

INDICACIONES DE USO

Ensayo inmunoabsorbente para la detección cualitativa de Dengue IgG en suero humano.

Agente de diagnóstico in vitro, para uso exclusivo de laboratorios clínicos o de gabinete.

RESUMEN Y APLICACIÓN

Los virus de dengue transmitidos por mosquitos (serotipo 1-4) causan fiebre de dengue, una enfermedad severa similar a la gripe. La enfermedad es prevalente en las regiones tropicales del "tercer mundo" y se extiende a los países desarrollados subtropicales. La OMS estima que ocurren entre 50 y 80 millones casos de dengue en todo el mundo cada año, incluyendo una variante potencialmente mortal de la enfermedad conocida como Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) y Síndrome de Shock por Dengue (SSD). La infección primaria al virus del dengue en una enfermedad auto limitada caracterizada por leve a alta fiebre que dura de 3 a 7 días, dolor de cabeza y detrás de los ojos severo, dolores musculares y articulares, erupción cutánea y vómitos. La infección secundaria es la forma más común de la enfermedad en muchas partes del sudeste asiático y América del Sur. La misma es más grave y puede resultar en FHD y SSD. Los principales síntomas clínicos pueden incluir fiebre alta, eventos hemorrágicos e insuficiencia circulatoria, con una tasa de mortalidad de hasta 40%. El diagnóstico precoz del SSD es particularmente importante, ya que los pacientes pueden morir dentro de 12 a 24 horas si no se administra el tratamiento adecuado. La infección primaria del virus del dengue se caracteriza por elevaciones en los niveles de anticuerpos específicos IgM de 3 a 5 días después de la aparición de los síntomas, lo cual generalmente persiste durante 30 a 60 días. Los niveles de IgG también se elevan después de 10 a 14 días y permanecen detectables de por vida. Durante la infección secundaria, los niveles de IgM generalmente suben más lentamente y alcanzan niveles más bajos que en la infección primaria, mientras que los niveles de IgG se elevan rápidamente entre 1 y 2 días después de la aparición de los síntomas.

DESCRIPCIÓN

Ensayo inmunoabsorbente de asociación enzimática (ELISA). En la prueba Dengue IgG Elisa, los pocillos están cubiertos con antígenos Dengue. Se incuba el suero diluido de los pacientes y el control dentro de los pocillos. En caso de presencia de anticuerpos específicos Dengue IgG estos se impregnan a la fase sólida de antígenos. Todos los anticuerpos que no se hayan impregnado se eliminan por medio del enjuague. El HRP que no se impregno se elimina en un siguiente lavado. La adición de un sustrato provoca que las enzimas generen una coloración. La intensidad en la coloración es directamente proporcional a la concentración de anti Dengue IgG en la muestra.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos con Streptavidina	12x8x1
2. Diluyente de la muestra: 1 Frasco (listo para usar)	22 mL
3. Calibrador (Tapa Amarilla): 1 Vial (listo para usar)	1 mL
4. Control Positivo (Tapa Roja): 1 Vial (listo para usar)	1 mL
5. Control Negativo (Tapa Azul): 1 Vial (listo para usar)	1 mL
6. Conjugado Biotin IgG Anti-humano	12 mL
7. Conjugado Enzimático: 1 Frasco (listo para usar)	12 mL
8. Sustrato TMB: 1 Frasco (listo para usar)	12 mL
9. Solución de Frenado: 1 Frasco (listo para usar)	12 mL
10. Concentrado de Lavado 20X: 1 Frasco	25 mL

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el reactivo a una temperatura de entre 2°C a 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales con potencial riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8°C) por siete días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta seis meses. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Prepare 1X de solución añadiendo los contenidos del frasco (25 ml, 20x) a 475ml de agua destilada o desionizada. Conserve a temperatura ambiente (18°C-26°C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Los controles (positivo y negativo) y el calibrador están listos para su uso. Prepare una dilución de las muestras de 1:21, agregando 10 µL de la muestra a 200 µL del diluyente. Mezclar bien.
3. Dispense 50 µL del suero diluido, calibrador y controles en los pozos designados.
4. Dispense 100 µL de Conjugado Biotin IgG Anti-humano en los pozos. Mezcle el contenido de los pozos.
5. Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente.
6. Retire el líquido de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Dispense 100 µl de conjugado enzimático en cada pozo e incube por 60 minutos a temperatura ambiente.
8. Retire el conjugado enzimático de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
9. Dispense 100 µl de sustrato TMB e incube por 15 minutos a temperatura ambiente.
10. Agregue 50 µl de solución de frenado.
11. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Chequear el Factor de Calibración (CF) valorado en el frasco del Calibrador. Este valor puede variar de lote a lote.
2. Calcule el valor del punto de corte. Calibrador (OD) por Factor de Calibración.
3. Calcule el anticuerpo (Ab) para cada determinación, dividiendo el valor (OD) de cada muestra entre el valor del punto de corte.

EJEMPLO DE LA MUESTRA TÍPICA

Media del Calibrador O.D.	0.34
Factor de Calibración (CF)	0.5
Valor Punto de Corte	0.4
Control Positivo O.D.	1.0
Anticuerpo Índice	3.0
Muestra del Paciente O.D.	0.8
Anticuerpo Índice	4.0

INTERPRETACIÓN

Lo siguiente es una guía para la interpretación de resultados de Virus de Dengue IgG; cada laboratorio deberá establecer su criterio para interpretación basado en sus muestras.

Unidades estándar= (Valor medio de la absorbancia de muestra/ Valor de absorbancia del calibrador) * 10.

INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ÍNDICES

- < 9 Anticuerpo no detectado de Virus de Dengue IgG por ELISA
- 9-11 Sobre el límite positivo se recomienda otra identificación clínica.
- >11 Anticuerpo detectado de Virus de Dengue IgG por ELISA

PERFORMANCE

1. Sensibilidad y Especificidad:

260 pacientes fueron analizados utilizando el presente kit ELISA y un kit ELISA de referencia. 190 sueros resultaron positivos y 68 resultaron negativos por ambos métodos. Las coincidencias entre ambos fueron del 99%. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	Dengue Virus IgG ELISA		
	+	-	Total
ELISA de Referencia	190	1	191
-	1	68	69
Total	191	69	260

2. Precisión:

Estudio Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coficiente de Variación %
1	16	1.98	0.10	5.05
2	16	0.65	0.04	6.15
3	16	0.16	0.01	6.26

Estudio Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coficiente de Variación %
1	10	2.14	0.22	10.28
2	10	0.54	0.04	07.40
3	10	0.15	0.00	13.33

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Para asegurar sensibilidad y especificidad en esta prueba IgG, el diluyente de la muestra provisto fue formulado para bloquear posibles interferencias de IgG y de Factor Reumatoideo (RF). Puede observarse turbidez luego de diluir la muestra, lo que se debe al bloque del suero IgG y no ha demostrado interferencia en los resultados. Dicha turbidez puede ser removida mediante centrifugación.
2. En especímenes con un alto RF y gran presencia de anticuerpos autoinmunes, no puede asegurarse la eliminación de interferencias.
3. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico.
4. Las muestras hemolizadas o lipémicas pueden causar resultados erróneos.

REFERENCIAS

1. Pinheiro FP, Corber SJ: Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. World Health Stat Q 50(3/4):161-169, 1997.
2. Gubler DJ, Trent DW: Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. Infect Agents Dis 2:383-393, 1993.
3. Wu SJ; Hanson B; Paxton H; Nisalak A; Vaughn DW; Rossi C; Henchal EA; Porter KR; Watts DM; Hayes CG. Evaluation of a dipstick enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue virus. Clin Diagn Lab Immunol 1997; 4(4):452-7.
4. Lam SK; Devine PL. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. Clin Diagn Virol 1998; 10(1):75-8.
5. Rossi CA; Drabick JJ; Gambel JM; Sun W; Lewis TE; Henchal EA. Laboratory diagnosis of acute dengue fever during the United Nations Mission in Haiti, 1995-1996. Am J Trop Med Hyg 1998;59(2):275-8