

1. Uso previsto

El test NADAL® HAV IgG/IgM es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección y la diferenciación simultánea de IgG e IgM contra el virus de la Hepatitis A (VHA) en muestras humanas de suero, plasma o sangre completa.

Esta prueba está destinada al uso profesional como test de detección, ayudando en el diagnóstico de una infección por el virus de VHA. Cualquier muestra reactiva con este test debe confirmarse con métodos alternativos de ensayo y otros hallazgos clínicos.

2. Introducción y significado clínico

El virus de la Hepatitis A (VHA) aislado por primera vez en 1973,¹ es un virus ARN sin envoltura de la familia *Picornaviridae*, género *Hepatovirus*. Su transmisión se produce principalmente en serie, de persona a persona, por vía oral-fecal. Sin embargo, el VHA también se puede transmitir por medio del agua contaminada, por contacto personal estrecho y por drogas de uso ilícito. La infección se caracteriza por una aparición rápida tras un periodo de incubación de aproximadamente 28 días (15-50 días), y seguida de una aparición rápida de los síntomas. Los signos y síntomas pueden incluir náuseas, vómitos, diarrea, orina oscura, ictericia, fiebre, dolor de cabeza, pérdida de peso y dolor abdominal. La probabilidad de la aparición de los síntomas aumenta con la edad. Normalmente, la enfermedad aguda no dura más de 2 meses. No hay una replicación viral crónica ni una etapa crónica de la enfermedad, a pesar de las recurrencias, puede producirse hepatitis aguda fulminante y otras complicaciones.² Los IgM anti-VHA son detectables en el mismo momento, o incluso antes, de la aparición de la enfermedad clínica, y desaparecen una vez pasados de 3 a 6 meses. Los IgG anti-VHA aparecen poco después de los IgM, y persisten durante años después de la infección, por lo que confieren inmunidad durante toda la vida.³ La presencia de IgG anti-VHA y la ausencia de IgM anti-VHA puede utilizarse para diferenciar entre infecciones pasadas y actuales. Los ensayos IgM pueden detectar anticuerpos durante un corto periodo de tiempo en individuos vacunados recientemente contra la Hepatitis A. Sin embargo, las concentraciones bajas detectadas de 4 a 6 meses después de la aparición de la infección no suelen producir resultados positivos.^{4,5}

El test NADAL® HAV IgG/IgM detecta y diferencia entre IgG anti-VHA e IgM anti-VHA en suero humano, plasma o sangre completa después de 15 minutos y puede ser realizado por personal mínimamente cualificado, sin necesidad de un equipo de laboratorio.

3. Principio del test

El test NADAL® HAV IgG/IgM es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral. El casete de test está compuesto por: 1) una almohadilla con conjugado de color burdeos que contiene antígenos de VHA conjugados con oro coloidal (conjugados Ag de VHA) y anticuerpos de control conjugados con oro coloidal, 2) una membrana de nitrocelulosa con dos líneas de test (M y G) y una línea de control (C). Los IgM anti-humanos de ratón recubren la línea "M", mientras que los IgG anti-humanos de ratón recubren la línea "G" y los anticuerpos de control recubren la línea "C".

Cuando se añade un volumen adecuado de muestra y búfer a los pocillos (S) y (B) respectivamente, la muestra migra por acción capilar a lo largo del casete de test. Si la muestra contiene IgM anti-VHA, se unirá a los conjugados de antígenos de VHA. El inmunocomplejo queda capturado en la membrana por el IgM anti-humano de ratón que la recubre, formando una línea de test "M" de color burdeos, indicando un resultado de test positivo para IgM anti-VHA. Si la muestra contiene IgG anti-VHA, se unirá también a los conjugados de antígenos de VHA. Los inmunocomplejos son capturados en la membrana por el IgG anti-humano de ratón, formando una línea "G" de color burdeos que indica un resultado de test positivo para IgG anti-VHA. La ausencia de ambas líneas de test "G" y "M" sugiere un resultado negativo.

El test contiene un control interno (C) que debe producir siempre una línea de color burdeos formada por el inmunocomplejo de anticuerpos de la línea de control, independientemente de la aparición de las líneas coloreadas de test (M y G). En caso contrario, el resultado no sería válido y se tendría que repetir la prueba con otro casete de test.

4. Reactivos y materiales provistos

- 30 test NADAL® HAV IgG/IgM en casete (incluye desecante)
- 30 tubos capilares (5 µL)
- 1 búfer "Buffer" (5 mL/bote)
- 1 manual de instrucciones

5. Materiales adicionales

- Reloj o cronómetro
- Dispositivo de punción (para el análisis de sangre completa)

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 añada la muestra al área de reacción (región de resultados).
- Evite tocar el área de reacción (región de resultados), para evitar su contaminación.
- No intercambie ni mezcle componentes de diferentes kits de test.
- No utilice muestras hemolizadas para este ensayo.
- 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. Lávese las manos en profundidad después de realizar la prueba.

- 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.
- Lea el resultado del test a los 15 minutos de haber dispensado la muestra al pocillo correspondiente del casete. Después de 20 minutos la lectura puede dar 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. No utilice sangre hemolizada para esta prueba.

Plasma

- Recolecte una muestra de sangre por punción venosa en un tubo recolector (con EDTA, citrato o heparina).
- 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.

Una vez recolectada la muestra, se recomienda analizarla lo antes posible. Si el análisis no se realiza inmediatamente, puede almacenar las muestras a 2-8°C hasta 5 días. Para almacenamientos prolongados, congélelas a -20°C. Evite ciclos múltiples de congelación-descongelación. Antes de realizar la prueba, lleve las muestras congeladas a temperatura ambiente y mézclelas bien. Las muestras que presenten partículas visibles se deben clarificar por centrifugación antes de su análisis. No utilice muestras que presenten gran lipemia, hemólisis o turbidez, ya que se pueden producir interferencias en la interpretación del resultado.

Sangre

Las gotas de sangre completa se pueden obtener por punción digital o venosa. Recolecte una muestra de sangre en un tubo de recolección (con EDTA, citrato o heparina).

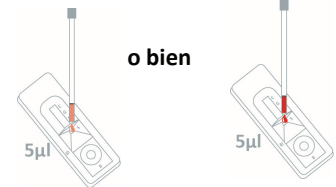
Si no va a realizar la prueba inmediatamente, refrigere las muestras de sangre completa a 2-8°C y analícelas dentro de las 24 horas siguientes a su recolección.

9. Procedimiento del test

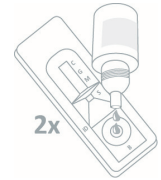
Lleve las muestras y los componentes de test a temperatura ambiente (15-30°C). Antes de comenzar la prueba, mezcle bien la muestra.

1. Cuando esté todo listo para comenzar, abra la bolsa sellada y extraiga el casete de test. A continuación, sitúelo sobre una superficie limpia y plana.
2. Etiquete el casete de test con el número de identificación de la muestra.
3. Presionando el tubo capilar, llénelo con suero, plasma o sangre completa. **No exceda la línea de la muestra.** El volumen de la muestra debe ser aproximadamente 5 µL.

Para una mayor precisión, transfiera la muestra utilizando una pipeta apta para depositar un volumen de 5 µL.



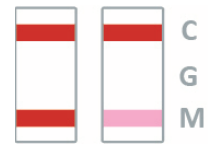
4. Sostenga verticalmente el tubo capilar y dispense toda la muestra en el centro del pocillo (S), evitando que se formen burbujas de aire.
5. Añada inmediatamente 2 gotas (aproximadamente 60-80 µl) del búfer en el pocillo correspondiente (B), sosteniendo el tubo verticalmente. Active el cronómetro.
6. Lea los resultados del test a los 15 minutos. Los resultados positivos ya se pueden visualizar después de 1 minuto. No interprete los resultados una vez pasados más de 20 minutos. Para evitar la confusión, elimine el casete de test una vez interpretado el resultado.



10. Interpretación del resultado

Positivo/reactivo para IgM:

Aparece una línea coloreada en la región de control (C) y una línea coloreada en la región de test (M) para IgM. El resultado del test indica la presencia de IgM anti-VHA.



Positivo/reactivo para IgG:

Aparece una línea coloreada en la región de control (C) y una línea coloreada en la región de test (G) para IgG. El resultado del test indica la presencia de IgG anti-VHA.



Positivo/reactivo para IgG e IgM:

Además de la línea de control (C), aparece una línea coloreada en cada región de test: "G" para IgG y "M" para IgM. El resultado del test indica la presencia de IgM e IgG anti-VHA.



Negativo/no reactivo:

Solo aparece la línea "C" de control. La ausencia de las líneas de test "G" y "M" indica que no se ha detectado la presencia de IgG o IgM anti-VHA en la muestra.



No válido

Si no aparece línea "C" de control, el ensayo no es válido, independientemente de la aparición de cualquier sombra coloreada en las líneas de test "G" o "M". Repita la prueba con un nuevo casete de test.



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

Control interno:

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.

Control externo:

Se recomienda el uso de controles positivos y negativos externos para asegurar el buen funcionamiento del ensayo.

12. Limitaciones

- Siga estrictamente los apartados "Procedimiento del test" e "Interpretación del resultado" cuando quiera detectar la presencia de anticuerpos anti-VHA en suero, plasma o sangre completa de sujetos individuales. En caso contrario, se pueden producir resultados incorrectos.
- El test NADAL® HAV IgG/IgM se limita a la detección cualitativa de IgM anti-VHA en suero humano, plasma o sangre completa. La intensidad de la línea de test no tiene una correlación lineal con la cantidad de anticuerpos en la muestra.
- Un resultado de test negativo, o no reactivo, no excluye la posibilidad de exposición o infección por VHA. Esto puede suceder si la cantidad de anticuerpos anti-VHA presentes en la muestra está por debajo del nivel de detección del test, o si la muestra no contenía dichos anticuerpos durante el estadio de la enfermedad en el que se efectuó la recolección.
- Los niveles inusualmente altos de anticuerpos heterófilos o factor reumatoide (≥ 2.500 UI/mL) pueden afectar a los resultados esperados.
- Los resultados obtenidos con este test solo se deberían interpretar junto con otros procedimientos de diagnóstico y hallazgos clínicos.

13. Valores esperados

Anualmente se producen alrededor de 1,5 millones de casos clínicos de Hepatitis A a nivel mundial, pero la tasa de infección es probablemente unas diez veces superior. Su incidencia está relacionada con los indicadores socioeconómicos, el acceso al agua potable y la vacunación. En los países menos desarrollados, con escasas condiciones sanitarias e higiénicas, el VHA es endémico y, en la mayoría de los casos, las personas se infectan durante la primera infancia. La mayor prevalencia de VHA se produce en algunas áreas de África, Asia y América Central y del Sur, donde la seroprevalencia puede llegar al 90%. En las regiones con mayor nivel de desarrollo, como América del Norte, Europa occidental, Australia y Japón, las tasas de infección suelen menores.

14. Características del rendimiento

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

Se analizaron un total de 65 muestras de pacientes sospechosos con el test NADAL® HAV IgG/IgM y con un EIA de IgM VHA disponible comercialmente. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Test NADAL® HAV IgG/IgM (IgM)			
EIA IgM VHA	Positivo	Negativo	Total
Positivo	15	0	15
Negativo	0	50	50
Total	15	50	65

Sensibilidad relativa: >99%

Especificidad relativa: >99%

Concordancia general: >99%

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

Se analizaron un total de 100 muestras de pacientes sospechosos con el test NADAL® HAV IgG/IgM y con un test de IgG VHA disponible comercialmente como referencia. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Test NADAL® HAV IgG/IgM (IgG)			
Test IgG VHA de referencia	Positivo	Negativo	Total
Positivo	75	1	76
Negativo	0	24	24
Total	75	25	100

Sensibilidad relativa: 98,7%

Especificidad relativa: >99%

Concordancia general: 99%

Reacciones cruzadas

Se analizaron las muestras de otras enfermedades infecciosas e inmunomarcadores para reacciones cruzadas con el test NADAL® HAV IgG/IgM. Los resultados indican que las siguientes muestras no presentan reacciones cruzadas con el test NADAL® HAV IgG/IgM:

Muestras	Tamaño de la muestra	Test NADAL® HAV IgG/IgM (reactividad)
Suero positivo de dengue	6	Negativo
Suero positivo de VHC	6	Negativo
Suero positivo VIH	6	Negativo
Suero positivo de sífilis	6	Negativo
Suero positivo de TB	6	Negativo
Suero positivo de <i>H. pylori</i>	6	Negativo
Suero positivo de HBsAg	6	Negativo
Suero positivo de ANA	6	Negativo
Suero positivo de HAMA	4	Negativo
Suero positivo de RF (≤ 2.500 UI/mL)	3	Negativo

Interferencia

Algunas sustancias comunes, como los medicamentos antifebriles, anticoagulantes y los componentes de la sangre pueden afectar al funcionamiento del test NADAL® HAV IgG/IgM. Se estudiaron los efectos de interferencias potenciales mediante la aplicación de determinadas sustancias en tres niveles de control estándar de VHA. Los resultados demuestran que, con las concentraciones analizadas, las sustancias no afectaron al rendimiento del test NADAL® HAV IgG/IgM.

Nota: - : Negativo; +: Positivo débil; +++: Positivo fuerte

Sustancias interferentes	Reactividad de IgG VHA			Reactividad de IgM VHA		
	Negativo	Positivo débil	Positivo fuerte	Negativo	Positivo débil	Positivo fuerte
Suero matriz	-	+	+++	-	+	+++
Bilirrubina 20 mg/dL	-	+	+++	-	+	+++
Hemoglobina 2 g/L	-	+	+++	-	+	+++
Glucosa 55 mmol/L	-	+	+++	-	+	+++
Ácido salicílico 1,45 mmol/L	-	+	+++	-	+	+++
Heparina 3.000 U/L	-	+	+++	-	+	+++
EDTA 3,4 µmol/L	-	+	+++	-	+	+++
Citrato de sodio 1,27 %	-	+	+++	-	+	+++

15. Referencias

1. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*. 1973; 182:1026-1028.
2. Matheny SC, Kingery JE. Hepatitis A. *Am Fam Physician*. 2012 Dec 1;86(11):1027-34.
3. Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. American Society for Microbiology, Washington DC, 2002
4. Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS. Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jan;19(1):63-79.
5. Stapleton JT. Host immune response to hepatitis A virus. *J Infect Dis*, 1995, 171(Suppl 1):S9-S14.

Rev. 0, 2016-02-05 MP