

# Dengue Virus IgM

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para  
la determinación cualitativa de  
anticuerpos IgM frente al virus del  
dengue en plasma y suero humanos.**

- Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro" -



**DIA.PRO**

**Diagnostic Bioprobes Srl  
Via G. Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

Correo electrónico: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF DENM.CE  
96 pruebas

## IgM frente al virus del dengue

### A. USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM frente a los subtipos 1, 2, 3 y 4 del virus del dengue en plasma y suero humanos de pacientes con sospecha de padecer una infección en curso de virus del dengue o en riesgo de padecerla.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

### B. INTRODUCCIÓN.

**El virus del dengue** es un miembro de la familia de virus *Flaviviridae* y se transmite a personas por la picadura de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

Cada año se infectan 100 millones de personas con el virus del dengue. Sin embargo, la mayoría de fallecimientos provocados por la infección del dengue son a causa de la Fiebre hemorrágica del dengue (DHF) y el Síndrome del shock por dengue (DSS).

El periodo de incubación del dengue clásico es de aproximadamente cuatro días. Es difícil distinguir el dengue clásico de otras enfermedades víricas y la persona normalmente se recupera en cinco días.

La DHF tiene un periodo de incubación similar al dengue clásico y muchos de los síntomas son iguales. No obstante, la fiebre es más severa y la somnolencia y el letargo son más extremos. Ello puede provocar que el individuo pierda volumen de sangre, ocasionando hipotensión, entrada en shock (DSS) y muerte.

Es importante entender por qué un individuo desarrollará DHF/DSS. Se ha descubierto que el virus del dengue tiene 4 subtipos. Esos 4 subtipos son cepas diferentes de virus del dengue que presentan una homología del 60-80% entre ellas. Cuando alguien se infecta con dengue desarrolla una respuesta inmunitaria a ese subtipo de dengue. La respuesta inmunitaria produce anticuerpos específicos frente a proteínas de la superficie de dicho subtipo que impiden que el virus se una a macrófagos (la célula diana que infectan los virus del dengue) y consiga entrar. Pero si otro subtipo de virus del dengue infecta al individuo, el virus activará el sistema inmunitario para atacarlo como si fuera el primer subtipo. Se engaña al sistema inmunitario porque los 4 subtipos tienen antígenos de superficie muy similares. Los anticuerpos se unen a las proteínas de superficie pero no inactivan el virus. La respuesta inmunitaria atrae a numerosos macrófagos, a los que infectará el virus porque no ha sido inactivado. Esta situación se conoce como incremento (o amplificación) dependiente de anticuerpos (ADE) de una infección vírica. Hace que la infección vírica sea mucho más aguda. El cuerpo libera citocinas que provocan que el tejido endotelial se convierta en permeable, lo que provoca fiebre hemorrágica y pérdida de líquidos de los vasos sanguíneos.

### C. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con antígenos del virus del dengue recombinantes, inmunodominantes y altamente purificados, expresando los epítomos inmunodominantes de los 4 serotipos.

En la 1ª incubación, la fase sólida se trata con muestras diluidas y los IgM anti virus del dengue son capturados, si los hay, por los antígenos.

Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la 2ª incubación se detectan IgM anti virus del dengue unidos mediante la adición de anticuerpo anti hIgM, marcado con peroxidasa (HRP).

La enzima capturada en la fase sólida, combinada con la mezcla substrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos anti IgM contra el virus del dengue presente en la muestra.

La neutralización de IgG anti-virus del dengue, que se lleva a cabo directamente en el pocillo en la 1ª incubación, se realiza

en el ensayo para bloquear interferencias debidas a esta clase de anticuerpos en la determinación de IgM.

### D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

#### 1. Microplaca: **MICROPLATE**

12 tiras x 8 micropocillos recubiertos con antígenos del virus del dengue recombinantes expresando los epítomos inmunodominantes de los 4 serotipos. Las placas están en una bolsa sellada con desecante. Dejar la microplaca a temperatura ambiente antes de abrirla, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y conservar a 4 °C.

#### 2. Control negativo: **CONTROL**

1x2,0 ml/vial. Listos para el uso. Codificado con color amarillo pálido.

Contiene suero humano diluido negativo para IgM anti virus del dengue, 2% de caseína, tampón de citrato sódico 10 mM a pH 6.0+/-0.1, 0.1% de Tween 20, además de azida sódica al 0.09% y Kathon GC al 0.1% como conservantes.

#### 3. Control positivo: **CONTROL+**

1x2,0 ml/vial. Listos para el uso. Codificado con color verde.

Contiene suero humano diluido positivo para IgM anti virus del dengue, 2% de caseína, tampón de citrato sódico 10 mM a pH 6.0+/-0.1, 0.1% de Tween 20, además de azida sódica al 0.09% y Kathon GC al 0.1% como conservantes.

#### 4. Solución de lavado concentrada: **WASHBUF 20X**

1x60 ml/botella. Solución concentrada 20x. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7,0+/-0,2, 0,05% de Tween 20 y Kathon GC al 0,05%.

#### 5. Conjugado enzimático: **CONJ**

1x16 ml/vial. Listo para el uso y codificado con color rojo. Contiene anticuerpos policlonales anti IgM humano conjugados con peroxidasa (HRP), 5% de albúmina de suero bovino (BSA), tampón Tris 10 mM a pH 6,8+/-0,1, Kathon GC al 0,1% y sulfato de gentamicina al 0,02% como conservantes.

#### 6. Cromógeno/Substrato: **SUBS TMB**

1x16 ml/vial. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3,5-3,8, dimetilsulfóxido 4%, tetra-metil-benzidina (TMB) 0,03% y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,02%.

**Nota: Evitar la exposición a la luz ya que la sustancia es fotosensible.**

#### 7. Ácido sulfúrico: **H2SO4 0,3 M**

1x15 ml/vial. Contiene solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M.

Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

#### 8. Diluyente de muestras: **DILSPE**

2x60ml/vial. Contiene 2% de caseína, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0+/-0,1, 0,1% de Tween 20, azida sódica al 0,09 % y Kathon GC al 0,1% como conservantes. Utilizar para diluir la muestra.

#### 9. Reactivo neutralizante: **SOLN NEUT**

1x8 ml/vial. Contiene anti-hIgG de cabra, 2% de caseína, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0+/-0,1, 0,1% de Tween 20, azida sódica al 0,09% y Kathon GC al 0,1% como conservantes.

#### 10. Sellador adhesivo n.º 2

#### 11. Manual de instrucciones n.º 1

#### E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (1000, 100 y 10 µl) y puntas de plástico desechables
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar los oxidantes químicos usados como desinfectantes)
3. Temporizador con un rango de 60 minutos como mínimo
4. Papel absorbente
5. Incubadora termostática de microplacas ELISA calibrada (en seco o húmedo), ajustada a +37 °C (+/-0,5 °C de tolerancia)
6. Lector calibrado de micropocillos ELISA con filtros de 450 nm (lectura) y 620-630 nm (blanco)
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA
8. Vórtex o similar.

#### F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

##### Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

1. El equipo solo debe ser utilizado por personal técnico adecuadamente formado e instruido, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). Todo el personal involucrado debe tener formación en procedimientos de bioseguridad, como recomienda el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y como ha publicado el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra VHB y VHA, para lo cual existen vacunas disponibles que son seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al abrir los viales del equipo y las microplacas, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno (TMB) a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Tras la recepción, conservar el equipo a una temperatura entre 2 y 8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en una cámara de refrigeración.
6. No intercambiar componentes de lotes distintos, ni tampoco de dos equipos del mismo lote.
7. Comprobar que los reactivos estén limpios y no contengan partículas pesadas visibles ni agregados. Si no es así, informar al supervisor del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente para reemplazar el equipo.
8. Evitar la contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
9. Evitar la contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas internas (viales) y en las etiquetas del envase externo. Según un estudio realizado en equipos abiertos, no se ha detectado ninguna pérdida relevante de actividad hasta 6 usos del dispositivo y hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Todas las muestras de suero humano deben manipularse de acuerdo con el nivel 2 de bioseguridad, según ha recomendado el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, EE.UU., de conformidad con lo publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. Se recomienda utilizar material plástico desechable para preparar los componentes líquidos o transferir los componentes a los equipos automatizados a fin de evitar la contaminación cruzada.

13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben eliminarse según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos procedentes del proceso de lavado, de restos de controles y de muestras deben tratarse como potencialmente infecciosos e inactivarse antes de su eliminación. Se recomienda la inactivación con lejía al 10 % durante 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, debe utilizarse papel absorbente empapado en lejía y, posteriormente, en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Los demás materiales de desecho que se generan durante la utilización del equipo (por ejemplo, puntas usadas en las muestras y controles, microplacas usadas) deben manipularse como si se tratase de fuentes potenciales de infección y deben eliminarse de acuerdo con las directivas nacionales y las leyes relativas al tratamiento de residuos de laboratorio.

#### G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar del laboratorio de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte a las muestras.
2. Las muestras deben identificarse claramente mediante códigos de barras o nombres a fin de evitar una interpretación errónea de los resultados. Se recomienda el uso de código de barras y lectura electrónica.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben descartarse para evitar falsos resultados, al igual que aquellas que contengan restos de fibrina, partículas pesadas o filamentosos y organismos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C hasta 5 días después de la extracción. Para períodos de conservación más largos, las muestras pueden almacenarse congeladas a -20 °C durante varios meses. Evitar congelar/descongelar cada muestra más de una vez, ya que pueden generarse partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

#### H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES

##### Microplaca:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de conservación.

De ser así, llamar al servicio de atención al cliente de Dia.Pro. Las tiras no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante entre +2° y +8°C. Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad incluido en la bolsa del desecante cambia de amarillo a verde.

##### Controles

Listos para el uso. Mezclar bien antes de usar.

##### Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse con cuidado antes de usarse.

Doc.:	INS DENM.CE/Esp	Página	4 de 7	Rev.: 6	Fecha: 2019/05
-------	-----------------	--------	--------	---------	----------------

Durante la preparación, evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

**Nota:** Una vez diluida, la solución de lavado es estable durante una semana entre +2...+8° C.

#### Conjugado enzimático:

Listos para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el componente, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

#### Cromógeno/Substrato:

Listos para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz intensa, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el componente, usar solo contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

#### Diluyente de muestras

Componente listo para usar. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

#### Reactivo neutralizante

Listos para el uso. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

#### Ácido sulfúrico:

Listos para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

**Frases H** de advertencia:

**H315** – Provoca irritación cutánea.

**H319** – Provoca irritación ocular grave.

**Consejos P** de prudencia:

**P280** – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

**P302 + P352** – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

**P332 + P313** – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

**P305 + P351 + P338** – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

**P337 + P313** – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

**P362 + P363** – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

## I. INSTRUMENTOS Y HERRAMIENTAS UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO

- Las **micropipetas** deben estar calibradas para dispensar el volumen correcto requerido en el ensayo y deben someterse a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol de uso doméstico, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/-2%. También se debe llevar a cabo de forma regular la descontaminación de derrames o residuos de los componentes del equipo.
- La **incubadora ELISA** debe ajustarse a 37 °C (+/-0,5 °C de tolerancia) y controlarse periódicamente para mantener la

temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua, siempre que estén homologados para la incubación de pruebas ELISA.

- El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. Antes de emplearse en los ensayos habituales del laboratorio, el lavador debe comprobarse cuidadosamente y optimizarse de forma correcta usando los controles del equipo y los paneles de referencia pertinentes. Para asegurarse de que el ensayo se realice conforme a lo esperado, normalmente basta con 4-5 ciclos de lavado (aspiración + dispensación de 350 µl/pocillo de solución de lavado = 1 ciclo). Se recomienda un tiempo de remojo entre ciclos de 20-30 segundos. Para establecer correctamente su número, se recomienda efectuar un ensayo con los controles del equipo y muestras positivas y negativas de referencia bien caracterizadas, tratando de ajustarlas a los valores indicados en la sección O "Control de calidad interno". La calibración periódica del volumen a dispensar (descontaminación y lavado de las agujas) debe hacerse según las instrucciones del fabricante.
- Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5 %.
- El **lector de microplacas ELISA** debe estar provisto de un filtro de lectura de 450 nm y de un segundo filtro (620-630 nm, altamente recomendado) para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10 nm; b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2,0; c) Linealidad ≥ 2,0; Reproducibilidad ≥ 1%. La lectura del blanco se lleva a cabo en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe calibrarse periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente, debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
- En caso de usar un **sistema automatizado ELISA**, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente establecidos, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control de calidad interno". El protocolo del ensayo debe instalarse en el sistema operativo de la unidad y corroborarse tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe homologarse y configurarse correctamente. Debe prestarse especial atención para evitar el arrastre causado por las agujas de dispensación y de lavado a fin de minimizar la posibilidad de contaminar los pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados ELISA cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
- El servicio de atención al cliente de Dia.Pro ofrece apoyo al usuario para ajustar y comprobar los instrumentos usados en combinación con el equipo con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requisitos descritos. También se ofrece apoyo para instalar los nuevos instrumentos que se van a usar con el equipo.

## L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO

- Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa del equipo (envase principal). No usar si ha caducado.
- Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados visibles.
- Comprobar que el cromógeno (TMB) sea incoloro o azul pálido aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico.
- Comprobar que no se hayan producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte (envase principal). Comprobar que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté perforada ni dañada.
- Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20x como se ha descrito anteriormente.

- Dejar los componentes restantes hasta que alcancen la temperatura ambiente (aprox. 1 hora) y luego mezclar suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
- Ajustar la incubadora ELISA a 37 °C y cargar el lavador ELISA con la solución de lavado diluida según las instrucciones del fabricante. Establecer el número correcto de ciclos de lavado de acuerdo con los parámetros de validación del instrumento para usarlo con el equipo.
- Comprobar que el lector ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
- En caso de usar un sistema automatizado, encenderlo, comprobar la configuración y asegurarse de usar el protocolo de ensayo adecuado.
- Comprobar que las micropipetas estén ajustadas en el volumen requerido.
- Asegurarse de que el resto del equipamiento esté disponible y listo para el uso.
- En caso de que surja algún problema, detener el ensayo y avisar al responsable.

#### M. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO

El ensayo debe realizarse de acuerdo con las instrucciones que se indican a continuación, teniendo cuidado de mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

##### M1. Protocolo de ensayo para pruebas de IgM de DNGV con sospecha de una infección en curso de virus del dengue

- Diluir las muestras en una proporción 1:101 en un tubo de dilución adecuadamente definido (por ejemplo: 1000 µl de diluyente de muestras + 10 µl de muestra). No diluir los controles, ya que están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos los componentes líquidos en un vórtex y después proceder como se describe a continuación.
- Poner el número de micropocillos necesarios en el soporte. Dejar el pocillo A1 vacío para la operación de blanco.
- Dispensar 50 µl de reactivo neutralizante en todos los pocillos, excepto A1, usado para operaciones de blanco.
- Dispensar 100 µl de control negativo por duplicado, 100 µl de control positivo por duplicado y 100 µl de muestras diluidas en cada pocillo adecuadamente identificado.
- Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37 °C**.

**Nota importante:** Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace el ensayo manualmente. No cubrir las tiras cuando se empleen instrumentos automatizados ELISA.

- Lavar la microplaca con el lavador automático como se indica más arriba (sección I.3).
- Dispensar 100 µl de conjugado en cada pocillo, excepto en el pocillo A1, y cubrir con el sellador. Comprobar que este componente de color rojo se haya dispensado en todos los pocillos excepto el A1.

**Nota importante:** Tener cuidado de no tocar la pared interna de plástico del pocillo con la punta de la pipeta que contiene el conjugado. Podría producirse contaminación.

- Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37 °C**.
- Lavar los micropocillos del mismo modo que en el paso 6.
- Dispensar 100 µl de la mezcla cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluido el pocillo para el blanco. Incubar después la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) en la oscuridad durante 20 minutos**.

**Nota importante:** No exponer a luz intensa directa. De lo contrario, se puede generar un fondo excesivo.

- Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos usando la misma secuencia que en el paso 9. La adición del

ácido cambia el color del control positivo y las muestras positivas de azul a amarillo.

- Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se describe en la sección I.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (sustracción del fondo, altamente recomendado), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

**Nota importante:** Este procedimiento proporciona la mayor sensibilidad.

Recomendado para la detección de IgM en infección aguda.

##### M2. Protocolo de ensayo para pruebas habituales genéricas de laboratorio de IgM de DNGV en ausencia de síntomas clínicos de infección en curso (corto)

Proceda como en el protocolo anterior aunque acorte los tiempos de incubación a **45 min** (incubación de muestra / punto 5) + **45 min** (incubación de conjugado / punto 8) + **15 min** (TMB / punto 10)

**Nota importante:** Este procedimiento proporciona la mayor especificidad. Recomendado para monitorización durante el embarazo y para propósitos de cribado general

##### Notas generales importantes:

- Si no se puede utilizar el segundo filtro, asegurarse de que no haya huellas dactilares en el fondo de los pocillos antes de la lectura a 450 nm. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de interrupción y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos desde su adición. Se podría producir alguna auto oxidación del cromógeno, causando una elevada actividad de fondo.

#### N. ESQUEMAS DEL ENSAYO

Método con sospecha de infección aguda	Operaciones
Reactivo neutralizante	50 µl
Controles negativo y positivo	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
<b>1ª incubación</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	4-5 ciclos
Conjugado enzimático	100 µl
<b>2ª incubación</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	4-5 ciclos
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl
<b>3ª incubación</b>	<b>20 min</b>
Temperatura	t.a.
Ácido sulfúrico	100 µl
Lectura DO	450 nm

Método corto	Operaciones
Reactivo neutralizante	50 µl
Controles	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
<b>1ª incubación</b>	<b>45 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	4-5 ciclos
Conjugado enzimático	100 µl
<b>2ª incubación</b>	<b>45 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	4-5 ciclos
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl
<b>3ª incubación</b>	<b>15 min</b>
Temperatura	t.a.
Ácido sulfúrico	100 µl
Lectura DO	450 nm

A continuación se incluye un ejemplo del esquema de dispensación:

		Microplaca											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M4											
B	CN	M5											
C	CN	M6											
D	CP	M7											
E	CP	M8											
F	M1	M9											
G	M2	M10											
H	M3	M11											

Leyenda: BL = Blanco CN = Control negativo  
CP = Control positivo Mn = Muestras

#### O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Siempre que se utiliza el equipo se hace una comprobación de validación con el fin de verificar si el rendimiento del ensayo es el previsto y exigido por la directiva IVDD 98/79/CE. Controlar que los datos siguientes coinciden:

Parámetro	Requisitos
Pocillo de blanco	Valor < 0,100 DO 450 nm
Control negativo	< 0,150 DO 450 nm
Control positivo	≥ 0,500 DO 450 nm

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pasar a la siguiente sección.

En caso contrario, no continuar y hacer lo siguiente:

Problema	Comprobar
<b>Pocillo de blanco</b> > 0,100 DO 450 nm	1. la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo;
<b>Control negativo</b> > 0,150	1. el procedimiento de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en el estudio previo de calificación; 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y el lavador se ha alimentado con la misma antes del uso; 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el calibrador positivo en lugar del negativo); 4. no ha existido contaminación del calibrador negativo ni de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas o al conjugado; 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas ni con el conjugado; 6. las agujas del lavador no están parcial o totalmente obstruidas
<b>Control positivo</b> < 0,500	1. el procedimiento se ha ejecutado correctamente; 2. no se han cometido errores en su distribución (p. ej.: dispensar un calibrador equivocado); 3. el procedimiento de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en el estudio previo de calificación; 4. que no se haya producido contaminación externa del calibrador.

Si se produce alguno de estos problemas, informar al responsable tras la comprobación para tomar las medidas pertinentes.

#### P. RESULTADOS

Si la prueba es válida, los resultados se calculan a partir del valor medio de DO 450 nm del control negativo (CN), mediante un valor de corte (Co) determinado con la siguiente fórmula:

### Valor de corte = CN + 0,250

**Nota importante:** Cuando el cálculo de los resultados se realiza mediante el sistema operativo de un equipo ELISA automático, hay que asegurarse de que la formulación usada para la interpretación de los resultados sea correcta.

#### Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los resultados se realiza mediante la relación entre el valor de DO 450 nm de la muestra (M) y el valor de corte (Co), o M/Co. Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

M/Co	Interpretación
< 0,9	Negativo
0,9 – 1,0	Equívoco
> 1,0	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no ha desarrollado anticuerpos IgM frente al virus del dengue.

Los pacientes cuya muestra resulte dudosa deben someterse a una nueva prueba con una segunda muestra tomada 1 o 2 semanas después de la inicial.

Un resultado positivo es indicativo de una infección en curso por virus del dengue y, por lo tanto, el paciente debe ser tratado en consecuencia.

#### Notas importantes:

1. En principio, cualquier posible muestra debe ser probada una segunda vez y si vuelve a dar positiva, debe enviarse a un ensayo de confirmación basado en un producto IVD apropiado de características similares.  
RT-PCR solo se recomienda al comienzo de la fase de infección aguda cuando el ARN pasa a ser detectable únicamente durante algunos días desde el evento. RT-PCR no es definitivamente un ensayo de confirmación para IgG o en todo caso en la etapa pos-aguda. De hecho, tanto IgM (durante un tiempo más corto) e IgG (para otro bastante más largo) pueden estar presentes en la fase pos-aguda, incluso en ausencia de ARN.
2. Cualquier muestra negativa en presencia de signos clínicos evidentes de infección debe enviarse para su confirmación con un producto IVD apropiado de características similares.
3. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio e interpretación.
4. Cuando se transmiten los resultados de la prueba del laboratorio a un centro informático, debe prestarse mucha atención para evitar la transferencia de datos erróneos.
5. El diagnóstico de infección debe ser realizado y comunicado al paciente solo por un médico cualificado, teniendo en cuenta síntomas clínicos y evidencias de anamnesis.

A continuación se describe un ejemplo de los cálculos a realizar.

Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio.

Control negativo: 0,080 – 0,120 – 0,080 DO 450 nm  
Valor medio: 0,100 DO 450 nm  
Menor de 0,150 – Válido  
Control positivo: 1,000 DO 450 nm  
Mayor de 0,500 – Válido  
Valor de corte = 0,100+0,250 = 0,350  
Muestra 1: 0,080 DO 450 nm  
Muestra 2: 1,800 DO 450 nm  
Muestra 1: S/Co < 0,9 = negativa  
Muestra 2: S/Co > 1,0 = positiva

## R. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

La evaluación del rendimiento ha sido realizada en paneles de muestras positivas y negativas con respecto a un equipo de referencia con marca CE.

### 1. Sensibilidad y especificidad diagnóstica:

La **Sensibilidad** diagnóstica se calculó en un panel de muestras positivas derivadas de personas que padecían infección por virus del dengue en fase inicial.

Se observó un valor de > 98% en relación con el equipo de referencia.

La **Especificidad** diagnóstica fue calculada en un panel de muestras derivadas de personas normales de origen europeo, sin flavivirus, y por lo tanto sin ningún signo de infección anterior de virus del dengue y respuesta negativa con un dispositivo de referencia.

Se observó un valor de > 98%.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

La especificidad del ensayo con respecto a otros miembros de los flavivirus y del virus Chikungunya se indica en el apartado "S. Limitaciones" que se incluye más abajo.

### 2. Reproducibilidad:

Se realizó un estudio con dos muestras de diferente reactividad IgM anti virus del dengue, examinadas en 16 réplicas, en tres tandas separadas. Los valores CV% obtenidos oscilan entre 10% y 20% según las lecturas de DO450nm.

La variabilidad mostrada en las tablas no dio como resultado una clasificación errónea de las muestras.

## S. LIMITACIONES

A causa de la consabida alta homología genética existente entre el virus del dengue y otros flavivirus, como el virus Zika y el virus del Nilo Occidental, además del virus Chikungunya, podrían observarse reacciones cruzadas en las poblaciones a las que afectan tales infecciones (principalmente personas de Sudamérica infectadas con el virus del dengue y el virus Zika desde hace años).

En principio, el ensayo solo debería utilizarse en personas que cumplan los requisitos clínicos del virus del dengue del CDC (por ej., signos y síntomas clínicos asociados con la infección por el virus del dengue) y/o epidemiológicos del virus del dengue del CDC en presencia de síntomas (por ej., haber residido o viajado a una región geográfica con riesgo real de contagio del virus del dengue durante el periodo del viaje, u otros criterios epidemiológicos de detección de este virus).

Los resultados del ensayo son útiles para la supuesta identificación de anticuerpos IgM contra el virus del dengue. Los resultados positivos y dudosos no se consideran concluyentes en el diagnóstico de la infección por el virus del Dengue. Estos resultados deben confirmarse con arreglo a las indicaciones del CDC (en particular, mediante un ensayo de neutralización).

Según estimaciones, se obtuvieron falsos positivos repetibles, no confirmados mediante otro ensayo ELISA, en menos del 2% de la población exenta de flavivirus normales y del virus de Chikungunya a causa de sustancias interferentes no identificadas.

En la población sana de Sudamérica se ha visto que la presencia de reacciones de falsos positivos es ligeramente superior debido a reacciones cruzadas con otro microorganismo endémico.

Se ha observado que las muestras congeladas que contienen partículas de fibrina o agregados generan algunos resultados falsos tras descongelarse. Estas muestras solo deben analizarse tras aclararlas por filtración o centrifugado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Hapugoda MD, Batra G, Abeyewickreme W, Swaminathan S, Khanna N. Single antigen detects both immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies elicited by all four dengue virus serotypes. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Nov;14(11):1505-14. Epub 2007 Sep 26.
- Kumarasamy V, Chua SK, Hassan Z, Wahab AH, Chem YK, Mohamad M, Chua KB. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. *Singapore Med J.* 2007 Jul;48(7):669-73.
- Chen YC, Huang HN, Lin CT, Chen YF, King CC, Wu HC. Generation and characterization of monoclonal antibodies against dengue virus type 1 for epitope mapping and serological detection by epitope-based peptide antigens. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Apr;14(4):404-11. Epub 2007 Feb 7.
- Ageep AK, Malik AA, Elkarsani MS. Clinical presentations and laboratory findings in suspected cases of dengue virus. *Saudi Med J.* 2006 Nov;27(11):1711-3.
- Falconar AK, de Plata E, Romero-Vivas CM. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Sep;13(9):1044-51.
- Tran TN, de Vries PJ, Hoang LP, Phan GT, Le HQ, Tran BQ, Vo CM, Nguyen NV, Kager PA, Nagelkerke N, Groen J. Enzyme-linked immunoassay for dengue virus IgM and IgG antibodies in serum and filter paper blood. *BMC Infect Dis.* 2006 Jan 25;6:13.
- Anandarao R, Swaminathan S, Fernando S, Jana AM, Khanna N. Recombinant multi-epitope protein for early detection of dengue infections. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Jan;13(1):59-67.
- Vázquez S, Pérez AB, Ruiz D, Rodríguez R, Pupo M, Calzada N, González L, González D, Castro O, Serrano T, Guzmán MG. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol.* 2005 Jun;33(2):132-7. Epub 2004 Dec 18.
- De Paula SO, Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis.* 2004 Dec;8(6):390-8. Epub 2005 May 9. Review.
- Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005 Feb;38(1):5-16. Review.

Todos los productos IVD que fabrica la empresa están sujetos a control mediante un sistema de gestión de calidad certificado conforme con la norma 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se comercializa solamente si cumple las especificaciones técnicas y los criterios de aceptación de la CE.

Fabricante  
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.  
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italia

