

Prueba rápida DENGUE-NET

(sangre/suero/plasma)

DNI 0723/01

REF DMDEN01

Uso deseado

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

Resumen

Transmitido por artrópodos, en especial por el mosquito urbano *Aedes aegypti*, el Dengue es una enfermedad causada por el flavivirus DENV, el cual, una vez transmitido por la picadura del mosquito, ingresa por endocitosis en las células y busca replicarse en el citoplasma, si bien, se sabe que este virus genera alrededor de 10 proteínas aún no se conoce con exactitud la función específica de las mismas, pues solo tres de ellas son estructurales [1,2]. Debido a la falta de información sobre la replicación de este virus es que aún no existen retrovirales que puedan inhibir su replicación, solamente existe un tratamiento que consiste en la infusión intravenosa precoz de soluciones cristaloides, sin embargo, este tratamiento reduce la mortandad de la enfermedad, de allí surge la importancia de detectar la presencia de este virus en etapas tempranas. Los síntomas que se pueden presentar son fiebre, inflamación de determinados tejidos, dolor general y fatiga, parte de la gravedad de la enfermedad son las complicaciones súbitas que pueden sufrir los individuos infectados. Se estima que anualmente son infectadas entre 50 y 100 millones de personas solo el continente americano [3]. Un diagnóstico temprano permitiría un manejo clínico eficiente con el fin de curar o prevenir complicaciones potencialmente mortales. Hoy en día se dispone de una amplia gama de métodos de diagnóstico serológicos y virológicos como lo son ELISA o el PCR, sin embargo, requieren de personal especializado y equipos de laboratorio no aptos para un diagnóstico de punto de uso.

La detección del antígeno NS1 (proteína viral secretada a sangre) por ELISA o inmunocromatografía es útil para el diagnóstico desde el primer día de fiebre y hasta por 14 días después de la infección. Las pruebas serológicas incluyen la detección de anticuerpos anti-dengue (IgG/IgM), si éstas se utilizan en conjunto con la detección del antígeno NS1 del virus se convierte en una herramienta útil para determinar el estado de la infección [4]. 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. Un test positivo a IgM e IgG indica una infección reciente por Dengue, mientras que, si el IgG es positivo, pero si el IgM es bajo o negativo, indica que el paciente tuvo una infección en el pasado. La presencia de sólo IgG y la ausencia de NS1 y/o IgM, no indica una infección por dengue reciente [5,6 y 7].

Principio

La prueba rápida DENGUE-NET (sangre/suero/plasma humano) es un inmunoensayo de flujo lateral cualitativo para la detección de anticuerpos IgM e IgG anti-Dengue, así como de antígeno NS1 del virus del dengue en muestras de sangre, suero o plasma. Esta prueba posee dos tiras, una para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-Dengue y otra 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, si la muestra contiene anticuerpos IgM anti-Dengue, la mezcla reacciona con las partículas revestidas de antígeno de Dengue y continúa migrando por capilaridad y reacciona con el anti-IgM 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 con antígeno de dengue, así como anticuerpos IgM anti-humano e IgG anti-humano impresos sobre la membrana.

La prueba rápida de dengue NS1 contiene partículas coloidales de oro conjugadas con anti-dengue NS1 y anti-dengue NS1 recubierto en la membrana.

Precauciones

Lea toda la información contenida en este prospecto antes de realizar la prueba.

- Exclusivo para uso *in vitro*.
- No utilice la prueba después de la fecha de caducidad.
- No fume, beba o coma en áreas donde se manipulen las muestras o las pruebas.
- Maneje todas las muestras como si tuvieran agentes infecciosos.
- Tome las precauciones establecidas contra posibles riesgos microbiológicos en todos los procedimientos y siga la norma de procedimientos para la eliminación adecuada de muestras.
- La humedad y la temperatura pueden afectar negativamente los resultados.
- La prueba utilizada debe desecharse de acuerdo a las normativas locales.
- No mezcle/cambie la solución de corrimiento o cartuchos de kits proveniente de lotes diferentes.

Almacenamiento y estabilidad de la prueba

Almacene la prueba en la bolsa sellada, a temperatura ambiente o refrigerado (2 -30 °C). Nota: NO CONGEELE LA PRUEBA.

- 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.

Almacenamiento de la muestra

- Se recomienda realizar la prueba inmediatamente después de que las muestras han sido recolectadas.
- No deje las muestras a temperatura ambiente durante períodos prolongados. Las muestras de suero y plasma pueden almacenarse a 2-8°C máximo 3 días.
- Para el almacenamiento a largo plazo, las muestras deben mantenerse por debajo de los -20°C. Solo la sangre obtenida por punción venosa deberá almacenarse a 2-8°C y tendrá que ser utilizada en un plazo de 2 días a partir de la recolección.
- No congele las muestras de sangre.
- Separe el suero o plasma de la sangre tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis. Utilice sólo muestras claras no hemolizadas.
- Muestras congeladas deben ser completamente descongeladas y mezcladas antes de su uso.
- Las muestras no deben congelarse y descongelarse repetidamente.

Materiales

Materiales incluidos:

- Cartucho de prueba
- Gotero
- solución de corrimiento
- Manual de instrucciones

Materiales requeridos, pero no incluidos:

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

Materiales opcionales:

- Centrífuga
- Sistema para toma de muestra por venopunción
- Micropipeta

Preparación y recolección de muestra

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

Siga las instrucciones descritas a continuación según el medio de obtención y muestra:

Por punción capilar:

- A. Lave la mano del paciente con agua tibia y jabón, después séquela con una toalla limpia.
- B. Masajea la mano sin tocar el sitio de la punción frotando la mano hacia la yema del dedo anular o medio.
- C. Perfore la piel con una lanceta estéril y limpie la primera señal de sangre.
- D. Frote suavemente la mano desde la palma hasta la yema de los dedos para formar una gota de sangre sobre el sitio de punción.
- E. Presione el bulbo del gotero y coloque el extremo inferior sobre la gota de muestra, suelte el bulbo hasta llenar la punta del gotero. Evite generar burbujas de aire.

Por Venopunción:

- a. Tome la muestra de acuerdo a los criterios establecidos para la correcta toma de muestra por venopunción.
- b. Separe el suero o plasma de la sangre tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis. Sólo utilice muestras claras, evite muestras hemolizadas.

Instrucciones de uso

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

1. Recolecte la muestra (sangre/suero/plasma), como se menciona anteriormente.
2. Coloque la muestra y la solución de corrimiento en cada pozo del cartucho de prueba:

Prueba IgG/IgM

En muestras de suero o plasma

- Coloque 2 gotas de muestra (aproximadamente 30 µL).
- Agregue 3 gotas de solución de corrimiento (aproximadamente 120 µL).

En muestras de sangre

- Coloque 2 gotas de muestra (aproximadamente 30 µL).
- Agregue 3 gotas de solución de corrimiento (aproximadamente 120 µL).

Prueba NS1

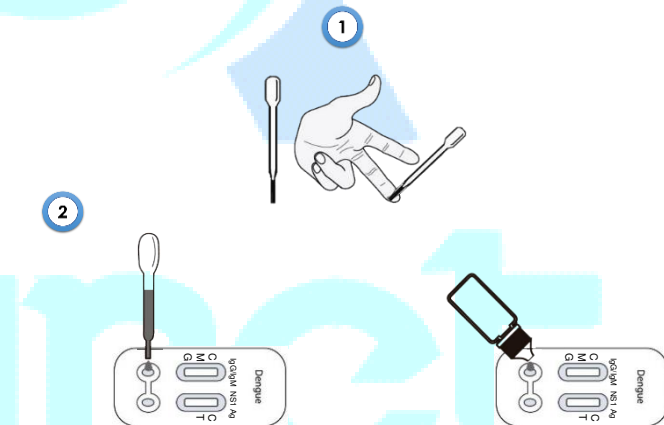
En muestras de suero o plasma

- Coloque 1 gota de muestra (aproximadamente 15 µL).
- Agregue 2 gotas de solución de corrimiento (aproximadamente 80 µL).

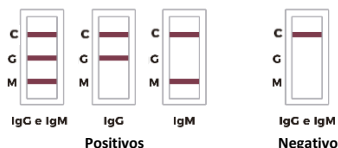
En muestras de sangre

- Coloque 2 gotas de sangre (aproximadamente 30 µL).
- Agregue 2 gotas de solución de corrimiento (aproximadamente 80 µL).

3. Interprete los resultados a los 15 minutos. No interprete el resultado después de 20 minutos.

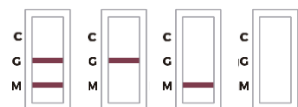


Resultados IgG e IgM



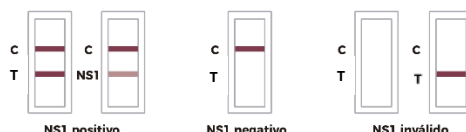
Positivos

Negativo



Inválido

Resultados NS1



Interpretación de los resultados

(Refiera por favor al ejemplo anterior)

POSITIVO (T): 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 (T).

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 G e M. No es necesario que la intensidad del color de las líneas coincida. 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.

POSITIVO (G): 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 (G). El resultado es positivo para el virus específico de dengue IgG y es probablemente indicativo de infección secundaria por dengue.

POSITIVO (M): 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 (M). 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 las líneas de prueba (T y/o G y/o M) variará dependiendo de la concentración de antígeno Dengue T y/o G y/o M 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 (T y/o G y/o M).

INVÁLIDO: La línea de control no aparece. El volumen de la muestra es insuficiente o las técnicas de procedimiento fueron incorrectas, estás suelen ser 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 más cercano.

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. Nota: No se suministran controles positivos ni negativos. Para ello 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 presentes 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, se recomienda volver a muestrear al paciente unos días después o confirmar por otras técnicas como PCR o 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 de la infección, las concentraciones de IgM anti-dengue pueden estar por debajo de los niveles detectables.
- Para la infección secundaria, una fracción baja de IgM anti-Dengue y una fracción 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.

Valores esperados

La prueba rápida NS1 de Dengue (sangre/suero/plasma humano) ha sido comparada con una prueba comercial líder en Dengue Ag EIA. La correlación entre estos dos sistemas fue 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 ha sido comparado con una prueba ELISA 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 | Dengue Ag ELISA | | Resultado | |
| Prueba rápida DENGUE-NET IgG | Resultados | Positivo | Negativo | Total |
| | Positivo | 82 | 2 | 84 |
| | Negativo | 2 | 272 | 274 |
| Resultados Totales | | 84 | 274 | 358 |

Sensibilidad Relativa: 97.62% (95% IC: 95.46% - 98.76%)

Especificidad Relativa: 99.27% (95% IC: 97.73% - 99.77%)

Precisión: 98.88% (95% IC: 97.16% - 99.56%)

IC: Intervalo de confianza

Dengue IgM/IgG

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

| Método | Dengue Ag ELISA | | Resultado | |
|------------------------------|-----------------|----------|-----------|-------|
| Prueba rápida DENGUE-NET IgG | Resultados | Positivo | Negativo | Total |
| | Positivo | 0 | 1 | 1 |
| | Negativo | 0 | 28 | 28 |
| Resultados Totales | | 0 | 29 | 29 |
| Método | Dengue Ag ELISA | | Resultado | |
| Prueba rápida DENGUE-NET IgM | Resultados | Positivo | Negativo | Total |
| | Positivo | 28 | 0 | 28 |
| | Negativo | 1 | 0 | 1 |
| Resultados Totales | | 29 | 0 | 29 |
| Sensibilidad relativa IgM | | 96.55 % | | |

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

| Método | Dengue Ag ELISA | | Resultado | |
|------------------------------|-----------------|----------|-----------|-------|
| Prueba rápida DENGUE-NET IgG | Resultados | Positivo | Negativo | Total |
| | Positivo | 57 | 0 | 57 |
| | Negativo | 2 | 0 | 2 |
| Resultados Totales | | 59 | 0 | 59 |
| Método | Dengue Ag ELISA | | Resultado | |
| Prueba rápida DENGUE-NET IgM | Resultados | Positivo | Negativo | Total |
| | Positivo | 20 | 1 | 21 |
| | Negativo | 1 | 37 | 38 |
| Resultados Totales | | 21 | 38 | 59 |
| Sensibilidad relativa IgG | | 96.55 % | | |
| Sensibilidad relativa IgM | | 95.24 % | | |

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

| Método | Dengue Ag ELISA | | Resultado | |
|------------------------------|-----------------|----------|-----------|-------|
| Prueba rápida DENGUE-NET IgG | Resultados | Positivo | Negativo | Total |
| | Positivo | 0 | 1 | 1 |
| | Negativo | 0 | 291 | 291 |
| Resultados Totales | | 0 | 292 | 292 |
| Método | Dengue Ag ELISA | | Resultado | |
| Prueba rápida DENGUE-NET IgM | Resultados | Positivo | Negativo | Total |
| | Positivo | 0 | 2 | 2 |
| | Negativo | 0 | 290 | 290 |
| Resultados Totales | | 0 | 292 | 292 |
| Especificidad relativa IgG | | 99.66 % | | |
| Especificidad relativa IgM | | 99.32 % | | |

Sensibilidad: 97.70% (95% IC: 95.65% - 98.80%)

Especificidad: 98.97% (95% IC: 97.36% - 99.60%)

Precisión: 98.94% (95% IC: 97.31% - 99.59%)

IC: Intervalos de confianza

Precisión

Intra-Ensayo

La precisión intra-ensayo se determinó usando 20 réplicas de tres muestras: un negativo, un positivo bajo y un positivo alto para el antígeno NS1.

Para la determinación de anticuerpos, se usaron 20 réplicas de cinco muestras: un negativo, un positivo bajo IgG, un positivo alto IgG, un positivo bajo IgM y un positivo alto IgM.

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

Inter-Ensayo

La precisión se determinó mediante 20 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 DENGUE-NET (sangre/suero/plasma humano) ha sido probado con muestras positivas de HAMA, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HbCAb, sífilis, VIH, H. Pylori, MONO, CVM, rubéola y TOXO. Los resultados no mostraron ninguna reactividad cruzada.

Interferencia

La prueba rápida DENGUE-NET (sangre/suero/plasma humano) fue probada con diez muestras positivas y diez muestras negativas enriquecidas con Acetaminofén, Ácido Acetilsalicílico, Ácido Ascórbico, Bilirrubina, Creatina, Cafeína, Ácido Géntisico, Hemoglobina, Albúmina y Ácido oxálico, no presento ninguna interferencia.

Referencias

- Velanda, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33-43.
- Martínez Torres, E. (2008). Dengue. *Estudios avanzados*, 22, 33-52.
- Schatzmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 1179-81.
- Andries AC, et al. Field evaluation and impact on clinical management of a rapid diagnostic kit that detects dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;4(12): e1993.
- Ruechusatsawat K, et al. Observación diaria de niveles de anticuerpos entre pacientes con dengue detectados mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA). *Japónés J. Trop. Med. Higiene* 1994; 22: 9-12
- Chen, X., Chen, R., Gu, W., He, J., Cai, W., Li, J., ... Yan, H. (2015). Clinical evaluation of dengue RNA, NS1, and IgM for diagnosis of dengue in Southern China. *Journal of Medical Virology*, 88(1).
- Shiv Sekhar Chatterjee, Ankush Sharma, Shilpee Choudhary, Sushil Kumar Chumber, et al. Significance of IgG optical density ratios (index value) in single reactive anti-Dengue virus IgG capture ELISA. *Iranian Journal of Microbiology*. Vol.8 No.6 Dec' 16:395-400

Índice de símbolos

| | |
|--|--|
| | Consultar manual de uso |
| | Solo para evaluación de desempeño in vitro |
| | Almacenar entre 2 - 30 °C |
| | No utilizar si el paquete está dañado |
| | Uso para investigación |

| | |
|--|--------------------|
| | Caducidad |
| | Número de catálogo |
| | Número de lote |
| | No reutilizar |