

## Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM y NS1 Combo en Casete (Sangre entera/Suero/Plasma) Ficha Tecnica

Una prueba rapida para la deteccion cualitativa de antigeno NS1, los anticuerpos IgG e IgM del virus del dengue en humanos de Sangre entera, suero o plasma.

Para uso profesional de diagnostico *in vitro*.

[USO]

La Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM y NS1 Combo en Casete (Sangre entera/Suero/Plasma) es un inmunoensayo cromatografico rapido para la deteccion cualitativa del antigeno NS1 y los anticuerpos IgG e IgM del virus del dengue en Sangre entera humana, suero o plasma como una ayuda en el diagnostico de infecciones de dengue.

[RESUMEN]

El dengue es un flavivirus, transmitida por el Aedes aegypti y Aedes albopictus mosquitos. Se encuentra ampliamente distribuida en todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo,<sup>1</sup> y causa hasta 100 millones de infecciones de dengue clasico ano.<sup>2</sup> La infeccion se caracteriza por un inicio repentino de fiebre, cefalea intensa, mialgias, artralgias y exantema.

La infeccion primaria del dengue provoca anticuerpos IgM para aumentar a un nivel detectable en 3 a 5 dias despues del inicio de la fiebre. Los anticuerpos IgM generalmente persisten durante 30 a 90 dias.<sup>3</sup> La mayoria de los pacientes de dengue en las regiones endemicas tienen infecciones secundarias,<sup>4</sup> resulta en altos niveles de anticuerpos IgG especificos antes o simultaneamente con IgM response.<sup>5</sup> Por lo tanto, la deteccion de anticuerpos anti-Dengue IgM especifica y anticuerpos IgG tambien pueden ayudar a distinguir entre las infecciones primarias y secundarias.

NS1 es una de las 7 proteinas no estructurales del virus del dengue que se cree que participan en la replicacion viral. NS1 existe como un monomero en su forma inmadura, pero se procesa rapidamente en el reticulo endoplasmico para formar un dimer estable. Una pequena cantidad de NS1 permanece asociada a organulos intracelulares donde se cree que esta involucrado en la replicacion viral. El resto de NS1 se encuentra ya sea asociada con la membrana plasmatica o secretada como hexadimer soluble. NS1 es esencial para la viabilidad viral pero su funcion biologica precisa es desconocida. Los anticuerpos producidos en respuesta a NS1 en la infeccion viral puede cruzar reaccionan con antigenos de superficie celular sobre las celulas epiteliales y las plaquetas y esto ha sido implicados en el desarrollo de fiebre hemorragica del dengue.

La Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM y NS1 Combo en Casete es una prueba rapida que utiliza una combination de antigeno NS1, anticuerpos IgG e IgM del virus del dengue en Sangre entera, suero o plasma de humano.

[PRINCIPIO]

La Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM en Casete (Sangre entera/Suero/Plasma) es un inmunoensayo cualitativo basado en membrana para la deteccion de anticuerpos de dengue en Sangre entera, suero o plasma. Esta prueba consiste en dos componentes, un componente de IgG y un componente de IgM. En el componente de IgG, el IgG anti-humano esta revestido en zona de la prueba de IgG. Durante la prueba, la muestra reacciona con las particulas antigeno de dengue recubiertas en el area de prueba. La mezcla luego migra hacia arriba en la membrana cromatograficamente por accion capilar y reacciona con el anti-IgG humana en la region de linea de prueba IgG. Si la muestra contiene anticuerpos IgG contra el dengue, una linea de color aparecera en la zona de la prueba de IgG. En el componente de IgM, anti-IgM humana esta recubierto de zona de la prueba de IgM. Durante la prueba, la muestra reacciona con IgM anti-humano, anticuerpos del dengue IgM, si esta presente en la muestra, reacciona con la IgM anti-humano y las particulas recubiertas de antigeno de dengue en el casete de prueba, y este complejo es capturado por la IgM anti-humano, formando una linea de color en la zona de la prueba de IgM.

Por lo tanto, si la muestra contiene anticuerpos IgG y/o IgM dengue, una linea de color aparecera en la zona de la prueba de IgG y/o IgM. Si la muestra no contiene anticuerpos del dengue, hay una linea de color aparecera en cualquiera de las regiones de linea de verification, lo que indica un resultado negativo. Para servir como control del procedimiento, una linea coloreada aparecera siempre en la zona de control, lo que indica que el volumen apropiado de muestra se ha arriado, y ha producido reaction de la membrana.

La Prueba Rapida de Dengue NS1 en Casete (Sangre entera/Suero/Plasma) es un inmunoensayo basado en membrana cualitativo para la deteccion del antigeno de Dengue NS1 en Sangre entera, suero o plasma. Durante la prueba, la muestra reacciona con Dengue-anticuerpo conjugado en el casete de prueba. El anticuerpo conjugado de oro se unira al antigeno de dengue en la muestra de

prueba que a su vez se unira con Anti-Dengue NS1 recubierto por la membrana. A medida que los reactivos se mueven a traves de la membrana, el anticuerpo Dengue NS1 en la membrana se unira el complejo antigeno-anticuerpo causando linea de color para formar en la zona de la prueba de la membrana de prueba. La intensidad de las lineas variara dependiendo de la cantidad de antigeno presente en la muestra. La aparicion de la linea de color en la region de la prueba debe considerarse como resultado positivo.

[REACTIVOS]

La Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM en Casete antigeno del dengue conjugado con particulas coloidales de oro, anti-humano IgM, IgG anti-humano cubierto en la membrana.

La Prueba Rapida de Dengue NS1 en Casete contiene particulas coloidales anti-dengue conjugado, anti-dengue cubierto en la membrana.

[PRECAUCIONES]

- Solo para uso profesional en diagnostico *in vitro*. No usar despues de la fecha de vencimiento.
- No ingerir alimentos, bebidas ni fume en el area donde se manipulan las muestras o kits.
- Manipule las muestras como si contienen agentes infecciosos. Mantenga precauciones contra amenazas microbiologicas durante todos los procesos y siga los procedimientos normativos para desechar las muestras adecuadamente. Use prendas de protection como batas de laboratorio, guantes desechables y lentes para el ensayo con muestras.
- Use vestimenta de protection con batas de laboratorio, guantes desechables e lentes.
- La humedad y la temperatura pueden afectar los resultados negativamente.

[ALMACENAMIENTO]

Almacene el producto en su empaque sellado a temperatura ambiente o refrigerado (entre 2 y 30°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en el empaque. La prueba debera permanecer en el empaque sellado hasta que sea usada. NO CONGELAR. No usar despues de la fecha de expiration.

(RECOLECCION DE LA MUESTRA Y PREPARACION)

- La Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM y NS1 Combo en Casete puede usar sangre pura (por venopuncion o punition en el dedo), suero o plasma.
- Para recolectar muestras de Sangre Pura por Puncion en el Dedo:
  - Lave la mano del paciente con jabon y agua tibia o limpiela con algodón y alcohol. Deje secar.
  - Masajee la mano sin tocar el lugar de la puncion, frotando hacia la punta del dedo medio o anular.
  - Pinche la piel con una lanceta esteril. Limpie la primera aparicion de sangre.
  - Frote la mano gentilmente desde la murieca hacia la palma y luego el dedo para formar una gota redonda de sangre sobre el lugar de la puncion.
- Anadir la muestra de Sangre entera por puncion capilar a la casete de prueba mediante el uso de un gotero 5 pL o medir micropipeta 10 pL para prueba de IgG/IgM y un gotero 25 pL o 75 pL micropipeta medicion para la prueba NS1. Los goteros 5 pL o 25 pL proporcionados con la prueba de dispensa de aproximadamente 10 pL o 25 pL o en una gota de sangre mas aun si se aspira en el gotero.
- Separe el suero o el plasma de la sangre en la brevedad posible para evitar hemolisis. Utilice solo muestras no hemolizadas.
- La prueba debe completarse inmediatamente despues de hacer recolectado las muestras. No deje muestras a temperatura ambiente por periodos prolongados. Las muestras de suero o plasma pueden ser almacenadas a temperaturas entre 2°C y 8°C hasta por 3 dias. Para almacenamiento a largo plazo, las muestras deben mantenerse a temperaturas por debajo de los -20°C. La sangre pura recolectada por venopuncion debe ser almacenada a temperaturas entre 2-8°C si la prueba se completara en los proximos 2 dias. No congele muestras de sangre pura. La sangre pura recolectada por puncion del dedo deber ser puesta a prueba inmediatamente.
- Lleve las muestras a temperatura ambiente antes de hacer la prueba. Las muestras congeladas deben estar completamente descongeladas y bien mezcladas antes de hacer la prueba. Las muestras no deben ser congeladas y descongeladas repetidas veces.
- Si las muestras han de ser transportadas, deben ser empacadas siguiendo las regulaciones que cubren el transporte de agentes etiologicos.
- EDTA K2, heparina de sodio, citrato de sodio y oxalato de potasio se pueden usar como anticoagulantes para la recoleccion de la muestra.

[MATERIALES ]

	Materiales Incluidos
• Dispositivos De Prueba	• Gotero
• Buffer	• Ficha Tecnica
	Materiales Requeridos No Incluidos

- Contenedores De Recoleccion De Muestra
- Temporizador
- Lancetas (para puncion de dedo)
- Maquina Centrifuga

[INSTRUCCIONES DE USO]

Permita que la prueba, la muestra y el regulador lleguen a temperatura ambiente (15-30°C) antes de comenzar el proceso.

1. Lleve el empaque a temperatura ambiente antes de abrirlo. Remueva el dispositivo del empaque sellado y uselo dentro de la proxima hora.

2. Coloque el dispositivo en un area limpia y estable.

> Para muestras de Suero o Plasma:

Para IgG/IgM:

- Para utilizar un gotero: Sostenga el gotero verticalmente, llene con muestra hasta la linea de llenado (aproximadamente 5 pL), y transfiera la muestra al area del espécimen (S) del casete de prueba, a continuation, arriar 3 gota de buffer (aproximadamente 120 pL) al area del buffer (B) e iniciar el temporizador. Evitar que queden atrapadas burbujas de aire en el pocillo de muestra.

- Para utilizar una micropipeta: Llene la pipeta y dispense 5 pL de suero o plasma al area de espécimen (S) del casete de prueba, a continuation, arriar 3 gota de buffer (aproximadamente 120 pL) al Area del buffer (B) e iniciar el temporizador.

Para NS1:

- Coloque el gotero en position vertical, arriar 3 gotas de suero o plasma (aproximadamente 75 pL) al area de espécimen (S), e iniciar el temporizador. Consulte la imagen siguiente.

> Para recolectar muestras de Sangre Puncion de dedo/Venopuncion:

Para IgG/IgM:

- Para utilizar un gotero: Sostenga el gotero verticalmente, saca el espécimen hasta aproximadamente 1cm por encima de la linea de llenado, y transfiera 1 gota de Sangre entera (aproximadamente 10 pL) al area del espécimen (S) del casete de prueba, a continuation, arriar 3 gota de buffer (aproximadamente 120 pL) al area del buffer (B) e iniciar el temporizador. Evitar que queden atrapadas burbujas de aire en el pocillo de muestra. Consulte la imagen siguiente.

- Para utilizar una micropipeta: Llene la pipeta y dispense 10 pL de Sangre entera al area de espécimen (S) del casete de prueba, a continuation, arriar 3 gota de buffer (aproximadamente 120 pL) al area del buffer (B) e iniciar el temporizador. Consulte la imagen siguiente.

Para NS1:

- Para usar un gotero: Sostenga el gotero en position vertical, arriar 3 gotas de Sangre entera (aproximadamente 75 pL) area del espécimen (S), a continuation, arriar 1 gota de buffer (aproximadamente 40 pL) e iniciar el temporizador. Consulte la imagen siguiente.

- Para utilizar un tubo capilar: Llenar el tubo capilar y transfiera aproximadamente 75 pL de muestra de sangre por puncion capilar al area del espécimen (S) del casete de prueba, a continuacion, arriar 1 gota de buffer (aproximadamente 40 pL) e iniciar el temporizador. Consulte la imagen siguiente.

3. Lea los resultados a los 10 minutos, no interprete los resultados despues de 20 minutos.

Nota: Se sugiere no usar el tampon mds alia de 6 meses despues de abrir el frasco.

[INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS]

(Use la imagen como referencia)

NS1 POSITIVO: \* Dos lineas de color aparecen. Una linea de color debe estar en la region de control (C) y otra linea de color debe estar en la region de prueba (NS1).

IgG y IgM POSITIVO: \*Tres lineas aparecen. Una linea roja debe estar en la region de control (C), y dos lineas de color debe aparecer en zona de la prueba de IgG e IgM zona de la prueba. Las intensidades de color de las lineas no tienen que coincidir. El resultado es positivo para anticuerpos IgG y IgM y es indicativo de infeccion secundaria de dengue.

IgG POSITIVO: \*Aparecen dos lineas. Una linea roja debe estar en la region de

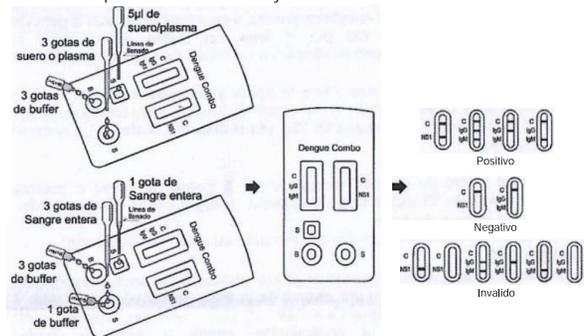
control (C), y una línea de color aparece en la zona de la prueba de IgG. El resultado es positivo para el virus Dengue-IgG específica y es probablemente indicativo de infección secundaria Dengue.

**IgM POSITIVO:** Parecen dos líneas. Una línea roja debe estar en la región de control (C), y una línea de color aparece en la zona de la prueba de IgM. El resultado es positivo para los anticuerpos IgM específicos del virus del dengue y es indicativo de infección primaria del dengue.

\*NOTA: La intensidad del color en la región de línea de prueba (NS1 y / o IgG y / o IgM) variara dependiendo de la concentración de antígeno de Dengue NS1 y / o IgG y / o IgG presente en la muestra. Por lo tanto, cualquier tono de color rojo en la región de la prueba debe ser considerado positivo.

**NEGATIVO:** Una línea de color aparece en la región de control (C). No aparece ninguna línea en la región de prueba (IgG/IgM/NSI).

**INVALIDO:** Si la línea del área de control (C) no aparece. Las razones más comunes para el resultado inválido son tamaño de la muestra insuficiente o técnicas de procedimiento equivocadas. Revise el procedimiento e intente nuevamente la prueba con un Nuevo dispositivo. Si el problema persiste, deje de usar el kit de prueba inmediatamente y contacte a su distribuidor local.



**[CONTROL DE CALIDAD]**

En la prueba se incluye un control de procedimiento. Una línea de color que aparece en la región de control (C) es el control de procedimiento ítemo. Confirma un volumen de muestra suficiente y una técnica de procedimiento correcta. Los estándares de control no se suministran con este kit; sin embargo, se recomienda probar un control positivo y un control negativo como buena práctica de laboratorio para confirmar el procedimiento de prueba y verificar el rendimiento adecuado de la prueba.

KL im itaciones]

- La Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM y NS1 Combo en Casete (Sangre entera/Suero/Plasma) solo indicara la presencia del antígeno NS1 del dengue y anticuerpos de dengue en la muestra y no debe ser utilizado como el unico criterio para el diagnostico de dengue.
- EL INSTRUCCIONES DE USO y el INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS deben ser seguidos de cerca cuando se prueba la presencia del dengue anticuerpo/antígeno en sangre entera, suero o plasma de sujetos individuales. Si no sigue el procedimiento puede dar resultados inexactos.
- Un resultado negativo de la prueba de Dengue NS1 no excluye la posibilidad de exposición a la infección crónica por el virus del dengue.
- Un resultado negativo para el Dengue NS1 puede ocurrir si la cantidad de dengue antígeno presente en la muestra esta por debajo de los limites de detección del ensayo, o el dengue antígeno que se detectan no estan presentes durante la etapa de la enfermedad en la que se recoge una muestra.
- Algunas muestras que contienen una concentración inusualmente alta de anticuerpos heterofílicos o el factor reumatoide pueden afectar los resultados esperados.
- Si el sintoma persiste, mientras que el resultado del Dengue NS1 prueba rapida es negativo o un resultado no reactivo, se recomienda volver a muestrearlos pacientes unos días de retraso o la prueba con un dispositivo de prueba alternative tal como PCR, ELISA.
- Los resultados obtenidos con esta prueba solo deben interpretarse en conjunción con otros procedimientos de diagnostico y hallazgos clinicos.
- En la etapa temprana de la fiebre, las concentraciones de anti-Dengue IgM

pueden estar por debajo de los niveles detectables. Para la infección primaria, un anticuerpo de captura de ensayo de sorbente inmune ligado a enzimas IgM (MACELISA) mostro que 80% de los pacientes con dengue ensayados exhibio niveles detectables de anticuerpos IgM por el quinto día despues de la infección, y 99% de los pacientes a prueba IgM positivo por día 10. Se recomienda que los pacientes se hagan la prueba dentro de este tiempo. Para la infección secundaria, una fracción molar baja de anti-Dengue IgM y una fracción molar alta de IgG que es ampliamente reactivos a flavivirus caracterizan los anticuerpos. <sup>5</sup> la serial de IgM puede ser I eve y puede aparecer la reaccion cruzada en la región de la línea de IgG.

- La reactividad serologica cruzada en todo el grupo de flavivirus (dengue 1, 2, 3 y 4, encefalitis de San Luis, el virus del Nilo Occidental, la encefalitis japonesa y el virus de la fiebre amarilla) es comun.<sup>6,7,8</sup> Los resultados positivos deben ser confirmados por otros medios.
- La continua presencia o ausencia de anticuerpos no pueden ser utilizados para determ inar el exito o el fracaso de la terapia.
- Resultados de pacientes inmunodeprimidos deben ser interpretados con precaution
- Como con todas las pruebas de diagnostico, todos los resultados deben interpretarse junto con otra information clinica disponible al medico.
- Si el resultado de la prueba es negativo y los sintomas clinicos persisten, se recomienda realizar pruebas adicionales utilizando otros metodos clinicos. Un resultado negativo no excluye en ningun momento la posibilidad de infección por dengue.
- El hematocrito de la sangre entera debe estar entre 25% y 65%.

**[CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO]**

**Sensibilidad y Especificidad**

La Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM y NS1 Combo en Casete (Sangre entera/Suero/Plasma) ha aprobado por un panel de seroconversion comparandolo con una prueba lider comercial dengue Ag ELISA usando muestras clinicas para Dengue NS1 y ha sido evaluado con muestras obtenidas de una poblacion de individuos sintomaticos y asintomaticos. Los resultados se confirmaron mediante un ensayo de la marca comercial lider ELISA de Dengue para IgG y IgM. Los resultados muestran que la sensibilidad relativa de la Prueba Rapida de Dengue NS1 en Casete (Sangre entera/Suero/Plasma) es del 95,8%, y la especificidad relativa es del 96,1%. La sensibilidad relativa global de la infección primaria y secundaria de la prueba rapida de la Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM en Casete (Sangre entera/Suero/Plasma) es del 94,3%, y la especificidad relativa es 99,1%, y la precision relativa es del 98,3%.

**Dengue IgG/IgM**

**Infección Primaria, los resultados de la**

Método	ELISA			
	Resultados	Positivo		Negativo
		IgM	IgG	
Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM en Casete (Sangre entera/Suero/Plasma)	Positivo	IgM	20	0
		IgG	4	0
	Negativo	0	0	0
Sensibilidad Relativa		83,3%		/

**Infección Secundaria, resultados de la**

Metodo	ELISA			
	Resultados	Positivo		Negativo
		IgM	IgG	
Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM en Casete (Sangre entera/Suero/Plasma)	Positivo	IgM	46	1
		IgG	18	63
	Negativo	0	0	0
Sensibilidad Relativa		71,9%		98,4%

Método	ELISA			
	Resultados	Positivo		Negativo
		IgM	IgG	
Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM en Casete (Sangre entera/Suero/Plasma)	Positivo	IgM	0	0
		IgG	0	0
	Negativo	0	0	429
Especificidad Relativa		/		99,1%

Sensibilidad Relativa: (20+63)/ (24+64) =94.3% (95%CI\*: 87.2%-98.1%);

Especificidad Relativa: 429/433=99.1% (95%CI\*: 97.7%-99.7%);

Precision: (20+63+429)/ (24+64+433) =98.3% (95%CI\*: 96.7%-99.2%).

\* Intervalo de confianza

**Dengue NS1**

Metodo	ELISA			Resultados
	Resultados	Positivo	Megativo	
Dispositivo de Prueba Rapida para Dengue NS1	Positivo	137	8	145
	Negativo	6	200	206
Resultados Total		143	208	351

Sensibilidad relativa: 137/143\*100%=95.8% (95%CI\*: 91.1%-98.4%);

Especificidad relativa: 200/208\*100%=96.1% (95%CI\*: 92.6%-98.4%);

Precision:(137+200)/(137+6+8+200)\*100%=96.0%(95%CI\*:93.4%-97.8%)

\* Intervalos de confianza

Precisidn

Intra-Ensayo

Precision dentro de una se ha determinado mediante el uso de 15 repeticiones especimenes de Dengue. Las muestras se identificaron correctamente> 99% de las veces.

Inter-Ensayo

Precision entre distintas series ha sido determinado por 15 ensayos independientes en los mismos especimenes de Dengue. Tres lotes diferentes de la Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM y NS1 Combo en Casete se han probado el uso de estos especimenes. Las muestras se identificaron correctamente> 99% de las veces.

**Reacciones Cruzadas**

La Prueba Rapida de Dengue IgG/IgM y NS1 Combo en Casete ha sido probado por HAMA, RF, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, anti-Syphilis, anti-HIV, HCV, anti-H. Pylori, anti-MONO, anti-CMV, anti-Rubella y anti-TOXO positivo especimenes. Los resultados no mostraron reactividad cruzada.

**Substancias que Interfieren**

Las siguientes sustancias potencialmente interferentes se anadieron a muestras negativas y positivas de Dencue.

Acetaminofen: 20 mg/dL .....Acido Acetilsalisilico: 20 mg/dL.

Acido Ascorbico: 2 g/dL Bilirubina: 1 g /dL

Creating: 200 mg/dL Cafeina: 20 mg/dL

Acido Gentisico: 20 mg/dL Hemoglobina 1000 mg/dL

Albumina: 2 g/dL Acido Oxalico: 60 mg/dL

Ningun de las sustancias con las cantidades mencionadas interfirieron con la prueba.

**[BIBLIOGRAFIA]**

- Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. Rev. Infect Dis. 1984; 6:251-264.
- Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
- Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Japanese J. Trop. Med. Hygiene* 1994; 22: 9-12.
- Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. *Rev. Med. Micro.* 1995; 6:39-48.
- Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
- Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jul; 10(4): 725-8.
- Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr (in German).* 1997; 147(19-20): 463-4.
- Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus *Microbiol Immunol.* 1994; 38(12): 951-5.