u>
<u>Cuadro 5.3. Distribución de las muestras y de los controles en la placa.....</u>	<u>23</u>
<u>Cuadro 5.4. Comparación entre el procedimiento del CDC y del Inciensa de acuerdo a las etapas de los procedimientos.....</u>	<u>24</u>
<u>Cuadro 5.5. Comparación entre el procedimiento del CDC y del Inciensa de acuerdo a reactivos.....</u>	<u>25</u>
<u>Cuadro 5.6. Parámetros a considerar en cada tipo de ensayo.....</u>	<u>28</u>
<u>Cuadro 6.1 Reactivos de casas comerciales utilizados para la realización del procedimiento del CDC.....</u>	<u>31</u>
<u>Cuadro 6.2 . Tratamiento de las muestras positivas utilizadas.....</u>	<u>32</u>
<u>Cuadro 6.3. Distribución de las muestras positivas en la placa, utilizadas para la realización de los 3 ensayos con el procedimiento del CDC.....</u>	<u>33</u>
<u>Cuadro 6.4 Distribución de las muestras positivas en la placa, utilizadas para la realización de los 3 ensayos con el procedimiento del Inciensa.....</u>	<u>33</u>
<u>Cuadro 6.5 . Muestras positivas utilizadas para determinar la sensibilidad del procedimiento del Inciensa y del CDC.....</u>	<u>34</u>
<u>Cuadro 6.6 . Diluciones de las muestras positivas 3, 7, 8, 9 y 13.....</u>	<u>34</u>
<u>Cuadro 6.7. Distribución de las muestras positivas diluidas en la placa que se utilizaron en el procedimiento del Inciensa.....</u>	<u>35</u>
<u>Cuadro 6.8. Distribución de las muestras positivas diluidas en la placa que se utilizaron en el procedimiento de los CDC.....</u>	<u>35</u>
<u>Cuadro 6.9. Distribución de las muestras indeterminadas en la placa utilizadas para el procedimiento del CDC.....</u>	<u>36</u>
<u>Cuadro 7.1 Resultados obtenidos de las muestras positivas al someterlas al procedimiento del Inciensa.....</u>	<u>38</u>
<u>Cuadro 7.2 Resultados obtenidos de las muestras positivas al someterlas al procedimiento del CDC.....</u>	<u>39</u>
<u>Cuadro 7.3 Comparación de DO a diferentes temperaturas de almacenamiento de las muestras positivas.....</u>	<u>40</u>
<u>Cuadro 7.4. Comparación de DO a diferentes temperaturas de almacenamiento de las muestras positivas.....</u>	<u>42</u>
<u>Cuadro 7.5 Densidades ópticas obtenidas de las diluciones de la muestra # 3 al someterla a los procedimientos de los CDC y del Inciensa.....</u>	<u>45</u>

<u>Cuadro 7.6 Densidades ópticas obtenidas de las diluciones de la muestra # 7 al someterla a los procedimientos de los CDC y del Inciensa.....</u>	<u>45</u>
<u>Cuadro 7.7 Densidades ópticas obtenidas de las diluciones de la muestra # 8 al someterla a los procedimientos de los CDC.y del Inciensa.....</u>	<u>46</u>
<u>Cuadro 7.8 Densidades ópticas obtenidas de las diluciones de la muestra # 9 al someterla a los procedimientos de los CDC y del Inciensa.....</u>	<u>46</u>
<u>Cuadro 7.9 Densidades ópticas obtenidas de las diluciones de la muestra # 13 al someterla a los procedimientos de los CDC y del Inciensa.....</u>	<u>47</u>
<u>Cuadro 7.10 Densidades ópticas obtenidas de las muestras indeterminadas a partir de los dos procedimientos.....</u>	<u>47</u>
<u>Cuadro 7.11 Resultados de las muestras positivas por dengue que se procesaron por leptospira, sarampión y rubéola.....</u>	<u>50</u>

1. INTRODUCCIÓN

El dengue actualmente es una de las enfermedades más frecuentes en Costa Rica, que afectan al hombre y constituye un severo problema de Salud Pública en el mundo, especialmente en la mayoría de los países tropicales, donde las condiciones del medio ambiente favorecen el desarrollo y la proliferación de *Aedes aegypti*, el principal mosquito vector. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), dos quintas partes de la población mundial vive en riesgo de ser infectada por dengue y más de 100 países han sido infectados por epidemias de dengue (<http://www.saludlatina.com/informaciones/dengue.htm>).

El Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (Inciensa) está desarrollando un sistema de aseguramiento de la calidad para demostrar la confiabilidad de sus resultados, lo que le permitirá ser competitiva frente a otros organismos, sus Laboratorios juegan un papel importante en la salud de los costarricenses, ya que sus resultados sirven de apoyo para la formulación de políticas de salud y nutrición y el monitoreo de la calidad diagnóstica en redes de vigilancia epidemiológica y es por ello que la validación de los procedimientos que utilizan estos Laboratorios es de suma importancia.

Hay diversas técnicas para el diagnóstico de dengue pero la detección de anticuerpos IgM contra el virus ha sido el más útil para el diagnóstico de casos clínicamente sospechosos, es rápido para determinar infecciones en casos hospitalizados de áreas endémicas y eficaz en la vigilancia de áreas no endémicas, pues cualquier caso positivo indica una infección reciente (Instituto Pedro Kouri (IPK), 1990).

2. GENERALIDADES DEL INCIENSA

2.1. Antecedentes de la Institución

El Inciensa, tuvo su origen en julio de 1963, con la creación del Centro Regional de Recuperación Nutricional. En 1969 el Centro se transformó en Clínica Nacional de Nutrición, integrada al Sistema Hospitalario Nacional y dedicada a la rehabilitación de niños desnutridos del país (Inciensa, 1996). Esta Institución se creó el 7 de octubre de 1977, mediante la Ley N°6088, como entidad adscrita al despacho del Ministerio de Salud; sus labores se iniciaron el 15 de agosto de 1978 y el 24 de setiembre 1979, se emite el decreto ejecutivo que reglamenta su funcionamiento (Aguilar y Vega, 1998).

2.2. Definición

Conforme al artículo 5^o, inciso e) y 25 de la Ley Orgánica del Ministerio de Salud el Inciensa, “es un órgano adscrito al Despacho del Ministerio de Salud, el cual tiene independencia en su funcionamiento administrativo y personería jurídica propia”. Y conforme a la Ley N° 6088 la Institución “es el organismo encargado de realizar programas nacionales de investigación y enseñanza en el campo de la salud y la nutrición” (La Gaceta, 1998).

2.3. Campos de acción de la Institución

En el Inciensa se desarrollan cuatro líneas fundamentales de acción: investigación científica, desarrollo tecnológico, vigilancia, enseñanza de la salud y nutrición. Todas ellas implementadas en estrecha coordinación con las instituciones del Sistema de Salud y apoyando al Ministerio de Salud, favoreciendo la consecución de logros en las áreas de (Inciensa, 1996):

- **Investigación Científica:** donde se promueve la producción, difusión y aplicación de conocimientos científicos y técnicos, con la finalidad de orientar

las políticas, estrategias, planes y acciones de salud y nutrición; donde la Institución apoya la identificación de necesidades de control y evaluación de sistemas y servicios de salud.

- **Desarrollo Tecnológico:** participa en el establecimiento de planes, proyectos y normas de aseguramiento de calidad de los servicios; y en la estandarización y el control de la calidad de métodos de análisis y procedimientos relacionados con la salud y nutrición en las personas.
- **Vigilancia de la Salud:** apoya la identificación de la situación de salud y de las estrategias necesarias para el desarrollo. Además, mediante sus Centros de Referencia, participa en la confirmación diagnóstica de enfermedades infectocontagiosas que enfrenta el país y los países del área.
- **Formación, capacitación y educación en salud:** aporta nuevos elementos y perspectivas a la enseñanza en salud y nutrición al incorporar a la educación como objeto de estudio, en el marco de los servicios de salud y los procesos de trabajo.

3. JUSTIFICACIÓN

El Inciensa está implementando un sistema de calidad en sus laboratorios y por esta razón, la Unidad de Aseguramiento de la calidad ha iniciado el proceso de validación de ciertos métodos que se consideran muy relevantes, en cuanto al proceso de diagnóstico de enfermedades emergentes y reemergentes. Por esta razón se ha seleccionado el diagnóstico de IgM – Dengue como técnica objeto de este estudio y considerando además que dicha técnica aporta aproximadamente un 30% de los diagnósticos de laboratorio que produce el Inciensa. A veces los casos de dengue se notifican equivocadamente como influenza, sarampión, leptospirosis, malaria, o síndromes víricos no específicos, debido a las dificultades del diagnóstico clínico, es por ello importante la confirmación de este diagnóstico por el laboratorio; ya que el Inciensa es la única Institución en el país donde se realiza este tipo de análisis.

El Centro Nacional de Referencia de Enfermedades Febriles y Dengue en su Laboratorio de Dengue del Inciensa, utiliza el procedimiento ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC – ELISA) para el diagnóstico de dengue, recomendado por el CDC (en español: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades). En el Inciensa se ha sustituido en el procedimiento el uso de la albúmina bovina sérica (BSA) y Suero Normal Humano (SNH) por leche descremada en polvo Dos Pinos[®], pero este cambio no ha sido documentado aún en nuestro país.

La validación del procedimiento utilizado por el Inciensa, proporcionará un mayor grado de confianza y seguridad en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo, ya que la actividad del Laboratorio de Dengue contribuye con la vigilancia de la enfermedad en áreas donde ya se estableció y en nuevas áreas geográficas, además con la aparición de nuevos serotipos, la confirmación de los casos graves o fatales y con el apoyo a las posibles encuestas seroepidemiológicas. Además se pretende generar más confianza en los clientes que compran sus servicios (principalmente la CCSS) en los resultados que emite el laboratorio para sus pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General.

Validación del procedimiento de determinación de IgM – captura (MAC – ELISA) para diagnóstico de dengue utilizado por el Inciensa

4.2. Objetivos Específicos.

- Analizar la especificidad del método.
- Analizar la sensibilidad del método.
- Analizar la incertidumbre del resultado.

5. MARCO TEÓRICO.

5.1. Generalidades de la enfermedad del dengue

5.1.1. Historia.

En América, la enfermedad data de más de 200 años, específicamente en la isla de Java en 1779 y Filadelfia (E.U.A.) en 1780. (<http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema10/den6290.htm>). En este continente, la primera epidemia de dengue clásico determinada en laboratorios fue relacionada con el serotipo de dengue 3 y afectó a la Cuenca del Caribe y a Venezuela entre 1963 y 1964. Alrededor de 1953 y 1954, en Trinidad y Tobago se aisló por primera vez el serotipo 2 a partir de casos no epidémicos y entre 1968 y 1969, otra epidemia afectó a varias islas del caribe y en su transcurso se aislaron los serotipos de dengue 2 y 3. Al comienzo y a mediados de la década de 1970, Colombia se vio afectada por extensos brotes asociados con los serotipos 2 y 3 (OPS, 1995). El serotipo 4 fue introducido en 1981 y desde entonces los tipos 1, 2, 3 y 4 han sido transmitidos simultáneamente en muchos países donde *Aedes aegypti* está presente; pero el evento más importante de dengue en América, tuvo lugar en 1981 cuando apareció la epidemia de Fiebre Hemorrágica asociada al serotipo 2 que afectó a Cuba (<http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema10/den6290.htm>).

5.1.2. Distribución

Actualmente, los serotipos de dengue, son endémicos en la parte meridional de China, Hainán, Vietnam, Laos, Camboya (Kampuchea), Tailandia, Myanmar (ex Birmania), India, Sri Lanka, Indonesia, Filipinas, Malasia y Singapur; la endemidad es menor en nueva Guinea, Bangladesh, Taiwán y gran parte de la Polinesia, pero los cuatro serotipos son endémicos de África (Ministerio de Salud, 2001).

Hoy en día, son endémicos uno o más virus de dengue en México, muchas islas del Caribe, en muchos países de América Central, así como en Venezuela, Colombia y Ecuador. Desde 1986, los brotes en Brasil se han propagado a Bolivia y Paraguay. Las epidemias pueden surgir en cualquier sitio en donde existan los vectores y se introduzca el virus, tanto en zonas urbanas como rurales (Ministerio de Salud, 2001).

En la siguiente figura se muestra la distribución global de dengue hasta el año 2000, según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos.

Distribución Mundial de Dengue en el 2000

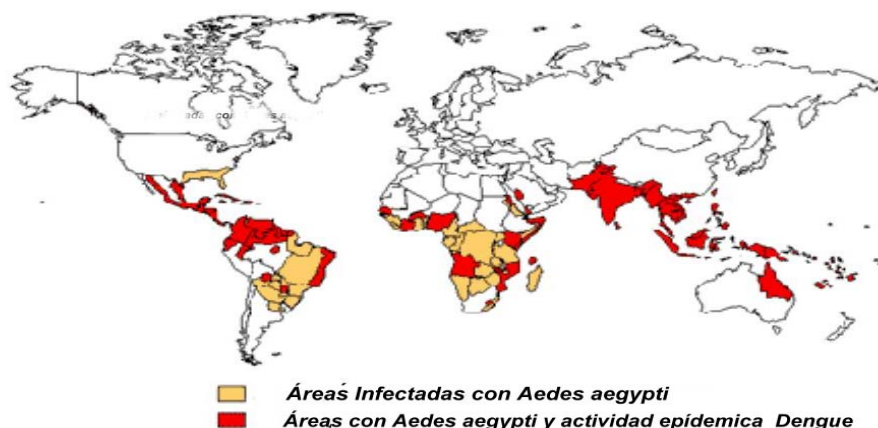


Figura 5.1 Distribución en el mundo del virus de dengue y del mosquito *Aedes aegypti*, en el año 2000. Según el CDC, 2001.

5.1.3. Agente etiológico.

El virus de dengue pertenece a la familia *Flaviviridae*, un arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) similar al de la Fiebre Amarilla. Se trata de virus envueltos (sensibles por tanto a la destrucción por agentes físicos y químicos), de 40-50 nm de diámetro, con cápsida icosaédrica y genoma de ARN monocatenario. Este virus opera directamente como ARN mensajero policistrónico (con varias regiones codificantes). El virus se adhiere a las células eucariotas, ingresa a ellas por viropexis (el virus es rodeado por la membrana plasmática), se

replica en el citoplasma y se ensambla en el retículo endoplasmático. Su genoma codifica para una poliproteína que es luego procesada en 10 polipéptidos: 3 estructurales (una proteína de nucleocápsida C, una membranosa prM y una glicoproteína de envoltura E: hemaglutinante y de adherencia) y 7 no estructurales, de las cuales se destaca la NS1, que puede inducir, como la E, una respuesta inmune protectora. Se reconocen por variación de la proteína E, los 4 tipos antigénicos (llamados DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4). Existe heterogeneidad de cepas dentro de cada tipo, que se correlaciona con variedad de secuencias de ARN, cuya identificación en prM, E y NS1 tiene utilidad epidemiológica (<http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema10/den6290.htm>).

5.1.4 . Aspectos epidemiológicos.

5.1.4.1. Vectores

Los cuatro serotipos de dengue pueden ser transmitidos por zancudos del género *Aedes aegypti* y por lo menos otras cuatro especies (*albopictus*, *cooki*, *polinesiensis* y el complejo *scutellaris*); pero al menos en América el más importante es el *Aedes aegypti* (<http://www.insp.mx/salvia/977/sal9771.html>).



Figura 5.2. Mosquito de *Aedes aegypti*
(<http://www.smu.org.uy/publicaciones/mu/1996v1/salvat.htm>.)

El adulto de *Aedes aegypti*, tiene un dorso con bandas de color plateado o amarillo blanquecino sobre fondo oscuro, y un dibujo característico en forma de lira en el dorso del tórax. Las patas están conspicuamente bandeadas y el último artejo de las patas posteriores es blanco (Figura 2). Las hembras presentan un abdomen puntiagudo (<http://www.smu.org.uy/>

Este mosquito es una especie tropical y subtropical que se encuentra en todo el mundo, por lo general está limitada a las latitudes comprendidas entre 35^o norte y 35^o sur, aunque se han observado hasta los 45^o latitud norte durante la estación cálida, pero en invierno no sobreviven. En cuanto a la altitud, los mosquitos no se encuentran por encima de los 1000 m, pero en la India y en Colombia se les ha encontrado a más de 2000 m. (OPS,1995). El mosquito es susceptible a temperaturas extremas y climas cálidos secos. Los adultos pierden actividad por desecación o por debajo de 12°C a 14°C (<http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema10/den6290.htm>).

5.1.4.2. Reservorios

La fuente de infección y el reservorio vertebrado es el hombre. El virus de dengue persiste en la naturaleza gracias al ciclo de transmisión hombre - mosquito - hombre (Ministerio de Salud, 2001)

5.1.5. Modo de transmisión de la enfermedad.

La transmisión es indirecta, se da por la picadura del mosquito hembra infectado, las cuales se infectan cuando se alimentan de sangre contaminada de personas enfermas, cuyas proteínas las requieren para el desarrollo de los huevos. El insecto está muy adaptado al ambiente urbano y pica al atardecer y al amanecer del día. No hay transmisión por contacto directo con una persona enferma (<http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema10/den6290.htm>).

5.1.6. Periodo de transmisibilidad.

El tiempo intrínseco de transmisibilidad corresponde al de la viremia de la persona infectada. Comienza un día antes del inicio de la fiebre y se extiende hasta el sexto u octavo día de la enfermedad. El virus se multiplica en el epitelio intestinal del mosquito hembra infectado, ganglios nerviosos, cuerpo graso y glándulas salivales. Durante el tiempo de incubación extrínseco (luego de 7 a 14 días), el

mosquito se vuelve infectante durante toda su vida y puede infectar al hombre por una nueva picadura (<http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema10/den6290.htm>).

Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). 2001, la replicación y la transmisión del virus de dengue se dan de la siguiente manera:

- El virus es transmitido a la persona por la saliva del mosquito al picar o alimentarse.
- El virus se replica en los órganos de la persona.
- El virus infecta los glóbulos blancos y el tejido linfático.
- El virus se libera y circula en sangre.
- Un segundo mosquito ingiere virus con sangre.
- El virus se replica en glándulas salivales y otras partes del mosquito.

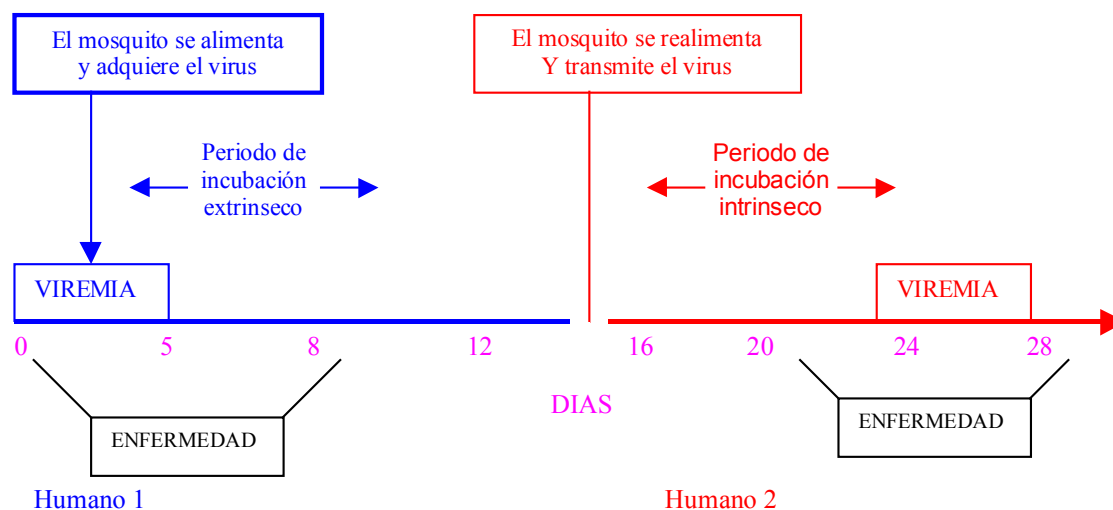


Figura 5.3. Esquema de transmisión del virus de dengue por *Aedes aegypti*.

En la siguiente figura se detalla un esquema de la transmisión del virus por el mosquito *Aedes aegypti* según el CDC, 2001.

5.1.7. Susceptibilidad e inmunidad

La susceptibilidad al dengue clásico es universal en todos los seres humanos, pero los niños suelen tener una enfermedad más benigna que los adultos. El restablecimiento de la infección por un serotipo genera inmunidad homóloga de larga duración, pero no protege contra otro serotipo. No obstante, en algunos casos cuando se presenta la reinfección, los anticuerpos circulantes de la infección anterior pueden provocar la aparición de dengue hemorrágico y del shock, principalmente los niños presentan mayor susceptibilidad que los adultos (Ministerio de Salud, 2001).

5.1.8. Clasificación

5.1.8.1. Dengue Clásico.

Según la publicación del Ministerio de Salud de Costa Rica (<http://www.binasss.sa.cr/poblacion/dengue.htm>), el dengue clásico presenta los síntomas de: fiebre alta repentina (39 °C - 40 °C), dolor de músculos, articulaciones, huesos, cabeza y ojos, sabor herrumbroso. Algunos enfermos presentan: Salpullido en tronco, brazos y piernas; sangrado de encías; con frecuencia hay vómito y diarrea. Estos síntomas se empiezan a presentar entre los 5 y 8 días después de la picadura y pueden durar de 3 a 7 días y la fase febril dura aproximadamente 7 días. Algunas personas presentan síntomas tan leves que no saben que ya sufrieron dengue clásico, quedando expuestos al dengue hemorrágico.

5.1.8.2. Fiebre Hemorrágica por Dengue

Se define por un descenso del nivel de plaquetas por debajo de 100.000/mm³ y un aumento del hematocrito (hemoconcentración) mayor del 20% del valor basal. Generalmente los serotipos 2,3 y 4 del virus de dengue pueden causar este tipo de fiebre (Pizarro et al, 1993). Se clasifica en:

- **Grado I:** dengue clásico más prueba del torniquete positiva.
- **Grado II:** grado I más sangrado espontáneo.

Según la publicación del Ministerio de Salud de Costa Rica (<http://www.binasss.sa.cr/poblacion/dengue.htm>), se presentan los síntomas de: fiebre repentina alta, que puede durar de 2 a 7 días; sangrado en diferentes partes del cuerpo; dificultad en la respiración, vómito, alteraciones de la presión, falta de apetito, palidez, sudoración y sueño.

5.1.8.3. Síndrome de Shock por Dengue

Según Pizarro et al. 1993, este síndrome puede manifestarse cuando el paciente ha sido previamente infectado por el virus de serotipo 1. Se clasifica en:

- **Grado III:** falla circulatoria
- **Grado IV:** shock profundo.

Los síntomas que se presentan son: insuficiencia circulatoria, dolor abdominal intenso y sostenido; vómitos frecuentes, caída brusca de la fiebre hasta la hipotermia.

5.1.9. Diagnóstico.¹

Este se hace en base a: cuadro clínico, noción epidemiológica, aislamiento del virus a partir de una muestra de sangre tomada en fase virémica, por serología con el aumento de IgG en por lo menos 4 veces en 2 muestras de sueros extraídos al inicio y 15 a 20 días después, o con IgM específica reactiva en una muestra de suero obtenida después de 5 días de enfermedad.

¹ Tomado de (<http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema10/den6290.htm>).

El trabajo de diagnóstico de laboratorio (ver cuadro 1) tiene la finalidad de: confirmar la enfermedad e identificar los serotipos circulantes y la vigilancia de la salud para determinar los niveles de transmisión de la infección por medio de encuestas seroepidemiológicas.

La confirmación de laboratorio de un caso de dengue se hace por:

- Aislamiento del virus o identificación de sus antígenos o ácidos nucleicos a partir del suero del paciente o en muestras de necropsia.
- Demostración de seroconversión (aumento de 4 veces o más en los títulos de IgG) en sueros pareados con intervalo de 14 a 21 días.
- Detección de IgM específica (a partir del 5º día de enfermedad) en presencia de una situación clínica y epidemiológica compatible.

El aislamiento viral se realiza a partir de sangre (debe ser obtenida en el período de viremia entre el primero y el quinto día de la enfermedad), derivados u otros tejidos en:

- a) Cultivos celulares eucariotas, que pueden ser del mosquito o de vertebrados, donde se debe hacer la identificación viral sobre estos por inmunofluorescencia, neutralización u otras reacciones.
- b) Ratones recién nacidos o mosquitos susceptibles, no vectores, por vía intratorácica.

La investigación de IgM específica antiviral, se realiza por ELISA de captura (MAC-ELISA).

La demostración de seroconversión puede hacerse por inmunofluorescencia (IF), fijación de complemento (FC), neutralización (N), inhibición de la hemoaglutinación (IHA) o ELISA. El método de referencia, sensible y específico, es el de neutralización. En encuestas seroepidemiológicas se utilizan el ELISA o la

Inhibición de la hemaglutinación, que son unos ensayos económicos y sencillos, que detectan anticuerpos de aparición precoz y persistencia prolongada.

Cuadro 5.1. Diagnóstico en Laboratorio de dengue

Métodos directos	Métodos indirectos
Cultivos celulares de mosquito.	Investigación de IgM antiviral. ELISA de captura.
Investigación de antígenos o ácidos nucleicos: IF, ELISA, sondas, PCR.	Investigación de seroconversión por IF, FC, N, IHA o ELISA. ELISA IgG o IHA para encuestas serológicas poblacionales.

Fuente: (<http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema10/den6290.htm>).

5.1.10. Métodos de Control.

En este momento no se dispone de vacunas que confieran protección contra los cuatro serotipos del virus, por lo cual los esfuerzos para controlar los brotes de dengue se basan en el control del vector, ya que la transmisión de la infección se puede interrumpir por la disminución de la densidad de los mosquitos, la difusión de acciones específicas y la participación de la población en acciones de vigilancia y control (<http://www.insp.mx/salvia/977/sal9771.html>).

5.1.11. Control de las epidemias de dengue.

Las acciones deben estar guiadas por encuestas y vigilancia de la distribución y presencia de los vectores. La vigilancia epidemiológica debe incluir: vigilancia del vector, alerta ante afecciones febriles o exantemas sospechosos de dengue y asignación y organización de recursos para estudios de laboratorio donde se investiga sobre posibles preparados inmunizantes (vacunas) basados en proteína NS1 o en combinación de serotipos de cepas atenuadas (<http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema10/den6290.htm>).

5.1.12. Situación de dengue en Costa Rica.

El dengue apareció por primera vez en 1940 y en 1953 la enfermedad fue erradicada por completo; sin embargo, luego se presentó un elevado número de casos en 1993, en la provincia de Puntarenas y luego en Guanacaste (Fuentes, 1993). Para 1994, la enfermedad se extiende a Alajuela y para junio, se confirma la existencia en el país de los serotipos 1, 2 y 4 (Fuentes, 1994). En 1995, la enfermedad se extiende a la zona sur del país, en junio, se confirma la existencia de todos los serotipos de dengue luego de la aparición confirmada por el Inciensa de 3 casos con serotipo 3 (Varela, 1995) en setiembre, se presenta el primer caso de dengue hemorrágico en Guanacaste y en octubre, la enfermedad afecta a Limón (Solís, 1995). Ya para el año 2001, el Ministerio de Salud había reportado 6 muertes por dengue Hemorrágico y la primera muerte se reportó en 1995 (Ávalos, 2001). Hoy en día se siguen reportando más casos, ya que la enfermedad no ha sido erradicada.

5.2. Diagnóstico de dengue por ELISA de Captura de IgM

En serología se utiliza la generación de anticuerpos (Ac) monoclonales que reconozcan de modo específico IgG e IgM humanas, la detección de estas inmunoglobulinas contra diferentes agentes que producen una respuesta inmunológica ha sido durante años el fundamento de la serología. Tradicionalmente, esta detección se ha llevado a cabo inmunológicamente por medio de anticuerpos anti-humanos desarrollados en mamíferos tales como conejos, cabras o terneros. Estos anticuerpos, conjugados a enzimas, compuestos fluorescentes o reactivos de afinidad, han sido usados para la detección de inmunoglobulinas en un gran número de inmunoensayos como inmunofluorescencia indirecta, ELISA, Western blot y otros. (<http://www.infomed.sld.cu/instituciones/ipk/carpeta.htm>.)

En la infección primaria por cualquier virus del complejo dengue se produce una respuesta de anticuerpos (Ac) de la clase IgM, los cuales aparecen en niveles

detectables una vez finalizada la fiebre y la viremia, por lo que se recomienda que la toma de muestras utilizadas para la determinación de este anticuerpo sean extraídas después del quinto día del establecimiento de la enfermedad (Instituto Pedro Kouri, 1990). Estos anticuerpos aparecen levemente antes de los anticuerpos IgG a partir del quinto día desde el inicio del cuadro clínico. Al quinto día están presentes en el 80% de los pacientes, entre el sexto y décimo día en el 93% y entre el décimo y vigésimo día en 99%, algunos pacientes pueden presentar al segundo o al cuarto día y otros tardan al menos 7 u 8 días. La IgM deja de detectarse a los 60 días, sin embargo persisten hasta los 90 días ([www.viajeros.cei.com.ar/sp/imagenes/ Dengue1.pdf](http://www.viajeros.cei.com.ar/sp/imagenes/Dengue1.pdf)).

El Inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA) ha sido utilizado como método para el diagnóstico serológico en un gran número de enfermedades vírales. Uno de los métodos aplicados para la determinación de dengue es la captura de IgM para demostrar infecciones actuales o recientes. Para ello se emplea inmunoglobulinas humanas anti – IgM fijadas a una placa (Instituto Tropical Pedro Kouri, 1990).

El método de captura para la determinación de IgM consiste en incubar la muestra con la fase sólida sensibilizada con anticuerpo anti – IgM, luego de un paso de lavados se agrega el antígeno específico para la IgM a determinar simultáneamente con el conjugado, luego de un nuevo paso de lavados se agrega el sustrato que desarrollará color si está presente la enzima (Albrecht, 1994).

5.2.1. Inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas (anticuerpos) son proteínas que se combinan con los determinantes antigénicos. Están presentes en el suero u otros líquidos corporales como las secreciones gástricas y la leche. Las inmunoglobulinas (Igs) se dividen en 5 clases de acuerdo a sus propiedades físicas, químicas e inmunológicas en : IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (cuadro 2) (Madigan et al, 1998).

Cuadro 5.2. Propiedades de las inmunoglobulinas humanas

Inmuno-globulina	Peso molecular	Proporción del anticuerpo total (%)	Sitios de unión al antígeno	Propiedades	Distribución
IgG	146 000	80	2	Principal anticuerpo circulante. Existen las subclases: IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₃ y IgG ₄ . Se unen débilmente al complemento.	Fluido extracelular; sangre y linfa; atraviesa la placenta.
IgM	970 000	6	10	Primer anticuerpo postinmunización; fuerte unión al complemento.	Sangre y linfa: superficie de linfocitos B.
IgA	160 000 385 000 en forma secretora	13	2 4	Principal anticuerpo de las secreciones	Secreciones (saliva y suero), fluidos celulares sanguíneos; presente en el suero en forma de monómero y como dímero en las secreciones.
IgD	184 000	1	2	Presente en menor cantidad; termolábil.	Sangre y linfa: superficie de linfocitos B
IgE	188 000	0.002	2	Participa en las reacciones alérgicas.	Sangre y linfa

Fuente: Madigan et al, 1998.

La IgM se produce durante la respuesta inicial contra un microorganismo invasor, es la más grande y contiene 5 unidades en forma de Y con dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas cada una. Las unidades se mantienen unidas por la cadena J. El gran tamaño de la IgM limita su presencia al torrente circulatorio (Mathews y Van Holde, 1998). En el transcurso de una respuesta primaria, la síntesis de IgM disminuye a medida de que aumenta la concentración de IgG, siendo la primera un poderoso activador del sistema del complemento y considerablemente más eficaz que la segunda en reacciones serológicas sobre base molecular (Zimbrón, 2000).

5.2.2. Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

La unión covalente de las enzimas a los anticuerpos da lugar a una técnica inmunológica que posee a la vez alta especificidad y sensibilidad. Esta técnica denominada ELISA utiliza anticuerpos que se unen covalentemente a las enzimas, de este modo se conservan las propiedades catalíticas de las enzimas y la especificidad de los anticuerpos (Madigan et al, 1998). Se utiliza para demostrar la presencia o ausencia de un antígeno o anticuerpo y se basa en el uso de uno de estos inmunoreactivos conjugado con una enzima (Albrecht, 1994).

5.2.2.1. Principios.

a - Fase Sólida: el antígeno o anticuerpo se fija sobre un soporte sólido para facilitar la separación de los reactivos libres y combinados, se ha encontrado que antígenos y anticuerpos se pueden unir covalentemente a material particulado como la celulosa o poliacrilamida, y que también se puede tener una adsorción pasiva (interacción hidrofóbica entre regiones no polares de la proteína y la matriz plástica no polar) a tubos, perlas, discos, peines o microplacas (micropozos), ya sea de nylon, poliestireno, polivinilo o polipropileno (Albrecht, 1994).

b - Conjugado: Una parte esencial del inmunoensayo por enzimas es la conjugación del antígeno o anticuerpo a una enzima. Para la elección de la enzima, se debe tener en cuenta: elevada afinidad, que se pueda obtener en forma pura y que posea una reacción con el sustrato fácilmente medible. Para esta técnica se utilizan la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina, la glucosa oxidasa y la betagalactosidasa (Albrecht, 1994).

c - Sustratos: su elección es muy importante, deben ser estables y solubles antes y después de la degradación. Los sustratos cromogénicos deben ser

inicialmente incoloros y fuertemente coloreados tras la degradación (Albrecht, 1994). Se mencionan los sustratos para la HRP:

- Como oxidantes se utilizan distintos peróxidos: peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) y peróxido de urea.
- Como reductores se emplean distintos cromógenos: OPD (ortofenilendiamina), TMB (tetrametilbencidina) y ABTS (sulfato de azidobenzotiazolidina).

5.2.3. Determinación de IgM – Captura (MAC - ELISA) para Diagnóstico de dengue utilizado en el Inciensa.

Este procedimiento es utilizado por la institución desde 1993 debido al elevado número de casos en el país durante ese año, su fundamento se basa en el procedimiento de ELISA de anticuerpos IgM captura (MAC - ELISA) utilizado por el CDC. Este determina la presencia de la enfermedad mediante la detección de los anticuerpos IgM que se encuentran en el suero de los pacientes en las primeras tres semanas desde el inicio de los síntomas y son indicativos de que hay presencia de enfermedad activa o reciente. El Laboratorio de Dengue del Inciensa modificó el procedimiento del CDC debido a que ha dado excelentes resultados en Honduras y a la disminución significativa del costo de la prueba.

Su fundamento consiste en que los anticuerpos IgM contra dengue del paciente son “capturados” por medio de un anticuerpo anti – IgM humano producido en animales y el cual se adhiere a una placa de microtítulo. Luego de varios lavados se emplea el antígeno que se unirá a los anticuerpos, luego de otros lavados se utiliza un segundo anticuerpo ligado a una enzima la cual se unirá al antígeno. La enzima, al unirse a un sustrato específico, actúa sobre el sustrato produciendo un cambio de color, el cual es proporcional a la concentración del anticuerpo en el suero del paciente (Aguilar y Vega, 1998).

5.2.3.1. Recepción de las Muestras.

Bajo criterios de aceptación (temperatura de envío y boleta de identificación), el laboratorio recibe las muestras (sueros) provenientes de Centros del Ministerio de Salud, Clínicas, Hospitales de la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS), y laboratorios privados del país; éstas se transportan congeladas o frías en tubos de ensayo o tubos eppendorf® con la respectiva boleta de identificación; las muestras se trasvasan a tubos plásticos, se tapan, se les asigna un código y son conservadas en un refrigerador a 4 °C, hasta la realización de la prueba que es generalmente el mismo día o un día después de haber llegado, dependiendo de la urgencia y/o cantidad de muestras. La boleta indica entre otros datos, los días de evolución de la enfermedad, que es importante debido a que la detección de anticuerpos IgM por el procedimiento se da luego de 5 días de evolución. Muchas veces sucede que en la boleta viene indicado que el paciente tiene menos de 5 días de evolución, pero la Institución le practica la prueba ya que aún no se “maneja” adecuadamente el término “días de evolución”, dándose situaciones en las que muestras con menos de cinco días resultan positivas para la prueba de IgM, lo que sugiere que realmente esa persona tiene más de cinco días de evolución de la enfermedad.

5.2.3.2. Etapas

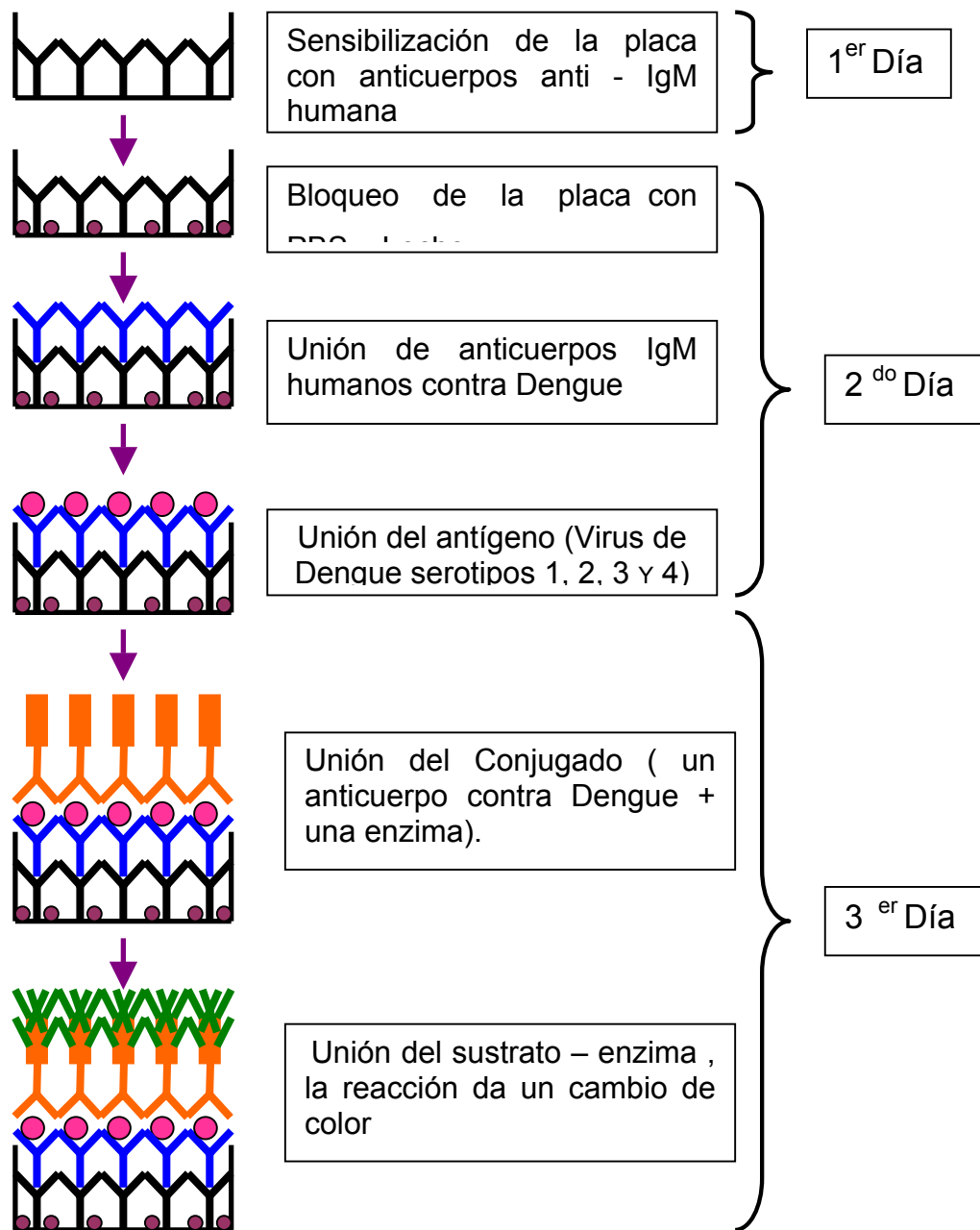
El tiempo total de realización de este procedimiento es de tres días (figura 4). Durante el primer día, se da la sensibilización de la placa con el anticuerpo anti – IgM humano y ésta se incuba durante la noche (aproximadamente 18 horas) a 4⁰C. En el segundo día, se da la selección de las muestras de los pacientes y la preparación del protocolo (cuadro 3); a la placa se le hacen 5 lavados con PBS y se bloquea con PBS – Leche al 1.39%, luego de otros 5 lavados, se agregan los sueros de los pacientes y los controles diluidos 1:40 en PBS - Leche , después de otros 5 lavados, a la placa se le agrega el antígeno diluido en PBS- Leche y se incuba toda la noche a 4⁰C. Al tercer día, a la placa se le hacen otros 5 lavados y se le agrega el conjugado diluido en PBS – Leche, luego de 7 lavados, se le agrega el sustrato, se incuba durante 30 minutos a 37 °C y posteriormente se deja

2 h a temperatura ambiente para el desarrollo del color y después, se coloca la placa en un lector de ELISA. Luego de realizarse la lectura se analizan los resultados; si la densidad óptica (DO) es ≥ 0.200 se considera positivo por anticuerpos IgM contra dengue, si la DO es < 0.200 es negativo y si la DO está entre 0.150 y < 0.200 se considera indeterminado (no hay suficientes anticuerpos IgM que puedan ser detectables por el procedimiento, o sea: no están en la concentración necesaria para que la prueba resulte positiva) y se solicita una segunda muestra. Si el resultado de la segunda muestra está de nuevo entre 0.150 y < 0.200 , ésta se considera negativa. Cuando se dan resultados indeterminados, la Institución pide una segunda muestra a los Centros de Salud de donde provino la primera, esta se debe de recolectar en menos de 4 días ya que el pico de producción de los anticuerpos IgM está entre el sexto y quinceavo día del inicio de la enfermedad, si los anticuerpos de la muestra del paciente no se han detectado en 7 días del inicio de la enfermedad, se considera negativa.

5.2.3.3. Control de los ensayos

Cuando se practica un nuevo ensayo, a cada placa se le colocan 4 controles: un control positivo fuerte, un control positivo débil, un control negativo y el PBS – leche (ver cuadro 3). Los controles fuertes, débiles y negativos se obtienen a partir de mezclas de sueros (pool) que ya fueron evaluados en ensayos anteriores, con lo que se hacen alícuotas de 25 ul de cada uno, se colocan en viales eppendorf® y se conservan a -20°C hasta su uso.

Cuando se realizan los ensayos de rutina, se verifican los resultados de los controles, para ello se colocan 3 veces cada uno en diferentes áreas de la placa (ver cuadro 3). Una vez realizada la lectura, se calcula el promedio total de cada control y este resultado se grafica en la carta de control de modo que se obtengan los resultados esperados. Si las lecturas están fuera del límite de control, el ensayo no es válido y se analizan las posibles causas del fallo, se toma la acción correctiva necesaria y se realiza de nuevo el ensayo.



Simbología: □ , Pocillo de la placa. Y , Anticuerpos anti - IgM humana. ● , Albúminas bovinas (leche descremada). Y , Anticuerpos IgM humana del paciente. ● , Antígenos (Dengue 1, 2, 3 y 4). Y . anticuerpo contra virus de dengue. ■ , Enzima peroxidasa (unida al anticuerpo contra dengue). X , Sustrato (peroxido de hidrogeno).

Figura 5.4. Fundamento del procedimiento determinación de IgM – Captura para el diagnóstico de dengue

Cuadro 5.3. Distribución de las muestras y de los controles en la placa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	SF	M	M	M	M	L	M	M	M	L	PBS
C	PBS	SN	M	M	M	M	M	M	M	M	M	PBS
D	PBS	SD	M	M	M	M	M	M	M	M	M	PBS
E	PBS	M	M	M	M	M	SD	M	M	M	SF	PBS
F	PBS	M	M	M	M	M	SN	M	M	M	SN	PBS
G	PBS	L	M	M	M	M	SF	M	M	M	SD	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Donde: PBS: Buffer, SF: suero control fuerte, SN: suero control negativo, SD: suero control débil, M: Muestras y L: PBS – Leche.

Si los resultados son los correctos, se anotan las lecturas en el protocolo, se identifican las muestras positivas y negativas y se procede a elaborar los reportes respectivos y se incorporan en la base de datos del Centros de Referencia (Aguilar y Vega, 1998).

5.2.4. Procedimiento de ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC - ELISA) para Diagnóstico de dengue utilizado por el CDC.

Este procedimiento tiene el mismo fundamento y su realización es muy similar al utilizado por el Inciensa. Este difiere en lo siguiente:

- El bloqueo de la placa se hace con PBS – Albúmina Bovina Sérica (BSA) al 4%.
- Los sueros de los pacientes y los controles se diluyen en PBS - albúmina bovina al 0.5 %.
- El antígeno y el conjugado son diluidos en PBS- Suero Normal Humano (SNH) al 20%.

A continuación se muestran los siguientes cuadros comparativos (cuadros 4 y 5): uno describe las etapas de los procedimientos y el otro muestra los reactivos y sus funciones. El procedimiento original del CDC se encuentra en el anexo 1 y el procedimiento del Inciensa en el anexo 2.

Cuadro 5.4. Comparación entre el procedimiento del CDC y del Inciensa de acuerdo a las etapas de los procedimientos

Etapas del procedimiento	Procedimiento CDC	Procedimiento Inciensa
1. Preparación del PBS	1.1. PBS = 8g NaCl + 0.2g KCl + 0.14g KH ₂ PO ₄ + 0.91g Na ₂ PO ₄ + Litro de agua destilada. 1.2. Se ajusta pH a 7.4	Es lo mismo
2. Sensibilización de la placa	2.1. Lavado de placa 3 veces con PBS. 2.2. 0.1 M amortiguador de carbonato = 1.59 g Na ₂ CO ₃ + 2.39 g NaHCO ₃ + 1 litro de agua destilada. Se ajusta pH a 9.6. 2.3. A cada pocillo de la placa se le añade 100 ul de anti - IgM humano diluido en búffer carbonato. 2.4. Se incuba en cámara húmeda durante 18 horas.	2.1. Es mismo. 2.2. Búffer carbonato - bicarbonato Sigma = una cápsula + 100 ml de agua desionizada. Se ajusta pH a 9.6. 2.3. A cada pocillo de la placa se le añade 100 ul de anti - IgM humano diluido en búffer carbonato - bicarbonato . 2.4. Es lo mismo
3. Bloqueo	3.1. Se lava la placa 5 veces con PBS. 3.2. Se prepara albúmina bovina (BSA) al 4% en PBS y con esta se llenan los pozos hasta el borde. 3.3. Se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente.	3.1. Es lo mismo. 3.2. Se prepara leche descremada al 1.39% en PBS y con esta se llenan los pozos hasta el borde. 3.3. Se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente o a 37 °C.
4. Adición de Anticuerpos (muestra: suero)	4.1. Lavar 5 veces PBS. 4.2. Se añade 50 ul por pozo de sueros desconocidos + controles positivo fuerte, débil y negativo diluidos en 1:40 en 0.5 % BSA - PBS. 4.3. Se incuba por 2 horas a 37 °C	4.1. Es lo mismo. 4.2. Se añade 50 ul por pozo de sueros desconocidos y controles positivo fuerte, positivo débil y negativo diluidos 1:40 en 1.39 % Leche - PBS. 4.3. Es lo mismo.
5. Adición del Antígeno	5.1. Lavado 5 veces con PBS. 5.2. Se diluye el antígeno preparado en cerebro de ratón en 20% de Suero normal humano (SHN) previamente extraído en acetona. Se añade 50 ul a cada pozo 5.3. Incubar 18 h a 4 °C.	5.1. Es lo mismo. 5.2. Se utiliza antígeno preparado en cerebro de ratón, se añade a la placa 50 ul del antígeno diluido en PBS – Leche). 5.3. Es lo mismo
6. Conjugado	6.1 Lavado 5 veces con PSB. 6.2. Diluir el conjugado en PBS que contiene 20% de extracto en acetona de SNH y agregar a cada pozo 50 ul. 6.3. Incubar 1h a 37 C.	6.1. Es lo mismo. 6.2. Se pipetea 25 ul de conjugado diluido en PBS - Leche en cada pozo, se diluye el conjugado monoclonal de ratón IgG peroxidasa de la siguiente manera (30ul + 2 ml de PBS - Leche). 6.3. Es lo mismo
7. Sustrato	7.1 Lavar 7 veces con PBS. 7.2. Añadir 100 ul del sustrato TMB por pozo. 7.3. Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y agregar la solución que detiene la reacción. Pero se puede usar el ABTS	7.1. Es lo mismo. 7.2. Añadir 100 ul por pozo del sustrato: solución A (ABTS) + Solución B (H ₂ O ₂). 7.3. Se incuba 1 h a 37 °C. Para que se observe el cambio de color se deja la placa a 2 h temperatura ambiente.
8. Lectura	8.1. Leer la placa en espectrofotómetro a 450 nm.	8.1. Leer la placa en espectrofotómetro a 405 /630 nm.
9. Resultados	DO mayor o igual a 0.200 = positivo. DO menor a 0.2 = negativo.	DO mayor o igual a 0.200 = positivo. DO menor a 0.200 = negativo. Si la DO esta entre 0.150 y < 0.200 = indeterminado

Cuadro 5.5. Comparación entre el procedimiento del CDC y del Inciensa de acuerdo a reactivos.

Reactivos	CDC	Inciensa	Función
PBS	8g NaCl + 0.2g KCl + 0.14g KH ₂ PO ₄ + 0.91g Na ₂ PO ₄ + Litro de agua destilada.	Es lo mismo	Lavado de placa para la eliminación de todo material no pegado (anti – IgM humana, anticuerpos IgM de muestra, antígeno y conjugado) y tiene la función de agente tensioactivo.
Búffer Carbonato	1.59 g Na ₂ CO ₃ g + 2.39 g NaHCO ₃ + 1 litro de agua destilada.	Búffer carbonato – bicarbonato (Sigma cat C-3014) = una cápsula + 100 ml de agua desionizada	Se utiliza para diluir la anti – IgM humana.
Anticuerpo contra IgM humano	Utilizan el goat anti-human IgM (No. 011003) Kirkegaard and Perry Laboratories	Utilizan el goat anti-human IgM (u chain específica) SIGMA I-0759	Una vez unidos a la placa "capturan" los Ac IgM humanos del paciente.
Albúmina bovina	Albúmina bovina fracción V de la casa comercial Intergen	La fuente de albúmina bovina es la leche en polvo descremada Dos Pinos® que se prepara con PBS.	En el bloqueo de la placa "rellena" los espacios donde el Ac anti – IgM humano no se unió y en el procedimiento del Inciensa funciona bloqueo de placa y diluyente de la muestra: donde la muestra es diluida en la concentración proteica del diluyente minimizando la unión inespecífico de las proteínas humanas sobre las paredes de la placa reduciendo la posibilidad de reacciones falsas positivas.
Antígeno	Los antígenos que se utilizan son derivados de tejido o de cerebro de ratón y son elaborados por ellos.	Son derivados de tejido o de cerebro de ratón y son preparados por el Instituto Pedro Kouri de Cuba	Se unen a los anticuerpos IgM humanos específicos contra dengue de la muestra del paciente.
Conjugado	El conjugado es el 6B6C-1 monoclonal conjugated by Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.	Es el mismo que utiliza el CDC.	Es un anticuerpo contra dengue que tiene unido la enzima peroxidasa. El conjugado tiene la función de unirse al antígeno.
Suero Normal Humano	Ellos lo hacen y lo utilizan en este procedimiento	No se utiliza	En el CDC lo utilizan como diluyente de la muestra: donde la muestra es diluida en la concentración de proteica del diluyente minimizando la unión inespecífico de proteínas humanas sobre las paredes de la placa reduciendo la posibilidad de reacciones falsas positivas
Sustrato	Usan el TMB (tetramethylbenzidine) de Kirkegaard and Perry (No. 50-76-05), pero dicen que otra alternativa es el ABTS (sulfonate del azino-diethylbenzthiazoline, No. 50-62-00) de la misma casa comercial.	Usan el ABTS de Kirkegaard and Perry (No. 50-62-00)	Consta de 2 soluciones que se mezclan: el revelador A (ABTS) y el revelador B (peróxido de hidrogeno). Gradualmente aparecerá una coloración verde en los pocillos de las muestras positivas y controles positivos a medida que la enzima actúe sobre el sustrato.

5.3. Validación de Métodos.

La Norma INTE – ISO/IEC 17025:2000 define validación como “la confirmación por examen y el aporte de evidencia objetiva de que se cumple un requisito en particular para un uso destinado y especificado” (Norma INTECO, 17025:2000).

Esta Norma en el apartado 5.4.5.2 indica que “el laboratorio debe de validar los métodos no normalizados, los métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio, métodos normalizados utilizados fuera del alcance previsto y las ampliaciones y modificaciones de métodos normalizados para confirmar que los métodos son apropiados para el uso destinado” (Norma INTECO, 17025:2000).

La validación de un método ”es un proceso por medio del cual se determinan y evalúan los atributos del método y es una parte importante del programa de garantía de calidad. Los métodos oficiales que se aplican al tipo de muestra para la que fueron especificados, no necesitan ser validados antes de ser usados, pero si la persona encargada del método no tiene la experiencia en el uso del método o cambia algunos de los requerimientos del método, puede optar por la revalidación” (Garfield, 1993).

Hay varias formas de abordar la validación de métodos y éstas son las siguientes (Garfield, 1993):

- Mediante la comprobación de los resultados con aquellos obtenidos usando un método oficial o estándar.
- Mediante el análisis de materiales de referencia certificados, de concentración conocida.

Las anteriores deben de ser consideradas si:

- Un método es nuevo para el laboratorio o para el analista.
- El laboratorio va a usar el método en el futuro con cierta regularidad.
- El método se ha revisado para incorporar mejoras.
- Control de calidad indica que un método establecido está cambiando con el tiempo.
- El método establecido fue usado en un laboratorio diferente, o con analistas diferentes o diferente instrumentación.
- Hay que demostrar la equivalencia entre dos métodos.

Los métodos deben de validarse por el laboratorio que usa el método y es responsable de asegurar que se valide adecuadamente y este tiene que decidir qué parámetros deben de ejecutar para su validación (Eurochem, 1998).

Si el laboratorio decide usar métodos validados debe de seguir las siguientes reglas:

- 1- La persona que va a desarrollar el método debe de familiarizarse con un nuevo método antes de usarlo por primera vez, para ello primero se le demostrará por una persona experta. Luego debe de usarlo trabajando con materiales de referencia o muestras de la práctica.
- 2- Se necesita hacer una valoración de cuantas muestras puede manejarse en un tiempo. Es mejor analizar bien unas muestras para intentar luego analizar un número grande.
- 3- Asegurarse de que cada cosa que se necesite para el método está disponible antes de comenzar a trabajar. Esto involucra tener la clase correcta de equipo, reactivos y normas.

Si es necesario adaptar o cambiar a algún método validado entonces la revalidación apropiada sería necesaria (Eurochem, 1998).

5.3.1. Parámetros a determinar para la validación de métodos.

Según la Organización Boliviana de Acreditación (OBA) 2000, para demostrar que un método es adecuado para la aplicación que se pretende es preciso determinar mediante estudios de laboratorio sus características de funcionamiento (parámetros), que puede incluir:

- Exactitud (sesgo)
- Precisión (repetitibilidad, reproducibilidad)
- Selectividad / especificidad
- Intervalo de trabajo
- Linealidad
- Limite de detección
- Limite de cuantificación
- Incertidumbre

Los parámetros que es preciso determinar difieren según el alcance del método de ensayo a validar. Los tipos de ensayo a considerar serán los siguientes (OBA. 2000):

- a - Determinación cuantitativa de un componente.
- b - Determinación cualitativa de un componente.

En el cuadro siguiente se definen los parámetros a considerar para cada tipo de ensayo:

Cuadro 5.6. Parámetros a considerar en cada tipo de ensayo.

TIPO DE ENSAYO	PARAMETRO
Determinación cuantitativa de un componente	Intervalo de trabajo Linealidad / Función respuesta Selectividad / Especificidad Precisión Exactitud Límite de cuantificación Incertidumbre Robustez
Determinación cualitativa	Selectividad / Especificidad Límite de detección

Fuente: OBA. 2000.

Para el presente informe se tomó en cuenta la sensibilidad, especificidad e incertidumbre que se detallan más adelante. Ver definiciones de los otros parámetros en el anexo 3.

5.4. Validación de métodos inmunológicos

Las pruebas inmunológicas suelen medir la cantidad total de anticuerpo que se une a una cantidad dada de antígeno (Roitt, 1998).

A medida que se introducen nuevas pruebas y métodos de diversas sustancias objeto de análisis (anticuerpos o antígenos), hay que escoger el que resulte más apropiado para las necesidades del laboratorio y para el estudio que se desee realizar. Es necesario tomar en cuenta una serie de parámetros: la especificidad, sensibilidad y precisión; además el factor costo y facilidad de ejecución del método. Las dos primeras pueden estar relacionadas entre sí (Taylor et al, 1979).

5.4.1. Especificidad

La especificidad de un método es la medida de una prueba para indicar la ausencia de un componente de una muestra cuando es realmente negativa respecto a ese componente, o una medida de la capacidad de una prueba para determinar exactamente la proporción de un componente en una muestra sin que interfieran los demás (Taylor et al, 1979).

5.4.2. Sensibilidad

Este parámetro se define como “la capacidad del método para detectar pequeñas cantidades de la sustancia (anticuerpos) que se mide, o para detectar pequeñas diferencias en la concentración de una serie de muestras. La sensibilidad de un método debe de compararse con la de otros métodos” (Taylor et al, 1979).

Es conveniente una sensibilidad máxima de las pruebas cuando la enfermedad es grave y su diagnóstico no debe de ser equivocado, la enfermedad pueda tratarse y los resultados falsos no plantean problemas graves (Taylor et al,1979).

5.4.3. Estimación de la Incertidumbre

Según la OBA. 2000, es el parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al valor asignado a la magnitud.

La estimación de la incertidumbre en procedimientos de laboratorio clínico, es algo complicada, especialmente si se consideran con detalle e individualmente todos los posibles componentes de la incertidumbre (Gella,1998).

La incertidumbre puede expresarse en términos de desviación estándar absoluta (incertidumbre estándar) o en desviación estándar relativa como un coeficiente de variación (Hill et al, 1998).

6. PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN.

Para la realización de este informe se compararon los procedimientos: el del Inciensa y del CDC.

Para el montaje del procedimiento del CDC; algunos de los reactivos comerciales que utiliza (cuadro 5), no pudieron ser conseguidos por razones de tiempo o porque el Inciensa no tiene proveedor. Se utilizaron los mismos reactivos pero de casas comerciales que les proveen al Inciensa. A pesar de esto se considera que el fundamento sigue siendo el mismo.

En el siguiente cuadro, se indica las casas comerciales de los reactivos utilizados, para la realización del procedimiento del CDC.

Cuadro 6.1. Reactivos de casas comerciales utilizados para la realización del procedimiento del CDC.

Reactivo	Utilizado por el CDC de Puerto Rico	Utilizado por el Inciensa
Anticuerpo contra IgM humano	Utilizan el goat anti-human IgM (No. 011003) Kirkegaard and Perry Laboratories	Se utilizó el goat anti-human IgM (u chain específica) SIGMA I-0759
Albúmina bovina	Albúmina bovina fracción V de la casa comercial Intergen.	Albúmina bovina fracción V de la casa comercial Sigma
Antígeno (Den 1, 2,3 y 4)	Ellos mismos lo fabrican	Se utilizó el fabricado por el Instituto Pedro Kouri

Todos los ensayos para este trabajo fueron realizados por el analista del Laboratorio de Dengue del Inciensa.

6.1. Preparación del PBS - BSA y el PBS –SNH

Para el montaje de las pruebas se procedió a la elaboración de los reactivos:

Se preparó el PBS – BSA de la siguiente manera:

- PBS - BSA al 4%: se pesó 4 g de BSA y se disolvió en 100 ml de PBS.
- PBS – BSA al 0.5%: se pesó 0.5 g de BSA y se disolvió en 100 ml de PBS.

El SNH se preparó de la siguiente manera:

- a. Se preparó una mezcla de suero o plasma que no presentó anticuerpos contra flavivirus. Para este trabajo se utilizó plasma humano procedente de la Clínica Bíblica.
- b. Se colocó 10 ml del plasma en un beaker de 2000 ml.
- c. Se le añadió 50 volúmenes (500 ml) de acetona y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- d. El beaker se dejó inclinado en un ángulo de 45⁰ durante la noche para que las proteínas del plasma que precipitaron se sedimentaran en el fondo.
- e. Se decantó el sobrenadante.
- f. Se repitieron los pasos c,d y e.

- g. Luego se dispersó el sedimento alrededor del fondo del beaker y se dejó reposar durante la noche en una cámara de extracción de gases para evaporar toda la acetona.
- h. Las proteínas extraídas se rehidrataron con 20 ml de PBS y se agitó por 2 h a temperatura ambiente.
- i. Después se centrifugó el SNH por 10 min a 1000 rpm, se guardó en un tubo con fondo cónico y se almacenó a -20°C .

Aunque el SHN extraído tubo una concentración del 50% al finalizar su preparación, se consideró como 100% como indica el CDC. Luego se tomó para la realización de los ensayos, 20 ml de esta solución y se diluyó en 100 ml de PBS para obtener una solución de PBS –SNH al 20%.

6.2. Selección de las muestras

Se seleccionó dos lotes de muestras, las cuales se conservaban a 4°C : un lote con 20 muestras positivas por dengue y otro con 45 muestras indeterminadas por dengue (DO entre 0.150 y <0.200). El lote de muestras positivas fue utilizado para determinar la estabilidad del anticuerpo y los parámetros de especificidad y sensibilidad; mientras que las muestras indeterminadas fueron utilizadas para ver si el procedimiento del CDC detecta pequeñas cantidades de anticuerpo que la técnica utilizada por el Incienssa.

6.3. Estabilidad del anticuerpo

A las muestras positivas se les practicaron tres ensayos por cada procedimiento (CDC y Incienssa) de la siguiente manera:

Cuadro 6.2. Tratamiento de las muestras positivas utilizadas.

Número de ensayo	Muestras conservadas a	Fecha de realización
1	4°C	2/5/2002
2	-20°C	6/5/2002
3	-20°C	9/5/2002

Todas estas muestras se colocaron en el protocolo ELISA - DENGUE de la siguiente manera:

Cuadro 6.3. Distribución de las muestras positivas en la placa, utilizadas para la realización de los 3 ensayos con el procedimiento del CDC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	SF	1	2	3	4	BSA		5	6	BSA	PBS
C	PBS	SN	7	8	9	10	11	12	13	14	15	PBS
D	PBS	SD	16		17	18	19	20			PBS	PBS
E	PBS						SD				SF	PBS
F	PBS						SN				SN	PBS
G	PBS	BSA					SF				SD	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Donde: Búffer PBS, SF: suero control fuerte, SN: suero control negativo, SD: suero control débil, y BSA: PBS – BSA.

Cuadro 6.4. Distribución de las muestras positivas en la placa, utilizadas para la realización de los 3 ensayos con el procedimiento del Incienssa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	SF	1	2	3	4	L		5	6	L	PBS
C	PBS	SN	7	8	9	10	11	12	13	14	15	PBS
D	PBS	SD	16		17	18	19	20			PBS	PBS
E	PBS						SD				SF	PBS
F	PBS						SN				SN	PBS
G	PBS	L					SF				SD	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Donde: Buffer PBS, SF: suero control fuerte, SN: suero control negativo, SD: suero control débil y L: PBS – Leche.

6.4. Determinación de los parámetros de sensibilidad y especificidad.

6.4.1. Sensibilidad.

De las muestras positivas por dengue se seleccionaron 5 muestras al azar correspondientes a los números 3, 7, 8, 9 y 13 donde las densidades ópticas se muestran en el cuadro 11. A estas muestras se les realizó diluciones (ver cuadro 12). Esto para comparar la sensibilidad del Inciensa con la del CDC o sea si tiene la “capacidad para detectar pequeñas cantidades de la sustancia que se mide” (Taylor et al,1979).

Cuadro 6.5. Muestras positivas utilizadas para determinar la sensibilidad del procedimiento del Inciensa y del CDC.

Muestras	Densidad óptica obtenida a partir del ensayo 3 por el procedimiento del incienSA
3	0.957
7	1.220
8	1.077
9	1.139
13	0.942

Fuente: datos obtenidos del Laboratorio de Dengue del Inciensa.

Cuadro 6.6. Diluciones de las muestras positivas 3, 7, 8, 9 y 13.

Dilución	Cantidad de la muestra en ul	Cantidad del diluyente en ul
1:400	1	399
1:500	1	499
1:600	1	599
1:700	1	699
1:800	1	799
1:900	1	899
1:1000	1	999
1:1100	1	1099
1:1200	1	1199
1:1300	1	1299

Las diluciones de las muestras se montaron en el protocolo para cada procedimiento de la siguiente manera:

Cuadro 6.7. Distribución de las muestras positivas diluidas en la placa que se utilizaron en el procedimiento del Incienssa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	SF	9 1: 400	9 1:500	9 1:600	9 1:700	L	9 1:800	9 1:900	9 1:1000	L	PBS
C	PBS	SN	9 1:1100	9 1:1200	9 1:1300	8 1:400	8 1: 500	8 1:600	8 1:700	8 1:800	8 1:900	PBS
D	PBS	SD	8 1:1000	8 1:1100	8 1:1200	8 1:1300	13 1:400	13 1: 500	13 1:600	13 1:700	13 1:800	PBS
E	PBS	13 1:900	13 1:1000	13 1:1100	13 1:1200	13 1:1300	SD	3 1:400	3 1: 500	3 1:600	SF	PBS
F	PBS	3 1:700	3 1:800	3 1:900	3 1:1000	3 1:1100	SN	13 1:1200	13 1:1300	7 1:400	SN	PBS
G	PBS	L			7 1:700		SF	7 1:990	7 1:1000	7 1:1100	SD	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Donde: PBS: Buffer PBS, SF: suero control fuerte, SN: suero control negativo, SD: suero control débil y L: PBS – Leche. En los demás pocillos de la placa, el número de arriba indica la muestra, y el de abajo su dilución.

Cuadro 6.8. Distribución de las muestras positivas diluidas en la placa que se utilizaron en el procedimiento del CDC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	SF	9 1:400	9 1:500	9 1:600	9 1:700	BSA	9 1:800	9 1:900	9 1:1000	BSA	PBS
C	PBS	SN	9 1:1100	9 1:1200	9 1:1300	8 1:400	8 1:500	8 1:600	8 1:700	8 1:800	8 1:900	PBS
D	PBS	SD	9 1:1000	8 1:1100	8 1:1200	8 1:1300	13 1:400	13 1:500	13 1:600	13 1:700	13 1:800	PBS
E	PBS	13 1:900	13 1:1000	13 1:1100	13 1:1200	13 1:1300	SD	3 1:400	3 1:500	3 1:600	SF	PBS
F	PBS	3 1:700	3 1:800	3 1:900	3 1:1000	3 1:1100	SN	3 1:1200	3 1:1300	7 1:400	SN	PBS
G	PBS	BSA	7 1:500	7 1:600	7 1:700	7 1:800	SF	7 1:900	7 1:1000	7 1:1100	SD	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Donde: Buffer PBS, SF: suero control fuerte, SN: suero control negativo, SD: suero control débil y L: PBS – Leche.

Luego se procedió a comparar la sensibilidad de las muestras indeterminadas con el CDC, éstas fueron colocadas en la placa de la siguiente manera:

Cuadro 6.9. Distribución de las muestras indeterminadas en la placa utilizadas para el procedimiento del CDC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	SF	1	2	3	4	BSA		5	6	BSA	PBS
C	PBS	SN	7	8	9	10	11	12	13		14	PBS
D	PBS	SD	15	16	17	18	19	20	21	22	23	PBS
E	PBS	24	25	26	27	28	SD		29	30	SF	PBS
F	PBS	31	32	33	34	35	SN	36	37	38	SN	PBS
G	PBS	BSA	39	40	41	42	SF	43	44	45	SD	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Donde: Buffer PBS, SF: suero control fuerte, SN: suero control negativo, SD: suero control débil y BSA: PBS – BSA.

6.4.2. Especificidad.

Para determinar este parámetro se tomaron 20 muestras positivas por dengue. A estas muestras se les aplicó los procedimientos de determinación de IgM para el diagnóstico de leptospirosis, sarampión y rubéola, para determinar posibles reacciones cruzadas o la aparición de falsos positivos.

Para la determinación de sarampión se utilizó la técnica de detección de anticuerpos IgM DADE BEHRING de origen Alemán, para la determinación de rubéola se utilizó la técnica de detección de anticuerpos IgM, ORGANON TEKNICA también de origen Alemán y para la determinación de leptospira se utilizó el procedimiento de detección de anticuerpos IgM Lepto – Dipstick de origen Holandés.

La especificidad se calculó con la siguiente fórmula:

		Estado de la enfermedad		
		Presente	Ausente	Total
Resultados de la prueba	Positivos	a	b	a+b
	Negativos	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	A+b+c+d

Donde:

a = número de positivos verdaderos

b = número de falsos positivos

c = número de falsos negativos

d = número de negativos verdaderos

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Negativo Verdadero}}{\text{Negativo Verdadero} + \text{Positivo Falso}} * 100$$

o sea

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{d + b} * 100$$

Donde el 100 equivale al porcentaje de especificidad

7. RESULTADOS

7.1. Estabilidad del anticuerpo

Al realizar los tres ensayos de las muestras positivas con cada procedimiento se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 7.1. Resultados obtenidos de las muestras positivas al someterlas al procedimiento del Inciensa.

Muestras	Ensayo 1 Muestras conservadas a 4 °C (DO)	Ensayo 2 Muestras conservadas a -20 °C (DO)	Ensayo 3 Muestras conservadas a -20 °C (DO) luego de 72 h
1	1.515	1.318	1.553
2	1.038	0.427	0.579
3	1.217	0.579	0.957
4	1.223	0.592	0.958
5	1.174	0.592	0.823
6	1.455	1.019	1.474
7	1.341	0.902	1.220
8	1.151	0.818	1.077
9	1.209	0.812	1.139
10	1.248	0.970	1.191
11	0.761	0.302	0.522
12	1.013	0.500	0.792
13	0.840	0.569	0.942
14	1.081	0.556	0.847
15	0.764	0.538	0.890
16	0.445	0.163	0.249
17	1.008	0.522	0.765
18	0.631	0.408	0.533
19	0.973	0.499	0.758
20	1.185	0.601	0.807

Fuente: Datos obtenidos en el Laboratorio de Dengue del Inciensa.

Cuadro 7.2. Resultados obtenidos de las muestras positivas al someterlas al procedimiento del CDC.

Muestras	Ensayo 1 Muestras conservadas a 4 °C (DO)	Ensayo 2 Muestras conservadas a -20 °C (DO)	Ensayo 3 Muestras conservadas a -20 °C (DO) luego de 72 h
1	1.602	1.627	1.587
2	1.621	1.398	1.413
3	1.650	1.460	1.576
4	1.553	1.455	1.461
5	1.554	1.516	1.560
6	1.606	1.604	1.650
7	1.163	1.364	1.279
8	1.204	1.214	1.262
9	0.924	1.276	1.090
10	1.008	1.094	1.192
11	1.194	1.150	1.102
12	0.900	1.156	1.080
13	1.242	1.154	1.289
14	1.183	1.095	1.208
15	1.139	1.083	1.234
16	1.306	0.687	0.666
17	1.552	1.333	1.382
18	1.434	1.480	1.434
19	1.483	1.502	1.155
20	1.495	1.501	1.460

Fuente: Datos obtenidos en el Laboratorio de Dengue del Inciensa.

Para evidenciar la posible degradación de la muestra por cambios de temperatura de conservación se compararon los ensayos 1 y 2, de cada procedimiento, ésta comparación de DO se muestra en el cuadro 18 y en las figuras 5 y 6.

Cuadro 7.3. Comparación de DO a diferentes temperaturas de almacenamiento de las muestras positivas del ensayo 1 y 2.

Muestra	Procedimiento del Inciensa		Procedimiento del CDC	
	Ensayo 1 Muestras conservadas a 4 °C (DO)	Ensayo 2 Muestras conservadas a -20 °C (DO)	Ensayo 1 Muestras conservadas a 4 °C (DO)	Ensayo 2 Muestras conservadas a -20 °C (DO)
1	1.515	1.318	1.602	1.627
2	1.038	0.427	1.621	1.398
3	1.217	0.579	1.650	1.460
4	1.223	0.592	1.553	1.455
5	1.174	0.592	1.554	1.516
6	1.455	1.019	1.606	1.604
7	1.341	0.902	1.163	1.364
8	1.151	0.818	1.204	1.214
9	1.209	0.812	0.924	1.276
10	1.248	0.970	1.008	1.094
11	0.761	0.302	1.194	1.150
12	1.013	0.500	0.900	1.156
13	0.840	0.569	1.242	1.154
14	1.081	0.556	1.183	1.095
15	0.764	0.538	1.139	1.083
16	0.445	0.163	1.306	0.687
17	1.008	0.522	1.552	1.333
18	0.631	0.408	1.434	1.480
19	0.973	0.499	1.483	1.502
20	1.185	0.601	1.495	1.501

Fuente: datos del Laboratorio de Dengue del Inciensa

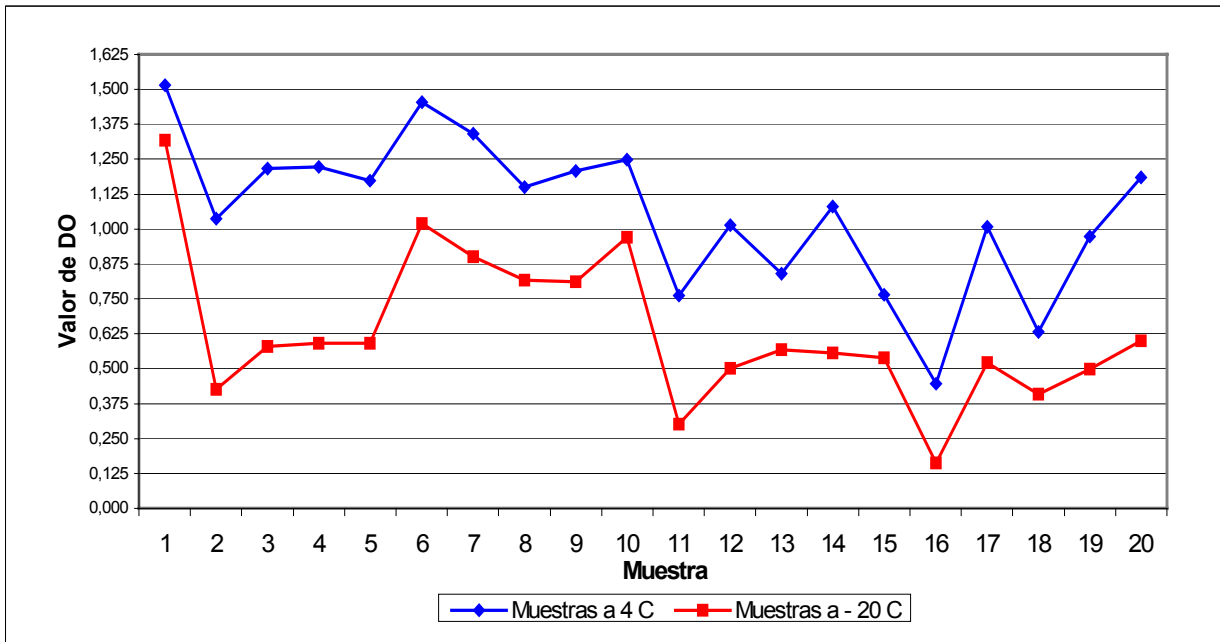


Figura 7.1. DO vs Muestra (ensayo 1 y 2) con el procedimiento del Inciensa. Fuente: datos obtenidos del Laboratorio de Dengue del Inciensa

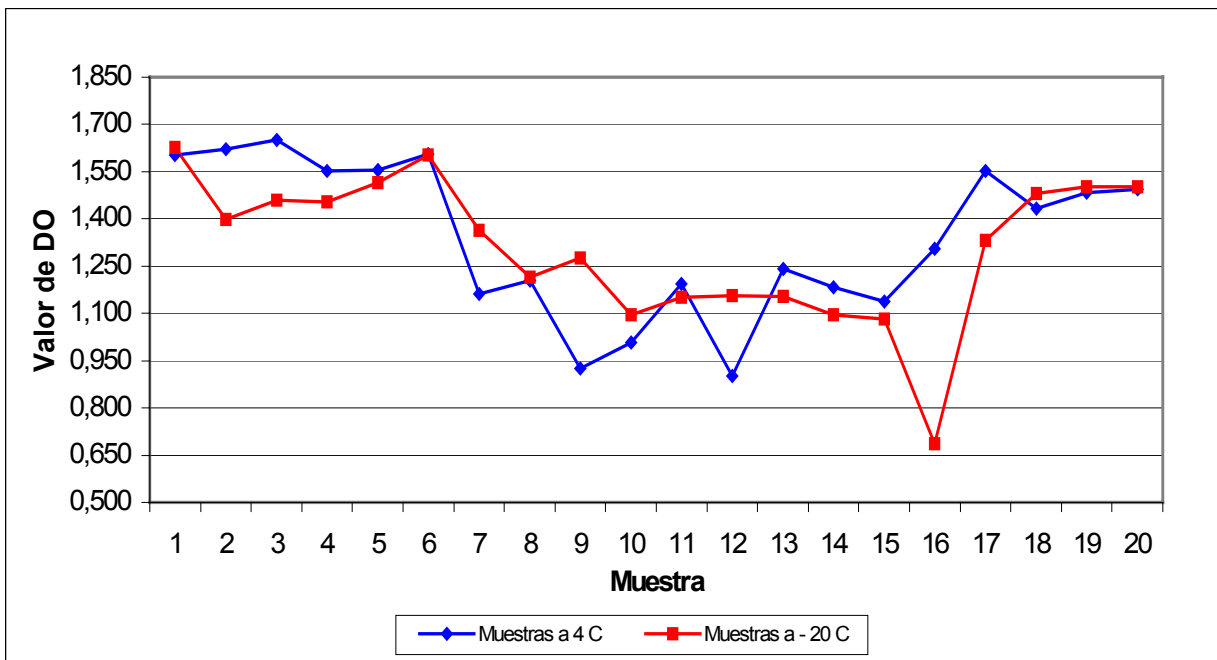


Figura 7.2. DO vs Muestra (ensayo 1 y 2) con el procedimiento del CDC. Fuente: datos obtenidos del Laboratorio de Dengue del Inciensa.

Para determinar posible la degradación de la muestra de acuerdo a la temperatura almacenamiento (72 h) se compararon los ensayos 2 y 3, de cada procedimiento, esta comparación de DO se muestra en el cuadro 19 y en las figuras 7 y 8.

Cuadro 7.4. Comparación de DO a diferentes temperaturas de almacenamiento de las muestras positivas del ensayo 2 y 3.

Muestra	Procedimiento del Incienssa		Procedimiento del CDC	
	Ensayo 2 Muestras conservadas a - 20 °C (DO)	Ensayo 3 Muestras conservadas a -20 °C (DO)	Ensayo 2 Muestras conservadas de - 20 °C (DO)	Ensayo 3 Muestras conservadas a -20 °C (DO)
1	1.318	1.553	1.627	1.587
2	0.427	0.579	1.398	1.413
3	0.579	0.957	1.460	1.576
4	0.592	0.958	1.455	1.461
5	0.592	0.823	1.516	1.560
6	1.019	1.474	1.604	1.650
7	0.902	1.220	1.364	1.279
8	0.818	1.077	1.214	1.262
9	0.812	1.139	1.276	1.090
10	0.970	1.191	1.094	1.192
11	0.302	0.522	1.150	1.102
12	0.500	0.792	1.156	1.080
13	0.569	0.942	1.154	1.289
14	0.556	0.847	1.095	1.208
15	0.538	0.890	1.083	1.234
16	0.163	0.249	0.687	0.666
17	0.522	0.765	1.333	1.382
18	0.408	0.533	1.480	1.434
19	0.499	0.758	1.502	1.155
20	0.601	0.807	1.501	1.460

Fuente: datos obtenidos del Laboratorio de Dengue del Incienssa

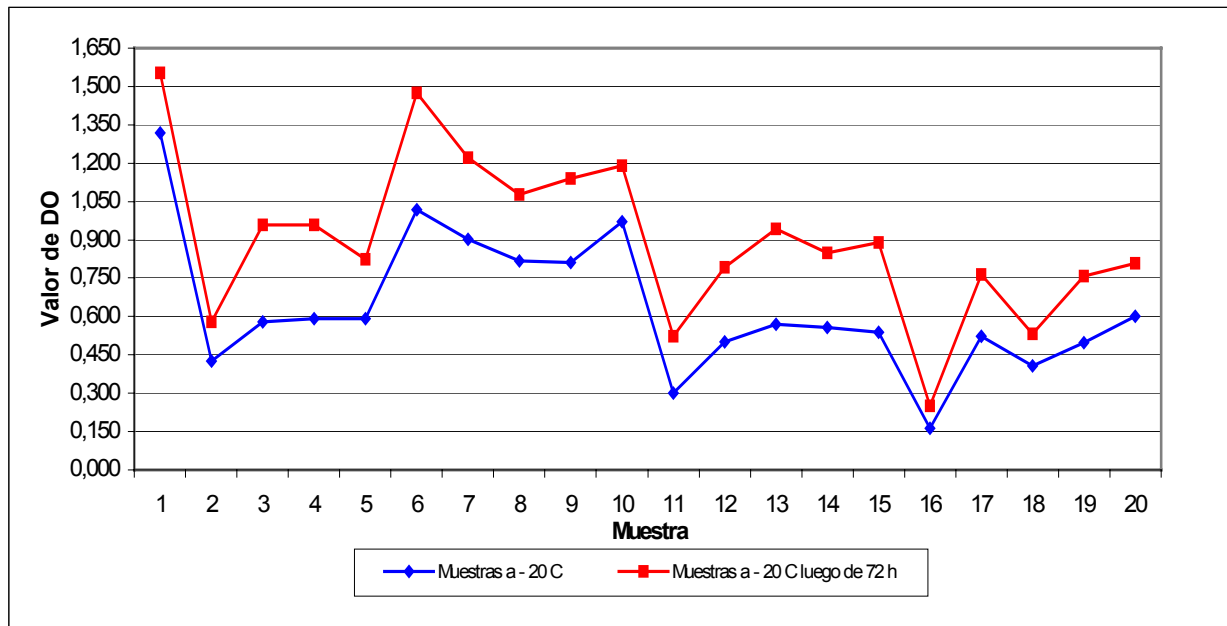


Figura 7.3. DO vs Muestra (ensayo 2 y 3) a 72 h para el procedimiento del Incienssa. Fuente: datos obtenidos del Laboratorio de Dengue del Incienssa

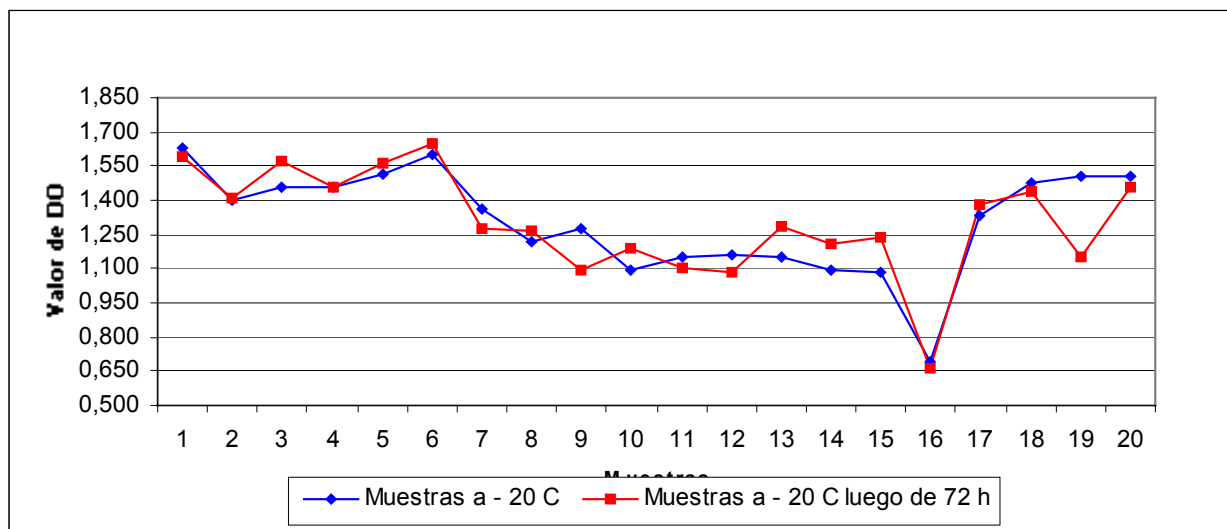


Figura 7.4 Do vs Muestra (ensayo 2 y 3) a 72 h para el procedimiento del CDC Fuente: datos obtenidos del Laboratorio de Dengue del Incienssa

El siguiente gráfico se realizó con el objetivo de observar la posible degradación de las muestras entre el ensayo 1 y 3 sometidos al procedimiento del Incienssa, porque entre el ensayo 2 y 3 (figura 7), la degradación no se observa muy bien.

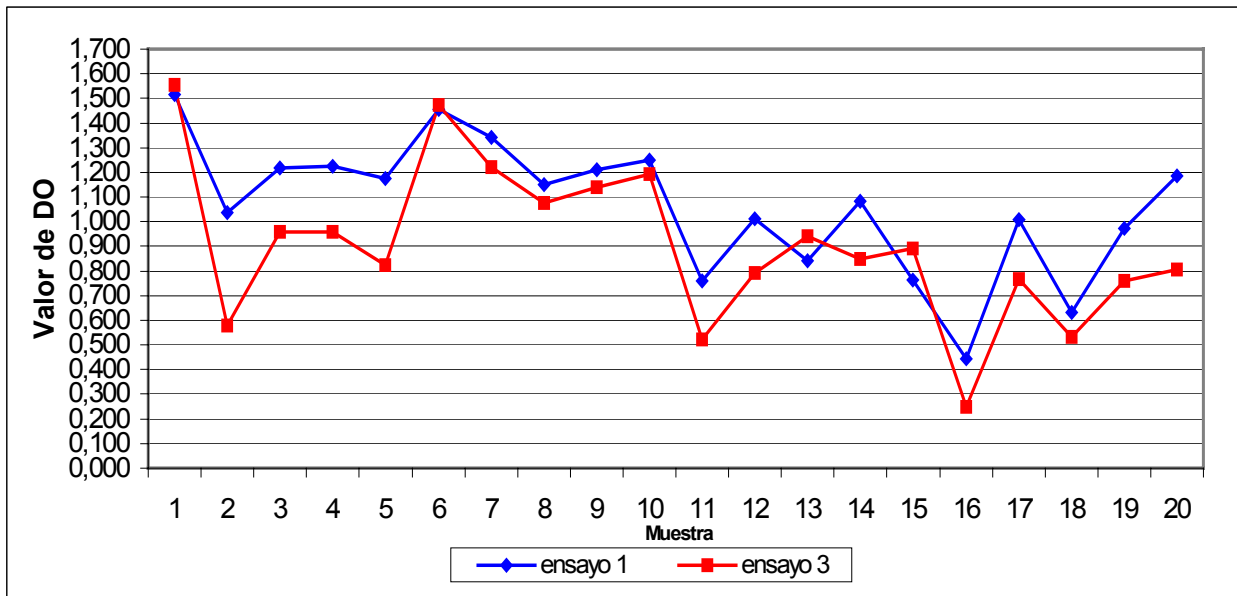


Figura 7.5. Valores de DO entre el ensayo 1 y 3 obtenidos con el procedimiento del Incienssa. Fuente: datos obtenidos del Laboratorio de Dengue del Incienssa.

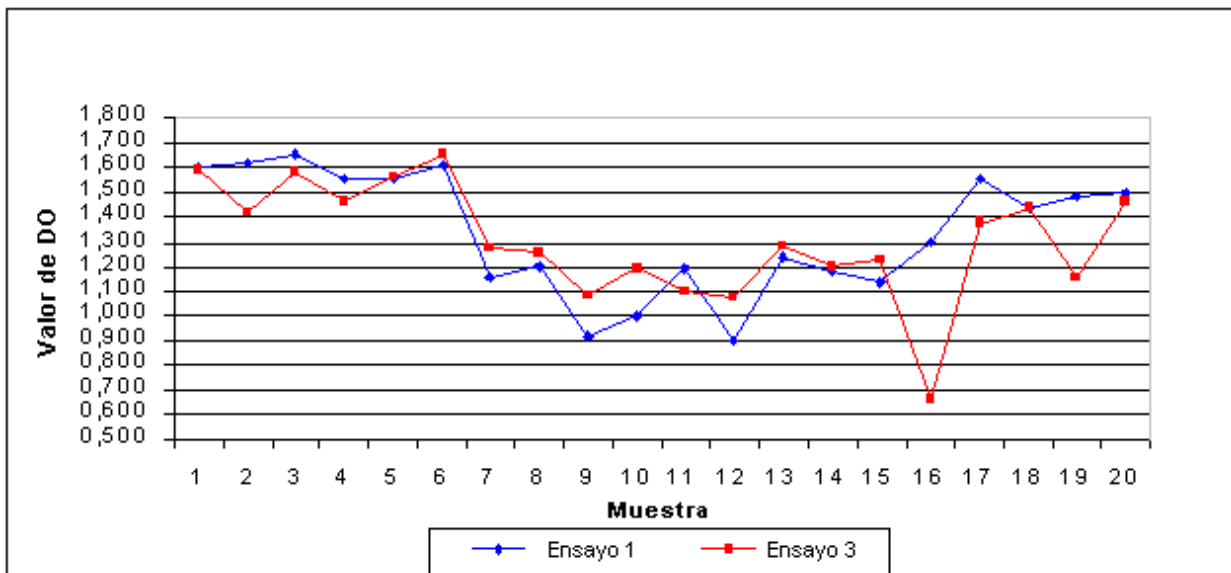


Figura 7.6 Valores de DO entre el ensayo 1 y 3 obtenidos con el procedimiento del CDC .Fuente: datos obtenidos del Laboratorio de Dengue del Incienssa.

En el gráfico anterior se observa el comportamiento de las muestras del ensayo 1 y 3 con el procedimiento del CDC, como se observa en las figuras 6 y 7 las muestras presentan un comportamiento muy parecido entre ellas.

7.2. Sensibilidad y especificidad

7.2.1 Sensibilidad

Al montaje de las muestras correspondientes a los números 3, 7, 8, 9 y 13 diluidas, para cada procedimiento, se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 7.5. Densidades ópticas obtenidas de las diluciones de la muestra # 3 al someterla a los procedimientos del CDC y del Inciensa.

Dilución	CDC		Inciensa	
	DO	Resultado	DO	Resultado
1:400	0.855	+	0.683	+
1:500	0.896	+	0.700	+
1:600	0.842	+	0.692	+
1:700	0.902	+	0.473	+
1:800	0.953	+	0.496	+
1:900	1.006	+	0.526	+
1:1000	0.910	+	0.483	+
1:1100	0.735	+	0.374	+
1:1200	0.901	+	0.455	+
1:1300	0.784	+	0.570	+

Fuente: datos suministrados por el Laboratorio de Dengue

Cuadro 7.6. Densidades ópticas obtenidas de las diluciones de la muestra # 7 al someterla a los procedimientos del CDC y del Inciensa.

Dilución	CDC		Inciensa	
	DO	Resultado	DO	Resultado
1:400	1.112	+	1.004	+
1:500	0.891	+	NR	
1:600	0.772	+	NR	
1:700	0.744	+	0.633	+
1:800	0.810	+	NR	
1:900	0.765	+	0.834	+
1:1000	0.865	+	0.951	+
1:1100	0.763	+	0.864	+
1:1200	No se montó		No se montó	
1:1300	No se montó		No se montó	

NR: Resultado de DO no reportado por derrame de la muestra en los pozos correspondientes. Las diluciones 1:1200 y 1:1300 no se montaron por falta de BSA.

Cuadro 7.7. Densidades ópticas obtenidas de las diluciones de la muestra # 8 al someterla a los procedimientos del CDC y del Incienssa

Dilución	CDC		Inciensa	
	DO	Resultado	DO	Resultado
1:400	0.871	+	0.702	+
1:500	0.947	+	0.594	+
1:600	0.869	+	0.681	+
1:700	0.922	+	0.723	+
1:800	0.936	+	0.480	+
1:900	0.917	+	0.665	+
1:1000	1.049	+	0.536	+
1:1100	0.765	+	0.542	+
1:1200	0.851	+	0.447	+
1:1300	0.620	+	0.482	+

Fuente: datos suministrados por el Laboratorio de Dengue

Cuadro 7.8. Densidades ópticas obtenidas de las diluciones de la muestra # 9 al someterla a los procedimientos del CDC y del Incienssa.

Dilución	CDC		Inciensa	
	DO	Resultado	DO	Resultado
1:400	1.155	+	0.614	+
1:500	1.022	+	0.634	+
1:600	1.062	+	0.633	+
1:700	1.092	+	0.537	+
1:800	1.108	+	0.620	+
1:900	1.103	+	0.565	+
1:1000	1.068	+	0.517	+
1:1100	0.856	+	0.647	+
1:1200	0.806	+	0.552	+
1:1300	0.789	+	0.436	+

Fuente: datos suministrados por el Laboratorio de Dengue

Cuadro 7.9. Densidades ópticas obtenidas de las diluciones de la muestra # 13 al someterla a los procedimientos del CDC y del Incienssa

Dilución	CDC		Inciensa	
	DO	Resultado	DO	Resultado
1:400	0.859	+	0.437	+
1:500	0.765	+	0.435	+
1:600	0.687	+	0.376	+
1:700	0.693	+	0.339	+
1:800	0.727	+	0.317	+
1:900	0.628	+	0.311	+
1:1000	0.427	+	0.289	+
1:1100	0.437	+	0.179	indeterminada
1:1200	0.298	+	0.181	Indeterminada
1:1300	0.350	+	0.084	-

Fuente: datos suministrados por el Laboratorio de Dengue

En el siguiente cuadro se observan las DO de las muestras indeterminadas que fueron obtenidas con el procedimiento del Incienssa y con el procedimiento del CDC.

Cuadro 7.10. Densidades ópticas obtenidas de las muestras indeterminadas a partir de los dos procedimientos.

Muestra	Inciensa (DO)	CDC (DO)
1	0.160	0.378
2	0.180	0.253
3	0.186	0.346
4	0.184	0.356
5	0.154	0.324
6	0.151	0.453
7	0.162	0.499
8	0.198	0.252
9	0.185	0.277
10	0.155	0.552
11	0.166	0.362
12	0.150	0.601

13	0.191	0.946
14	0.167	0.865
15	0.154	1.063
16	0.145	0.735
17	0.188	0.861
18	0.185	0.222
19	0.195	0.598
20	0.195	0.933
21	0.165	0.684
22	0.178	0.798
23	0.174	0.506
24	0.167	0.708
25	0.161	0.687
26	0.179	0.622
27	0.197	0.872
28	0.160	0.618
29	0.177	0.911
30	0.198	0.803
31	0.170	0.601
32	0.163	0.760
33	0.169	0.831
34	0.172	0.660
35	0.183	0.541
36	0.195	0.500
37	0.188	0.796
38	0.184	0.748
39	0.150	0.480
40	0.161	0.694
41	0.177	0.600
42	0.173	0.401
43	0.150	0.458
44	0.181	0.638
45	0.184	0.840

Fuente: Datos obtenidos en el Laboratorio de Dengue del Inciensa.

En el siguiente gráfico (figura 11) representa las densidades ópticas del cuadro anterior. Donde se observa la diferencia de sensibilidad en ambos procedimientos

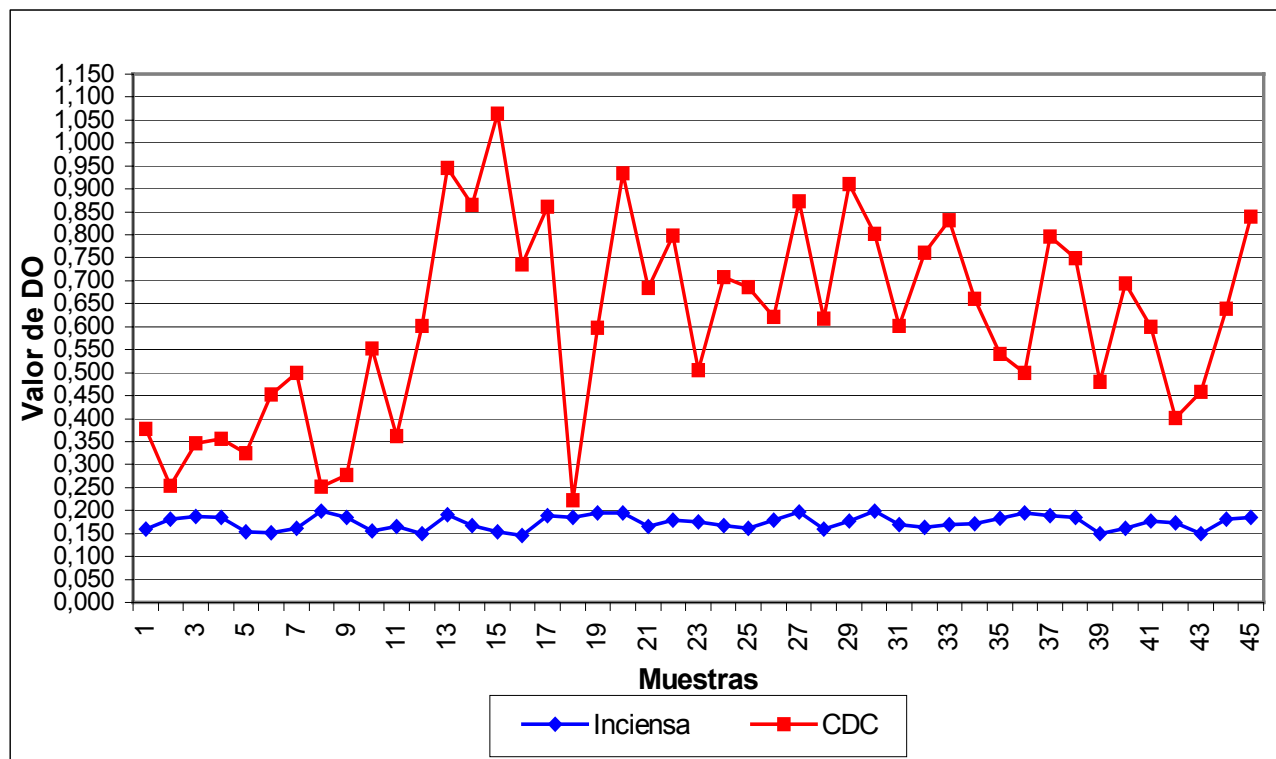


Figura 7.7. Comparación de DO de muestras indeterminadas por el procedimiento del Inciensa vs el CDC Fuente: datos obtenidos del Laboratorio de Dengue del Inciensa.

7.2.2. Especificidad

Las muestras positivas por dengue se les practicó, los procedimientos de determinación de IgM para leptospira, rubéola y sarampión. De estas determinaciones se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 7.11. Resultados de las muestras positivas por dengue que se procesaron por leptospira, sarampión y rubéola.

Muestra	Determinación de IgM para Leptospira	Determinación de IgM para Sarampión	Determinación de IgM para Rubéola
1	Negativa	Negativa	Negativa
2	Negativa	Negativa	Negativa
3	Negativa	Negativa	Negativa
4	Negativa	Negativa	Negativa
5	Negativa	Negativa	Negativa
6	Negativa	Negativa	Negativa
7	Negativa	Negativa	Negativa
8	Negativa	Negativa	Negativa
9	Negativa	Negativa	Negativa
10	Indeterminada	Negativa	Negativa
11	Negativa	Negativa	Negativa
12	Negativa	Negativa	Negativa
13	Negativa	Negativa	Negativa
14	Negativa	Positiva	Negativa
15	Negativa	Negativa	Negativa
16	Negativa	Negativa	Negativa
17	Negativa	Negativa	Negativa
18	Negativa	Negativa	Negativa
19	Negativa	Negativa	Negativa
20	Negativa	Negativa	Negativa

Fuente: datos suministrados por el Laboratorio de Dengue

7.2.2.1. Cálculo de especificidad

- a- Cálculo de la especificidad para las muestras sometidas a determinación de IgM para leptospira. La muestra indeterminada puede considerarse como una positiva débil o una reacción cruzada.

		Estado de la enfermedad		
		Presente	Ausente	Total
Resultados de la prueba	Positivos	0	1	1
	Negativos	0	20	20
	Total	0	21	21

$$Especificidad = \frac{\text{Negativo Verdadero}}{\text{Negativo Verdadero} + \text{Positivo Falso}} * 100$$

$$Especificidad = \frac{20}{21} * 100\% = 95\%$$

- b- Muestras positivas por dengue sometidas a determinación de IgM para sarampión.

Estado de la enfermedad

		Estado de la enfermedad		
		Presente	Ausente	Total
Resultados de la prueba	Positivos	0	1	1
	Negativos	0	20	20
	Total	0	21	21

$$Especificidad = \frac{\text{Negativo Verdadero}}{\text{Negativo Verdadero} + \text{Positivo Falso}} * 100$$

$$Especificidad = \frac{20}{21} * 100\% = 95\%$$

c- Muestras positivas contra dengue sometidas a determinación de IgM para Rubéola.

		Estado de la enfermedad		
		Presente	Ausente	Total
Resultados de la prueba	Positivos	0	0	0
	Negativos	0	20	20
	Total	0	20	20

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Negativo Verdadero}}{\text{Negativo Verdadero} + \text{Positivo Falso}} * 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{20}{20} * 100\% = 100\%$$

De acuerdo a los resultados anteriores se considera que la prueba de determinación de IgM –captura contra dengue utilizada por el Inciensa posee un 95% de especificidad

8. DISCUSIÓN.

Antes de iniciar con el análisis de los resultados obtenidos en el presente informe, se debe aclarar ciertas premisas:

- a- El punto de corte para los dos procedimientos es de 0.200 de DO, eso quiere decir que $DO \geq 0.200$ las muestras se consideran positivas.
- b- El fin de utilizar el procedimiento del CDC, fue para compararlo con el utilizado por el Inciensa. Para validar un procedimiento se debe de comparar con otros métodos de referencia.
- c- El procedimiento del CDC fue ejecutado en el Laboratorio de Dengue del Inciensa, se utilizaron los mismos reactivos sólo que de diferente casa comercial (cuadro 7) y su fundamento sigue siendo el mismo, ya que el CDC afirma que en el caso de la anti – IgM humana, el conjugado y el antígeno “cualquier anticuerpo contra IgM

humano puede ser usado siempre y cuando sea purificado por columnas de afinidad” y con respecto al conjugado “se puede utilizar cualquier anticuerpo contra los virus de dengue siempre y cuando no exhiba una amplia reactividad cruzada”, el antígeno que se utiliza en la prueba “puede ser derivado de cerebro de ratón o de cultivo celular y no necesita ser purificado”. Con respecto a la BSA mientras sea fracción V, se puede utilizar en la prueba (anexo 1).

8.1. Incertidumbre

El procedimiento de determinación de IgM captura para el diagnóstico del dengue que el Inciensa utiliza es considerado como un procedimiento de Laboratorio clínico

La incertidumbre de los resultados en esta clase de procedimientos de Laboratorio Clínico es muy complicada, si se considera todos los posibles componentes o variables de esta (Gella, 1998).

La incertidumbre de esta prueba tiene diversas variables que se explican a continuación:

a) Inestabilidad de la muestra

Todas las muestras de suero tienen diferentes títulos de anticuerpos, estos varían para cada persona y hay que tomar en cuenta su edad, sexo y raza, es por ello que el título de anticuerpos deben ser tomados solamente como una guía (hay presencia) y no como un valor absoluto. (<http://www.biocientifica.com.ar/espanol/intrctivos/igm-turdimetrica.html>)

Cuando un paciente visita al médico, este hace un diagnóstico con base a lo que el paciente le dice y a lo que el médico comprueba en su examen físico, si éste determina que cumple con la definición de caso de dengue, le toma una muestra de sangre y le pregunta desde cuando tiene la fiebre (días de evolución de la enfermedad), muchas veces ni el médico ni el paciente tienen claro los días del inicio de la fiebre y puede ser que tenga más o menos días de evolución. Esto es muy importante porque el pico de

producción de anticuerpos se da generalmente entre el sexto y quinceavo día de haber iniciado la enfermedad.

Si el paciente tiene la enfermedad, puede ser que la muestra haya sido tomada antes de los 5 días (que no es lo recomendado por la producción de anticuerpos IgM que se da luego de haber terminado la viremia), o sea luego de 5 días y puede ser que la cantidad de anticuerpos que tenga no sea la suficiente para que la prueba lo considere positivo (el valor de DO es mayor o igual a 0.200) y el diagnóstico de este paciente sea considerado como indeterminado (valor de DO entre 0.150 y < 0.200).

b) Pipeteo de la muestra.

La técnica de pipeteo en cada analista es diferente, puede ser que tome más o menos volumen de una muestra, esto es más evidente cuando se tratan de volúmenes muy pequeños como los microlitros que se toman con micropipetas. Según informa el Inciensa, “las pipetas utilizadas para la ejecución de las pruebas se encuentran debidamente calibradas”

La pipeta siempre dispensa la misma cantidad (un valor \pm el rango de exactitud) al primer toque. Si el analista se equivoca y dispensa al segundo toque, toma más volumen de muestra y si la pipeta tiene contacto con los bordes del recipiente puede ser que dispense menor cantidad de muestra.

c) Tiempos de incubación y temperatura de incubación.

Los tiempos y la temperatura de incubación son importantes en este procedimiento porque facilitan el bloqueo de la placa con PBS – Leche, la unión del anticuerpo IgM contra dengue con la anti – IgM, la unión del antígeno al anticuerpo IgM, la unión un anticuerpo contra dengue unido a una enzima con el antígeno y la reacción entre la enzima y el sustrato que se adiciona hasta el final. De modo que se obtenga una máxima sensibilidad en la prueba, al facilitarse estas uniones.

d) Suministro de energía eléctrica

Otra variable que se debe de tomar en cuenta es que el Inciensa recibe fluctuaciones de voltaje en el suministro eléctrico, que podría afectar a los equipos, por ejemplo el lector de ELISA, por lo que los valores de DO reportados pueden tener variaciones.

Según Gella. 1998, “debería estudiarse y cuantificarse todos y cada uno de los componentes de la incertidumbre para detectar las significativas y realizar el cálculo de la incertidumbre, esto es útil para identificar las causas principales de la variabilidad y realizar acciones encaminadas a reducir la incertidumbre sin embargo, se trata de un proceso engorroso y que difícilmente puede ser llevado a cabo en el laboratorio clínico” Este mismo autor afirma que por todas las variables que afectan a los procedimientos del laboratorio clínico, se debe de considerar la imprecisión interserial (CV_a) (desviación estándar de las mediciones se repiten) como una estimación de la incertidumbre de medida en los procedimientos de estos tipos de laboratorios.

El Laboratorio de Dengue es consciente de todas estas variables. Pero como se dijo anteriormente, el cálculo de la incertidumbre de los resultados que generan para este tipo de pruebas es muy complicada y difícil de llevar a cabo ya que se debe de analizar cada variable. De acuerdo con lo expresado anteriormente, a la capacidad del laboratorio, en cuanto a reactivos y al tiempo disponible para la realización del presente informe no se procedió a realizar el cálculo de la incertidumbre de los resultados.

Estas variables (incisos a, b, c y d) no afectan a las muestras positivas fuertes ni a las negativas, pero pueden afectar aquellos sueros que tienen bajos títulos (baja producción) de anticuerpos, el Laboratorio resuelve el problema estableciendo un rango de DO comprendido entre 0.150 y < 0.200 , que son las muestras indeterminadas (podrían tener bajos títulos de anticuerpos IgM) y quiere decir que los pacientes tienen dengue. El Laboratorio pide segunda muestra urgente para confirmar el diagnóstico clínico. El Laboratorio forma parte de toda una red de vigilancia de la enfermedad, por lo que depende de las acciones de la misma, cuando se pide la segunda muestra en

ocasiones ésta llega luego del tiempo establecido que generalmente es de 4 días, por lo que el pico de producción de anticuerpos ha bajado (entre el sexto y quinceavo día), si la muestra llega luego de 15 días, para aquellas personas que tienen bajos títulos, la prueba las puede considerar nuevamente indeterminadas o negativas porque los títulos van disminuyendo, ya que los anticuerpos IgM no son de memoria inmunológica. El Inciensa no es responsable del manejo de la muestra fuera del Laboratorio, ni del tiempo de toma de la segunda muestra esto es una responsabilidad de los Centros de Salud.

El laboratorio elabora gráficos de control por cada control como una medida de control de calidad para cada ensayo de rutina que realiza. Estos gráficos se elaboran de la siguiente manera: a cada técnico se les da una de mezcla de controles positivos fuertes, positivos débiles, negativos y PBS – Leche, cada uno hace 20 repeticiones (en total 40) como mínimo de cada una, se ha demostrado que los valores de DO resultado de esas repeticiones nunca son idénticos entre ellos, ni entre los dos técnicos, por lo que se ha discutido anteriormente El responsable del procedimiento toma todos los valores de DO de las repeticiones por cada control de los dos técnicos, las suma, saca el promedio y la desviación estándar y con ello elabora el gráfico. En este, coloca el valor de la media y las \pm desviaciones estándar con respecto a la media

Cuando se realizan los ensayos de rutina, a cada placa se colocan los controles repetidos 3 veces, una vez finalizado el ensayo, se calcula el promedio de las repeticiones de cada control y se gráfica en su respectivo gráfico control, si el promedio del control pasa el límite de control el ensayo no es válido y se toman las medias respectivas. Por ejemplo, si la DO del control PBS – Leche se pasa de las + dos desviaciones estándar quiere decir que la leche en polvo está contaminada y por lo tanto repite el ensayo y se desecha la leche y se compra una nueva.

8.2. Estabilidad del anticuerpo.

Según el Laboratorio de Dengue del Inciensa, para analizar la degradación del anticuerpo con respecto a temperatura y tiempo se deben de utilizar muestras con cantidades conocidas de anticuerpos, en este caso se utilizaron muestras en donde no se conocía la cantidad exacta de anticuerpos. Para determinar esto se debe de utilizar la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA). Debido a que la técnica de ELISA es utilizada para determinar presencia de la enfermedad

Para este informe se analizó el efecto de la temperatura de almacenamiento de las muestras sometidas al procedimiento del Inciensa y del CDC para determinar la posible degradación de los anticuerpos en las muestras. Sin embargo, los resultados obtenidos de los ensayos realizados por el procedimiento el Inciensa (figuras 5, 7 y 9)² y del CDC (figuras 6, 8, 10)³ muestran que no hubo una posible degradación, no se puede concluir que la muestra se degradó o no, debido a que los resultados de ambas técnicas son afectadas por las variables de la incertidumbre.

En la literatura se afirma que las muestras deben de conservarse en un refrigerador de 2 °C a 8 °C por un periodo no mayor de 7 días, ya que esa es su temperatura de estabilidad y si es necesario mantener las muestras por periodos más largos, estas deben de ser conservadas a – 20 °C y se debe de evitar la congelación y descongelación repetidas puesto que se puede producir la degradación de los anticuerpos (<http://www.biocientifica.com.ar/espanol/intrctivos/igm-turdimetrica.html>).

La degradación de los anticuerpos de las muestras para el procedimiento de diagnóstico de dengue de debe de ser considerara importante por las siguientes razones:

² En la figura 9 se observa valores de DO muy parecidos entre el ensayo 1 y 3, los valores de DO que se muestran en las figuras 5 y 7 pudieron ser afectados por las variables de la prueba (técnica de pipeteo, inestabilidad de la muestra, fluctuaciones de energía)

³ Cuando se analiza los valores de DO de las muestras sometidas al procedimiento del CDC se observa que mantienen un comportamiento parecido durante la realización de los 3 ensayos.

- Cuando ingresan muestras para ser sometidas a los ensayos de rutina, éstas se conservan a 4 °C, luego de ser realizado el montaje (máximo 4 días luego de haber ingresado la muestra al Laboratorio), se conserva a – 20 °C y forma parte de la seroteca del Laboratorio.
- La seroteca es importante para estudios posteriores, por lo que la degradación puede afectar mas que todo a las muestras positivas débiles y las indeterminadas.
- La elaboración de los controles fuertes y débiles se realizan a partir de muestras positivas fuertes y débiles conservadas a -20 °C. Se hace una mezcla de sueros fuertes y otra de sueros débiles a las cuales se les determina su rango de valor de IgM y se almacenan en alícuotas de 25 ul a – 20 °C y como los controles no se les agrega preservante, la degradación puede afectar a los positivos débiles, pero el Laboratorio los conserva como máximo durante 4 meses

8.3. Sensibilidad y especificidad.

8.3.1. Sensibilidad

Para el análisis de la sensibilidad, se determinó que por razones de tiempo para la elaboración del presente informe y a que no se conoce la cantidad exacta del anticuerpo en la muestra, se consideró la dilución final 1:1300, ya que en la mayoría de las muestras aun daban positivas. Sin embargo se deben de realizar más diluciones hasta que se den valores de DO menores a 0.150.

Como se muestran en los cuadros 20, 21, 22, 23 y 24, en todas las diluciones de las muestras se observa que la técnica del CDC tiene lecturas de densidad óptica más altas que la técnica del Inciensa lo que sugiere que el primero es más sensible. Esta sensibilidad afecta a las muestras indeterminadas (figura 10), ya que el procedimiento del CDC las considera positivas, en un principio se pensó que podrían ser falsos positivos pero debido a su alta especificidad de un 95%, se consideran como resultados positivos.

Con respecto a todos los resultados obtenidos para determinar este parámetro se puede decir que el procedimiento del CDC es más sensible que el procedimiento del Inciensa, ya que tubo mayor capacidad de capturar cantidades (títulos bajos) más pequeñas del anticuerpo IgM humano contra dengue. Sin embargo el Inciensa cubre esto solicitando las segundas muestras a aquellos pacientes cuyos resultados dan indeterminados.

Hay que tener en cuenta que los títulos de anticuerpos de cada muestra son diferentes, el título esta relacionado como se dijo anteriormente con el paciente y en la fase de la enfermedad en que se encuentra, es por ello que algunos tienen altos o bajos títulos, es por esta razón para la realización de cada ensayo con el procedimiento del Inciensa se establece como la dilución óptima de la muestra (suero del paciente), 1:40 para que aquellas personas que tengan bajos títulos puedan ser detectadas y ser consideradas como positivas o indeterminadas, o sea una máxima sensibilidad para aquellas muestras que tengan bajos títulos.

8.3.2. Especificidad

La especificidad para el procedimiento del Inciensa y del CDC, está dada por el anticuerpo anti – IgM contra dengue, ya que por medio de éste se inicia el fundamento de ambos procedimientos, “capturar” los anticuerpos IgM contra dengue para el diagnóstico.

Al ser sometidas muestras positivas por dengue con otros procedimientos de determinación de IgM para el diagnóstico de otras enfermedades febriles como leptospira, sarampión y rubéola, se obtuvo una especificidad del 95 %, lo que quiere decir que el 5%⁴ de inespecificidad puede darse por reacciones cruzadas. Debido al nivel de muestras que ingresan al laboratorio que generalmente son miles por año, esta inespecificidad se considera como poco significativa, además la técnica de ELISA como en la mayoría de las pruebas serológicas se sabe que nunca va a tener un 100% de especificidad.

8.4. Otras consideraciones

Con base en los resultados que se presentaron en este informe, el procedimiento de determinación IgM captura para el diagnóstico del dengue que el Inciensa utiliza demuestra un buen funcionamiento.

Cabe destacar que el Laboratorio de Dengue del Inciensa participa en comparaciones interlaboratoriales internacionales de control de calidad, con el CDC y Instituto Pedro Kouri de Cuba (IPK). En una entrevista realizada a la Doctora Jenny Lara. 2002, microbióloga responsable del procedimiento afirmó que “en todas las ocasiones en que se ha participado se ha obtenido un 100% de concordancia con los resultados. La documentación respectiva sobre estas participaciones se encuentra disponible en los archivos del Laboratorio y de la Unidad de Aseguramiento de la Calidad” Además manifestó que estuvieron supervisados por el CDC y al ver que los resultados concordaban el CDC decidió que podían realizar el procedimiento independientemente.

Hay que considerar que este procedimiento es más económico que el utilizado por los CDC, en el sentido de que se utiliza la leche descremada de una marca nacional que es mucho más barata y sirve para el bloqueo de la placa, dilución de los sueros, antígeno y conjugado. Esto es muy importante para los países subdesarrollados en donde los recursos para la investigación son limitados. No solamente el Laboratorio de Dengue no es el único que utiliza la leche descremada, hay Instituciones como la División de Virología del Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública del Instituto de Salud de Perú, que la utiliza en su procedimiento de determinación de anticuerpos IgM contra el virus de Dengue (García et al, 2000).

⁴ Según el CDC la prueba puede presentar reacciones cruzadas por otros flavivirus como encefalitis de San Luis y encefalitis japonesa.

9. CONCLUSIONES

- El procedimiento de determinación de IgM captura para el diagnóstico del dengue que utiliza el Inciensa, es una herramienta indispensable para el diagnóstico de casos clínicamente sospechosos y en los sistemas de vigilancia epidemiológica de la enfermedad.
- El fin del procedimiento es detectar todos los positivos, negativos e indeterminados (presencia o no presencia de anticuerpos IgM contra dengue) para el sistema de vigilancia epidemiológica.
- La técnica presenta una serie de variaciones que pueden deberse al analista, a la técnica de pipeteo o fluctuaciones de energía del lector de ELISA.
- Las muestras positivas débiles y las indeterminadas son las más afectadas por variables de la incertidumbre de la técnica, sin embargo se recurre a segunda muestra para comprobar si es positiva o negativa, pero puede seguir teniendo el mismo error.
- El título de anticuerpos de los sueros del paciente es también un factor importante, cada paciente presenta diferente título es por ello que la dilución óptima del suero en la prueba es de 1:40 para que aquellas muestras que presenten bajo título puedan ser detectables.
- No se pudo determinar si hubo degradación de la muestra por ambas técnicas debido a que los resultados fueron afectados por las variables que constituyen la incertidumbre de las técnicas.
- Para analizar la degradación de los anticuerpos por temperatura y tiempo de almacenamiento se debe de usar muestras con cantidades conocidas de anticuerpos y se debe de usar la metodología del IHA.

- Al montar las muestras indeterminadas con la técnica del CDC, los resultados obtenidos fueron positivos (la prueba tiene la capacidad de detectar pequeñas cantidades del anticuerpo).
- La técnica del CDC parece ser más sensible que la del Inciensa; es por ello que la Inciensa usa la dilución 1:40 para detectar aquellas muestras que tienen bajos títulos.
- La especificidad de este procedimiento es de un 95%, lo que se considera como un valor aceptable para procedimientos que involucran técnicas de determinación de anticuerpos por ELISA.
- Aunque el Inciensa sustituyera la albúmina bovina sérica (BSA) y el suero normal humano por leche descremada Dos Pinos, los resultados del presente informe son satisfactorios y esto es ganancia para la Institución en el sentido de reducción de costos debido a que la BSA es uno de los reactivos más caros⁵ por sus técnicas de obtención y extracción. Además la leche cumple con las funciones de bloqueo y reducción de reacciones inespecíficas que son evidentes con la sensibilidad y la especificidad.
- El procedimiento de determinación de IgM – captura para el diagnóstico del dengue utilizado Laboratorio del Inciensa presenta muy buena sensibilidad y especificidad.

⁵ Según el catalogo de Sigma 2001, 500 g de BSA fracción V cuesta \$ 941.40

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda agregar preservante a las muestras de suero, principalmente a los controles, que son obtenidos de mezclas de sueros.
- Debido a que la técnica del CDC es más sensible, se puede montar aquellas muestras indeterminadas de acuerdo a la disponibilidad del laboratorio para realizarla.
- Si las pipetas están calibradas el Laboratorio debería de tener su correspondiente certificado.
- Debido a las variables que presenta la técnica se debe de analizar (sí está dentro de las posibilidades del laboratorio) cada una por separado.

11. BIBLIOGRAFIA

Aguilar, S. y Vega, C. 1998. “Diseño de un modelo para el aseguramiento de la calidad en los laboratorios de los Centros de Referencia de Incienssa”. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Industrial, Escuela de Ingeniería Industrial, Universidad de Costa Rica.

Albrecht, A. 1994. Análisis por Enzimas Fijadas a Inmunoabsorbentes – Tests ELISA: Aplicación al Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas Y de la Infección por HIV. Wiener Lab. 19 pp.

Ávalos, A. 2001. “Dengue ha afectado a 4497 en este año”. ”. La Nación. (San José, Costa Rica), 27 setiembre 2001, sección A. 8 p.

Biocientífica. “IgM Turbidimétrica”. (2-6-2002). <<http://www.biocientifica.com.ar/espanol/instructivos/igm-turbidimetrica.html>>

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). 2001. “Home Page De la Fiebre de Dengue de la CDC”. (25-1-2002). <http://www.stanford.edu/group-virus-1999-asb-flavi-flavivirus_htm>

Chiparelli, H y Schelotto, F. “Dengue, una enfermedad emergente muy cerca de nuestro país”. (20-1-2002). <<http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema10/den6290.htm>>

“El Dengue no es una infección exótica”. (2-5-2002). <www.viajeros.cei.com.ar/sp/imagenes/Dengue1.pdf>

Eurochem. 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 61 pp.

- Fuentes, J. 1993. "INCIENSA Confirmó el Brote de Dengue". La República. (San José, Costa Rica), 21 Octubre 1993, sección A. 6 p.
- Fuentes, J. 1994. "Tres Virus de Dengue en el País". La República. (San José, Costa Rica), 22 junio 1994, sección A. 6 p.
- García, M; Cabezas, C; Martos, L; Gonzáles, A y Acosta, R. 2000. "Determinación de Anticuerpos IgM Contra el Virus del Dengue a partir de Sangre Absorbida en Papel Filtro: un Método Alternativo y Sencillo". (6-6-2002). < www.ins.sld.pe/downloads/publicaciones/Revista%20Exp.%20vol.%207.pdf>
- Garfield, F. 1993. Principios de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos. AOAC Internacional. Estados Unidos de América. 193 pp.
- Gella, J.1998. Metrología en el Laboratorio Clínico. BioSystems, S.A. Barcelona: España. 36 pp.
- Hill, P; Uldall, A y Wilding, P. 1998. Fundamentos de la Evaluación Externa de Calidad. Federación Internacional de Química Clínica (IFCC). La Plata: Argentina. 30 pp.
- Inciensa. 1996. "Historia". (1-1-2002). <[http:// www.netsalud.sa.cr/ms/inciensa.htm](http://www.netsalud.sa.cr/ms/inciensa.htm)>
- Instituto Pedro Kouri (IPK). 1990. Manual de Laboratorio para el Diagnóstico de Dengue. INCAP Y OPS. 81pp.
- INTE-ISO/IEC 17025:2000 "Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración". 44 pp.

- IPK. “Carpeta de Proyectos”. (2-03-2002) <<http://www.infomed.sld.cu/instituciones/ipk/carpeta.htm> >.
- La Gaceta No. 36. 1998. “Decreto No 26656-S”. La Gaceta. (San José, Costa Rica), 20 febrero 1998, 1-3 pp.
- Lara, J. 2002. Sobre rondas Internacionales de Control de Calidad del Laboratorio de Dengue. Entrevista Personal, Laboratorio de Dengue del Inciensa.
- Madigan , M; Martinko, J y Parker, J. 1998. Biología de los Microorganismos. 8^{va} edición. Prentice Hall. Madrid: España. 1 064 pp.
- Mathews, C y Van Holde, K. 1998. Bioquímica. 2^{da} edición. Mc Graw Hill – Interamericana. Madrid: España. pp 271
- Ministerio de Salud. 2001. “Dengue”. (26-1-2002). <<http://www.netsalud.sa.cr/ms/estadist/enferme/dengue.htm>>
- OBA. 2000. “Publicación informativa: Guía para los laboratorios que realizan validaciones de métodos de análisis químicos”. (4-03-2002). <<http://www.infoblo.com/oba/docs/obapub006.doc>>
- OPS.1995. Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: guía para su prevención y control. Publicación Científica N^o 548. Washington D.C, EUA. 3 – 29 pp.
- Pizarro, D; Terwes, G; Solano, A; Vargas, W y Vives, J. 1993. “Dengue: Guías para el Diagnóstico y Tratamiento de Dengue y Dengue Hemorrágico”. Ministerio de Salud y OPS. San José: Costa Rica. 22 pp.
- Publicación del Ministerio de Salud. Departamento de prensa, San José, Costa Rica “El Dengue”.(3-02-2002).< <http://www.binasss.sa.cr/poblacion/dengue.htm> >
- Ramos. C y Ramos, J. “ Centro de investigación sobre enfermedades Infecciosas”. (2-3-2002). <<http://www.insp.mx/salvia/977/sal9771.html>>

- Roitt, I. 1998. Inmunología: Fundamentos. Novena Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid: España. 497 pp.
- Salud Latina. “El Dengue”.(7-03-2002). <<http://www.saludlatina.com/informaciones/dengue.htm>>
- Salvatella, R. “*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay.” (26-1-2002) <<http://www.smu.org.uy/publicaciones/rmu/1996v1/salvat.htm>>
- Solís, M. 1995. “Dengue Aparece en la Zona Sur”. La Nación. (San José, Costa Rica), 29 abril 1995, sección A. 18 p.
- Solís, M. 1995. “Pruebas Apuntan a Dengue Hemorrágico”. La Nación. (San José, Costa Rica), 26 setiembre 1995, sección A. 6 p.
- Solís, M. 1995. “Dengue en Limón y Atenas”. La Nación. (San José, Costa Rica), 29 octubre 1995, sección A. 16 p.
- Taylor, R; Huong, A; Fulford, K; Przybyszewski, V y Hearn, T. 1979. Control de Calidad en las pruebas inmunológicas. Centros para el Control de Enfermedades. Secretaría de Salud. Atlanta, Georgia: Estados Unidos. 105 pp.
- Varela, I. 1995. “Tenemos Todos los Virus de Dengue”. La República. (San José, Costa Rica), 15 junio 1995, sección A. 8 p.
- Zimbrón, M. 2000. “Inmunoglobulinas” (29-1-2002). <<http://www.percano.com.mx/prescripcionmedica/paginas-2000/septiembre-2000/inmunoglobulinas.htm>>

12. ANEXOS

12.1. Anexo 1. ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC-ELISA) para el Diagnóstico de Dengue CDC Laboratorio de Dengue San Juan, Puerto Rico.

1 - La sensibilización

- a- A cada pozo añadir 100 µl de anticuerpo de captura (anti-IgM humano) diluido en solución amortiguadora CO₃.
- b- Incubar cuatro horas a temperatura ambiente, o durante la noche a 4°C en una cámara húmeda.

2 - La preparación de la placa

- a- Lavar la placa 3 veces en PBS o agua, si los lavados son manuales, hacer 2 más.
- b- Golpear la placa para secarla.

3 - Bloqueo

- a- Llenar los pozos con una solución al 4% de albúmina bovina sérica en PBS.
- b- Incubar 15 minutos a 37°C

4 – Lavar la placa 1 vez con PBS.

5 - Muestra del suero.

- a- Diluir el suero 1:40 en PBS que contiene 0.5% de albúmina bovina sérica. (500 µL diluyente + 12.5 µL de suero)
- b- Añadir 50 µl de cada muestra a cada pozo. No use las filas exteriores de los pozos.
- c- Incubar durante 2 horas a 37 °C.

6 - Lavar la placa 5 veces con PBS

7 - El antígeno

- a- Diluir la mezcla de antígenos en PBS que contiene 20% de suero normal humano extraído en acetona.
- b- Agregar 50 µl de antígeno a cada pozo.
- c- Incubar durante la noche a 4°C.

8 - Lavar la placa 5 veces con PBS

9- Conjugado

- a- Diluir el conjugado en PBS que contiene 20% acetona-extracto de suero normal.
- b- Agregar 25 µl del conjugado a cada pozo.

- c- Incubar 1 hora a 37°C.
- 10- Lavar la placa 7 veces con PBS

11 - Sustrato

- a- Agregar 100 µl del sustrato TMB a cada pozo.
- b- Incubar a 10 minutos a temperatura ambiente.
- c- Agregar 100 µl de la solución que detiene la reacción.

12 - Calibración del lector de placa. El lector debe ser evaluado semanalmente.

14 - Leer la placa a 450 nm. Blanquear la placa contra el suero control negativo.

15 - Organización y interpretación de resultados

Cada placa debe tener por lo menos un control positivo y dos negativos diferentes. El control positivo debe tener una densidad óptica (DO) intermedia de 0.5 a 0.8 previamente determinada por pruebas repetidas. En el laboratorio se utiliza dos controles positivos, uno alto (1.8 y 2.0) y otro débil (0.7-1.0). Si el control positivo no alcanza el valor apropiado, la prueba no es válida. El control negativo se usa como el blanco de la placa y el otro en la prueba.

Las muestras que tienen una densidad óptica final de 0.2 o mayor se considera que son positivas. Muestras que tienen densidades ópticas marginales (0.2 - 0.5) deben repetirse. Alternativamente, puede pedirse una segunda muestra colectada por lo menos después de una semana o puede hacerse una prueba de IgG, para detectar un posible aumento en el título de los anticuerpos IgG, característica de infecciones secundarias de flavivirus.

16 - Fracaso de la prueba

La causa primaria de fracasos en la prueba es la degradación de uno o más de los reactivos.

Retitular el antígeno y el conjugado usando un titulador uno contra otro.

Retitular el anticuerpo de captura.

Controlar el color del sustrato usando una pequeña cantidad pequeña de conjugado no diluido.

17 - Los reactivos para la prueba de ELISA se almacenan a -20 °C o se guardan a 4 °C mientras se usan. En el recibo, cada recipiente del reactivo es marcado con la fecha de recibo. Tome nota de fechas de expiración. No deben usarse reactivos después de la fecha de expiración de fabricantes.

Notas en el Procedimiento

- Buffer fostato salino. pH 7.4

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.14 g
Na ₂ HPO ₄	0.91 g
Agua	1000 ml

- Las Placas.

Los diferentes plásticos tienen características de absorción diferentes para las proteínas. Nosotros recomendamos placas Dynatech Immulon-2 (Catálogo No. 011-010-3450). Para utilizar otros tipos de plásticos, deben evaluarse usando suero positivo conocido.

Dynatech Laboratories
14340 Sullifield Circle
Chantilly, VA, USA 22021

- Sensibilización

Cualquier anticuerpo contra IgM humano puede usarse con tal de que sea purificado por columnas de afinidad. Después de disolver el anticuerpo se diluye en 0.1 M de búffer carbonato pH 9.6.

Búffer Carbonato:

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.39 g
Agua destilada	llevar a 1000 ml.

Cada lote de anticuerpo debe ser titulado para determinar la dilución correcta a ser utilizada en la prueba. Se debe de seleccionar la dilución más alta que dará una densidad óptica mayor que 1.0 después de 2 horas de incubación con un suero positivo fuerte. Una vez diluido, el anticuerpo está estable 4°C durante una semana.

Nosotros usamos :goat anti-human IgM (No. 011003)
Kirkegaard and Perry Laboratories
8042 Cessna Avenue
Gaithersburg, MD, USA 20879
(301)948-7755
en una dilución de 1:200.

Una vez sensibilizado las placas, se pueden almacenar las placas en una cámara húmeda a 4 °C durante una semana.

- Albúmina Bovina. Nosotros usamos la fracción V (cat. # 3225) de:

Intergen
2 Marshallville Road
Purchase, New York 10577
914-694-1429

- Muestra de suero.

La dilución de suero mínima que es compatible con un background bajo debe ser usada. Si el background es demasiado alto, las muestras de suero ser diluidas en PBS + 20% de suero normal humano extraído en acetona. Los sueros del control positivos y negativos deben ser incluidos en cada placa.

- Antígeno.

El antígeno usado en la prueba puede ser derivado de cerebro del ratón o de cultivo de tejido y no necesita ser purificado. Cada lote de antígeno debe ser titulado para determinar la dilución óptima. Nuestro antígeno es el virus de cultivo de tejido extraído en acetona. Debe guardarse liofilizado a -20°C . Una vez reconstituido tiene una vida en el estante de 5 días a 4°C o un mes a -20°C . El antígeno normalmente es el primer reactivo que se deteriora y debe cambiarse o retitulado si su control positivo da una lectura baja. Los cuatro serotipos de dengue pueden probarse individualmente o mixtos. La prueba mixta es más conveniente pero la sensibilidad es ligeramente menor.

Cada vial de antígeno debe ser separadamente titulado en este formato de ELISA que usa sueros homólogos. Si los sueros definidos no están disponibles se debe usar una mezcla de sueros positivos. La dilución más alta de antígeno que da una DO entre 0.5 y 1.0 será la dilución que se utilice para la prueba. Luego se mezclan los cuatro serotipos de dengue en partes iguales. Luego se realiza una titulación cruzada de esta mezcla de antígenos contra el conjugado utilizando un suero positivo intermedio y un suero negativo. La combinación antígeno/conjugado mas alta que permita discriminar claramente entre el suero positivo y el negativo serán las diluciones a utilizarse en la prueba.

- Conjugado.

Cualquier anticuerpo contra los virus de dengue puede usarse con tal de que exhiba una amplia reactividad cruzada. Este debe ser purificado por precipitación pero no necesariamente por afinidad. Nuestro conjugado es el anticuerpo monoclonal 6B6C-1 conjugado a peroxidasa producido por Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. (West Grove Pa.). El fluido ascítico también puede usarse. La conjugación con la peroxidasa del rábano picante es mejor ya que esta enzima tiene un background más bajo que la fosfatasa alcalina. El conjugado es indefinidamente estable a -20°C o 1 semana a 4°C . La dilución óptima es determinada por un titulador contra el antígeno.

- Sustrato.

Este laboratorio usa TMB (tetramethylbenzidine) from Kirkegaard and Perry (No. 50-76-05). Otra alternativa es el ABTS (sulfonate del azinodiethylbenzthiazoline, No. 50-62-00). OPD (diamine del orthophenylene) debe evitarse porque es un carcinógeno conocido. El control positivo en cada placa debe alcanzar una densidad óptica característica después de 1 hora de incubación. Leyendo los resultados, las placas de ELISA del lector debe borrarse contra el suero del control negativo. Los sueros de prueba, cuya densidad óptica sea mayor o igual a 0.2 son considerados positivos. Si su máquina blanquea en aire, usted debe restar el valor del control negativo a cada valor de la prueba. El límite de 0.2 es un valor conservado, que genera más falsos negativos que los falsos positivos.

- Interpretación.

Es importante tener presente que este ELISA puede presentar reacciones cruzadas con otros flavivirus como la encefalitis de San Louis y la encefalitis japonesa. Una prueba positiva es por consiguiente evidencia sólo presuntiva para infección de virus de dengue. Para un diagnóstico confirmado, el virus debe aislarse o debe hacerse una prueba de la neutralización con el suero. Nosotros también hallamos que hay una proporción alta de falsos negativos con suero colectado durante la fase aguda en los primeros cinco días a partir del momento en que aparecen los síntomas. Por consiguiente una prueba negativa durante este periodo no puede aceptarse, y una muestra convaleciente se pide. En el sexto día después de la infección, la prueba está por lo menos 90% sensible.

En el caso de infecciones secundarias, un porcentaje pequeño de pacientes no producirá niveles perceptibles de anticuerpo de IgM. Además, desde que el título de IgM persiste en la sangre para un máximo de dos a tres meses, los sueros colectados después de este tiempo dará resultados negativos. Sin embargo, la confirmación de recientes infecciones todavía puede hacerse en estos casos con una prueba de IgG si es una infección secundaria.

- General.

Los tiempos de incubación que se recomiendan en esta prueba se seleccionaron para obtener una máxima sensibilidad. Una prueba corta puede hacerse en un día reduciendo el tiempo de incubación del suero y del antígeno a una hora a 37 °C cada uno de ellos, pero hay alguna pérdida de sensibilidad.

- Suero Humano normal (SNH)

j. Se prepara a partir de una mezcla de suero o plasma que no presenta anticuerpos contra flavivirus.

- k. Se coloca 10 ml del suero o plasma en un beaker de 2000 ml.
- l. Se le añade 50 volúmenes (500 ml) de acetona y se agita a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- m. El beaker se deja inclinado en un ángulo de 45^o durante la noche para que las proteínas del plasma o suero precipiten y se sedimentaran en el fondo.
- n. Se decanta el sobrenadante.
- o. Se repiten los pasos c,d y e.
- p. Luego se dispersa el sedimento alrededor del fondo del beaker y se deja reposar durante la noche en una cámara de extracción de gases para evaporar toda la acetona.
- q. Las proteínas extraídas se rehidratan con 20 ml de PBS y se agita por 2 h a temperatura ambiente.
- r. Después se centrifuga el SNH por 10 min a 1000 rpm, se guarda en un tubo con fondo cónico y se almacena a – 20 °C.

Aunque el SHN extraído tiene una concentración del 50% al finalizar su preparación, está se considera como 100%.

Procedimiento estructurado por Donald S. Burke, M.D., Walter de Reed Army Institute of Research Investigación, Washington, D.C.

Bibliografía

- Burke, et al. 1982. Antibody capture immunoassay detection of Japanese encephalitis virus immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 15, 1034-1042.
- Burke et al. 1985. Bull WHO 63, 1037
- Bundo and Igarashi. 1985. J. Virol. Methods 11, 15.
- Kuno, Gomez, and Gubler. 1987. Detecting artificial anti- dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hyg., 36, 153.

12.2. Anexo 2. Determinación de IgM-captura para diagnóstico del dengue utilizado por el INCIENSA

Introducción

En la Norma ISO/IEC 17025 "Requisitos generales para la competencia de laboratorios de calibración y ensayo" se establece la necesidad de contar con procedimientos documentados. Por este motivo, se hace necesario la elaboración de procedimientos que den los lineamientos para la realización de los ensayos de modo que se pueda asegurar la eficacia del proceso.

El dengue es una enfermedad viral aguda caracterizada por fiebre de aparición y elevación brusca con dolores intensos de cuerpo, de cabeza y retrooculares, exantema cutáneo y fatiga. Algunos pacientes pueden tener manifestaciones hemorrágicas graves. Debido a los síntomas de la enfermedad se confunden con otros padecimientos más leves, no siempre es fácil realizar el diagnóstico considerando sólo las manifestaciones clínicas. Por ello, la confirmación de los casos requiere de pruebas de laboratorio de diferente tipo (serológicos, virológicos, de biología molecular, etc.).

El presente es el procedimiento de Determinación de IgM de captura para el diagnóstico de dengue utilizado en el Centro Nacional de Referencia de Dengue del Inciensa. En el mismo, se determina la presencia de la enfermedad mediante la detección de los llamados anticuerpos IgM (inmunoglobulina M) que se encuentran en el suero de los pacientes en las primeras semanas desde el inicio de los síntomas y son indicativos de la presencia de la enfermedad en su etapa aguda.

Fundamento del método:

En este procedimiento, los anticuerpos del tipo IgM del paciente son "capturados" por medio de un anticuerpo producido en animales y el cual se adhiere a una placa de microtítulo. Luego de varios lavados se emplea un segundo anticuerpo ligado a una enzima la cual se unirá a los anticuerpos IgM del paciente que hayan sido "capturados" sobre la placa. La enzima, al unirse a un sustrato específico, actúa sobre el sustrato produciendo un cambio de color, el cual es proporcional a la concentración de anticuerpo en el suero del paciente.

Objetivo

El propósito de este procedimiento es detallar la técnica para la detección de los anticuerpos IgM anti-virus del dengue.

Alcance

Este procedimiento es aplicable al laboratorio del Centro Nacional de Referencia de Enfermedades Febriles del Inciensa.

Autoridades y responsabilidades

El Coordinador del laboratorio es responsable de mantener actualizados los procedimientos acorde con las actividades que se realizan y de velar por el cumplimiento en la aplicación práctica de este procedimiento. El técnico de laboratorio es responsable de llevar a cabo este ensayo, de acuerdo con los lineamientos especificados en este procedimiento.

Abreviaturas

CNRDEF: Centro Nacional de Referencia de Enfermedades Febriles

ELISA: siglas en inglés para ensayo inmunoenzimático (Enzyme-Linked ImmunoAssay)

Definiciones

Anticuerpos: moléculas proteicas encontradas en el suero de los pacientes y que funcionan como mecanismo de defensa contra diferentes microorganismos.

Antígeno: molécula o sustancia que es capaz de inducir una respuesta inmune en un individuo. Una vez purificado, puede usarse en la preparación de ensayos diagnósticos.

Sustrato: sustancia química que produce color gracias al efecto de una molécula desdobladora (enzima) presente en un sistema de ensayo.

Conjugado monoclonal: anticuerpo producido en un animal y que además de ser capaz de reconocer un único elemento inmune o antígeno, tiene unida (conjugada) una molécula enzimática o desdobladora que actuará sobre el sustrato presente en el sistema de ensayo.

Lector ELISA: Es un espectrofotómetro de propósito general controlado por un microprocesador, diseñado para leer la densidad óptica y calcular el resultado de ensayos inmunológicos de lectura en placas.

PBS: Solución fosfato-salina, para amortiguar el pH.

ABTS: Sistema de sustrato para peroxidasa con las siglas correspondientes a la fórmula química del 2.2'azino.di [3-ethyl-benzthiazoline sulfonato].

Referencias

Manipulación y preparación de elementos para la determinación de IgM-Captura para el diagnóstico de dengue (CD-DP04-01)

Control interno de la calidad (CD-DP14-01)

Procedimiento

1 Información para la realización del procedimiento

Materiales y equipos

Incubadora a 37°C

Lector ELISA

Reactivos

Agua destilada

Anticuerpo anti IgM humano en oveja (Goat anti-Human IgM (μ chain specific) SIGMA I-0759

Antígeno: Dengue 1, 2, 3 y 4 preparados en el Instituto Pedro Kouri de Cuba

Conjugado monoclonal de ratón IgG peroxidasa: (Peroxidase conjugate IgG fraction Monoclonal Mouse Antibody SLE , MSI-7, hybridoma GB6C-1). Jackson Immuno Research.

Control negativo: mezcla de sueros a los que se práctico el examen antes con resultados negativos

Control positivo: mezcla de sueros a los que se practicó el examen antes con resultados positivos.

Leche descremada en polvo instantánea (Dos Pinos®). Esta marca ha demostrado dar los resultados más consistentes en los ensayos.

Sustrato: ABTS Sistema de sustrato para peroxidasa, . Kirkegaard and Perry 50-62-00

PBS: Amortiguador fosfato salina

Bófer fosfato bicarbonato 0.05 M, pH 9.6

Se prepara disolviendo una cápsula de bófer fosfato bicarbonato (Sigma Cat. C-3041) en 100 ml de agua desionizada. El pH debe ser 9.6 a temperatura ambiente.

Preparación de reactivos

Para preparar el PBS se debe pesar:

0.218 g de NaH_2PO_4 (o 0.25 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) +
1.5 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
y disolver en aproximadamente 700 ml de agua destilada.

Ajustar el pH a 7.4 con NaOH o HCl 0.1 N.

Agregar 8.75 g de NaCl y ajustar a 1000 ml con agua destilada.

El PBS se puede esterilizar por autoclavado (no estrictamente necesario en este procedimiento).

El bófer fosfato bicarbonato 0.05 M, pH 9.6 se prepara disolviendo una cápsula de bófer fosfato bicarbonato (Sigma Cat. C-3041) en 100 ml de agua desionizada. El pH debe ser 9.6 a temperatura ambiente.

Se debe mantener un control estricto de la calidad de todos los reactivos utilizados en la prueba. Cualquier modificación o cambio observado en los mismos debe anotarse en el protocolo respectivo para su consideración en la evaluación final de cada ensayo.

Secuencia de operaciones

La placa de prueba consta de 96 pozos, pero se usan en total 60 (los bordes no se usan): en 48 de ellos se colocan muestras, en 3 se colocan muestras de control positivo fuerte, en 3 se colocan muestras de control positivo débil y en 3 se colocan muestras de control negativo (el resto se dejan sin llenar). El orden en cual se llenan los pozos es el indicado en el anexo No. 1. En el protocolo se anota el número de identificación de cada muestra, según su colocación en la placa.

Selección de muestras y preparación de protocolo

Seleccione las muestras a ser procesadas y llene completamente el protocolo respectivo (Anexo 1) asegurándose de incluir los respectivos controles

Sensibilización de la placa

Lave 3 veces la placa con PBS pH 7.2-7.5 o agua destilada. Agregue 100 ul de anti IgM diluída en bófer fosfato-bicarbonato (33 ul de anti-IgM más 6.6 ml de bófer) . Incube toda la noche a 4° C (aproximadamente 18 horas).

NOTA: todos los lavados del procedimiento se deben realizar utilizando un peine de 8 salidas ("manifold") conectado a una jeringa de vidrio de repetición y ajustado para dispensar aproximadamente 300 ul por pozo. El líquido de lavado se debe descartar en la pila con un movimiento rápido tratando de eliminar el máximo posible de líquido. Después del último lavado la placa se debe sacudir fuertemente 4 o 5 veces sobre papel toalla antes de proceder al siguiente paso.

Lavado de la placa

Lave la placa cinco veces con PBS pH 7.4 para eliminar el exceso de IgM.

Bloqueo

Llene los pozos hasta el borde con 5% leche descremada en PBS (1.39 g leche / 100 ml PBS pH 7.2-7.5, preparado fresco cada día) e incube por 30 minutos a temperatura ambiente o a 37°C.

Lavado de la placa

Lave cinco veces con PBS pH 7.2-7.5 para eliminar el exceso de leche.

Anticuerpo (muestra: suero o disco saturado)

Diluya los sueros y controles 1:40 en PBS leche (25 ul de suero o control + 975 ul de PBS leche) Pipetee 50 ul de cada muestra o control en el pozo respectivo del protocolo.

Incubación

Incube la placa dos horas a temperatura ambiente (24°C).

Lavado de la placa

Lave cinco veces con PBS pH 7.2-7.5.

Antígeno (de cerebro de ratón o de cultivo de tejido)

Prepare la dilución del antígeno de la siguiente manera : 290 ul de antígeno + 3.5 ml de PBS-leche

Pipetee 50 ul del antígeno diluído en cada pozo, excepto en los pozos de la orilla de la placa (debido probablemente a problemas de evaporación, los resultados en estos pozos resultan poco consistentes y poco confiables)

Incubación

Incube la placa hasta el otro día (aproximadamente 18 horas) a 4°C en cámara húmeda.

Lavado de la placa

Lave cinco veces con PBS pH 7.2-7.5.

Conjugado

Diluya el conjugado monoclonal de ratón IgG peroxidasa de la siguiente manera:
30 ul de conjugado + 2.0 ml de PBS-leche (dilución 1:2500)

Pipetee 25 ul de conjugado diluido a cada pozo

Nota: Cada vez que se abre un nuevo vial del conjugado, éste deberá titularse para determinar la dilución óptima de trabajo

Incube la placa 1 hora a 37°C.

Lavado de la placa

Lave todos los pozos siete veces con PBS pH 7.2-7.5 para eliminar el exceso de conjugado.

Sustrato

Mezcle 3.5 ml de ABTS sustrato de peroxidasa con 3.5 ml de solución B de peroxidasa (H₂O₂)

Pipetee 100 ul de la mezcla en cada pozo de la placa de prueba (excepto los pozos de las orillas)

Incubación

Incube la placa 30 minutos a 37°C. Observe el desarrollo del color. Para ello, deje 2 horas a temperatura ambiente.

Lectura

Lea la densidad óptica en el espectrofotómetro (405/630 nm). Con este sustrato el color es azul verdoso.

Verificación de resultados

Interpretación de los resultados

Si densidad óptica ≥ 0.200 = positivo por anticuerpos IgM contra virus dengue
Si densidad óptica < 0.200 = negativo por anticuerpos IgM contra virus dengue
Si la densidad óptica $0.150 < DO < 0.200$ indeterminado por anticuerpos IgM contra virus dengue (con 5 o menos días de evolución)

Se verifican los resultados de los controles, de modo que se obtengan los resultados esperados. Para ello, las lecturas de los controles se grafican en una carta de control (según DP-DP14-01 "Control interno de calidad") con el fin de determinar si se mantienen dentro del rango establecido (\pm dos desviaciones estándar).

Si estos resultados son incorrectos, se analizan las posibles causas, se toma la acción correctiva necesaria y se realiza de nuevo el ensayo.

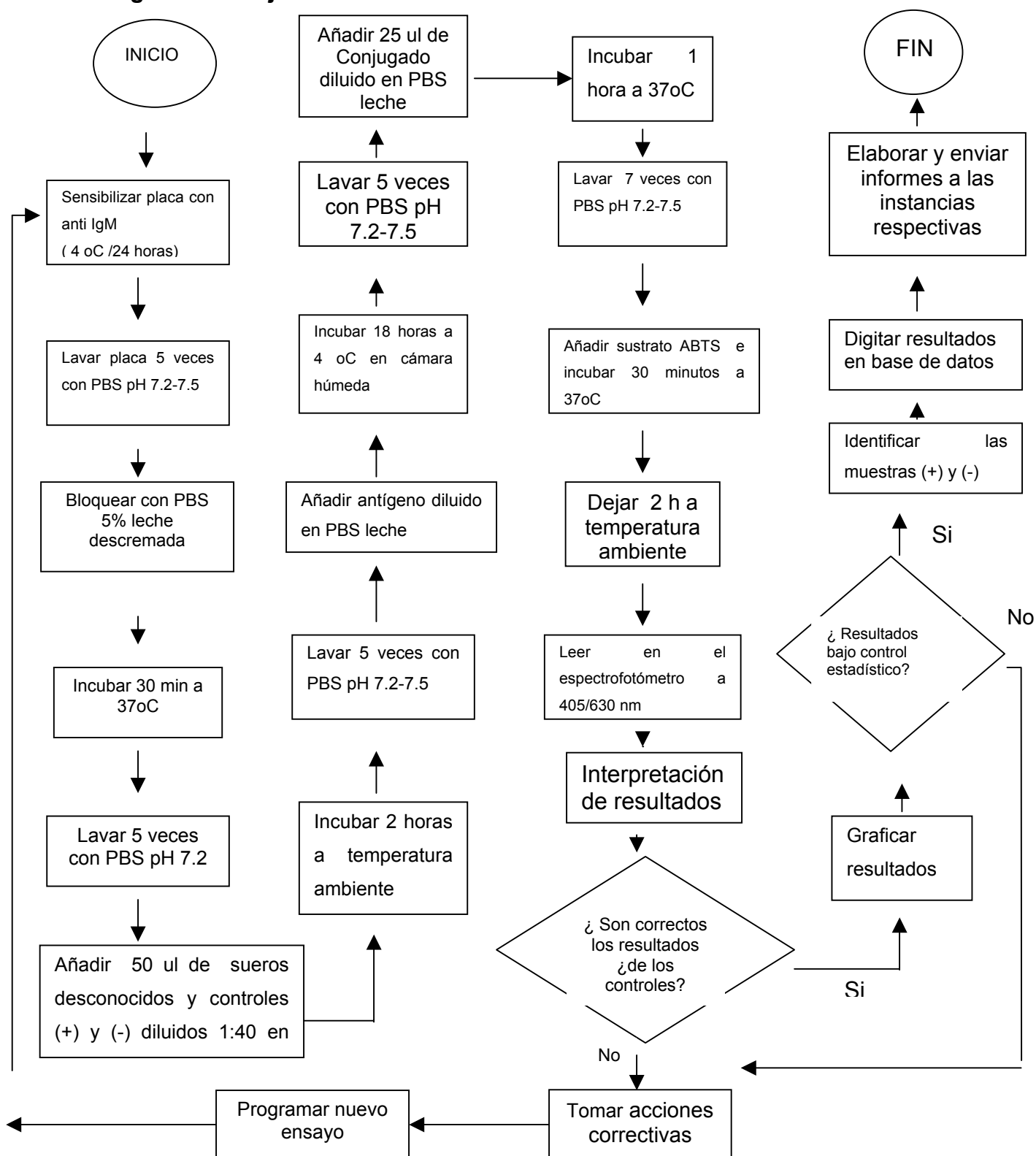
Si los resultados son los correctos, se anotan las lecturas en el protocolo, se identifican las muestras positivas y negativas y se procede a elaborar los reportes respectivos utilizando el formulario mostrado en el anexo No. 2 e incorporado en la base de datos del CNRDEF.

Los reportes de los resultados positivos son preparados y enviados de inmediato siguiendo el procedimiento establecido

8.Registros, informes y formularios

Protocolo Mac-Elisa (CD-DF05-01)
Informe del estudio por dengue (CD-DF05-02)

Diagrama de flujo



Bibliografía

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. Manual de Laboratorio para el diagnóstico del dengue. s.l. OPS/INCAP, s.f.

Anexos

Anexo No. 1

Protocolo para pruebas de ELISA CDR Enfermedades Febriles-Inciensa

CD-DF05-01

PROTOCOLO MAC-ELISA

ANTICUERPO

ANTIGENO

CONJUGADO

SUSTRATO

Prueba No. Fecha:

Responsable

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	SF	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	PBS
C	PBS	SN	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	PBS
D	PBS	SD	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	SF	Muestra	Muestra	Muestra	Leche	PBS
E	PBS	Leche	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	SN	Muestra	Muestra	Muestra	SD	PBS
F	PBS	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	SD	Muestra	Muestra	Muestra	SN	PBS
G	PBS	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Leche	Muestra	Muestra	Muestra	SF	PBS
	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Observaciones

..... ..

SF: Control positivo fuerte
 SD: Control positivo débil
 SN: Control negativo

Anexo No. 2 Informe del estudio por dengue

**Instituto Costarricense de
Investigación y Enseñanza en
Nutrición y Salud**
INCIENSA - MINISTERIO DE SALUD
Tel: 279-9911 Fax: 279-0486

Reporte de resultados por determinación de anticuerpos IgM dengue

Referencia:

Nombre :

N° expediente:

**Centro de
Salud:**

Cantón:

Región:

Días evolución: Fecha ingreso:

Dirección:

Resultado:

**MQC responsable
CNR Enfermedades Febriles**

12.3 Anexo 3 Otras Definiciones de validación de métodos

Aplicadas a validación de métodos analíticos⁶

Exactitud de medida: grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. El término “exactitud” cuando se aplica a un conjunto de resultados de mediciones implica la combinación de los componentes aleatorios y de un error sistemático común o de un componente del sesgo.

Intervalo de trabajo: el intervalo de trabajo de un método es el intervalo de concentración en el que puede obtenerse una exactitud y precisión adecuadas al objetivo del método.

⁶ Según la OBA. 2000.

Límite de cuantificación: es la concentración mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Se establece examinando una muestra o material de referencia apropiado.

Límite de detección de una sustancia: la menor magnitud que puede examinarse de una sustancia en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.

Linealidad/ Función respuesta: es la relación entre la concentración de una sustancia y la respuesta del método. Esta relación, denominada comúnmente curva patrón o curva de calibración, no tiene por qué ser lineal para que el método sea eficaz. Cuando no sea posible la linealidad para un método, se deberá encontrar un algoritmo adecuado.

Precisión: grado de concordancia entre resultados de mediciones obtenidas independientemente bajo condiciones establecidas. La precisión depende sólo de la distribución de errores aleatorios y no tiene ninguna relación con el valor verdadero o el valor especificado. La medida de la precisión se expresa en términos de imprecisión y se calcula como la desviación estándar de los resultados de las mediciones. Una menor precisión se refleja por una mayor desviación estándar. Los resultados de ensayo independientes significan resultados obtenidos sin la influencia de un resultado precedente del mismo material o similar. Las medidas de precisión cuantificadas dependen de una manera crítica de las condiciones estipuladas. Las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad son un conjunto particular de las condiciones extremas estipuladas.

Repetibilidad: precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida y durante un corto intervalo de tiempo.

Reproducibilidad: precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mensurando, con diferentes operadores, diferentes equipos de medida, en diferentes laboratorios, etc.

Robustez: resistencia de un método al cambio de respuesta cuando se introducen pequeñas variaciones en el procedimiento.

Selectividad: reacción, prueba o ensayo que puede efectuarse con varias sustancias (moléculas, elementos, iones), pero muestra cierto grado de preferencia por una determinada sustancia (molécula, elemento, ion).

Selectividad / especificidad: el grado por el cual un método puede determinar una sustancia particular dentro de una mezcla compleja, sin ser interferido por otros componentes de la mezcla.

Sesgo: diferencia entre la esperanza matemática de los resultados de una medición y el valor de referencia aceptado. El sesgo es un error sistemático total en contraposición al error aleatorio. Puede haber una o varios componentes de errores sistemáticos que contribuyen al sesgo. Una diferencia sistemática importante en relación al valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo.

Aplicadas a validación de métodos microbiológicos⁷

Desviación negativa: ocurre cuando el método alternativo da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo. esta desviación se convierte en un resultado negativo falso cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es positivo.

Desviación positiva: ocurre cuando el método alternativo da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo. Esta desviación se

⁷ Según la G-ENAC-04.1997

convierte en un resultado positivo falso cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es negativo.

Especificidad: Grado en que un método se ve afectado por los otros componentes en una muestra con múltiples componentes. Un método específico es el que no se ve afectado por ninguno de los otros componentes.

Limite de cuantificación: número mínimo de organismos dentro de una variabilidad definida que pueden determinarse bajo las condiciones experimentales del método evaluado.

Limite de detección: número mínimo de organismos que pueden ser detectados, pero en cantidades que no pueden ser estimadas con precisión.

Linealidad: Capacidad del método cuando se utiliza con una determinada matriz para dar resultados proporcionales al número de microorganismos presentes en la muestra.

Precisión relativa: grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia, como los proporcionados por los organismos nacionales de normalización o el organismo internacional de normalización (ISO).

Repetibilidad: grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando realizadas en las mismas condiciones de medición.

Reproducibilidad: grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mesurando realizadas en diferentes condiciones de medición.

Sensibilidad: capacidad del método para detectar ligeras variaciones en el número de microorganismos dentro de una determinada matriz.

