

1. Uso previsto

El test NADAL® Dengue IgG/IgM es un inmunoensayo de flujo lateral para la diferenciación y la detección simultánea de IgG e IgM contra el virus del Dengue (serotipos DEN 1, 2, 3 y 4) en muestras humanas de suero, plasma o sangre completa. Este ensayo solo está indicado para el uso profesional como test de detección, ayudando al diagnóstico de una infección por el virus del Dengue. Cualquier muestra reactiva con el test NADAL® Dengue IgG/IgM se debe confirmar con métodos alternativos de test.

2. Introducción y significado clínico

El Dengue es un virus monocatenario con envoltura y con ARN de sentido positivo, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, que incluye cuatro serotipos distintos de virus (DEN1, 2, 3, 4). Los virus del Dengue se transmiten por mosquitos de actividad diurna de la familia *Stegomyia*, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

En la actualidad, más de 3,9 millones de personas que habitan en las zonas tropicales de Asia, África, Australia y América, están en riesgo de infección por Dengue. A nivel mundial, se estima que se producen anualmente unos 100 millones de casos de fiebre del dengue y 250.000 casos de fiebre hemorrágica del dengue potencialmente mortal.^{1-3,7}

La detección serológica es el método más común para el diagnóstico de una infección por el virus del Dengue. Los IgM contra el virus del Dengue comienzan a aparecer a los 3-5 días de la exposición inicial y permanecen en circulación durante aprox. 30-90 días. El nivel de IgG contra el virus del Dengue aumenta a los 7 días de la exposición inicial, alcanza su valor máximo a las 2-3 semanas y perdura durante toda la vida.^{4,6}

El test NADAL® Dengue IgG/IgM utiliza proteínas recombinantes de Dengue que reconocen IgG e IgM para cuatro serotipos del virus del Dengue. El ensayo es fácil de realizar, el entrenamiento requerido es mínimo y no se requieren incómodos equipos de laboratorio.

3. Principio del test

El test NADAL® Dengue IgG/IgM es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral que detecta anticuerpos contra los cuatro serotipos del virus del Dengue.

El casete de test está compuesto por: 1) un hisopo de conjugado de color burdeos con antígenos de Dengue recombinantes de envoltura, conjugados con oro coloidal (conjugado de Dengue) y conjugado de oro con IgG de conejo 2) una tira de membrana de nitrocelulosa con dos líneas de test "G" y "M" y una línea de control "C". Los anticuerpos contra IgG anti-humanos están prefijados en la línea "G" y los anticuerpos contra IgM anti-humano están prefijados en la línea "M", donde los anticuerpos de cabra contra IgG anti-conejo están prefijados en la línea "C".

Cuando se añade un volumen adecuado de muestra al pocillo correspondiente (S) del casete, la muestra migra por acción capilar a lo largo del casete. Si los virus IgG anti-Dengue están presentes en la muestra, se unirán a los conjugados de Dengue. Este inmunocomplejo es capturado por anticuerpos IgG anti-Dengue, formando una línea "G" de color burdeos e indicando un resultado de test positivo para IgG, lo que sugiere una infección secundaria o previa por Dengue.

Si la muestra contiene IgM anti-Dengue, se unirán a los conjugados del Dengue. Este inmunocomplejo es capturado por anticuerpos IgM anti-Dengue, dando lugar a la aparición de una línea "M" de color burdeos. Esto significa que el resultado del test es positivo para IgM, sugiriendo una infección primaria reciente.

Si tanto las líneas "G" y "M" son visibles, el resultado del test sugiere infecciones por Dengue primarias o secundarias. La ausencia de ambas líneas "G" y "M" sugiere un resultado negativo.

El test contiene un control interno (línea de control "C") que consiste en la aparición de una línea de color burdeos formada por conjugado de IgG de cabra anti-conejo con IgG de conejo con oro, independientemente de que aparezcan o no cualquiera de las líneas de test "G" y "M". Si no aparece la línea de control, el resultado no es válido y se debe repetir la prueba con otro casete de test.

4. Reactivos y materiales provistos

- 25 casetes de test NADAL® Dengue IgG/IgM
- 25 tubos capilares (5 µL)
- 1 búfer "Buffer" (5 mL/bote)
- 1 manual de instrucciones

5. Materiales adicionales

- Reloj o cronómetro
- Lanceta

6. Almacenamiento y conservación

Todos los reactivos están listos para su uso tal como se suministran. Almacene los test cerrados a 2-30°C. Si los kits de test se almacenan a 2-8°C, asegúrese de llevarlos a temperatura ambiente antes de abrirlos. El test se mantiene estable hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. No congele los dispositivos ni los exponga a temperaturas por encima de los 30°C.

7. Advertencias y precauciones

- Solo apto para el uso profesional de diagnóstico *in-vitro*.
- Lea atentamente todo el procedimiento del test antes de comenzar la prueba.
- No utilice el test después de la fecha de caducidad indicada en el envase.
- No debe utilizar el dispositivo si el envase está dañado.
- No reutilice los test.
- No utilice muestras de sangre hemolizada para esta prueba.
- No añada la muestra al área de reacción (región de resultados).
- Evite tocar el área de reacción (región de resultados), a fin de evitar posibles contaminaciones.
- Evite la contaminación cruzada de las muestras utilizando un nuevo recipiente recolector para cada una.
- No intercambie ni mezcle componentes de diferentes kits de test.
- No coma, beba o fume durante la manipulación de las muestras y la realización del test.
- Utilice ropa protectora, como bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección, mientras manipule las muestras.

- Manipule las muestras como si contuviesen agentes infecciosos. Siga durante todo el procedimiento las precauciones establecidas para riesgos microbiológicos, y las directrices estándar para la eliminación de las muestras.
- Este test contiene productos de origen animal. El conocimiento certificado del origen y/o estado sanitario de los animales no garantiza completamente la ausencia de agentes patogénicos transmisibles. Por eso, se recomienda tratar este producto como potencialmente infeccioso y seguir las precauciones habituales durante su manipulación (p.ej. no ingerir ni inhalar).
- La humedad y la temperatura pueden afectar negativamente a los resultados del test.
- La eliminación de los materiales utilizados debe realizarse de acuerdo con las regulaciones locales.
- Lea el resultado del test a los 25 minutos de haber dispensado la muestra en el pocillo correspondiente del casete. La lectura de los resultados después de más de 25 minutos puede dar lugar a resultados erróneos.
- No realice la prueba en una habitación con corrientes de aire, como ventiladores eléctricos o aire acondicionado.

8. Recolección de muestras y preparación

Considere los materiales de origen humano como infecciosos y trátelos utilizando procedimientos estándar de bioseguridad.

Plasma

- Recolecte por punción venosa una muestra de sangre en un tubo recolector (con EDTA, citrato o heparina) por venipunción.
- Separe el plasma por centrifugación.
- Retire con cuidado el plasma en un tubo nuevo etiquetado.

Suero

- Recolecte una muestra de sangre por punción venosa en un tubo de recolección (que no contenga anticoagulantes).
- Deje que la sangre se coagule.
- Separe el suero por centrifugación.
- Retire el suero con cuidado en un nuevo tubo etiquetado.

Tras su recolección, analice las muestras lo más pronto posible. Si las muestras de suero o plasma no se analizan inmediatamente, almacénelas a 2-8°C hasta 5 días. Para almacenamientos prolongados, congélelas a -20°C.

Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras. Antes de realizar la prueba, lleve lentamente las muestras congeladas de suero o plasma a temperatura ambiente y mézclelas bien. Las muestras que presenten partículas visibles se deben clarificar por centrifugación antes de realizar el test. Para evitar las interferencias con la interpretación de los resultados, no utilice muestras que presenten gran lipemia, hemólisis o turbidez.

Sangre completa

Las gotas de sangre completa se pueden obtener por punción digital o venosa. No utilice sangre hemolizada para la prueba.

Si no se va a realizar la prueba inmediatamente, refrigere las muestras de sangre completa a 2-8°C. Las muestras se deben analizar dentro de las 24 horas siguientes a la recolección.

9. Procedimiento del test

Lleve las muestras y los casetes de test a temperatura ambiente antes de realizar la prueba. Una vez que las muestras están descongeladas, mézclelas bien antes de realizar la prueba.

1. Cuando esté todo listo para la prueba, abra la bolsa sellada y extraiga el casete de test. Coloque el casete de test sobre una superficie limpia y plana.
2. Asegúrese de etiquetar el casete de test con el número de identificación de la muestra.
3. Llene el tubo capilar con suero, plasma o sangre completa sin sobrepasar la línea de muestra. El volumen de muestra debe ser aprox. 5 µL.

Para una mayor precisión, transfiera la muestra con una micropipeta capaz de dispensar un volumen de 5 µL.



4. Sostenga verticalmente el tubo capilar y dispense la totalidad de la muestra en el centro del pocillo correspondiente (S), evitando que se formen burbujas de aire.

5. Sosteniendo el vial en posición vertical, añada inmediatamente 3 gotas (aprox. 110-130 µL) de búfer "Buffer" al pocillo correspondiente (B). Active el cronómetro.



6. Lea el resultado del test a los 25 minutos exactamente. No interprete los resultados una vez pasados más de 25 minutos. Para evitar la confusión, elimine el casete de test una vez interpretado el resultado.



10. Interpretación del resultado

Positivo/reactivo para IgG:

Aparece una línea de color burdeos en el área de la línea de control "C" y una línea burdeos en el área de la línea de test "G". El resultado del test indica la presencia de IgG anti-Dengue, indicando la etapa tardía de una infección primaria, secundaria precoz o previa.



Positivo/reactivo para IgM:

Aparece una línea de color burdeos en cada área de control "C" y una línea también de color burdeos en el área de la línea de test "M".



El resultado del test indica la presencia del virus IgM anti-

Dengue, sugiriendo una infección primaria reciente por Dengue.

Positivo/reactivo para IgG e IgM:

Además de las líneas de control "C", aparece una línea de color burdeos en cada región de test: "G" y "M". El resultado del test indica la presencia de virus del Dengue IgG e IgM, sugiriendo una infección actual primaria o una secundaria precoz por Dengue.



Nota:

Las muestras con resultados positivos se deben confirmar con métodos de test alternativos y teniendo en cuenta todos los hallazgos clínicos, antes de que se determine como positivo.

Negativo/no reactivo:

Solo aparece la línea "C" de control. La ausencia de cualquier sombra coloreada de las líneas de test "G" o "M" indica que no se han detectado anticuerpos anti-Dengue.



No válido:

Si no aparece la línea "C" de control, el ensayo no es válido, independientemente de la aparición de cualquier sombra coloreada en las zonas de las líneas de test "G" o "M".



Si no aparece la línea de control dentro del tiempo de lectura especificado, los resultados del test no son válidos y se deben descartar. En ese caso, revise el procedimiento y repita la prueba con un nuevo casete de test. Si el problema persiste, deje de usar el kit inmediatamente y contacte con su distribuidor local.



Las causas más frecuentes de que no aparezca la línea de control son un volumen de muestra insuficiente, un procedimiento incorrecto o que el dispositivo esté caducado.

11. Control de calidad

El casete contiene un control interno del procedimiento:

La línea coloreada que aparece en la región de control (C) se considera un control interno del procedimiento. Esta línea confirma que el volumen de muestra ha sido suficiente, que la membrana ha reaccionado correctamente y que la técnica del procedimiento ha sido adecuada.

Las *buenas prácticas de laboratorio (BPL)* recomiendan el uso de materiales de control para asegurar que el funcionamiento del test es correcto.

12. Limitaciones

- Siga estrictamente los apartados "Procedimiento del test" e "Interpretación del resultado" cuando quiera detectar la presencia de anticuerpos contra el Dengue en muestras de suero, plasma o sangre completa de sujetos individuales. En caso contrario, se podrían obtener resultados incorrectos.
- El test NADAL® Dengue IgG/IgM se limita a la detección cualitativa de anticuerpos contra el virus del Dengue en

muestras humanas de suero, plasma o sangre completa. La intensidad de la línea de test no tiene una correlación lineal con la cantidad de anticuerpos en la muestra.

- Este test no proporciona información sobre los serotipos del Dengue.
- El test NADAL® Dengue IgG/IgM no se puede utilizar para diferenciar una infección primaria de una secundaria.
- Son comunes las reacciones cruzadas con otros flavivirus (p.ej. encefalitis japonesa, virus del Nilo Occidental, fiebre amarilla, etc.). Por esta razón, es posible que las muestras de pacientes infectados con estos virus, muestren algún nivel de reactividad con este test.
- Un resultado negativo no reactivo, para un sujeto individual indica la ausencia de anticuerpos detectables contra el Dengue. Sin embargo, un resultado de test negativo o no reactivo no excluye la posibilidad de exposición o infección por el virus del Dengue.
- Pueden producirse resultados negativos o no reactivos si la cantidad de anticuerpos contra el Dengue presentes en la muestra están por debajo del límite de detección del test o si los anticuerpos detectados no estaban presentes durante la etapa de la enfermedad en la que se recolectó la muestra.
- Las muestras que contienen cantidades inusualmente altas de anticuerpos heterófilos o de factor reumatoide, pueden afectar a los resultados esperados.
- Si los síntomas persisten mientras que el resultado obtenido con el test es negativo o no reactivo, se recomienda repetir la prueba unos días después o con un método alternativo de test.
- Los resultados obtenidos con este test solo se deben interpretar junto con otros procedimientos de diagnóstico y hallazgos clínicos.

13. Características del rendimiento

Rendimiento clínico del test NADAL® Dengue IgG/IgM (IgM)

Se analizaron un total de 314 muestras de pacientes sospechosos utilizando el test NADAL® Dengue IgG/IgM y también un método de referencia (EIA) para IgM anti-Dengue. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

		EIA Dengue IgM		
		+	-	Total
Test NADAL® Dengue IgG/IgM (IgM)	+	31	1	32
	-	3	279	282
	Total	34	280	314

Sensibilidad relativa: 96,9%

Especificidad relativa: 98,9%

Concordancia general: 98,7%

Rendimiento clínico del test NADAL® Dengue IgG/IgM (IgG)

Se analizaron un total de 326 muestras de pacientes sospechosos utilizando el test NADAL® Dengue IgG/IgM y también un método de referencia (EIA) para IgG anti-Dengue.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

		EIA Dengue IgG		
		+	-	Total
Test NADAL® Dengue IgG/IgM (IgG)	+	36	1	37
	-	2	287	289
	Total	38	288	326

Sensibilidad relativa: 97,3%

Especificidad relativa: 99,3%

Concordancia general: 99,1%

14. Referencias

- Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: The emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995;1(2):55-57.
- Gubler DJ, Trent DW. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infect Agents Dis* 1994;2:383-393
- Monath TP. Dengue: The risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2395-2400.
- Price DD, Wilson SR, Dengue Fever, e-medicine, <http://www.emedicine.com/EMERG/topic124.htm>, Jan, 2002.
- Innis BL, and Nisalak A, et al: An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where denude and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hygiene*. 1989; 40: 418-427.
- Anonymous. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1997
- Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1760. doi:10.1371/journal.pntd.0001760.

Rev. 0, 2016-02-12 MP