



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO BIOANÁLISIS

EVALUACIÓN DE UN MÉTODO INMUNOCROMATOGRÁFICO PARA  
LA DETECCIÓN DE ROTAVIRUS HUMANO Y ADENOVIRUS 40/41 EN  
HECES DE NIÑOS CON SÍNDROME DIARREICO  
(Modalidad: Tesis de Grado)

MARIÁNGELES ANA HURTADO MENDOZA

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2012

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
RESUMEN .....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	8
Muestras de Heces .....	8
Determinación de rotavirus por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) (Sulbarán <i>et al.</i> , 2000).....	8
Detección de adenovirus por microscopia electrónica de transmisión (MET) .....	9
Detección de rotavirus y adenovirus por inmunocromatografía (GastroVir-Strip, Coris).....	9
Evaluación del ensayo inmunocromatográfico .....	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
CONCLUSIONES.....	22
RECOMENDACIONES .....	23
BIBLIOGRAFÍA .....	24
ANEXOS .....	29
<b>Hoja de Metadatos</b> .....	<b>31</b>

## **DEDICATORIA**

A

Dios Todopoderoso, por darme fortaleza, salud y fe para cumplir esta meta tan importante en mi vida y por mantener siempre iluminado mi camino.

Mi madre Maritza Mendoza, por darme la vida ante todo, por brindarme su apoyo y su amor incondicional, por sus consejos siempre acertados y por su enorme paciencia y a quien debo mi formación personal y profesional.

Mi padre Armando Hurtado, quien también ha formado parte de mi vida y ha influenciado también en mi formación.

Mis hermanos Freddy Hurtado y Alfredo Hurtado, por ser mis modelos a seguir, a mis tías, abuela y primos, que cada uno a su manera me brindaron su apoyo en todo este tiempo y a quienes les doy gracias infinitas por estar a mi lado.

Yonny Montes, por brindarme su cariño, paciencia y apoyo constante en esta etapa tan importante para mí, gracias por estar siempre allí para ayudarme y darme ánimos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A

Mi asesor, Dr. Antonio Maldonado, por su constancia, dedicación, por brindarme sus conocimientos, su amistad y apoyo para la realización de esta investigación.

Los profesores Jesús Bastardo y Luz Villalobos de Bastardo, por sus orientaciones siempre acertadas.

Al Licenciado Alberto Blanco, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de desarrollar parte de esta investigación en dichas instalaciones.

Mis mejores amigas, Marlin Yegres, Ynés Martínez y Susanny Caraballo, por su apoyo incondicional, porque entre las cuatros fue más llevadera la carga.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comparación de resultados obtenidos por el método inmunocromatográfico respecto a la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).....	14
<b>Tabla 2.</b> Comparación de los valores predictivo positivo y predictivo negativo del método inmunocromatográfico en presencia y ausencia de la prevalencia. ....	19

## RESUMEN

Se llevó a cabo la evaluación de un método inmunocromatográfico para el diagnóstico de rotavirus y adenovirus 40/41 conocido comercialmente como GastroVir-Strip, de la casa comercial Coris BioConcept, utilizando como método de referencia (prueba de oro) la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Para ello se utilizaron 125 muestras de heces de niños que cursaron diarrea aguda en el año 2009 y que se mantenían en el Laboratorio de Virología del Postgrado en Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Estas muestras, anteriormente examinadas por ELISA, fueron reexaminadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, y luego analizadas por el método inmunocromatográfico. Se obtuvo una sensibilidad de 98,5% y una especificidad de 100,0% para el método inmunocromatográfico. Los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN), sin tomar en cuenta la prevalencia de la infección fueron del 100,0% y 98,3% respectivamente, mientras que tomando en cuenta la prevalencia los valores fueron de 92,4% y 99,5% respectivamente. Del total de muestras analizadas se encontró una muestra (0,8%) positiva para adenovirus por inmunocromatografía, la cual no pudo ser confirmada por microscopía electrónica (ME), tal vez porque la muestra fecal no contenía partículas virales intactas para su observación. Los resultados indican que el método inmunocromatográfico evaluado en esta investigación cumple con los requisitos necesarios para considerarla como prueba de primera elección ya que además de tener una elevada sensibilidad y especificidad permite distinguir a individuos enfermos de los que no lo están con una alta confiabilidad, es fácil de realizar y requiere poco tiempo.

## INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis aguda es una de las enfermedades más comunes en el ser humano y continúa siendo una de las causas significantes de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo (WHO, 1999). El rotavirus es el principal agente causal de esta enfermedad y es la mayor causa de mortalidad infantil en países en desarrollo.

La incidencia de la infección por rotavirus es similar en los países en desarrollo y en los desarrollados, donde ni la calidad del suministro de agua ni las condiciones higiénicas y sanitarias han demostrado influir en el control de la infección. Sin embargo, en los países más pobres la letalidad es mayor, producto de la desnutrición y de las dificultades para acceder oportunamente a los servicios de salud (Sirok *et al.*, 2006).

Entre los años 1986 y 2000 el rotavirus causó en todo el mundo 111 millones de episodios de diarrea infantil que requirieron cuidados en el hogar, ocasionó 25 millones de consultas, dos millones de hospitalizaciones y un promedio de 440 mil muertes (Parashar *et al.*, 2003). Se estima que a los 5 años de edad, casi todos los niños han experimentado un episodio de diarrea por rotavirus, uno de cada cinco niños ha asistido a una consulta médica; uno de cada 65 de ellos ha requerido hospitalización y aproximadamente uno de cada 293 muere (Parashar *et al.*, 2003).

Un estudio realizado por Parashar *et al.* (2006) que para el período de 2000 a 2004 hubo un incremento de las muertes de niños por rotavirus, que ascendieron a más de 600 mil a nivel global. En América Latina se estima que 10 millones de niños sufren esta enfermedad todos los años, lo que resulta en dos millones de consultas. De ellos, 75 mil son hospitalizados y 15 mil mueren.

En Venezuela, los rotavirus constituyen la principal causa de diarrea severa en niños menores de 5 años ya que están asociados aproximadamente a una cuarta parte (23%) de todos los episodios de diarrea que requieren tratamiento médico y a un tercio

(33%) de aquellos que necesitan hospitalización (Salinas *et al.*, 2004).

Los rotavirus humanos fueron inicialmente descritos por Bishop *et al.* (1973) en Australia, quienes observaron partículas virales al microscopio electrónico (ME) en biopsias de intestino delgado de niños que tenían diarrea severa de origen no bacteriano. Basándose en la morfología de estos virus, cuya apariencia al microscopio electrónico era similar a la de una rueda de carreta antigua, fueron bautizados con el nombre de rotavirus, del latín *rota*, que quiere decir rueda (Flewett *et al.*, 1974).

El género *Rotavirus* pertenece a la familia *Reoviridae*. Son virus desnudos con simetría icosaédrica de 75 nm. La cápside está formada por tres capas proteicas concéntricas que engloban el material genético, el cual está constituido por once segmentos de ácido ribonucleico (ARN) de doble cadena (Estes, 2001). La capa externa del virión está formada por dos proteínas: la glicoproteína VP7 que le da un aspecto liso a la partícula viral y por la proteína VP4 en forma de espigas. La intermedia, de aproximadamente 10 nm de grosor, está constituida por trímeros de la proteína VP6, dándole a la partícula un aspecto rugoso, esta proteína es la más abundante del virus, constituyendo aproximadamente el 40% de la proteína total del virión. La capa interna formada por la proteína VP2 es la que encierra en su interior al genoma viral (Lawton *et al.*, 1997; Estes, 2001).

En función de la especificidad serológica de la VP6, se han descrito siete grupos diferentes, asignándoles letras, de la A a la G. Los virus del grupo A son los que producen infecciones habituales en el ser humano, aunque los del grupo B y C también han sido asociados ocasionalmente con la enfermedad en humanos. Los rotavirus de los grupos D, E y F sólo se han aislado de especies animales (O’Ryan *et al.*, 2005). Los rotavirus humanos del grupo A se subdividen a su vez en dos subgrupos (subgrupo I y subgrupo II) (Estes, 2001).

Las proteínas de la capa externa VP7 y VP4 inducen la producción de anticuerpos

neutralizantes y se han utilizado para una clasificación dual en serotipos. Los serotipos definidos por la VP7 se denominan G (designación dada a esta por ser una glicoproteína) y los definidos por VP4 se denominan P (por ser sensibles a las proteasas). Existen 15 serotipos G y 20 genotipos P, de los cuales 10 (G) y 12 (P), se conoce que infectan a humanos. Las combinaciones de serotipos G y P pueden ser teóricamente muchas, pero sólo cinco combinaciones son las más frecuentes en el mundo: G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8] y G2P[4] (Santos y Hoshino, 2005).

El período de incubación del rotavirus es de uno a tres días postinfección y los síntomas varían desde una infección subclínica a una diarrea leve, moderada o severa. En ocasiones pueden aparecer vómitos con una duración media aproximada de 2 a 6 días. Con frecuencia los vómitos aparecen primero que la diarrea, pero esta última se mantiene por más tiempo. También puede presentarse fiebre generalmente en entre 38°C y 39°C, dolor abdominal, y algunos presentan manifestaciones respiratorias de las vías superiores. La diarrea tiene una duración aproximada de 2 a 5 días (Farkas y Jiang, 2007).

La mortalidad asociada a esta enfermedad es debida a la severa deshidratación que provoca la infección, por lo que la recomendación principal en este padecimiento es la de rehidratar y mantener el balance electrolítico del paciente. Las manifestaciones clínicas de la infección por rotavirus no son suficientes para ofrecer un diagnóstico preciso, por lo que se requiere de la detección directa del virus, o del antígeno viral, en las heces (Kapikian y Chanock, 2001).

La principal ruta de transmisión de los rotavirus es la vía fecal-oral, aunque también se ha especulado que el contacto persona a persona, el contacto con secreciones respiratorias, y/o el contacto con superficies contaminadas pudieran ser fuentes de transmisión, ya que los altos índices de infección por este virus en los primeros tres años de vida, en todo el mundo son independientes de las condiciones higiénicas y sanitarias (Arias *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2005).

Aunque existen distintos métodos para detectar rotavirus en las heces, los más habituales en la práctica clínica son las técnicas inmunológicas (inmunoensayo enzimático, aglutinación con látex e inmunocromatografía), que detectan antígenos de rotavirus del grupo A, más específicamente la proteína VP6. Entre estos métodos inmunológicos, el inmunoensayo enzimático es el considerado de referencia por su elevada sensibilidad y especificidad (Flewett *et al.*, 1989). La inmunocromatografía es una técnica introducida más recientemente, y numerosas casas comerciales han desarrollado pruebas para el diagnóstico de rotavirus basados en este método, en el cual se emplean anticuerpos monoclonales (Bon *et al.*, 2007). Se trata de métodos diagnósticos sencillos, rápidos, que no requieren instrumental especial y que presentan valores de sensibilidad y especificidad muy similares a los mostrados por el inmunoensayo enzimático (Wilhelmi *et al.*, 2001).

Existen otros métodos para detectar rotavirus pero no están disponibles en muchos laboratorios, como la microscopía electrónica directa y la inmunoelectromicroscopía (Buesa *et al.*, 2000). Los métodos moleculares detectan la presencia de ARN vírico, bien poniendo de manifiesto segmentos de ARN bicatenario mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), o bien amplificando por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) previamente sintetizado por reacción de transcripción inversa (RT-PCR). Estos métodos requieren la extracción previa del ácido nucleico vírico. Por otro lado, tienen la ventaja de que permiten caracterizar los diferentes aislados, bien por el patrón electroforético del ARN vírico (electroforetipo) o bien determinando el genotipo G y P por PCR semi-anidada, utilizando los cebadores adecuados. La detección de rotavirus de grupos B y C se puede realizar también utilizando PAGE. Estas técnicas han abierto la posibilidad de estudiar la evolución y la variabilidad de los rotavirus en diferentes regiones geográficas y a lo largo del tiempo (Buesa *et al.*, 2000).

Otro virus de importancia en la gastroenteritis infantil es adenovirus, el cual fue descrito por primera vez como agente viral único por Rowe *et al.* (1953) mientras

intentaban establecer cultivos celulares de amígdalas y tejido adenoideo (Cevenini *et al.*, 1997). Presenta tasas variables de infección, y son responsables del 1 al 20% de los casos de diarrea en la infancia (Farkas *et al.*, 2007). Se observa en varios países sin considerarse endémica de alguna zona en particular, infectando de igual forma a niñas y niños en cualquier época del año ya que no se han presentado patrones de estacionalidad para la infección. En países como China, Guatemala y Estados Unidos se han reportado del 5% al 18% de infecciones causadas por este agente viral y en menor porcentaje (2%) en Tailandia, Venezuela y Brasil (Cevenini *et al.*, 1997).

Los adenovirus humanos pertenecen a la familia *Adenoviridae*. Poseen apariencia esférica, con un diámetro de 70-90 nm, carecen de envoltura y poseen una cápside de simetría icosaédrica, compuesta por 12 pentones y 240 hexones (Matthews, 1979). El material genético de los adenovirus está constituido por un ácido desoxirribonucleico (ADN) bicatenario lineal cuya masa molecular oscila entre 20 y 25 M<sub>r</sub> (Wadell *et al.*, 1984).

Los 51 diferentes serotipos de adenovirus humanos han sido clasificados en seis subgéneros (A-F) sobre la base de sus características biofísicas y bioquímicas (Benko y Harrach, 2003). Los serotipos entéricos que más frecuentemente están asociados con la gastroenteritis causada por adenovirus son el 40 y 41, los cuales pertenecen al subgénero F y los serotipos 1, 2, 5 y 6 pertenecientes al subgénero C. También, aunque en menor número, pueden darse aislamientos asociados a gastroenteritis pertenecientes al subgénero A, de los serotipos 12, 18 y 31 (Baum, 2000).

Entre los síntomas asociados a la infección de adenovirus entéricos, la diarrea parece ser el síntoma predominante, acompañada o no de vómitos, inapetencia y decaimiento. Estas manifestaciones clínicas van desde una enfermedad sin fiebre hasta un estado comatoso provocado por la deshidratación (Cruz *et al.*, 1998). El cuadro de gastroenteritis por adenovirus entéricos es menos grave que el de rotavirus (Uhnoo *et al.*, 1998).

Los adenovirus pueden ser detectados a través de microscopía electrónica basándose en su morfología típica, cuando se encuentran en elevadas concentraciones en las heces, lo que con frecuencia ocurre en las personas infectadas que presentan sintomatología, aunque se estima que se requiere del orden de  $10^6$  partículas víricas por gramo de muestra para poder ser observadas. La inmunolectromicroscopía, utilizando antiseros o anticuerpos monoclonales, incrementa la sensibilidad de la ME (Buesa *et al.*, 2009).

Existen otras técnicas que permiten detectar antígenos (proteínas virales) o parte del genoma (ADN) viral. Ejemplo de ello serían, la ME, la aglutinación en látex, radioinmunoanálisis e inmunoensayos enzimáticos cuando se utilizan anticuerpos policlonales, ya que no distinguen los adenovirus entéricos de los otros adenovirus. Sin embargo, su sensibilidad para los serotipos 40 y 41 aumenta cuando para éstas mismas técnicas se emplean anticuerpos monoclonales (Halonen *et al.*, 1980; Johansson *et al.*, 1980). Además de estas técnicas, se han descrito ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, muy sensibles para detectar adenovirus entéricos fecales (Takiff *et al.*, 1985; Hadmmon *et al.*, 1987).

Los laboratorios clínicos, que no cuentan con métodos moleculares, dependen de métodos más sencillos pero confiables para dar resultados en poco tiempo al médico tratante. Toda prueba diagnóstica debe reflejar su capacidad de proporcionar resultados verdaderos de aquello que se está evaluando y este desempeño se puede medir a través de la sensibilidad y especificidad (Jaimes, 2007).

En 1947, Yerushalmy introdujo los términos de sensibilidad y especificidad como indicadores estadísticos que evalúan el grado de eficacia inherente a una prueba diagnóstica. El mismo autor define la sensibilidad como la capacidad de la prueba para detectar a un sujeto enfermo, es decir, expresa cuan sensible es la prueba en detectar presencia del agente etiológico de la enfermedad en un individuo y a la especificidad como, la capacidad que tiene la prueba de identificar como sanos o no enfermos, a los

que efectivamente lo son.

Considerando la alta mortalidad ocasionada por la gastroenteritis en niños menores de 5 años, surge la necesidad de utilizar métodos rápidos y confiables para su diagnóstico, a fin de asegurar una terapia adecuada, por lo que el propósito de este estudio fue conocer la utilidad de uno de los métodos diagnósticos más utilizados actualmente en nuestro país, evaluando la sensibilidad y especificidad de una prueba comercial que detecta rotavirus de grupo A y adenovirus 40/41; basado en el método inmunocromatográfico con anticuerpos monoclonales y utilizando como referencia la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de alta especificidad para los rotavirus y la microscopía electrónica para adenovirus.

El objetivo general que se persiguió con esta investigación fue, evaluar un método inmunocromatográfico comercial para la detección de rotavirus humano y adenovirus 40/41 en heces de niños menores de cinco años con diarrea aguda. Para tal fin, se plantearon los siguientes objetivos específicos: identificar la presencia de rotavirus humanos en heces de niños diarreicos por electroforesis en gel de poliacrilamida (prueba de oro), detectar rotavirus humano y adenovirus 40/41 en heces de niños diarreicos por inmunocromatografía, confirmar la presencia de adenovirus 40/41 en heces de niños diarreicos por microscopía electrónica y calcular la sensibilidad y especificidad, así como el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, del ensayo inmunocromatográfico.

## METODOLOGÍA

### **Muestras de Heces**

Se utilizaron 125 muestras de heces provenientes de igual número de niños menores de cinco años que cursaron diarrea aguda en el año 2009, en Cumaná, estado Sucre, Venezuela, y que se mantenían congeladas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Nuair Ultralow Freezer, Korea del sur) en el Laboratorio de Virología del Postgrado en Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Estas muestras, previamente examinadas por ELISA, fueron reexaminadas para confirmar la presencia de rotavirus por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés), que fue la técnica utilizada como prueba de oro o “gold standard” en la evaluación del ensayo inmunocromatográfico.

### **Determinación de rotavirus por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) (Sulbarán *et al.*, 2000).**

Todas las muestras de heces fueron tratadas con una solución de acetato de sodio 0,1 mol/l que contenía dodecyl sulfato sódico (SDS, por sus siglas en inglés) al 1%. Luego se le añadió un volumen igual de una mezcla de fenol-cloroformo y se agitó vigorosamente por 3 minutos. La emulsión resultante se centrifugó a 10 000 g por 20 minutos y del sobrenadante se separaron 500  $\mu\text{l}$ . El ARN encontrado en el sobrenadante se concentró por el método de Sambrook *et al.* (1989), añadiendo etanol frío absoluto al sobrenadante en una relación aproximada de 2:1, se agitó y dejó toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego, se centrifugó y el ARN precipitado se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla de disociación [tris(hidroximetil)aminometano 0,5 mol/l ajustado a pH 6,8 con ácido clorhídrico, glicerina al 0,76%, SDS 20% y azul de bromofenol].

La separación de los segmentos de ARN de los rotavirus se realizó por electroforesis en geles planos de poliacrilamida a una concentración de 5%, la cual se dejó correr entre 5 y 7 horas a temperatura ambiente con una corriente constante de 30 mA (Chudzio *et al.*, 1989).

Finalizada la corrida, los geles se lavaron con agua bidestilada por 30 minutos, agitándose constantemente. Seguidamente, se reemplazó por una solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 12 mmol/l por 30 minutos y se enjuagaron dos veces con agua bidestilada. La etapa de reducción, se llevó a cabo por un máximo de 6 minutos, con una solución de hidróxido de sodio 0,75 mol/l que contenía formaldehído 0,76%, hasta que las bandas fueron claramente visibles. Para detener el revelado los geles se colocaron en ácido acético al 5%.

### **Detección de adenovirus por microscopia electrónica de transmisión (MET)**

Las muestras de heces se resuspendieron al 20% en tampón fosfato salino y posteriormente se clarificaron por centrifugación a 3 000 g durante 15 minutos. Los sobrenadantes se colocaron en una rejilla de cobre (400 mesh) cubierta con Formvar e impregnada con carbón. Las partículas virales adheridas a la rejilla fueron teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico al 2%. Luego se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (MET) Hitachi H-600 (60 000 a 80 000 X) en el Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (UDO) “Susan Tai” (IIBCAUDO). Las heces fueron consideradas negativas cuando ninguna partícula viral fue detectada en los diversos campos de la rejilla.

### **Detección de rotavirus y adenovirus por inmunocromatografía (GastroVir-Strip, Coris)**

El principio de la prueba está basado en un sistema de membranas de nitrocelulosa que contienen anticuerpos monoclonales dirigidos contra rotavirus y adenovirus. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopes de la VP6 del rotavirus humano del grupo A, y contra proteínas específicas del adenovirus 40/41 humano, conjugados con partículas de látex. Estos complejos se encuentran inmovilizados en las tiras de nitrocelulosa.

Cuando se introduce la tira en la fase líquida de la suspensión fecal, el conjugado (látex-anticuerpos monoclonales) migra por capilaridad junto con la muestra hasta

encontrarse con el anticuerpo monoclonal anti adenovirus y formar un complejo (látex-anticuerpo monoclonal-adenovirus). La migración continuará y el nuevo complejo se fijará en el anticuerpo monoclonal adsorbido en una zona específica de la nitrocelulosa, en donde aparecerá una banda roja.

La solución continúa la migración por la tira hasta encontrarse con anticuerpos monoclonales anti-rotavirus adsorbidos a la nitrocelulosa y formar el complejo conjugado-rotavirus que se fijará a anticuerpos monoclonales anti-rotavirus y aparecerá una banda azul.

De acuerdo con la metodología sugerida por el fabricante, se añadieron 0,5 ml ó 15 gotas de la solución del tampón de dilución en tubos de ensayo de 3 ó 5 ml de capacidad. Se introdujo con un aplicador de madera en cada tubo previamente rotulado, una cantidad suficiente de muestra fecal para obtener una dilución aproximada de 4% p/v. Para muestras líquidas, se tomaron aproximadamente 150 µl y se añadieron al tubo que contenía la solución tampón. Luego se agitó para homogeneizar la solución y se dejó reposar de 1 a 2 minutos. Finalmente, se sumergió la tira sensibilizada en cada tubo en el sentido indicado por la flecha roja (Anexo 1).

Se dejó incubar durante 10 minutos. Si la muestra fecal contiene rotavirus y/o adenovirus aparecerán unas bandas azul y/o roja, respectivamente, en zonas específicas de la tira de nitrocelulosa. En ambos resultados aparecerá una banda adicional correspondiente al control interno del ensayo.

### **Evaluación del ensayo inmunocromatográfico**

Para la evaluación del ensayo inmunocromatográfico se calcularon e interpretaron los siguientes parámetros estadísticos: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

Para realizar los cálculos de estos parámetros se emplearon las fórmulas

matemáticas propuestas por Jaimes, 2007 y que están señaladas abajo. Los análisis estadísticos fueron calculados a su vez, con el programa OpenEpi 2.3.1. La prevalencia estimada de rotavirus en la población infantil, utilizada en los cálculos de VPP, VPN, fue del 20 %:

$$\text{Sensibilidad (S)} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo (VPP)*} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo negativo (VPN)*} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo (VPP)**} = \frac{\text{prevalencia} \times \text{sensibilidad}}{(\text{prev.} \times \text{sen.}) + [(1 - \text{prev.}) \times (1 - \text{sen.})]} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo negativo (VPN) **} = \frac{(1 - \text{prevalencia}) \times \text{especificidad}}{[(1 - \text{prev.}) \times \text{especificidad}] + [\text{prev} \times (1 - \text{sen.})]} \times 100$$

\* Valores predictivos sin tomar en cuenta la prevalencia.

\*\* Valores predictivos tomando en cuenta la prevalencia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La necesidad de realizar un diagnóstico rápido de los agentes etiológicos de la gastroenteritis para instaurar un tratamiento eficaz de la diarrea ha impulsado el desarrollo de técnicas diagnósticas que disminuyan el tiempo necesario para la obtención de los resultados y que tengan altos niveles de fiabilidad, para orientar el tratamiento de las gastroenteritis y restringir la transmisión de los virus. Los métodos inmunocromatográficos cumplen con estas características, pero antes requieren de evaluaciones en cuanto a su sensibilidad y especificidad para asegurar la confiabilidad.

De las 125 muestras de heces facilitadas por el Laboratorio de Virología del Postgrado en Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, utilizadas en una investigación previa donde se empleó como método diagnóstico para rotavirus el inmunoensayo enzimático (ELISA), se obtuvieron 67 muestras positivas y 58 negativas.

Con el fin de confirmar la presencia de rotavirus en dichas muestras, se procedió a determinar la presencia del genoma viral por PAGE. Los resultados obtenidos fueron exactamente iguales a los de ELISA: 67 muestras positivas para rotavirus, que mostraron el patrón típico de ARN de los rotavirus del grupo A en el gel y 58 muestras negativas.

Una vez reexaminadas las muestras por PAGE, estas fueron analizadas por el método inmunocromatográfico, resultando 66 positivas a rotavirus humano y 59 negativas (tabla 1), lo que significa que el último método detectó el 98,5% de las positivas por PAGE. Este alto porcentaje de detección de rotavirus humanos podría atribuírsele al hecho de que la prueba inmunocromatográfica emplea anticuerpos monoclonales de captura dirigidos específicamente contra epítopes de la proteína VP6 de los rotavirus que aun se encontraban intactos en las muestras utilizadas en el estudio.

**Tabla 1.** Comparación de resultados obtenidos por el método inmunocromatográfico respecto a la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

		PAGE (prueba de oro)		Total
		Positivos	Negativos	
GastroVir-Strip	Positivos	66	0	66
	Negativos	1	58	59
Total		67	58	125

Sensibilidad = 98,5 % (IC 95 %, 92,0 – 99,7)

Especificidad = 100,0 % (IC 95 %, 93,7 – 100,0)

En la determinación de antígenos virales de adenovirus 40/41, solo se encontró 1 muestra positiva (0,8 %), de las 125 muestras analizadas, a través del método inmunocromatográfico.

Se ha estimado que entre el 1 al 20% de las diarreas virales en todo el mundo son causadas por adenovirus (Farkas *et al.*, 2007). El estudio realizado en el año 2008 por Cermeño *et al.*, en Ciudad Bolívar, demostró una prevalencia para adenovirus del 2,7%, mientras que en el realizado por Rivero *et al.*, (2009) en el estado Zulia, el más reciente realizado en nuestro país, no se demostró la presencia de adenovirus en la población estudiada.

La frecuencia de infección por adenovirus encontrada en este estudio, se ubica por debajo de las reportadas por estos autores, y resulta importante destacar que a nivel regional y nacional no hay estudios más recientes que demuestren la presencia de este agente en niños con diarrea aguda y con los que puedan establecerse comparaciones.

Para constatar la presencia de adenovirus en la muestra fecal, positiva por inmunocromatografía, se realizó una tinción negativa de la muestra para su observación al microscopio electrónico de transmisión.

No se encontraron por ME partículas compatibles con la morfología típica de los adenovirus, probablemente debido a que las muestras sufrieron varios procesos de congelamiento y descongelamiento en el tiempo, lo cual dañaron la integridad de la partícula. Sin embargo, es importante hacer notar que para la detección de adenovirus u otros virus a través del método inmunocromatográfico, no es necesario que la partícula viral permanezca íntegra en cuanto a su estructura, siempre y cuando las proteínas de la cápside de estos virus, capaces de interactuar con los anticuerpos fijados a la tira reactiva, permanezcan intactas, lo que explicaría la muestra positiva para adenovirus encontrada en este estudio por el método inmunocromatográfico.

Sólo una muestra resultó negativa para rotavirus a través del método inmunocromatográfico, pero positiva a través de PAGE. Este hecho podría explicarse desde el punto de vista de cantidad de muestra utilizada para cada prueba. En la inmunocromatografía se requiere diluir (aproximadamente 10%) una muy pequeña cantidad de materia fecal en una solución tampón para luego sumergir la cinta reactiva y luego obtener un resultado. Esto implica que cantidades muy bajas de proteína VP6 de los RVH presentes en la muestra podría disminuir aun más al diluirlas en buffer pudiendo no ser detectadas por este método. Sin embargo, para el método PAGE se requiere una cantidad mayor de suspensión fecal (aproximadamente 500 ml de la suspensión) para la extracción del ARN viral con acetato de sodio y una mezcla de fenol-cloroformo. Al tomar mayor cantidad de materia fecal aumenta la probabilidad de incluir más partículas virales en el proceso de extracción y así obtener un resultado positivo por PAGE.

La sensibilidad y la especificidad del método inmunocromatográfico en estudio, fue del 98,5 y 100,0 % respectivamente. Por lo que queda demostrado que aún siendo una prueba sencilla de realizar y de bajo costo, es comparable y hasta igual de confiable que la electroforesis en gel de poliacrilamida. El empleo de anticuerpos monoclonales en pruebas como éstas garantizan una elevada especificidad en comparación con otros

métodos serológicos utilizados para detectar rotavirus en muestras de heces.

La sensibilidad y especificidad de una prueba inmunológica debe mantener un nivel mayor del 90,0% para considerarse como buena (Martínez, 2004). Esto concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación, donde tanto la especificidad como la sensibilidad del método inmunocromatográfico evaluado, se encuentran por encima de ese valor.

Existen varios estudios en los que se comparan métodos inmunocromato-gráficos comerciales para la detección de rotavirus en heces, con técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, los de Nguyen *et al.* (2007) donde observaron una sensibilidad y una especificidad del 87,8% y 93,3%, respectivamente, para Dipstick “Eiken” Rota kit, de SA Scientific; y el de Wilhelmi *et al.* (2001) donde la sensibilidad y la especificidad fueron del 98,5% y 96,2%, respectivamente, para Rota-Strip, de Coris BioConcept.

Es importante destacar que en este último estudio los autores utilizaron el mismo estuche de inmunocromatografía de la casa comercial Coris BioConcept, que se usó en este trabajo obteniendo resultados similares a los reportados en el presente trabajo. Esto demuestra que dicho estuche sigue manteniendo la misma sensibilidad y especificidad de detección de RVH desde hace diez años.

También, Bon *et al.* (2007) compararon la prueba VIKIA® Rota-Adeno con una técnica de inmunoensayo enzimático, y encontraron una sensibilidad del 92,5 % y una especificidad del 100,0 %, valores similares a los hallados en esta investigación. Téllez *et al.* (2008) evaluaron la prueba inmunocromatográfica conocida como Simple Rota-Adeno, usando como método de referencia la RT-PCR. En este caso la sensibilidad y especificidad fue de 98,4% y 84,8%.

De igual manera, Fariña *et al.* (2008), evaluaron dos métodos inmunocromato-

gráficos de las marcas comerciales Operon Simple y SD Bioline Rotavirus, para los que obtuvieron respectivamente valores de sensibilidad y especificidad de 98,8% y 82,4% para Operon Simple y de 96,4% y 85,0% para SD Bioline Rotavirus. En dicha investigación se utilizó a PAGE como método de referencia.

Existe similitud entre los resultados obtenidos en esta investigación con respecto a los de todos los autores mencionados anteriormente, teniendo en cuenta que en dichas investigaciones se usaron diferentes métodos de referencias o pruebas de oro, desde técnicas serológicas hasta métodos moleculares y en todos los casos, el método inmunocromatográfico mostró valores de sensibilidad y especificidad superiores al 80,0%, demostrando que además de ser una prueba sencilla de realizar, es igual de confiable que las técnicas consideradas como de referencia.

Las pequeñas variaciones observadas entre la sensibilidad y especificidad arrojadas por los diferentes métodos cromatográficos estudiados pudiera deberse a varios factores como, la utilización de diferentes estándares de oro en los diversos trabajos, al transporte y conservación de la muestra, tiempo entre la recolección y procesamiento, calidad de los anticuerpos de captura y presencia en la muestra de enzimas que degradan proteínas o ácidos nucleicos, entre otros (Ferreira *et al.*, 2006).

Si bien la sensibilidad y especificidad son dos propiedades independientes no deben analizarse por separado al momento de considerar la elección de una prueba. Estas poseen como ventaja adicional de que son propiedades intrínsecas a la prueba diagnóstica, y definen su validez independientemente de cual sea la prevalencia de la enfermedad en la población a la cual se aplica (Jaimes, 2007). Al ser características intrínsecas de una medición, la sensibilidad y la especificidad no experimentan grandes variaciones según el lugar en el que se apliquen, siempre que se realice en condiciones similares (Cabello y Pozo, 1997).

A pesar de que la sensibilidad y la especificidad se consideran las características

operacionales fundamentales de una prueba diagnóstica, en la práctica su capacidad de cuantificación de la incertidumbre médica es limitada. Se necesita más bien evaluar la medida en que sus resultados modifican realmente el grado de conocimiento que se tenía sobre el estado del paciente. Concretamente, interesa conocer la probabilidad de que un individuo para el que se haya obtenido un resultado positivo, sea efectivamente un enfermo; y lo contrario, conocer la probabilidad de que un individuo con un resultado negativo esté efectivamente libre de la enfermedad, y las medidas o indicadores que responden a estas interrogantes son los valores predictivos. Estos, no son una característica o una propiedad intrínseca de la prueba, sino que dependen de la sensibilidad y la especificidad de la misma (Jaimes, 2007).

Para efectos de esta investigación, en cuanto a los cálculos de los valores predictivos, se utilizaron fórmulas independientes de la prevalencia y al mismo tiempo, fórmulas dependientes de ella. Esto con la finalidad de estudiar el efecto que ejerce la prevalencia en la evaluación de una prueba diagnóstica.

La OMS reportó para el año 1999 una prevalencia de los rotavirus de 34,0% a 52,0% en países desarrollados y de 20,0% a 40,0% en países en vías de desarrollo. En Venezuela la prevalencia es cercano al 28,6 % (OPS, 2007) y para Cumaná, de acuerdo al último estudio realizado entre 2006 y 2007 (Maldonado *et al.*, 2010), es de 19,5%. De acuerdo a esta información, se escogió para esta investigación la prevalencia del 20,0% para los cálculos de los valores predictivos.

Sin tomar en cuenta la prevalencia de la infección, el valor predictivo positivo (VPP) para el método inmunocromatográfico, fue del 100,0% y el valor predictivo negativo (VPN) del 98,3%. Es decir, que el 100,0% de los pacientes con resultado positivo, ciertamente padecieron la infección por rotavirus, mientras que el 98,3% de los pacientes no presentaron la enfermedad. Lo que indica claramente que dicho método refleja con certeza el estado de salud del paciente y respalda los resultados obtenidos en cuanto a sensibilidad y especificidad de la prueba en estudio (Tabla 2).

El uso de estas fórmulas son recomendables cuando se quieren conocer los valores predictivos de una prueba y no se conoce la prevalencia en el contexto donde piensa utilizarse.

Cuando se calcularon los VPP y VPN tomando en cuenta la prevalencia de la enfermedad los resultados variaron, el VPP disminuyó a 92,4% y el VPN aumentó a 99,5%. Aún cuando el VPP para el método inmunocromatográfico disminuyó, la inclusión de la prevalencia no tuvo gran impacto en dichos resultados, ya que este se mantiene por encima del 90,0%, por lo que el método sigue resultando confiable por cuanto continúa clasificando a los pacientes de acuerdo a su verdadero estado de salud.

A diferencia de lo que ocurre con la sensibilidad y especificidad, los valores predictivos donde se incluye la prevalencia, no son estables para cada prueba sino que varían acorde a la frecuencia de la enfermedad en la población estudiada (Pita y Pértegas, 2010).

**Tabla 2.** Comparación de los valores predictivo positivo y predictivo negativo del método inmunocromatográfico en presencia y ausencia de la prevalencia.

	VPP %	VPN %
<b>Con prevalencia</b>	92,4	99,5
<b>Sin prevalencia</b>	100,0	98,3

Si la prevalencia de una determinada enfermedad en una población es baja, como en este caso, el valor predictivo positivo tiende a disminuir, ya que, al haber un mayor número de personas sanas, se incrementa el número de falsos positivos. Es decir, si solo un porcentaje bajo de la población está afectada, un resultado negativo permite descartar la enfermedad con un elevado margen de confianza, pero no permite afirmar su existencia, por lo que habría que confirmar el resultado con una segunda prueba (Pita y

Pértegas, 2010).

Por el contrario, si la prevalencia es alta, aumentará el valor predictivo positivo y disminuirá el valor predictivo negativo, pues, al haber un mayor número de personas enfermas, aumenta el número de falsos negativos. Es decir, un resultado positivo tiende a confirmar su presencia, mientras que si el resultado es negativo no ayudará a excluirla (Pita y Pértegas, 2010).

En general, el valor predictivo positivo disminuye a medida que la prueba diagnóstica se aplica a poblaciones con prevalencia de enfermedad más baja. Esto se debe a que una prueba que produce falsos positivos se aplica a una población de sujetos mayoritariamente sanos, por lo que en esta situación es relativamente fácil obtener muchos falsos positivos (Cabello y Pozo, 1997).

Queda claro como la prevalencia es un factor determinante en los valores predictivos tanto negativos como positivos, y su uso en los cálculos de los diversos parámetros que permiten validar una prueba diagnóstica debe estar sujeto a revisión, esto debido a que se suele probar nuevos métodos de diagnósticos en hospitales y clínicas donde la prevalencia es elevada. Por ello si se busca emplearlas en la población general, debe conocerse siempre cuál es el comportamiento de esas mismas pruebas donde las prevalencias son bajas, con el fin de evitar que la tasa de falsos positivos aventaje a la tasa de verdaderos.

Queda demostrado que el método inmunocromatográfico evaluado en esta investigación cumple con los requisitos necesarios para considerarla como prueba de primera elección, ya que demostró ser sencilla y rápida de realizar, dos características importantes en el diagnóstico de una enfermedad que en muchos casos resulta mortal, como lo son las diarreas agudas por rotavirus y adenovirus 40/41. Permite distinguir a los individuos enfermos de los que no presentan la enfermedad, no se requieren de instrumentales costosos, de instalaciones ni de entrenamiento especial para poder

realizarla y lo más importante, es económicamente accesible, por lo que puede implementarse en cualquier laboratorio.

Resulta sumamente importante evaluar de manera constante y exhaustiva, las diferentes pruebas diagnósticas utilizadas en los laboratorios clínicos, con el fin de seleccionar la más adecuada en cada momento, para así proporcionarle al paciente un resultado realmente confiable y fidedigno y de esa manera contribuir al rápido diagnóstico y curación de las enfermedades.

## **CONCLUSIONES**

El método inmunocromatográfico puesto a prueba en esta investigación demostró ser muy confiable, por cuanto es capaz de clasificar a cada paciente como sano o enfermo.

Es necesario estimar la prevalencia de la enfermedad en el medio donde se va a utilizar, con el fin de calcular y ajustar sus valores predictivos para el uso indicado, es decir, confirmar o descartar la enfermedad.

## **RECOMENDACIONES**

Para obtener resultados aún más exactos y precisos es recomendable que las técnicas se desarrollen como vienen indicadas por los fabricantes, para garantizar la confiabilidad de los resultados.

En cuanto a la microscopia electrónica, deben utilizarse muestras purificadas y que hayan sido sometidas a los procesos previos de ultracentrifugación, para así eliminar cualquier interferente que imposibilite la visualización. Igualmente, debe evitarse en lo posible la congelación y descongelación repetida de las muestras, ya que las partículas virales pierden su estructura característica y por lo tanto no pueden observarse a través del microscopio electrónico.

## BIBLIOGRAFÍA

Arias, F.; Guerrero, I.; Méndez, E.; Zárate, S.; López, T.; Espinosa, R. y Romero, P. 2002. Molecular Biology of rotavirus cell entry. *Arch. Med. Res.*, 33: 356-361.

Baum, S. 2000. *Adenovirus*. In G.L. Mandell, G.L.; Bennet, J.E. y Dolin, R. (eds) *Principles and practice of infectious diseases*. Quinta Edición. Churchill Livingstone, New York.

Benko, M. y Harrach, B. 2003. Molecular evolution of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 272: 3-35.

Bishop, R.; Davidson, G.; Holmes, I. y Ruck, B. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet.*, 302 : 1281-1283.

Bon, F.; Kaplon, J.; Metzger, M. y Pothier, P. 2007. Evaluation of seven immunochromatographic assays for the rapid detection of human rotaviruses in fecal specimens. *Pathol. Biol.*, 55: 149-153.

Buesa, J.; Álvarez, M.; Castillo, J. y Vila, J. 2009. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 27: 406-411.

Buesa, J.; De Sousa, C.; Asensi, M.; Martínez, O.; Prat, J. y Gil, M. 2000. VP7 and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from children with gastroenteritis over a 3-year period in Valencia, Spain. *Euro. J. Epidemiol.*, 16: 501-506.

Cabello J. y Pozo F. 1997. Métodos de investigación en Cardiología Clínica: Estudios de evaluación de las pruebas diagnósticas en Cardiología. *Rev. Esp. Cardiol.*, 50: 507-519.

Cermeño, J.; Hernández, I.; Camaripanoa, M.; Medina, N.; Guevara, A. y Hernández, C. 2008. Etiología de diarrea aguda en niños menores de 5 años Ciudad Bolívar, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 28: 55-60.

Cevenini, R.; Mazzaracchio, R.; Rumpianesi, F.; Donati, D.; Moroni, A.; y Sambri, V. 1997. Prevalence of enteric adenoviruses from acute gastroenteritis. A five year study. *Eur. J. Epidemiol.*, 3:147-150.

Chudzio, T.; Kasatiya, S.; Irvine, N. y Sankar-Mistry, P. 1989. Rapid screening test for the diagnosis of rotavirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2394-2396.

Cruz, J.; Caceres, P. y Cano, F. 1998. Adenoviruses types 40&41 and rotavirus associated with diarrhea in children from Guatemala. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 1780-1788.

Estes, M.K. 2001. *Rotaviruses and their replication*. In *Fields Virology*. Fields, B.; Knipe, D.; Howley, P.; Chanock, R.; Melnick, J.; Monath, T.; Roizman, B. y Straus, S. (eds). Cuarta Edición. New York. Raven Press.

Fariña, N.; Galeano, M.E.; Martínez, M.; Ferreira, R.; Vega, M.; Espínola, E.; Parra, G.I.; Figueredo, L. y Russomando, G. 2008. Sensibilidad y especificidad del método inmunocromatográfico utilizado para el diagnóstico de rotavirus. *Men. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 6: 5-10.

Farkas, T. y Jiang, X. 2007. *Rotaviruses, caliciviruses, astroviruses, enteric adenoviruses; and other diarrheic viruses*. In: *Manual of clinical microbiology*. Murray, P.; Baron, E.; Jorgensen, J.; Landry, M. y Pfaller, M. (eds). 9th ed. Washington: ASM Press.

Ferreira, T.L.; Becho, M.C.; Bernardo, A.R.; Branco, T.C. y Ribeiro, R.S. 2006 Performance of a latex agglutination test in the diagnosis of acute gastroenteritis by rotavirus. *Braz. J. of Microbiol.*, 37: 587-589.

Flewett, T. H.; Bryden, A. S.; Davies, H.; Woode, G. N. y Bridger, J. C. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*, 2: 61-63.

Flewett, T.; Arias, C.; Avendano, L.; Ghafoor, A.; Mathan, M. y Mendis, L. 1989. Comparative evaluation of the WHO and DAKOPATTS enzyme-linked immunoassays kits for rotavirus detection. *Bull WHO*; 67: 369-374.

Hadmmon, G.; Hannan, C.; Yeh, T.; Fischer, K.; Mauthe, G. y Straus, S. 1987. DNA hybridization for diagnosis of enteric adenovirus infection from directly spotted fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 1881-1885.

Halonen, P.; Sarkkinen, H.; Arstila, P.; Hjertson, E. y Torfason, E. 1980. Four-Layer radioimmunoassay for detection of adenovirus in stool. *J. Clin. Microbiol.*, 11: 614-617.

Jaimes, F. 2007. Pruebas diagnósticas: uso e interpretación. *Acta Med. Colomb.*, 32: 29-33.

Johannson, M.; Uhnoo, I.; Kidd, A.; Madeley, G. y Wadell, G. 1980. Direct identification of enteric adenovirus, a candidate new serotype associated with infantile gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, 23: 840-842.

Kapikian, A. y Chanock, R. 2001. *Rotaviruses*. In *Fields Virology*. Fields, B.; Knipe, D.; Howley, P.; Chanock, R.; Melnick, J.; Monath, T.; Roizman, B. y Straus, S. (eds). Cuarta Edición. New York. Raven Press.

Lawton, J.; Estes, M. y Prasad B. 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature. Struct. Biol.*, 4: 118-121.

Maldonado, A.; Franco, M. y Blanco, A.; Villalobos, L.; Martínez R.; Hagel I.; González R. y Bastardo, J.W. 2010. Características clínicas y epidemiológicas de la infección por rotavirus en niños de Cumaná, Venezuela. *Invest. clín, dez.*, 51: 519-529.

Martínez, J. 2004. Erradicación del VIH. Sus limitaciones. Boletín de tratamientos experimentales contra el SIDA., 15: 6-9.

Matthews, R. 1979. The classification and nomenclature of viruses. *Intervirolgy*. 11: 133-135.

Nguyen T.A.; Khamrin P.; Takanashi S.; Hoang P.L.; Pham L.D. y Hoang K.T. 2007. Evaluation of immunochromatography test of detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. *J Trop Pediatr*, 53: 264-269.

Organización Panamericana de la Salud, OPS. 2007. "Datos e indicadores de vigilancia de rotavirus entre los años 2005-2007". "Rotavirus". <[http://www.paho.org/Spanish/AD/FCH/IM/Rotavirus\\_TablasVigilanciaMarzo2008.pdf](http://www.paho.org/Spanish/AD/FCH/IM/Rotavirus_TablasVigilanciaMarzo2008.pdf)> (08/10/2011).

O’Ryan, M.; Prado, V. y Pickering, L. 2005. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 16: 125-136.

Parashar, U.; Alexander, J. y Glass, R. 2006. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. Recommendations and reports. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 55: 1-13.

Parashar, U.; Hummelman, E.; Bresee, J.; Miller, M. y Glass, R. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.*; 9: 565-572.

Pérez, J.; Vargas, P.; Isa, P.; López, C. y Arias, F. 2005. Rotavirus Vaccine Early introduction in Latin America-Risks and Benefits, *J. virol.*, 37: 1-10.

Pita, S. y Pértegas, S. 2010. Unidad de Epidemiología Clínica y

Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, España. *Cad. Aten. Primaria*; 10: 120-124.

Rivero, Z.; Maldonado, A.; Bracho, A.; Castellanos, M.; Torres, Y.; Costa, L.; Méndez, A. y Márquez, L. 2009. Prevalencia de enteroparasitos, rotavirus y adenovirus en niños aparentemente sanos. *Kasmera*, 37: 62-73.

Rowe, W.; Huebner, R.; Gilmore, L.; Parrott, R. y Ward, T. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 84: 570-573.

Salinas, B.; González, G.; González, R.; Escalona, M.; Materán, M. y Pérez-Schael, I. 2004. Epidemiologic and clinical characteristics of rotavirus disease during five years of surveillance in Venezuela. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 23: 161-167.

Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, second Ed. Cold Spring Harbor laboratory, New York.

Santos, N. y Hoshino, Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.*, 15: 29-56.

Sirok, A.; Le Pera, V. y Sandín, D. 2006. Agentes virales de gastroenteritis: Rotavirus. In: Temas de bacteriología y virología médica. Segunda Edición. Montevideo, Uruguay.

Sulbarán, M.; Maldonado, A. y Bastardo, J. 2000. Método rápido de diagnóstico de rotavirus en heces. *Saber*, 12: 29-36.

Takiff, H.; Seidlin, M.; Krause, P.; Rooney, J.; Brandt, C.; Rodríguez, W.; Yolken, R. y Straus, S. 1985. Detection of enteric adenoviruses by dot blot hybridization using a molecularly cloned viral DNA probe. *J. Med. Virol.*, 16: 107-118.

Téllez, C.J.; Montava, R.; Ribes, R.; Tirado, M.D. y Buesa, J. 2008. Evaluación de dos equipos inmunocromatográficos comerciales para el diagnóstico rápido de la infección por rotavirus. *Rev. Argent. Microbiol.*, 40: 167-170.

Uhnoo, I.; Wadell, G. y Svensson, L. 1998. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J. Clin. Microbiol.*, 20: 365-372.

Urrestarazu M, Liprandi F, Pérez E, Gonzalez R, Pérez-Schael I. 1999. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en

Venezuela. *Rev Panam Salud Pública*; 6:149-156.

Wadell, G. 1984. Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 110: 191-220.

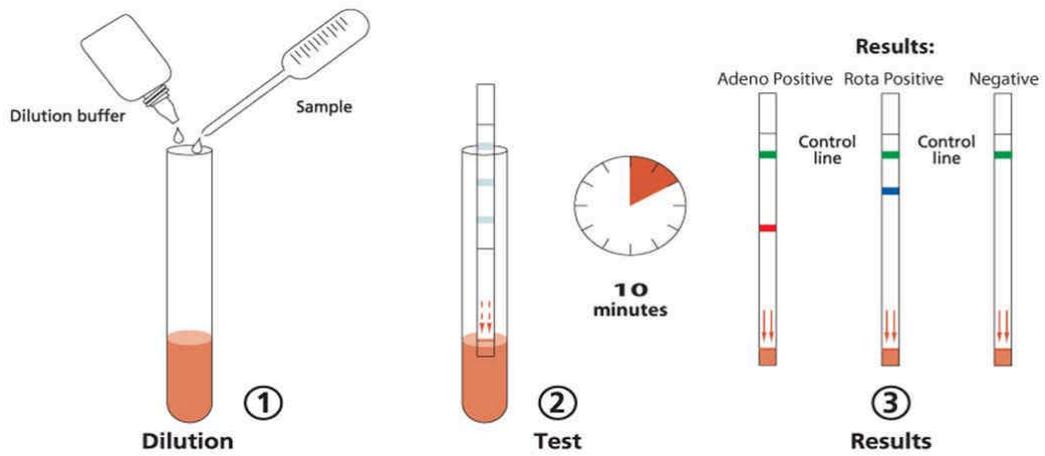
WHO-World Health Organization 1999. Rotavirus vaccines. WHO position paper. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 74: 33-40.

Wilhelmi, I.; Colomina, J.; Martín-Rodrigo, D.; Román, E. y Sánchez-Fauquier, A. 2001. New immunochromatographic method for rapid detection of rotaviruses in stool samples with standard enzyme immunoassay and latex agglutination techniques. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 20: 741-743.

Yerushalmy J. 1947. Statistical problems in assessing methods of medical diagnosis, with special reference to X-ray techniques. *Pub Health Rep*; 62: 1432-1449.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1



**PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA INMUNOCROMATOGRÁFICA  
PARA EL DIAGNÓSTICO DE ROTAVIRUS HUMANO Y ADENOVIRUS 40/41  
KIT GastroVir-Strip, Coris**

# **Hoja de Metadatos**

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

<b>Título</b>	EVALUACIÓN DE UN MÉTODO INMUNOCROMATOGRÁFICO PARA LA DETECCIÓN DE ROTAVIRUS HUMANO Y ADENOVIRUS 40/41 EN HECES DE NIÑOS CON SINDROME DIARREICO.
<b>Subtítulo</b>	

### Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
Hurtado M, Mariángeles Ana	<b>CVLAC</b>	<b>16.701.011</b>
	<b>e-mail</b>	Mariangeles_h@hotmail.com
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

### Palabras o frases claves:

<b>Inmunocromatografía</b>
<b>Rotavirus Humano- Adenovirus 40/41</b>
<b>Evaluación- Sensibilidad- Especificidad- Valores Predictivos</b>

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

### Resumen (abstract):

Se evaluó un método inmunocromatográfico para el diagnóstico de rotavirus y adenovirus 40/41 conocido comercialmente como GastroVir-Strip, de la casa comercial Coris BioConcept, utilizando como método de referencia la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Para ello, se utilizaron 125 muestras de heces de niños que cursaron diarrea aguda en el año 2009, almacenadas en el Laboratorio de Virología del Postgrado en Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Las muestras previamente examinadas por inmunoensayo enzimático (ELISA), donde resultaron 67 positivas y 58 negativas para rotavirus, fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, y luego por el método inmunocromatográfico. La sensibilidad fue de 98,51% y la especificidad de 100,00% para el método inmunocromatográfico. Los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN), sin tomar en cuenta la prevalencia de la infección fueron del 100,00% y 98,33% respectivamente, mientras que tomando en cuenta la prevalencia los valores fueron de 92,42% y 99,51% respectivamente. Del total de muestras analizadas, se encontró una muestra (0,80%) positiva para adenovirus por inmunocromatografía, la cual no pudo ser confirmada por microscopía electrónica (ME). En cuanto a la detección de rotavirus humanos, los resultados indican que, el método inmunocromatográfico evaluado en esta investigación, tiene una elevada sensibilidad y especificidad, por lo que permite distinguir a individuos enfermos

con una alta confiabilidad, es fácil de realizar y requiere poco tiempo de ejecución.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail								
Maldonado, Antonio	ROL	CA	<input type="checkbox"/>	AS	<input checked="" type="checkbox"/>	TU	<input type="checkbox"/>	JU	<input type="checkbox"/>
	CVLAC								
	e-mail	mcheo@yahoo.com							
Sulbarán, María Zulay	ROL	CA	<input type="checkbox"/>	AS	<input type="checkbox"/>	TU	<input type="checkbox"/>	JU	<input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC								
	e-mail								
Rojas, Yacqueline	ROL	CA	<input type="checkbox"/>	AS	<input type="checkbox"/>	TU	<input type="checkbox"/>	JU	<input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC								
	e-mail								

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2012	06	21
------	----	----

Lenguaje: spa

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS-HURTADO.DOC	Application/Word

Alcance:

Espacial:            **NACIONAL**            (Opcional)

Temporal:           **TEMPORAL**            (Opcional)

**Título o Grado asociado con el trabajo:**

**LICENCIADA EN BIOANÁLISIS**

**Nivel Asociado con el Trabajo:**

**LICENCIADA**

**Área de Estudio:**

**BIOANÁLISIS**

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:**

**UNIVERSIDAD DE ORIENTE**

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

**JUAN A. BOLANOS CUMPEL**  
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfa: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

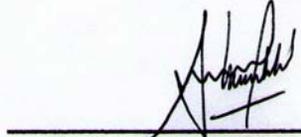
## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009):** “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



---

**Mariángeles A. Hurtado M.**  
Autor



---

**Prof. Antonio Maldonado**  
Asesor