



DENGUE IgG ELISA KIT (SERUM / PLASMA)



REF E0311



USO

La Prueba ELISA *Aria* Dengue IgG es un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas para la detección cualitativa de IgG anti dengue virus (DEN1, 2, 3, 4) en suero o plasma humana. Está diseñado para ser usado por profesionales en el diagnóstico de la infección aguda con virus dengue.

INTRODUCCIÓN

El virus del dengue, un virus envuelto ARN monocatenario positivo que pertenece a la familia *Flaviviridae* y se puede clasificar en cuatro serotipos distintos (DEN1, 2, 3, 4). Los virus son transmitidos por mosquitos, principalmente el *Aedes aegypti*, y *Aedes albopictus*. Hoy, más de 2.5 billones de personas que viven en áreas tropicales de Asia, África, Australia, y las Américas están en riesgo de infectarse por dengue. Se estima que 67-136 millones de casos de fiebre del dengue y 20,000 muertes ocurren anualmente en el mundo^{1,2}.

La detección serológica es un método común para diagnosticar la infección del virus. Durante la infección primaria, el anti virus dengue IgG comienza a aparecer de 4-6 días tras el comienzo de la fiebre. Alcanza su máximo tras aproximadamente 2 semanas y permanece en circulación por 2-3 meses^{4,5}. Los niveles de IgG anti dengue virus comienzan a aumentar lentamente, alcanzan su máximo entre 14-21 días y decrecen a niveles bajos que persisten durante toda la vida⁶.

Durante la infección secundaria frecuentemente se observa un aumento de anticuerpos IgG. Niveles de IgG se puede detectar desde 3 días tras el comienzo de síntomas. Los niveles de anticuerpos IgG aumentan a niveles más altos que en una infección primaria⁷. Importante, anticuerpos anti dengue IgG aumentan más temprano o simultáneamente con anticuerpos IgM, y a niveles más altos durante una infección secundaria^{4,8}.

La Prueba ELISA *Aria* Dengue IgG usa antígenos anti dengue recombinantes de dengue para detectar anticuerpos IgG específicamente para los 4 tipos de serotipos de dengue (DEN1, 2, 3, 4).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La Prueba ELISA *Aria* Dengue IgG es un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas basado en el principio de metodología de capturar inmunoensayos para la detección del IgG anti dengue virus en suero o plasma humana.

La Prueba ELISA *Aria* Dengue IgG está compuesta por dos partes claves:

- 1) Micropozos pre cubiertas con anticuerpo IgG monoclonal de ratón anti humano.
- 2) Líquido de trabajo conjugado compuesto por antígenos de dengue y conjugados HRP anti dengue.

Durante el ensayo, la muestra se incuba en los micropozos de las tiras. Si anti dengue IgG está presente en la muestra, se une con anticuerpos IgG anti humanos cubiertos en el micropozo y todas de las muestras no unidas se eliminan luego por una etapa de lavado.

Durante una incubación secundaria de HRP solución de trabajo conjugada, el anti dengue IgG en la superficie del micropozo se une a los conjugados por un antígeno dengue la cual forma un conjugado complejo. Todas muestras no unidas se remueven por una etapa de lavado. Después de agregar el sustrato TMB, la presencia del conjugado complejo se demuestra por el color azul, resultando de la reacción entre enzima y sustrato. La reacción la reacción se detiene con solución de parada y la absorbencia (DO) se lee en un espectrofotómetro a 450/620-690 nm.

MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales y reactivos suministrados

No.	Descripción	Cantidad	Catálogo
1	Tiras pre cubiertas anti dengue IgG	8 pozos x 12 tiras	E0311W
2	Antígeno dengue liofilizado	3 frascos	E0311Ag
3	Conjugados HRP anti dengue (concentración 100X)	0.2 mL	E0311H
4	Diluyente de enzima	15 mL	E0311ED
5	Control positivo dengue IgG	0.2 mL	E0311P
6	Control negativo dengue IgG	0.2 mL	E0311N
7	Diluyente de muestra	2x30 mL	E0311SD
8	Tampón de lavado (concentración 30X)	25 mL	WF3001-25
9	Sustrato A TMB	6 mL	TMB3001A
10	Sustrato B TMB	6 mL	TMB3001B
11	Solución de parada	13 mL	WF3002
12	Hoja de trabajo	1	E0311ES
13	Inserto de producto	1	WF3003
Otros	3 x Selladores de microplacas y 1 Bolsa Ziploc		

Materiales y reactivos requeridos pero no suministrados

1. Pipeta capaz de dispensar volúmenes de 5 µL, 50 µL y 100 µL con precisión superior a 98.5%
2. Lector de placas con ancho de banda de 10nm o menos con rango de densidad óptica de 0-3 DO o más a 450 nm
3. Papel secante para escurrir las tiras
4. Cronómetro
5. Agua destilada o des-ionizada

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos, excepto los conjugados HRP anti dengue y el tampón de lavado concentrado, se suministran listos para su uso. Almacene todos los componentes a 2-8°C. No congelar. Asegúrese de llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de usarlos. Devuelva todos los reactivos a refrigeración de 2-8°C inmediatamente después de uso. Guarde los micropozos no usados en la bolsa zip-lock suministrada con desecante. Si no se abren, todos los reactivos son estables hasta la fecha de expiración demostrada en la etiqueta de la caja. A partir de su apertura, la estabilidad de los componentes es 8 semanas a 2-8°C, o hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta más temprana.

COLECCIÓN MANIPULACIÓN DE LA MUESTRA

1. El suero o plasma debe ser preparado a partir de muestras de sangre obtenidas por técnicas adecuadas.
2. Esta prueba está diseñada para muestras de suero o plasma sin aditivos.
3. Referir a la muestra entre 2-8°C si no se va a ensayar inmediatamente. Si se prevé un periodo de almacenamiento superior a 3 días, la muestra debe ser congelada (-20°C). Evite la congelación/descongelación repetida de las muestras. Si la muestra va a ser transportada, empáquela de acuerdo a las regulaciones para el transporte de agentes etiológicos.
4. Las muestras con microglocias pueden dar resultados no consistentes. Clarifique estas muestras por centrifugación antes de su ensayo.
5. No use muestras con altos grados de lipemia, hemolisis o turbidez. No use muestras con acida sódica.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS ANTES DEL ENSAYO

1. Lleve todos los reactivos y controles a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Determine los volúmenes de la solución de trabajo conjugada y el tampón de lavado. Cada tira de micropozo requiere 900 µL de solución de trabajo conjugado y 50 mL de tampón de lavado.
3. **Preparación del antígeno dengue reconstituido**
 - 3.1 Golpee ligeramente el frasco del antígeno dengue para coleccionar todo el polvo del antígeno liofilizado. Transfiere 2.0 mL de diluyente de enzima a cada frasco de antígeno dengue. Cada frasco de antígeno es suficiente para 4 tiras de micropozos.
 - 3.2 Menea el frasco para disolver completamente el antígeno. Incube en el tiempo ambiente por 10 minutos exactos.
 - 3.3 El antígeno reconstituido es estable en 2-8°C hasta 3 semanas. Selle la tapa con parafilm para minimizar la evaporación y guarde el frasco inmediatamente en 2-8°C.

Preparación del antígeno dengue reconstituido

- 3.1 Golpee el frasco ligeramente y agregue diluyente de enzima 2.0 mL



3.2	Menea el frasco e incube		10 minutos
3.3	Selle y guarde		2-8°C, hasta 3 semanas

4. **Preparación de la solución de trabajo conjugada:**
El conjugado de trabajo debe ser preparado al menos 30 minutos antes del ensayo
- 4.1 En un tubo separado, mezcle e antígeno reconstituido, el diluyente de enzima y 100x conjugado concentrado como se demuestra en la siguiente tabla. Incube los tres reactivos en un tubo separado "solución de trabajo conjugada" a temperatura ambiente (20-25°C) por exactamente 10 minutos.

	1 tira	2 tiras	3 tiras
Antígeno reconstituido	450 µL	900 µL	1,350 µL
Diluyente de enzima	450 µL	900 µL	1,350 µL
100x conjugación	9 µL	18 µL	27 µL

- 4.2 Use solución de trabajo conjugado inmediatamente. Deseche los tubos de solución conjugadas no usados después de 4 horas.

Preparación del trabajo de solución conjugada

4.1	Mezcle e incube (dengue reconstituido, el diluyente de enzima y 100x conjugado)		2-8°C 60 minutos
4.2	Use solución de trabajo conjugado inmediatamente		2-8°C Hasta 4 horas

5. **Preparación de controles y muestras de dengue IgG**
Diluye el control negativo de dengue IgG, control positivo y las muestras del paciente con diluyente de muestra 100 veces doblados; e.g. para 5 µL de control o muestra, agregue 500µL diluyente de muestra.
6. **Preparación de tampón de lavado**
Si precipitantes son visible, añada el tampón de lavado hasta 37°C. Diluye la concentración del tampón de lavado 30 veces doblado con agua destilada o re-ionizada como lo siguiente:

Placa	Agua destilada	Tampón de lavado (30X)	Volumen final
1 tira	2 mL	2 mL	60 mL
2 tiras	4 mL	4 mL	120 mL
3 tiras	6 mL	6 mL	180 mL
4 tiras	8 mL	8 mL	240 mL

El tampón de lavado diluido puede almacenar a 2-8°C hasta 3 días.

7. Mezcle cada control antes de agregar en los pozos de prueba.
8. Marque el número de micropozos necesitados y marque la hoja de trabajo ELISA con la información apropiada. Desarrójele los positivos y negativos en duplicación para asegurar precisión.

PROCEDIMIENTO

1. Tome el número deseado de tiras y ubíquelas en el soporte. Ponga las tiras no usadas en la bolsa zip-lock y sellelas.
2. Marque el número de muestras de acuerdo a la designación hecha en la hoja de trabajo:
 - 2.1 **Pozos vacíos:** No añada muestras o controles
 - 2.2 **Pozo de control:** Añade 100 µL de control positivo de dengue IgG diluida y 100 µL de control negativo de dengue IgG en los pozos designados.
 - 2.3 **Pozos de ensayo:** Añada 100 µL de muestra a cada pozo.
3. Mueva la placa suavemente por 20seg y cúbrala con el sellador.
4. Incube las tiras a 37°C por 20 minutos. Es importante tomar el tiempo de los experimentos para que la incubación de muestra y de la solución de trabajo conjugado termine simultáneamente.
4. Lave para remover materiales ilimitados:
 - Lavado manual:** Deseche cuidadosamente la mezcla de incubación a un recipiente de desecho. Llene cada pozo con 350 µL de tampón de lavado diluido y mueve la placa suavemente por 20-30 seg. Deseche la solución de lavado completamente. Repite estos pasos 4 veces más. Después del último paso de lavado, golpee la placa contra un papel absorbente para eliminar cualquier residuo líquido.
 - Lavado automático:** Lavado de placa automático debe ser calibrado para asegurar lavado eficiente. Llene cada pozo con 350 µL de un tampón de lavado diluido y deje que se remoje por 20-30 segundos. Aspire cada pozo completamente. Repite cuatro veces más.
5. Agregue 100 µL de solución de trabajo conjugado ya preparado a cada pozo excepto los pozos vacíos. Mueva los micropozos suavemente por 20 segundos para asegurar una buena mezcla.
6. Incube a 37°C por 20 minutos.
7. Lave la placa 5 veces como se describe en el Paso 4.
8. Añada 50 µL de TMB Sustrato A y 50 µL de TMB Sustrato B a cada pozo, incluyendo los pozos vacíos. Mueva los micropozos suavemente por 20 segundos para asegurar una buena mezcla.
9. Incube a temperatura ambiente (20-25°C) en la oscuridad por 15 minutos.
10. Pare la reacción con la adición de 100 µL de solución de parada a cada pozo, incluyendo el pozo vacío. Mueva suavemente por 20 seg. Pipetee la solución de parada en la misma secuencia que la adición de sustrato. **Es importante asegurarse de que todo el color azul cambie completamente amarillo.**
11. Ajuste la longitud de onda del lector a 450nm. Mida la absorbencia (DO) de cada pozo respecto a los pozos vacíos dentro de los 30 minutos tras añadir la solución de parada. Puede usarse un filtro de 620-690 nm como referencia para mejorar los resultados.

Resumen del procedimiento

1.	Segura las tiras en los micropozos		Numero de tiras
2.	Agregue controles y muestras diluidas Mueva suavemente		100 µL 20 segundos
3.	Incube		37°C, 20 minutos
4.	Lavado: manualmente o automático		5 veces
5.	Agregue solución de trabajo conjugado. Mueva suavemente		100 µL 20 segundos
6.	Incube		37°C, 20 minutos
7.	Lavado: manualmente o automático		5 veces
8.	Agregue Sustrato TMB A y B. Mueva suavemente		50 µL + 50 µL 20 segundos
9.	Incube en lo oscuro		RT (20-25°C) 15 minutos
10.	Agregue solución de parada y mueve suavemente		100 µL, 20 segundos
11.	Lee resultados		450/620-690 nm entre 30 minutos

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

A. Determinación del valor de corte

Valor de corte = 0.97 + N
 N: DO promedio de los controles negativos. Use N=0.13 para el cálculo del valor de corte si el promedio del DO es menor que 0.13.

B. Cálculo de la razón DO de las muestras

Calcule la razón DO de cada muestra dividiendo su valor DO por el valor de corte como sigue:

$$\text{Razón DO de la muestra} = \frac{\text{DO Muestra}}{\text{Valor de Corte}}$$

C. Validación del ensayo

El valor del promedio de DO de los controles positivos debe ser ≥ 1.5
 El valor del promedio de DO de los controles negativos debe ser ≤ 0.26
 Revise el procedimiento incluyendo tiempo de incubación y temperatura repite el ensayo si el promedio de los controles no es atendido.

D. Interpretación de los resultados

Razón DO de la muestra

Negativa	< 1.0
Positiva	≥ 1.0

- Un resultado negativo indica que no hay niveles detectables de anticuerpo anti dengue IgG en la muestra.
- Los resultados justo debajo del valor de corte (hasta 10% inferiores al valor de corte) deben ser interpretados con cuidado (se recomienda re-evaluar las muestras correspondientes por duplicado cuando esto suceda).
- Las muestras con razón DO ≥ 1.0 son inicialmente consideradas como positivas por la Prueba ELISA *Aria* Dengue IgG. Estas deben ser re-evaluadas por duplicado antes de llegar a una conclusión final. Si después de la re-evaluación de la muestra, el valor de absorbencia de ambos duplicados es menor que el valor de corte, el resultado inicial no es repetible y la muestra será considerada negativa Prueba ELISA *Aria* Dengue IgG. Los resultados no repetibles son a menudo causados por:
 - Lavado inadecuado de los pozos,
 - Contaminación de las muestras con suero o plasma con altas concentraciones de antígeno,
 - Contaminación del sustrato por agentes oxidantes (lejía, iones metálicos, etc.),
 - Contaminación de la solución de parada.
 Si después de la re-evaluación al menos uno de los duplicados es igual o mayor que el valor de corte, el resultado inicial es repetible y la muestra se considera positiva mediante la Prueba ELISA *Aria* Dengue IgG, sujeto a las limitaciones del procedimiento, descritas debajo.

DESEMPEÑO

1. Exactitud de detección

Se colectó un total de 291 muestras a partir de sujetos susceptibles y se evaluaron mediante la Prueba ELISA *Aria* Dengue IgG y otro inmunoensayo enzimático comercial. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

EIA referencia	Prueba ELISA <i>Aria</i> Dengue IgG		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	27	1	28
Negativo	5	258	263
Total	32	259	291

Sensibilidad Relativa: 96.4%, Especificidad Relativa: 98.1%, Concordancia: 97.9%

2. Precisión

a. La precisión intra-ensayo se determinó evaluando 15 réplicas de tres muestras de pacientes.

Muestra	N	OD	SD	CV
Negativo	15	1.32	0.08	6.1%
Positivo alto	15	0.23	0.01	5.2%
Positivo bajo	15	2.25	0.15	6.7%

b. La precisión inter-ensayo se determinó ensayando tres muestras de pacientes en tres ensayos diferentes. Los datos fueron analizados por ANOVA (análisis de varianzas).

Muestra	Operaciones	OD	SD	CV
Negativo	10	1.55	0.08	2.0%
Positivo alto	10	0.24	0.01	4.2%
Positivo bajo	10	1.50	0.12	5.2%

3. Reactividad cruzada

No se observaron resultados falsos positivos de la Prueba ELISA en 2 a 10 muestras positivas de pacientes con las siguientes enfermedades o infecciones:

VCH	HBsAg	ANA	H. pylori	Malaria
Sifilis	ANA	AMA	RF (hasta 8,400 UI/mL)	

4. Interferencia

Sustancias comunes (como los analgésicos, antiácidos y componentes de la sangre) pudieran afectar el rendimiento de la Prueba ELISA *Aria* Dengue IgG. Esto fue estudiado mediante la adición de estas sustancias en 3 muestras clínicas de dengue IgG: negativa, débil positiva, fuerte positiva. Los resultados demuestran que estas sustancias no afectan el desempeño de la prueba a las concentraciones ensayadas.

Lista de sustancias potencialmente interferentes y concentraciones ensayadas:

1. Ácido Salicílico 10 mmol/L	5. Glucosa 55 mmol/L
2. Citrato de Sodio 1%	6. Heparina 3,000 U/L
3. Creatinina 1.5 mmol/L	7. Bilirrubina 10 mg/dL
4. EDTA 0.4 µmol/L	

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Uso de Diagnóstico In Vitro

Este inserto debe ser leído completamente antes de la realización de la prueba. Si no se sigue el inserto se pueden generar resultados erróneos.

- No use componentes vencidos.
- Use todos los reactivos a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usarlos.
- No utilice los componentes de otro tipo de prueba como sustituto de los componentes de este kit.
- No utilice suero derivado de sangre hemolizada para la prueba.
- No ingiera los reactivos. Evite contacto con los ojos, piel y boca. Use ropa protectora y guantes mientras manipula los reactivos y las muestras clínicas. Lávese bien las manos después de ejecutar el ensayo.
- No fume, beba ni coma en las áreas donde se manipulen muestras o reactivos del kit.
- Los materiales de suero humano usado para la preparación de controles han sido probadas y no son reactivos con el anticuerpo VIH-1 y 2, VCH, y HBsAg. Sin embargo, los usuarios de esta prueba deben seguir las precauciones universales del CDC de Estados Unidos para la prevención de transmisión del VIH, VHB y otros patógenos de transmisión sanguínea.
- Deseche todas las muestras y los materiales del kit usados como residuos biológicos peligrosos.
- Al comienzo de cada incubación, y después de añadir la solución de parada, mueve suavemente las tiras para asegurar un buen mezclado. Evite la formación de burbujas que resulten valores de absorbencia no exactos. Evite salpicar líquido mientras agita las tiras.

- No permita que las tiras se sequen entre el fin de la operación de lavado y la adición de reactivos.
- La enzima TMB sustrato es muy sensible a iones metálicos. Por tanto no permita que ningún elemento metálico entre en contacto con el conjugado o el sustrato de solución.
- La reacción de la enzima depende en la temperatura. Asegure que la temperatura ambiente cae entre 20-25°C.
- El Sustrato TMB debe ser incoloro. La aparición de color indica que el reactivo debe ser reemplazado. El Sustrato B TMB debe ser almacenado en la oscuridad.
- Use una punta nueva para cada muestra. Nunca use el contenedor de la muestra para distribuir el conjugado y el Sustrato TMB.
- El procedimiento de lavado es crítico. Los pozos deben ser aspirados completamente antes de añadir el tampón de lavado o los reactivos líquidos. Un lavado automático debe ser válido por la Prueba RecombiLISA Dengue IgG. Un lavado insuficiente puede causar baja presión o valores de absorbencia elevados.**
- Lectores de micropozos deben ser calibrados por la instrucción del fabricante para asegurar la determinación precisa de absorbencia. Lectores no calibrados a veces tienen resultados inválidos.**
- Evite la exposición a luz intensa durante el desarrollo del color.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- El procedimiento de análisis y la interpretación de resultados deben ser seguidos muy cuidadosamente se evalúe la presencia de anticuerpos del virus dengue en suero o plasma. Si no se sigue el procedimiento pueden generarse resultados inexactos.
- La Prueba ELISA *Aria* Dengue IgG se limita a la detección cualitativa de los anticuerpos IgG asociados con la infección secundaria de dengue. Sin embargo, se ha propuesto que la proporción de anticuerpos (IgG/IgM) pueden ser usados para distinguir entre infecciones primarias y secundarias.
- Un resultado negativo para un sujeto individual indica la ausencia de anticuerpos dengue IgG detectables. Sin embargo, un resultado negativo no descarta la posibilidad de exposición o infección del virus dengue.
- Un resultado negativo puede ocurrir si la cantidad de los anticuerpos dengue IgG del virus dengue presentes en la muestra es más bajo que el nivel de detección para el ensayo, o los anticuerpos IgG que si se detectan no están presentes durante la etapa de la enfermedad en la que se colecta la muestra.
- Reactividad cruzada serológica con otros flavivirus común (e.g. hepatitis japonesa, virus West Nile, fiebre amarilla, etc.) por lo tanto, es posible que pacientes con enfermedades pueden demostrar un nivel de reactividad con la prueba.
- Una infección puede progresar rápidamente. Si la síntomas persisten mientras el resultado de Prueba ELISA *Aria* Dengue IgG es negativo, es recomendable probar con métodos alternativo.
- Algunas muestras que contienen típicamente altos de anticuerpos heterofílicos o de factor reumatoides pueden afectar los resultados esperados.
- Cualquier uso o interpretación de los resultados de esta prueba debe tener en cuenta otras evidencias clínicas y el criterio del clínico de salud.

REFERENCIAS

- Anonymous. Dengue: prevention and control. EXECUTIVE BOARD, 136th session, Report by the Secretariat. Geneva: World Health Organization, 21 November 2014.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature 2013; 496: 651-657.
- Anonymous. Global strategy for dengue prevention and control. Geneva: World Health Organization, 2012.
- Tang KF. Ocular Diagnosis of dengue: an update. Expert Rev Anti Infect Ther 10 (8), 895-907 (2012).
- Malstead SB, Sotya JA, Shepard DS. The burden of dengue infection. Lancet, 2007; 369:1410-1411
- Wong RW et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. Nature Reviews Microbiology 8, S30-S37. 2010.

Index of Symbols

	See instructions for use	[CONJ]	Conjugates
	For <i>in vitro</i> diagnostic use only	[ANTIGEN]	Antigen
	Catalog #	[ENZ DILT]	Enzyme diluent
	Lot number	[CONTROL +]	Positive control
	Tests per kit	[CONTROL -]	Negative control
	Do not reuse	[SAMP DILT]	Sample diluent
	Manufacturer	[TMB SUBS]	TMB substrate
	Date of manufacture	[STOP SOLN]	Stop solution
	Authorized representative	[WASH BUFF]	Wash buffer
	Store between 2-8°C	[MICROWELLS]	Coated microwells
	Use by		

CTK Biotech, Inc.
 10110 Mesa Rim Road,
 San Diego, CA 92121
 Tel: 858-457-8698
 Fax: 858-535-1739
 E-mail: info@ctkbiotech.com

MDSS GmbH
 Schiffgraben 41,
 30175 Hannover, Germany
 PI-E0311-ARIA-SP Rev. F1.0
 Fecha de publicación: 2016-09-15
 Versión en Español

Solo para exportación. No para ser comercializado en los EEUU