

# Prueba rápida en cartucho para DENGUE NS1 /DENGUE IgG-IgM

(Sangre/suero/plasma)

Prueba rápida para la detección cualitativa del antígeno NS1 y anticuerpos IgG e IgM en muestras de sangre, suero o plasma humano. Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.

## Uso deseado

La prueba rápida de dengue (sangre/suero/plasma humano) es un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa del antígeno NS1 y anticuerpos IgG e IgM del virus de dengue en sangre, suero o plasma humano para ayudar en el diagnóstico de infecciones por dengue.

## Resumen

El dengue es un flavivirus, transmitido por el mosquito *Aedes Aegypti* y *Aedes Albopictus*. Se distribuye ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (1) y causa hasta 100 millones de infecciones anualmente (2, 5). La infección por dengue se caracteriza por un inicio repentino de fiebre, dolor de cabeza intenso, mialgia, artralgia y sarpullido. La infección primaria por dengue hace que los anticuerpos IgM aumenten a un nivel detectable en 3 a 5 días después del inicio de la fiebre. Los anticuerpos IgM generalmente persisten durante 30 a 90 días. La mayoría de los pacientes con dengue en regiones endémicas tienen infecciones secundarias, lo que resulta en altos niveles de anticuerpos IgG antes o simultáneamente con la respuesta de IgM (3). Por lo tanto, la detección de anticuerpos IgM e IgG anti-dengue también puede ayudar a distinguir entre infecciones primarias y secundarias (4).

La proteína NS1 es una de las 7 proteínas no estructurales del virus del dengue que se cree que están involucradas en la replicación viral, se presenta como monómero en su forma inmadura, pero se procesa rápidamente en el retículo endoplasmático para formar un dímero estable. Una pequeña cantidad de NS1 permanece asociada con organelos intracelulares donde se piensa que está implicado en la replicación viral (6). El resto de NS1 se encuentra asociado con la membrana plasmática o secretado como un hexámero soluble. El NS1 es esencial para la viabilidad viral, pero su función biológica precisa es desconocida. Los anticuerpos elevados en respuesta a NS1 durante la infección viral pueden reaccionar de forma cruzada con antígenos de superficie celular en células epiteliales y plaquetas y desarrollando la fiebre hemorrágica del dengue (7,8).

## Principio

La prueba rápida de dengue (sangre/suero/plasma humano) es un inmunoensayo de flujo lateral cualitativo para la detección de anticuerpos IgM e IgG así como de antígeno NS1 del dengue en muestras de sangre, suero o plasma. Esta prueba consta de dos componentes, una tira para la detección de anticuerpos y otra tira para la detección del antígeno NS1. La tira para detección de anticuerpos tiene un componente IgG y un componente IgM. En el componente IgG, se recubre con un anticuerpo de tipo IgG anti-humano en la región de la línea de prueba de IgG. Durante la prueba, la muestra reacciona con partículas revestidas con antígeno de dengue en el cartucho de prueba. La mezcla migra por acción capilar hacia arriba y reacciona con el IgG anti-humano en la región de la línea de prueba de IgG. Si la muestra contiene anticuerpos IgG contra el dengue, aparecerá una línea de color en la región de la línea de prueba de IgG. En el componente IgM, se recubre con un anticuerpo IgM anti-humano en la región de la línea de prueba IgM. Durante la prueba, la muestra reacciona con el anti-IgM humano. Los anticuerpos IgM anti-dengue, si están presentes en la muestra, reaccionan con el anti-IgM humano y las partículas recubiertas de antígeno de dengue en el cartucho de prueba. Este complejo es capturado por el IgM anti-humano, formando una línea coloreada en la región de la línea de prueba IgM. Por lo tanto, si la muestra contiene anticuerpos IgG de dengue, se aparecen en la región de la línea de prueba de IgG. Si la muestra contiene anticuerpos IgM de dengue, aparecerá una línea de color en la región de la línea de prueba IgM. Si la muestra no contiene anticuerpos contra el dengue, no aparecerá ninguna línea coloreada en alguna de las regiones de la línea de prueba, lo que indica un resultado negativo. Para servir como control del procedimiento, siempre aparecerá una línea coloreada en la región de la línea de control, indicando que se ha añadido el volumen apropiado de espécimen y se ha producido la absorción de la membrana.

En la tira para la detección del antígeno NS1 en sangre, suero o plasma humano, la muestra reacciona con anticuerpos conjugados anti-dengue en el cartucho de prueba. El conjugado de anticuerpos de oro se unirá al antígeno de dengue en la muestra, que a su vez se unirá con el anti-dengue NS1 impreso en la membrana. A medida que el reactivo se mueve a través de la membrana, el anticuerpo anti-Dengue NS1 en la membrana se unirá al complejo anticuerpo-antígeno causando que se forme la línea rosa pálida u oscura en la región de la línea de prueba de la membrana (NS1). La intensidad de la línea variará dependiendo de la cantidad de antígeno.

## Reactivos

La prueba rápida de dengue IgG/IgM contiene partículas coloidales de oro conjugadas de antígeno de dengue, IgM anti-humano e IgG anti-humano recubierta sobre la membrana. La prueba rápida de dengue NS1 contiene partículas coloidales de oro conjugadas anti-dengue y anti-dengue recubierta en la membrana.

## Precauciones

- Lea toda la información contenida en este prospecto antes de realizar la prueba.
- Para el diagnóstico *in vitro* no utilizar productos después de la fecha de caducidad.
  - No fumar, beber o comer en áreas donde se manipulen las muestras o las pruebas.
  - Manejar todas las muestras como si tuvieran agentes infecciosos.
  - Tomar en cuenta las precauciones establecidas contra de posibles riesgos microbiológicos en todos los procedimientos y siga la norma de procedimientos para la eliminación adecuada de muestras.
  - La humedad y la temperatura puede afectar negativamente a los resultados.
  - La prueba utilizada debe desecharse de acuerdo con las normativas locales.
  - No intercambiar el buffer o los cartuchos de kits de diferentes lotes.

## Almacenamiento y estabilidad

- Almacenar la prueba en la bolsa sellada, a temperatura ambiente o refrigerado (2-30 °C). La prueba es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa sellada. La prueba debe permanecer en la bolsa sellada hasta su uso.
- No congelar.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.

## Recolección de muestras y almacenamiento

El cartucho de prueba rápida de Dengue puede utilizarse con sangre (venopunción o capilar), suero o plasma.

### Para recolectar muestras de sangre por punción capilar:

1. Lave la mano del paciente con agua tibia y jabón. Permita que se seque.
2. Masaje la mano sin tocar el sitio de la punción frotando la mano hacia la yema del dedo anular o medio.
3. Perfore la piel con una lanceta estéril. Limpie la primera señal de sangre.
4. Frote suavemente la mano desde la palma hasta la yema de los dedos para formar una gota de sangre sobre el sitio de punción.
5. Añadir la muestra de sangre

### a. Mediante el uso de un gotero:

-Presionar el bulbo del gotero y coloque el extremo inferior sobre la gota de muestra, soltar el bulbo para recolectar la muestra. Evitar burbujas de aire.

-A continuación, presionar el bulbo para dispensar la sangre en la zona de muestra del cartucho de prueba.

### b. Mediante goteo de dedo:

-Colocar las gotas de sangre en la zona de muestra de cada uno de los cartuchos de prueba.

### Para recolectar muestras de sangre por Venopunción:

1. Tomar la muestra en base a los criterios establecidos.
2. Separar el suero o plasma de la sangre tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis. Sólo muestras claras, no hemolizadas se pueden utilizar.
3. Las pruebas deben realizarse inmediatamente después de recolectar la muestra.
4. No deje las muestras a temperatura ambiente durante períodos prolongados.

## Almacenamiento de la muestra

- La prueba debe llevarse a cabo inmediatamente después de que las muestras han sido recolectadas.
- No dejar las muestras a temperatura ambiente durante períodos prolongados. Muestras de suero y plasma pueden almacenarse a 2-8°C hasta por 3 días.
- Para el almacenamiento a largo plazo, las muestras deben mantenerse por debajo de los -20°C. Toda la sangre obtenida por punción venosa deberá almacenarse a 2-8°C si la prueba se realiza en un plazo de 2 días a partir de la recolección.
- No congelar muestras de sangre. Separar el suero o el plasma de la sangre tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis. Utilice sólo muestras claras no hemolizadas.
- Muestras congeladas deben estar completamente descongeladas y bien mezcladas antes de la prueba.
- Las muestras no deben congelarse y descongelarse repetidamente.

## Materiales

### Materiales suministrados

- Cartucho de prueba para detectar anticuerpos IgG e IgM
- Cartucho de prueba para detectar el antígeno NS1
- Gotero
- Buffer
- Manual de instrucciones

### Materiales requeridos, pero no suministrados

- Lanceta (punción capilar)
- Almohadilla con alcohol
- Temporizador

### Materiales opcionales

- Centrífuga
- Tubo Vacutainer para toma de muestra por venopunción

## Instrucciones de uso

Permita que el cartucho de prueba, muestra, buffer y/o controles alcancen la temperatura ambiente (15-30°C) antes de su uso.

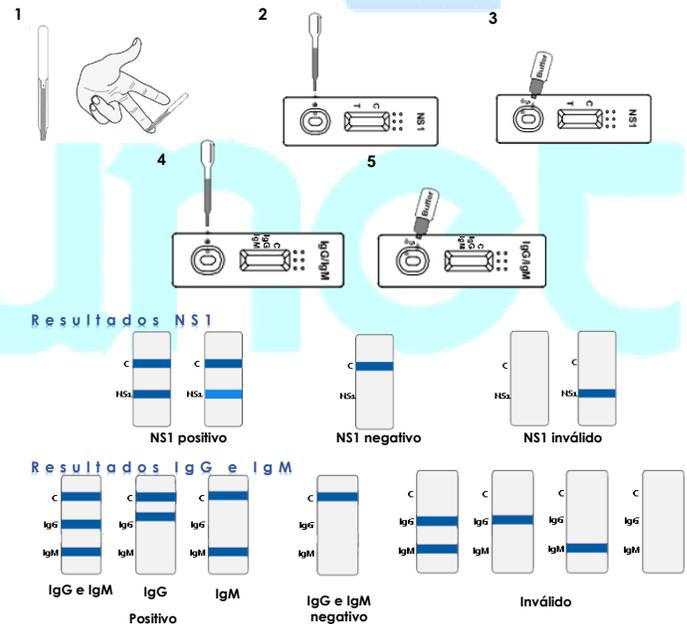
1. Recolecte la muestra (sangre/suero/plasma) con el gotero

### Para NS1

2. Coloque 2 gotas de muestra (20 µL) (sangre/suero/plasma) en el cartucho de prueba.
3. Agregue 1 gota de buffer

### Para IgG/IgM

4. Coloque 2 gotas de muestra (20 µL) (sangre/suero/plasma) en el cartucho de prueba
5. Agregue 1 gota de buffer
6. Interprete los resultados a los 10 minutos



## Interpretación de los resultados

(Refiera por favor al ejemplo de arriba)

**NS1 POSITIVO:** Aparecen dos líneas. Una línea de color debe estar en la región de la línea de control (C) y otra línea de color aparente debe estar en la región de la línea de prueba (NS1).

**IgG e IgM POSITIVO:** Aparecen tres líneas. Una línea de color debe estar en la región de la línea de control (C) y otras dos líneas de color deben estar en la región de la línea de prueba de IgG e IgM. La intensidad del color de las líneas no tiene que coincidir. El resultado es positivo para los anticuerpos IgG e IgM indicados en la etapa final de la infección primaria del dengue y la etapa temprana de la infección secundaria del dengue.

**IgG POSITIVO:** \* Aparecen dos líneas. Una línea de color debe estar en la región de la línea de control (C) y otra línea de color aparente debe estar en la región de la línea de prueba (IgG). El resultado es positivo para el virus específico de dengue IgG y es probablemente indicativo de infección secundaria por dengue.

**IgM POSITIVO:** \* Aparecen dos líneas. Una línea de color debe estar en la región de la línea de control (C) y otra línea de color aparente debe estar en la región de la línea de prueba (IgM). El resultado es positivo para los anticuerpos IgM específicos para el virus del dengue y es indicativo de infección por dengue.

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

**NEGATIVO:** Aparece una línea de color en la región de la línea de control (C). No aparece ninguna línea en la región de la línea de prueba (NS1 y/o IgG y/o IgM).

**INVALIDO:** La línea de control no aparece. El volumen de la muestra es insuficiente o las técnicas de procedimiento incorrecto son las razones más probables de la falla. Revise el procedimiento y repita la prueba con un nuevo cartucho. Si el problema persiste, deje de usar el cartucho de prueba inmediatamente y póngase en contacto con su distribuidor local.

## Control de calidad

Un control de procedimiento interno se incluye en la prueba. Una línea de color que aparece en la región de línea de control (C) es un control interno de procedimiento válido, que confirma que el volumen de la muestra fue suficiente y las técnicas del procedimiento de realización fueron correctas. No se suministran controles con esta prueba; se recomienda que los controles positivos y negativos se prueben como una buena práctica de laboratorio para confirmar el procedimiento de prueba y para verificar el rendimiento adecuado de la prueba.

## Limitaciones

- La prueba rápida de dengue (sangre/suero/plasma humano) sólo indican la presencia de antígeno Dengue NS1 y anticuerpos contra el dengue en la muestra y no deben utilizarse como único criterio para el diagnóstico de Dengue.
- Un resultado de prueba negativo para Dengue NS1 no excluye la posibilidad de exposición o infección por virus de dengue.
- Un resultado negativo para el Dengue NS1 puede ocurrir si la cantidad de antígeno de dengue presente en la muestra está por debajo de los límites de detección del ensayo o si el antígeno detectado no está presente durante la etapa de la enfermedad en la que se recolecta la muestra.
- Algunas muestras que contienen títulos inusualmente altos de anticuerpos heterófilos o el factor reumatoide puede afectar los resultados esperados en la prueba de antígeno NS1.
- Si el síntoma persiste, mientras que el resultado de la prueba rápida del dengue NS1 es negativo o no reactivo, se recomienda volver a muestrear al paciente unos días después o probarlo con un dispositivo de prueba alternativo como PCR, ELISA.
- Se recomienda que el hematocrito de las muestras se encuentre entre 25 a 65%.
- Los resultados obtenidos con esta prueba sólo deben interpretarse conjuntamente con otros procedimientos diagnósticos y hallazgos clínicos.
- En el inicio temprano de la fiebre, las concentraciones de IgM anti-dengue pueden estar por debajo de los niveles detectables. En la infección primaria, la determinación de anticuerpos IgM por ELISA (MAC-ELISA) demostró que el 80% de los pacientes muestreados, presentaron niveles detectables de IgM a los 5 días después de la infección. Después de la infección, el 99% de los pacientes evaluados, presentaron IgM positivos al día 10. Es recomendable que los pacientes sean evaluados dentro de este período. Para la infección secundaria, una fracción molar baja de IgM anti-Dengue y una fracción molar alta de IgG que es ampliamente reactiva a los flavivirus se presenta. La señal de IgM puede ser débil y la reacción cruzada en la región de la línea de IgG puede aparecer.
- La reactividad cruzada serológica en el grupo de flavivirus (Dengue 1, 2, 3 y 4 encefalitis de San Luis, virus del Nilo Occidental, encefalitis japonesa y el virus de fiebre amarilla) es común. Los resultados positivos deben ser confirmados por otros medios.
- La presencia o ausencia continua de anticuerpos no determina el éxito o el fracaso de la terapia.
- Los resultados de pacientes inmunosuprimidos deben ser interpretados con precaución.
- Como con todas las pruebas de diagnóstico, todos los resultados deben ser interpretados junto con otra información clínica disponible para el médico.
- Si el resultado de la prueba de anticuerpos es negativo y los síntomas persisten, se recomienda el uso de otros métodos clínicos. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección por Dengue.

## Valores esperados

La prueba rápida NS1 de Dengue (sangre/suero/ plasma humano) ha sido comparado con una prueba comercial líder en Dengue Ag EIA. La correlación entre estos dos sistemas es del 96.0%. La infección primaria por dengue se caracteriza por la presencia de anticuerpos IgM detectables a los 3-5 días después de la aparición de la infección. La infección secundaria por dengue es caracterizada por la elevación de IgG específica al dengue, en la mayoría de los casos, esto se acompaña de niveles elevados de IgM. La prueba rápida de Dengue (sangre/suero/plasma humano) ha sido comparado con una prueba comercial líder en Dengue ELISA, demostrando una sensibilidad del 83.3% para la IgM en la infección primaria y 98.4% para la IgG en la infección secundaria.

## Características de presentación

### Sensibilidad y Especificidad

La prueba rápida NS1 de Dengue (sangre/suero/plasma humano) ha pasado un panel de seroconversión y comparado con una prueba EIA de antígeno de dengue con muestras clínicas de Dengue NS1 y se ha evaluado con muestras obtenidas de una población de pacientes sintomáticos y asintomáticos. Los resultados de anticuerpos fueron confirmados por una prueba comercial de Dengue ELISA para IgG e IgM.

## Dengue NS1

Método	Resultados	Dengue Ag EIA		Resultado Total
		Positivo	Negativo	
		Positivo	137	
Negativo	6	200		
<b>Resultados Totales</b>		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%)

Exactitud:  $(137+200) / (137+6+8+200) * 100\% = 96.0\%$  (95% CI: \*92.4%-97.8%)

\*Intervalos de confianza

## Dengue IgM/IgG

### Para Infección primaria de dengue para los resultados de las pruebas de IgM/ IgG

Método	Resultados	ELISA		Negativo	
		Positivo			
		IgM	IgG		
Cartucho de Prueba Rápida de Dengue (Sangre/Suero/Plasma)	Positivo	IgM	20	0	0
		IgG	4	0	0
	Negativo	0	0	0	0
<b>Sensibilidad Relativa</b>		83.3%	/	/	

### Para Infección secundaria de dengue para los resultados de las pruebas de IgM/ IgG

Método	Resultados	ELISA		Negativo	
		Positivo			
		IgM	IgG		
Cartucho de Prueba Rápida de Dengue (sangre/suero/plasma)	Positivo	IgM	46	1	0
		IgG	18	63	0
	Negativo	0	0	0	0
<b>Sensibilidad Relativa</b>		71.9%	98.4%	/	

### Para Infección negativa a dengue para los resultados de las pruebas de IgM/ IgG

Método	Resultados	ELISA		Negativo	
		Positivo			
		IgM	IgG		
Cartucho de Prueba Rápida de Dengue (Sangre/Suero/Plasma)	Positivo	IgM	0	0	1
		IgG	0	0	3
	Negativo	0	0	429	
<b>Sensibilidad Relativa</b>		/	/	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%)

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

\*Intervalos de confianza

## Precisión

### Intra-Ensayo

La precisión intra-ensayo se ha determinado usando 15 réplicas de cuatro muestras: un negativo, un positivo bajo, un positivo medio y un positivo alto para el antígeno NS1.

Para la determinación de anticuerpos, se usaron 15 réplicas de cuatro muestras: un negativo, un positivo IgG, un positivo IgM y positivo IgG/IgM.

Todas las muestras fueron correctamente identificadas > 99% de las veces.

### Inter-Ensayo

La precisión se ha determinado mediante 15 ensayos independientes sobre las mismas muestras para antígeno NS1 y anticuerpos IgG/IgM. Tres diferentes lotes de esta prueba se analizaron con estas muestras. Las muestras fueron correctamente identificadas > 99% del tiempo.

## Reactividad cruzada

La prueba rápida de dengue (sangre/suero/plasma humano) ha sido probado con muestras positivas de HAMA, RF, HBSAb, HBEAg, HBEAb, HBCAb, sifilis, VIH, H. Pylori, MONO, CVM, rubéola y TOXO. Los resultados no mostraron ninguna reactividad cruzada.

## Referencias

- Halstead SB. Atención primaria selectiva de salud: estrategias para el control de la enfermedad en el mundo en desarrollo: XI. Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6: 251 - 264.
- Halstead SB. Patogénesis del Dengue: desafíos a la biología molecular. Ciencia. 1988; 239: 476 - 481.
- Ruechusatsawat K, et al. Observación diaria de niveles de anticuerpos entre pacientes con dengue detectados mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Japonés J. Trop. Med. Higiene 1994; 22: 9-12
- Lam SK. Fiebre del Dengue Hemorrágico. Rev. Med. Micro. 1995; 6: 39 - 48
- Fiebre del dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2da Edición. Geneva: Organización Mundial de la Salud
- Yamada K, et al. Respuestas de anticuerpos para la fiebre del dengue japonés. Pacientes mediante los ensayos de neutralización y de inhibición de la hemaglutinación demostraron reactividad cruzada entre el dengue y los virus de la encefalitis japonesa. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10 (4): 725 - 8.
- Dobler G, et al. Reacciones cruzadas de pacientes con fiebre aguda de dengue a encefalitis. Wien Med Wochenschr (en alemán). 1997; 147 (19 - 20): 463 - 4
- Makino Y, et al. Estudios sobre reacciones serológicas cruzadas en flavivirus secuencial. Microbiol Immunol. 1994; 38 (12): 951 - 5.

## Índice de símbolos

	Atención, ver instrucciones de uso		Uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	No reutilizar		Fecha de caducidad
	Almacenar entre 2-30 °C		Número de lote
	No utilizar si el paquete está dañado		Leer instrucciones para su uso