UMELISA DENGUE® IgG

INTERÉS CLÍNICO

El Dengue es una enfermedad febril aguda, de etiología viral que se transmite al hombre por la picadura de mosquitos del género *Aedes* que actúan como vectores de los virus responsables de la enfermedad (1,2). Las infecciones por virus del complejo Dengue (tipos 1 al 4) producen fiebre elevada de comienzo súbito, acompañada de cefalea intensa y mialgias. En ocasiones la infección produce síntomas más severos con manifestaciones hemorrágicas y de shock, casos en los cuales la mortalidad puede ser elevada, particularmente en niños (3). Muchas infecciones por Dengue no dan lugar a la presentación de un cuadro clínico florido y la enfermedad solo puede reconocerse por la presencia de una respuesta específica de anticuerpos y por la viremia. Estos casos, en zonas de alto índice de infestación por mosquitos del género *Aedes* , representan una importante fuente para la transmisión de la enfermedad (4).

El UMELISA DENGUE IgG se utiliza para detectar anticuerpos de la clase IgG contra los cuatro serotipos del virus Dengue en muestras de suero. La detección de anticuerpos IgG al virus Dengue resulta de extrema utilidad tanto en el diagnóstico de casos clínicamente sospechosos (utilizando muestras pareadas), como en los sistemas de vigilancia epidemiológica.

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El **UMELISA DENGUE IgG** es un ensayo inmunoenzimático en su variante de captura, en el cual la fase sólida está constituida por tiras de ultramicroELISA revestidas con anti IgG humana.

Las muestras se incuban en los pocillos y si éstas contienen anticuerpos IgG específicos se fijarán a la anti IgG humana del recubrimiento. A continuación, previo lavado que elimina los componentes no fijados, se añade el antígeno de Dengue seguido nuevamente de incubación y lavado. Se añade entonces un anticuerpo monoclonal murino, específico al virus Dengue, conjugado con fosfatasa alcalina (F.A.). En caso de reacción positiva este anticuerpo marcado se unirá al complejo formado previamente sobre la fase sólida. Un nuevo lavado de la tira eliminará entonces el conjugado en exceso.

Al añadir un sustrato fluorigénico (4-Metilumbeliferil fosfato), éste será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos contra el virus Dengue.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.

Código UM 2026 (288 pruebas)

Contenido:	
Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL
R2: Suero de Carnero.	1 x 18 mL
R3: Control Negativo	1 x 0,5 mL
R4: Control Positivo	1 x 0,5 mL
R5: Antígeno Dengue	3 x Liofilizado
R6: Conjugado	1 x 7,5 mL
R7: Sustrato	1 x 2 mL
R8: Tampón Sustrato	1 x 18 ml

Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante.

Los controles resultaron negativos a las pruebas de detección de anti-VIH 1+2, HBsAg, anti-VHC y Sífilis. El Control Positivo ha sido inactivado por tratamiento térmico.

Preparación de las soluciones de trabajo:

R1: Para una tira de reacción, diluya 1 mL de la solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R2: Diluya 1:4 con solución de trabajo R1. Cantidad necesaria por tira: 2 mL (0,5 mL de R2 + 1,5 mL de R1). Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R3: Listo para usar.

R4: Listo para usar.

R5: Reconstituya con 2 mL de solución de trabajo R2. Cantidad necesaria por tira 0,2 mL.

R6: Listo para usar. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL.

R7: Diluya 1:10 con R8. Cantidad necesaria por tira: 0,5 mL (0,05 mL de R7 + 0,45 mL de R8). Prepare inmediatamente antes de usar y sólo lo necesario para el ensayo.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse de 2 a 8 ºC. En estas condiciones, serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.

Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante dos meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.

Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante dos meses de 2 a 8 ºC en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

El antígeno una vez reconstituido es estable durante 30 días y puede ser conservado de 2 a 8 ºC o a -20 ºC.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.

- Papel absorbente.

- Hipoclorito de Sodio.

- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.

- Pipetas de precisión entre 5 y 1 000 µL.

- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL.

- Incubadora a 37 ± 1 ºC.

PRECAUCIONES

- Antes de comenzar a trabajar verifique que todos los reactivos estén completamente homogéneos y a temperatura ambiente.

- Manipule las muestras y los controles como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.

- Considere a los equipos y accesorios que han estado en contacto directo con las muestras como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza que se recomiendan en los manuales de usuario correspondientes.

- Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta protectora.

- Utilice puntas limpias o nuevas para la reconstitución y trabajo con las soluciones y las muestras.

- No incorpore a los frascos originales remanentes de reactivos.

- Los sueros a utilizar deben ser preferentemente frescos, no inactivados por calor y sin precipitados. Debe evitarse la congelación y descongelación reiterada de las muestras.

- Verifique que todas las tiras de reacción estén bien niveladas en el soporte.

- Evite posibles contaminaciones con materiales fluorescentes.

- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.

- Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo y lavado.

- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.

- El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.

- Los reactivos del **UMELISA DENGUE IgG** de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1.- Preparación de las muestras y controles.

Los controles se presentan en el estuche listos para usar.

Diluya las muestras 1:21 con la solución de trabajo R2 (5 µL de suero + 100 µL de la solución).

2.- Adición de las muestras y controles a las tiras de reacción.

Coloque 10 µL de las muestras previamente diluidas y de los controles sobre los pocillos de reacción, de acuerdo con el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
B	P	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
C	N	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
D	N	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
E	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
F	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

El Control Positivo (P) y el Control Negativo (N) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado . Si utiliza el programa UMELISA DENGUE IgG para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3.- Incubación de las muestras y controles.

Incube las tiras durante 1 hora a 37 ºC en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

4.- Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción seis veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (25 µL). La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

5.- Adición del antígeno.

Añada 10 µL del antígeno en cada pocillo de las tiras de reacción empleando una punta preferiblemente nueva o sólo destinada para este uso.

6.- Incubación del antígeno.

Incube las tiras de reacción 1 hora a 37 ºC en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

7.- Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4 e inmediatamente proceda a añadir el conjugado.

8.- Adición del conjugado.

Con una punta nueva extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras del ensayo y depósitelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de reacción.

9.- Incubación del conjugado.

Incube las tiras de reacción 1 hora a 37 ºC en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

10.- Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

11.- Adición del sustrato.

Coloque 10 µL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de las tiras de reacción.

12.- Incubación del sustrato.

Incube 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (20 – 25 ºC). En estas condiciones se garantiza una señal de fluorescencia del Control Positivo entre 60 y 180 unidades. Sin embargo, debido a las variaciones de temperatura se recomienda que cada laboratorio establezca su propio tiempo de incubación óptimo.

13- Lectura.

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

La validación, interpretación de resultados y su impresión, son efectuados automáticamente por el lector SUMA con el programa UMELISA DENGUE IgG, o pueden hacerse manualmente por el operador siguiendo las instrucciones que se describen a continuación.

CONTROL DE LA CALIDAD

Las condiciones mínimas requeridas para asegurar la calidad del ensayo son las siguientes:

a) Al menos dos de los duplicados del Control Negativo (NN) deben tener un valor de fluorescencia menor de 10 unidades.

b) Al menos uno de los duplicados del Control Positivo (P1 o P2) debe tener un valor de fluorescencia entre 60 y 180 unidades.

c) (NN)/ (P - NN) < 0,1 Donde:

NN: Valor promedio del Control Negativo.

P: Menor valor de fluorescencia de los duplicados del Control Positivo que se encuentre dentro de los límites de calidad.

NIVEL DE CORTE

Las muestras se consideran reactivas cuando:

(Fi-NN)/(P-NN) ³ 0,150

Fi = Fluorescencia de la muestra.

Las muestras se consideran en el umbral de positividad (BL), cuando sus resultados se encuentran en una zona comprendida entre el nivel de corte y un 15 % por debajo del mismo (“zona gris").

Para definir de una forma rápida el nivel de corte y el límite inferior de la “zona gris” cuando no se dispone del programa automático, se calcula de la siguiente forma:

$$FNC = 0{,}1500\ (P\text{-}NN) + NN$$

$$FBL = 0{,}1275\ (P\text{-}NN) + NN$$

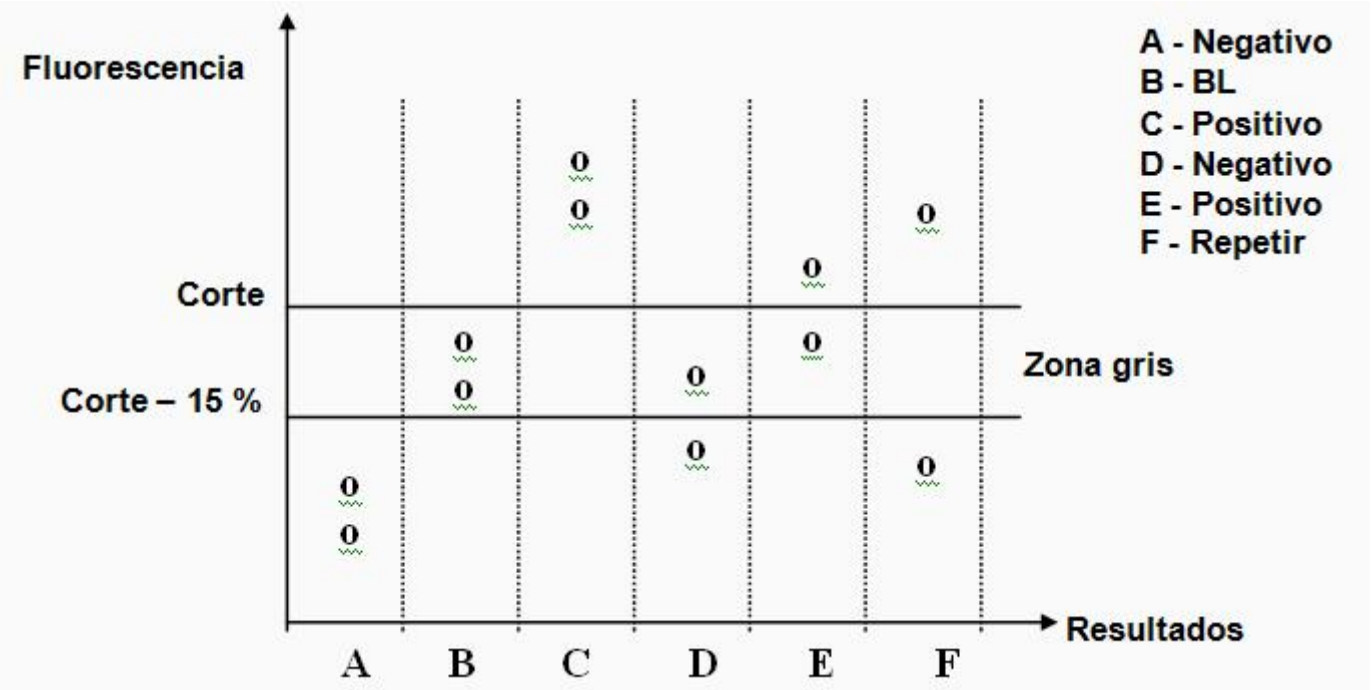
Donde:

FNC = Valor de la fluorescencia correspondiente al nivel de corte.

FBL = Valor de la fluorescencia correspondiente al límite inferior de la “zona gris”

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

I- Muestras analizadas por duplicado



II-Muestras analizadas de forma simple:

-Si se obtienen valores menores que el límite inferior de la “zona gris” la muestra se considera no reactiva.

-Si una muestra presenta valores mayores o iguales que el nivel de corte, se considera reactiva **("POSITIVO")** .

-Si una muestra se encuentra en la “zona gris” **(“BL”)** se considera en el umbral de la positividad.

Se recomienda que toda muestra con resultado **("POSITIVO")** o **(“BL”)** se repita antes de realizar una interpretación, utilizando la fuente original.

Para aquellos casos que hayan resultado repetidamente BL, se recomienda tomar otra muestra al menos siete días después de la primera, para establecer un diagnóstico más certero.

Las muestras que resulten repetidamente reactivas tienen alta probabilidad de contener anticuerpos de la clase IgG específicos al virus Dengue.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

La evaluación de estos parámetros, llevada a cabo en el Instituto Mexicano del Seguro Social, se realizó utilizando muestras positivas a IgG anti-Dengue, muestras positivas a IgM anti-Rubeola y muestras procedentes de donantes de sangre. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Total de muestras evaluadas	VP	FN	VN	FP	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
467	99	2	360	6	98,01	98,36	96,19	99,44

VP: Verdaderos Positivos **FN:** Falsos Negativos **VN:** Verdaderos Negativos

FP: Falsos Positivos **S:** Sensibilidad **E:** Especificidad

VPP: Valor Predictivo Positivo **VPN:** Valor Predictivo Negativo

---

BIBLIOGRAFÍA

1.- Gublen, D. J.: Current research on Dengue Current topics in Vector Research. 3:37-56, 1987.

2.- Halstead, S. B.: Viral hemorrhagic fevers. J Infect Dis 143: 127-129, 1981.

3.- WHO (1985) Arthropod-Borne and Rodent-Borne Viral Disease. Report of a WHO Scientific Group. Technical report series # 719. Geneva: World Health Oganization.

4.- Halstead, S. B.: The XX th century Dengue pandemic: need for surveillance and research. Wld hlth statist quart, 45:292-297, 1989.

5.- Innis, B. L., et al: An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize Dengue infections where Dengue and Japanese encephalitis co-circulate. Am J Trop Med Hyg 40:418-427, 1989.

Octubre 21, 2004.

UMELISA DENGUE IgG

CODIGO UM 2026

Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653. La Habana, Cuba. Teléfono: 208-2929. Fax: (537) 208-6514.

Fuente: http://www.tecnosuma.com/Informacion/Inserts%20(html)/UMELISA%20IgG.htm