

NADAL® Dengue NS1 Ag+IgG/IgM Test (test cassette)

REF 532016N-25



DE Gebrauchsanweisung	2	CZ Návod k použití	37
EN Instructions for use	7	FI Käyttöohje	42
FR Instructions d'utilisation	12	SE Användarinstruktioner	47
ES Instrucciones de uso	17	Symbols	55
IT Istruzioni per l'uso	22	Our Teams	56
PL Sposób użycia	27		
PT Instruções de Utilização	32		



1. Verwendungszweck und Anwendungsbereich

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test ist ein schneller chromatographischer Immunoassay zum gleichzeitigen Nachweis und zur Differenzierung des Dengue-NS1-Antigens und anti-Dengue-Virus-IgG und -IgM in humanem Vollblut, Serum oder Plasma. Der Test ist als Hilfsmittel bei der Diagnose von Dengue-Infektionen bestimmt und nur für den professionellen Gebrauch ausgelegt.

2. Einleitung und Diagnostische Bedeutung

Das Dengue-Virus ist ein Flavivirus, das durch die Tigermücken *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* übertragen wird. Es ist in den tropischen und subtropischen Gebieten der Welt weit verbreitet¹ und verursacht jährlich bis zu 100 Millionen Infektionen.² Klassische Dengue-Infektionen sind durch plötzliches Einsetzen von Fieber, starke Kopfschmerzen, Myalgie, Arthralgie und Hautausschlag gekennzeichnet.

Dengue-Primärinfektionen verursachen eine Steigerung von IgM bis zu nachweisbaren Konzentrationen in 3 bis 5 Tagen nach dem Einsetzen von Fieber. IgM bleiben normalerweise 30 bis 90 Tage bestehen.³ Die meisten Dengue-Patienten in endemischen Gebieten haben Sekundärinfektionen,⁴ die zu hohen Konzentrationen spezifischer IgG vor oder gleichzeitig mit einer IgM-Reaktion führen können.⁵ Daher kann der Nachweis von spezifischen anti-Dengue-IgM und -IgG auch dazu beitragen, zwischen Primär- und Sekundärinfektionen zu unterscheiden.

NS1 ist eines von 7 Nichtstrukturproteinen des Dengue-Virus, die vermutlich alle an der viralen Replikation beteiligt sind. NS1 existiert als Monomer in seiner unreifen Form, wird aber im endoplasmatischen Retikulum verarbeitet, um ein stabiles Dimer zu bilden. Eine kleine Menge an NS1 bleibt mit intrazellulären Organellen assoziiert, wo sie an der viralen Replikation beteiligt ist. Der Rest des NS1-Proteins bindet entweder an die Plasmamembran oder wird als ein lösliches Hexadimer abgesondert. NS1 ist essenziell für die virale Lebensfähigkeit, jedoch ist seine genaue biologische Funktion unbekannt. Antikörper, die als Reaktion auf NS1 bei Virusinfektionen gebildet werden, können mit Zelloberflächenantigenen auf Epithelzellen und Blutplättchen kreuzreagieren. Dies hat Auswirkungen auf die Entwicklung von Dengue-hämorrhagischem Fieber.

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test ist ein Schnelltest, der eine Kombination von beschichteten und an farbige Partikel gekoppelte Dengue-Antikörpern zum Nachweis von Dengue NS1-Antigenen und an farbige Partikel gekoppelte Dengue-Antigene zum Nachweis von anti-Dengue-IgG und anti-Dengue-IgM in menschlichem Vollblut, Serum oder Plasma verwendet.

3. Testprinzip

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test ist ein qualitativer membran-basierter Immunoassay zum Nachweis von anti-Dengue-Antikörpern und Dengue NS1-Antigenen im Vollblut, Serum und Plasma.

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test enthält zwei Teststreifen (linke Seite: der Dengue NS1 Ag Test, rechte Seite: der kombinierte Dengue IgG/IgM Test).

Der Dengue IgG/IgM Test auf der rechten Seite besteht aus zwei Bestandteilen. Im IgG-Bestandteil sind anti-human IgG-Antikörper im Testlinienbereich „IgG“ vorbeschichtet. Während der Testung reagiert die Probe mit Dengue-Antigenen-beschichteten Partikeln in der Testkassette. Das Gemisch wandert dann chromatographisch durch Kapillarkraft die Membran entlang und reagiert mit anti-human IgG-Antikörper im Testlinienbereich „IgG“. Wenn in der Probe anti-Dengue IgG vorhanden sind, erscheint eine farbige Linie im Testlinienbereich „IgG“.

Im IgM-Bestandteil sind anti-human IgM-Antikörper im Testlinienbereich „IgM“ vorbeschichtet. Wenn in der Probe anti-Dengue IgM vorhanden sind, reagieren sie ebenfalls mit den Dengue-Antigen-beschichteten Partikeln in der Testkassette. Der Komplex wird dann durch anti-human IgM-Antikörper abgefangen und dadurch entsteht eine farbige Linie im Testlinienbereich „IgM“.

Wenn die Probe keine Dengue-Antikörper enthält, entstehen keine farbigen Linien in den Testlinienbereichen, was auf ein negatives Ergebnis hindeutet.

Dengue NS1 Ag Test auf der linken Seite:

Während der Testung reagiert die Probe mit Dengue-Antikörper-Konjugaten auf dem internen Teststreifen. Gold-Antikörper-Konjugate binden Dengue-Antigene in der Probe, welche wiederum von den auf der Membran vorbeschichteten anti-Dengue NS1-Antikörpern gebunden werden. Wenn das Gemisch dann durch Kapillarkraft die Membran entlang wandert, binden anti-Dengue NS1-Antikörper den Antikörper-Antigen-Komplex, dadurch wird eine hellrosa oder dunkelrosa Linie im Testlinienbereich (T) der Membran gebildet. Die Farbintensität der Linien kann abhängig von der Antigenmenge, die in der Probe vorhanden ist, variieren. Das Erscheinen der rosa Linie im Testlinienbereich (T) ist als ein positives Ergebnis zu betrachten.

Das Erscheinen der beiden farbigen Linie in den Kontrolllinienbereichen (C) dient als Verfahrenskontrolle und weist darauf hin, dass jeweils genügend Probenvolumen hinzugegeben wurde und dass die Membranen ausreichend durchnässt sind.

4. Bestandteile der Testpackung

- 25 Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Testkassetten
- 25 Einwegpipetten (5 µl)
- 25 Einwegpipetten (25 µl)
(die mitgelieferten 5 µl- und 25 µl-Pipetten übertragen jeweils ca. 5 µl und 25 µl in einem Tropfen, auch wenn mehr Blut in die Pipette aufgenommen wird)
- 1 Puffer „Buffer“ (3 ml)
- 1 Gebrauchsanweisung

5. Zusätzlich benötigte Materialien

- Probensammelbehälter
- Zentrifuge (nur für Serum/Plasma)
- Timer
- Lanzette (für Vollblut aus Fingereinstich)
- ggf. 75 µl-Kapillare
- ggf. Mikropipette

6. Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test-Kits sollten bei 2-30°C gelagert und bis zum auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum benutzt werden. Testkassetten sind bis zum auf den Folienbeuteln angegebenen Verfallsdatum stabil. Testkassetten sollten bis zur Verwendung in versiegelten Folienbeuteln verbleiben. Frieren Sie Tests nicht ein. Verwenden Sie die Tests nicht nach dem Verfallsdatum.

7. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für den professionellen *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch.
- Lesen Sie die komplette Gebrauchsanweisung vor der Testdurchführung sorgfältig durch.
- Den Test nicht nach dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Test nicht verwenden, wenn der Folienbeutel beschädigt ist.
- Tests nicht wiederverwenden.
- Proben nicht in das Reaktionsfeld (Ergebnisfeld) geben.
- Das Reaktionsfeld (Ergebnisfeld) nicht berühren, um Kontamination zu vermeiden.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen sollte für jede Probe ein eigener Probensammelbehälter verwendet werden.
- Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in dem Bereich, in dem mit Proben und Testkits umgegangen wird.
- Tragen Sie beim Umgang mit Proben Schutzkleidung wie Laborkittel, Einmalhandschuhe und Schutzbrille.
- Behandeln Sie alle Proben so, als ob sie infektiöse Reagenzien enthielten. Beachten Sie bestehende Vorsichtsmaßnahmen für mikrobiologische Risiken während aller Verfahren sowie Standardrichtlinien für die korrekte Probenentsorgung.
- Dieser Test enthält Erzeugnisse tierischen Ursprungs. Zertifizierte Kenntnisse der Herkunft und/oder des Sanitärzustands der Tiere gewährleisten nicht völlig die Abwesenheit übertragbarer Pathogene. Es wird daher empfohlen, diese Produkte als potentiell infektiös zu betrachten und sie gemäß den üblichen Sicherheitsvorkehrungen zu behandeln (z.B. Verschlucken oder Einatmen vermeiden).
- Feuchtigkeit und Temperaturen können Testergebnisse beeinträchtigen.
- Benutzte Testmaterialien sollten gemäß lokalen Vorgaben entsorgt werden.

8. Probennahme, -vorbereitung und -lagerung

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test kann mit Vollblut, Serum oder Plasma durchgeführt werden.

Vollblutprobenentnahme aus Fingerpunktion

- Waschen Sie die Hand des Patienten mit Seife und warmem Wasser oder säubern Sie sie mit einem Alkoholtupfer. Lassen Sie sie trocknen.
- Massieren Sie die Hand ohne dabei die Einstichstelle zu berühren, indem Sie die Hand abwärts in Richtung der Kuppe des Mittel- oder Ringfingers reiben.
- Stechen Sie die Haut mit einer sterilen Lanzette. Wischen Sie den ersten Blutropfen ab.
- Reiben Sie vorsichtig die Hand vom Handgelenk zur Handfläche und zum Finger, damit sich auf dem Einstichpunkt ein runder Tropfen bildet.

Vollblut aus Venenpunktion

Für eine Serum- oder Plasma-Testung trennen Sie Serum oder Plasma vom Blut so schnell wie möglich, um eine Hämolyse zu vermeiden. Verwenden Sie nur klare, nicht hämolytierte Proben.

Die Testung sollte unmittelbar nach der Probenentnahme durchgeführt werden. Bewahren Sie Proben nicht bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum auf. Serum- und Plasmaproben können bei 2-8°C bis zu 3 Tage gelagert werden. Für eine längere Lagerung sollten die Proben bei -20°C gelagert werden. Venöses Vollblut sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden, wenn der Test innerhalb von 2 Tagen nach Probenentnahme durchgeführt wird. Frieren Sie die Vollblutproben nicht ein. Vollblutproben aus Fingerpunktion sollten unverzüglich getestet werden. Bringen Sie Proben vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur. Eingefrorene Proben sollten vor Testdurchführung vollständig aufgetaut und gut gemischt werden. Proben sollten nicht wiederholt eingefroren und aufgetaut werden. Wenn Proben versendet werden sollen, sollten diese gemäß Bundesverordnungen für ätiologische Mittel verpackt werden.

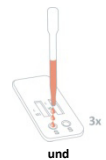
9. Testdurchführung

Bringen Sie alle Tests, Proben, Puffer und/oder Kontrollen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (15-30°C).

1. Entnehmen Sie die Testkassette dem verschlossenen Folienbeutel und legen Sie sie auf eine saubere und ebene Oberfläche. Die Testkassette muss unverzüglich nach der Öffnung des Folienbeutels verwendet werden. Kennzeichnen Sie die Testkassette mit der Patienten- oder Kontrollidentifikation.
2. **a) Für Serum- oder Plasmaproben:**

Für Dengue NS1 Ag:

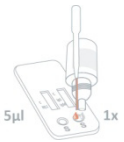
Halten Sie die mitgelieferte 25 µl-Pipette senkrecht und geben Sie 3 Tropfen (ca. 75 µl) Serum oder Plasma in die Probenvertiefung (S) der Testkassette.



Für anti-Dengue IgG/IgM:

I. Mittels einer Pipette:

Halten Sie die mitgelieferte 5 µl-Pipette senkrecht, saugen Sie damit die Serum- oder Plasmaprobe bis zur ersten Verbreiterung (ca. 5 µl) auf und geben Sie sie in die Probenvertiefung (S) der Testkassette. Anschließend geben Sie 1 Tropfen (ca. 40 µl) Puffer hinzu. **Vermeiden Sie Luftblasen in der Probenvertiefung.**



oder

II. Mittels einer Mikropipette:

Geben Sie mit der Mikropipette 5 µl Serum oder Plasma in die Probenvertiefung (S) der Testkassette. Anschließend geben Sie 1 Tropfen (ca. 40 µl) Puffer hinzu.

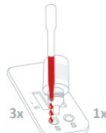


b) Für Vollblutproben aus Finger-/Venenpunktion

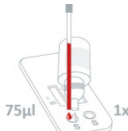
Für Dengue NS1 Ag:

I. Mittels einer Pipette:

Halten Sie die mitgelieferte 25 µl-Pipette senkrecht und geben Sie 3 Tropfen (ca. 75 µl) Vollblut in die Probenvertiefung (S) der Testkassette. Anschließend geben Sie 1 Tropfen (ca. 40 µl) Puffer hinzu.



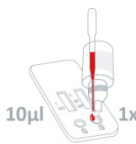
oder



oder



und



oder



10 min

II. Mittels Kapillarröhrchen

Füllen Sie die Kapillare mit einer Blutprobe und geben Sie ca. 75 µl aus in die Probenvertiefung (S) der Testkassette. Anschließend geben Sie 1 Tropfen (ca. 40 µl) Puffer hinzu.

III. Mittels hängender Tropfen

Lassen sie 3 hängende Tropfen (ca. 75 µl) Vollblut aus Fingerpunktion in die Probenvertiefung (S) der Testkassette fallen. Anschließend geben Sie 1 Tropfen (ca. 40 µl) Puffer hinzu.

Für anti-Dengue IgG/IgM:

I. Mittels einer Pipette:

Halten Sie die mitgelieferte 5 µl-Pipette senkrecht, saugen Sie damit die Vollblutprobe 1 cm über der ersten Verbreiterung (ca. 10 µl) auf und geben Sie sie in die Probenvertiefung (S) der Testkassette. Anschließend geben Sie 1 Tropfen (ca. 40 µl) Puffer hinzu.

II. Mittels einer Mikropipette:

Geben Sie mit der Mikropipette 10 µl Vollblut in die Probenvertiefung (S) der Testkassette. Anschließend geben Sie 1 Tropfen (ca. 40 µl) Puffer hinzu.

3. Starten Sie den Timer.

4. Werten Sie das Ergebnis nach 10 Minuten aus. Nach mehr als 20 Minuten keine Ergebnisse mehr auswerten.

10. Testauswertung

Positiv für Dengue NS1 Ag:

Eine farbige Linie erscheint in jedem Kontrolllinienbereich „C“ und eine farbige Linie erscheint im Testlinienbereich „NS1“. Das Ergebnis kann auf eine aktuelle Infektion hindeuten.



Positiv für anti-Dengue IgG:

Eine farbige Linie erscheint in jedem Kontrolllinienbereich „C“ und eine farbige Linie erscheint im Testlinienbereich „IgG“.



Das Ergebnis kann auf eine Dengue-Virus-Sekundärinfektion hindeuten.

Positiv für anti-Dengue IgM:

Eine farbige Linie erscheint in jedem Kontrolllinienbereich „C“ und eine farbige Linie erscheint im Testlinienbereich „IgM“. Das Ergebnis kann auf eine Dengue-Virus-Primärinfektion hindeuten.



Positive für anti-Dengue IgG/IgM:

Jeweils eine farbige Linie erscheint in jedem Kontrolllinienbereich „C“ und jeweils eine farbige Linie erscheint im Testlinienbereich „IgG“ und „IgM“. Das Ergebnis kann auf eine Dengue-Virus-Sekundärinfektion hindeuten. Die Farbintensitäten der Linien müssen nicht übereinstimmen.



Hinweis: Eine Kombination positiver Ergebnisse für verschiedene Parameter ist möglich.

Negativ:

Es erscheint jeweils eine farbige Linie in jedem Kontrolllinienbereich „C“. Es erscheinen keine farbigen Linien in den Testlinienbereichen „NS1“, „IgG“ und „IgM“.



Ungültig:

Mindestens eine Kontrolllinie „C“ erscheint nicht. Ergebnisse von den Tests, die nach der festgelegten Auswertzeit nicht alle Kontrolllinien gebildet haben, müssen verworfen werden.



Ungenügendes Probenvolumen, abgelaufene Tests oder fehlerhafte Vorgehensweise sind die wahrscheinlichsten Ursachen dafür, dass die Kontrolllinie nicht erscheint. Überprüfen Sie den Verfahrensablauf und wiederholen Sie die Testung mit einer neuen Testkassette. Falls das Problem weiterbesteht, verwenden Sie das Test-Kit bitte nicht weiter und setzen Sie sich mit ihrem Distributor in Verbindung.



Hinweis: Die Farbintensität im Testlinienbereich „NS1“ und/oder „IgG“ und/oder „IgM“ kann abhängig von der Konzentration der Dengue NS1-Antigene und/oder „IgG“ und/oder „IgM“, die in der Probe vorhanden sind, variieren. Daher sollte jede Farbtonung im Testlinienbereich als positives Ergebnis betrachtet werden.

11. Qualitätskontrolle

Die Testkassette beinhaltet eine interne Verfahrenskontrolle: Jeweils eine in Kontrolllinienbereichen (C) erscheinende farbige Linie wird als interne Verfahrenskontrolle betrachtet. Sie bestätigt ausreichendes Probenvolumen, eine korrekte

Verfahrenstechnik und dass die Membran ausreichend durchnässt ist.

Die Gute Laborpraxis (GLP) empfiehlt den Einsatz von Kontrollmaterialien zum Nachweis der einwandfreien Leistung des Test-Kits.

12. Grenzen des Tests

- Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test weist nur die Anwesenheit von Dengue-NS1-Antigenen und anti-Dengue-Antikörpern in der Probe nach und sollte nicht als einziges Kriterium für die Diagnose von Dengue verwendet werden.
- Die Abschnitte „Testdurchführung“ und „Testauswertung“ sollten bei der Testung auf die Anwesenheit von Dengue-Antigenen und anti-Dengue-Antikörpern im Vollblut, Serum und Plasma genau befolgt werden. Die Nichtbeachtung des Verfahrens kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Ein negatives Testergebnis für Dengue NS1 Ag schließt eine mögliche Exposition gegenüber einer Infektion oder eine Infektion mit Dengue-Viren nicht aus.
- Ein negatives Testergebnis für Dengue NS1 Ag kann auftreten, wenn die Menge an Dengue-Antigenen in der Probe unter der Nachweisgrenze des Tests liegt oder wenn die nachgewiesenen Dengue-Antigene während des Krankheitsstadiums, in dem die Probe entnommen wurde, nicht vorhanden waren.
- Proben, die unüblich hohe Titer von heterophilen Antikörpern oder rheumatoiden Faktoren enthalten, können die erwarteten Testergebnisse beeinträchtigen.
- Wenn die Symptome weiterbestehen, während das mit dem NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test erhaltene Ergebnis negativ oder nicht-reaktiv ist, empfiehlt es sich, einige Tage später eine wiederholte Testung des Patienten oder zusätzliche Tests, basierend auf alternativen Testmethoden, wie z.B. PCR oder ELISA, durchzuführen.
- Die mit dem NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test erzielten Ergebnisse sollten nur in Verbindung mit anderen diagnostischen Verfahren und klinischen Befunden interpretiert werden.
- Nach frühem Einsetzen des Fiebers können anti-Dengue IgM-Konzentrationen unterhalb von nachweisbaren Konzentrationen liegen. Für Primärinfektionen zeigte ein Antibody-Capture-IgM-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (MAC-ELISA), dass 80% aller getesteten Dengue-Patienten nachweisbare IgM-Konzentrationen am fünften Tag nach der Infektion aufwiesen und 99% aller Patienten am Tag 10 IgM-positiv getestet wurden. Daher empfiehlt es sich, dass die Patienten innerhalb dieses Zeitraums getestet werden. Was Sekundärinfektionen betrifft, kennzeichnen ein niedriger Stoffmengenanteil der anti-Dengue-IgM und ein hoher Stoffmengenanteil der anti-Dengue-IgG, welche weitgehend reaktiv zu Flaviviren sind, die Antikörper.⁵ Die Testlinie „IgM“ kann schwach sein und eine Kreuzreaktion kann im Testlinienbereich „IgG“ auftreten.
- Serologische Kreuzreaktivitäten durch die Flavivirus-Gruppe (Dengue 1, 2, 3 & 4, St. Louis-Enzephalitis, West-Nil-Virus, Japanische Enzephalitis und Gelbfieberviren) ist üblich.^{6,7,8} Positive Ergebnisse sollten unter Verwendung anderer Methoden bestätigt werden.

- Die andauernde An- oder Abwesenheit von Antikörpern kann nicht dazu verwendet werden, um den Erfolg oder Misserfolg der Behandlung zu bestimmen.
- Ergebnisse von immunsupprimierten Patienten sollten mit Vorsicht ausgewertet werden.

13. Erwartete Werte

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test wurde mit einem führenden, kommerziell erhältlichen Dengue Ag EIA verglichen. Die Korrelation zwischen beiden Systemen beträgt 96%.

Eine Dengue-Primärinfektion wird durch die Anwesenheit von nachweisbaren IgM 3-5 Tage nach dem Beginn der Infektion gekennzeichnet. Eine Dengue-Sekundärinfektion wird mit einer Steigerung von Dengue-spezifischen IgG in Verbindung gebracht. In den meisten Fällen geht dies mit erhöhten IgM-Werten einher.

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test wurde mit einem führenden, kommerziell erhältlichen Dengue ELISA verglichen und zeigte eine Sensitivität von 83,3% für IgM bei Primärinfektionen und >99,9% für IgG bei Sekundärinfektionen.

14. Leistungsmerkmale des Tests

Sensitivität und Spezifität

Ein Serokonversionspanel, das klinische Proben von einer Gruppe mit symptomatischen und einer mit asymptomatischen Personen umfasste, wurde mit dem NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test auf Dengue-NS1-Antigene und anti-Dengue-IgG/IgM getestet. Die Ergebnisse für Dengue NS1 Ag wurden mit einem führenden, kommerziell erhältlichen Dengue Ag EIA bestätigt, wohingegen die Ergebnisse für anti-Dengue-IgG/IgM mit einem führenden, kommerziell erhältlichen Dengue ELISA bestätigt wurden.

Die Ergebnisse für anti-Dengue-IgG/IgM zeigen, dass die gesamte relative Sensitivität für Primär- und Sekundärinfektionen des NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Tests 95,7% beträgt, die relative Spezifität >99,9% beträgt und die gesamte relative Genauigkeit 99,3% beträgt.

Dengue-Primärinfektion für IgG/IgM Testergebnisse

		Dengue ELISA			
		Positiv		Negativ	
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Ergebnisse	IgM	IgG		
	Positiv	IgM	15	0	0
		IgG	3	0	0
Negativ		0	0	0	

Relative Sensitivität (IgM): 83,3%

Dengue-Sekundärinfektion für IgG/IgM Testergebnisse

		Dengue ELISA			
		Positiv		Negativ	
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Ergebnisse	IgM	IgG		
	Positiv	IgM	37	0	0
		IgG	15	52	0
Negativ		0	0	0	

Relative Sensitivität (IgM): 71,2%

Relative Sensitivität (IgG): >99,9%

Nicht-Dengue Infektion für IgG/IgM Testergebnisse

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Ergebnisse		Dengue ELISA		
			Positiv		Negativ
	Positiv	IgM	IgG	IgM	
			0	0	0
		IgG	0	0	0
	Negativ		0	0	338

Relative Sensitivität (Negativ): >99,9%

Relative Sensitivität: $(15+52)/(18+52) = 95,7\%$ (95%CI*: 88%~99,1%)

Relative Spezifität: $338/338 >99,9\%$ (95%CI*: 99,1%~100%)

Genauigkeit: $(15+52+338)/(18+52+338) = 99,3\%$ = (95%CI*: 97,9%~99,8%)

*Konfidenzintervalle

Die Ergebnisse für Dengue NS1 Ag zeigen, dass die relative Sensitivität des NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Tests 95,8% beträgt und die relative Spezifität 96,1% beträgt.

Dengue NS1 Ag Testergebnisse:

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test	Dengue Ag ELISA			
		+	-	Total
	+	137	8	145
	-	6	200	206
	Total	143	208	351

Relative Sensitivität: $137/143*100\% = 95,8\%$ (95%CI*: 91,1%~98,4%)

Relative Spezifität: $200/208*100\% = 96,1\%$ (95%CI*: 92,6%~98,4%)

Genauigkeit: $(137+208)/(137+6+8+200)*100\% = 96\%$ (95%CI*: 93,4%~97,8%)

* Konfidenzintervalle

Präzision

Intra-Assay

Die Präzision innerhalb eines Durchlaufs wurde anhand von 15 Replikaten von vier Proben ermittelt: einer negativen, einer niedrig-positiven, einer mittel-positiven und einer hoch-positiven. Die Proben wurden in >99% der Fälle korrekt identifiziert.

Inter-Assay

Die Präzision zwischen verschiedenen Durchläufen wurde anhand von 15 unabhängigen Tests derselben vier Proben ermittelt: einer negativen, einer niedrig-positiven, einer mittel-positiven und einer hoch-positiven. Drei verschiedene Chargen der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Tests wurden mit diesen Proben getestet. Die Proben wurden in >99% der Fälle korrekt identifiziert.

Kreuzreaktivität

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test wurde mit Proben getestet, die positiv für HAMA, RF, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Syphilis, HIV, HCV, *H. pylori*, MONO, CMV, Röteln und TOXO sind. Die Ergebnisse zeigten keine Kreuzreaktivitäten.

Interferierende Substanzen

Die folgenden potenziell interferierenden Substanzen wurden Dengue-negativen und -positiven Proben zugegeben:

Acetaminophen: 20 mg/dl	Coffein: 20 mg/dL
Acetylsalicylsäure: 20 mg/dL	Gentisinsäure: 20 mg/dL
Ascorbinsäure: 2 g/dL	Albumin: 2 g/dL
Kreatin: 200 mg/dL	Hämoglobin 1000 mg/dL
Bilirubin: 1 g/dL	Oxalsäure: 60 mg/dL

Keine dieser Substanzen interferierte mit dem Test bei getesteten Konzentrationen.

15. Referenzen

- Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.
- Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
- Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese J. Trop. Med. Hygiene 1994; 22: 9-12.
- Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. Rev. Med. Micro. 1995; 6:39-48.
- Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
- Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4): 725-8.
- Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
- Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus. Microbiol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2016-09-06 OM/UJA

1. Intended Use

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test is a rapid chromatographic immunoassay for the simultaneous qualitative detection and differentiation of the dengue NS1 antigen and anti-dengue virus IgG and IgM in human whole blood, serum or plasma. The test is intended for use as an aid in the diagnosis of dengue infections and designed for professional use only.

2. Introduction and Clinical Significance

Dengue virus is a flavivirus, transmitted by tiger mosquitos *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. It is widely distributed throughout the tropical and subtropical areas of the world¹ and causes up to 100 million infections annually.² Classic Dengue infection is characterised by a sudden onset of fever, intense headache, myalgia, arthralgia and a rash.

Primary dengue infection causes IgM to increase to a detectable level in 3 to 5 days after the onset of fever. IgM generally persist for 30 to 90 days.³ Most dengue patients in endemic regions have secondary infections,⁴ resulting in high levels of specific IgG prior to or simultaneous with IgM response.⁵ Therefore, the detection of specific anti-dengue IgM and IgG can also help to distinguish between primary and secondary infections.

NS1 is one of 7 Dengue virus non-structural proteins which are thought to be involved in viral replication. NS1 exists as a monomer in its immature form, but is rapidly processed in the endoplasmic reticulum to form a stable dimer. A small amount of NS1 remains associated with intracellular organelles where it is thought to be involved in viral replication. The rest of NS1 is found either to be associated with the plasma membrane or to be secreted as a soluble hexadimer. NS1 is essential for viral viability but its precise biological function is unknown. Antibodies produced in response to NS1 in viral infection can cross-react with cell surface antigens on epithelial cells and platelets. This has implications in the development of dengue hemorrhagic fever.

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test is a rapid test that utilises a combination of coated dengue antibodies bound to coloured particles for the detection of dengue NS1 antigens and dengue antigens bound to coloured particles for the detection of anti-dengue IgG and anti-dengue IgM in human whole blood, serum or plasma.

3. Test Principle

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test is a qualitative membrane-based immunoassay for the detection of anti-dengue antibodies and dengue NS1 antigens in human whole blood, serum or plasma.

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test contains two test strips (left side: Dengue NS1 Ag Test; right side: Dengue IgG/IgM Test).

The Dengue IgG/IgM Test on the right side consists of two components. In the IgG component anti-human-IgG are precoated in the testline region 'IgG'. During testing, the specimen reacts with dengue antigen-coated particles in the test cassette. The mixture then migrates along the membrane chromatographically by capillary action and reacts with the anti-human IgG antibodies in the test line region 'IgG'. If the

specimen contains anti-dengue IgG, a coloured line appears in the test line region 'IgG'.

In the IgM component, anti-human IgM antibodies are precoated in the test line region 'IgM'. If anti-dengue IgM are present in the specimen, they react with the dengue antigen-coated particles in the test cassette. The complex is then captured by the anti-human IgM antibodies, forming a coloured line in the test line region 'IgM'.

If the specimen does not contain dengue antibodies, no coloured line appears in either of the test line regions, indicating a negative result.

The Dengue NS1 Ag Test on the left side:

During testing, the specimen reacts with dengue antibody-conjugates on the membrane of the internal test strip. The gold-antibody conjugates bind to dengue antigens in the specimen, which in turn are bound by anti-dengue NS1 antibodies precoated on the membrane. As the mixture moves along the membrane, the anti-dengue NS1 antibodies bind to the antibody-antigen complex, causing pale or dark pink line to form in the test line region 'NS1' of the membrane. The colour intensity of the lines may vary depending upon the amount of antigens present in the sample. The appearance of a pink line in the test line region 'NS1' should be considered as a positive result.

If the specimen does not contain dengue antigens, no coloured line appears in the test line region, indicating a negative result.

The appearance of both coloured lines in the control line regions (C) serve as a procedural control, indicating that proper volume of specimen has been added and membrane wicking has occurred.

4. Reagents and Materials Supplied

- 25 NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM test cassettes
- 25 disposable pipettes (5 µl)
- 25 disposable pipettes (25 µl)
(the provided 5 µl and 25 µl pipettes dispense approximately 5 µl and 25 µl respectively in one drop even if more blood is aspirated into the pipette)
- 1 Buffer (3 ml)
- 1 package insert

5. Additional Materials Required

- Specimen collection containers
- Centrifuge (for serum/plasma)
- Timer
- Lancet (for fingerstick whole blood only)
- Capillary tube (75 µl, if needed)
- Micropipette (if needed)

6. Storage & Stability

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test kits should be stored at 2-30°C and used before the expiry date printed on the packaging. Test cassettes are stable until the expiration date printed on the foil pouches. Test cassettes should remain in sealed pouches until use. Do not freeze tests. Do not use tests beyond the expiration date.

7. Warnings and Precautions

- For professional *in-vitro* diagnostic use only.

- Carefully read through the test procedure prior to testing.
- Do not use the test beyond the expiration date indicated on the package.
- Do not use the test if the foil pouch is damaged.
- Do not reuse tests.
- Do not add samples to the reaction area (result area).
- In order to avoid contamination, do not touch the reaction area (result area).
- Avoid cross-contamination of specimens by using a new specimen collection container for each specimen obtained.
- Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and test kits are handled.
- Wear protective clothing such as laboratory coats, disposable gloves and eye protection when specimens are being assayed.
- Handle all specimens as if they contain infectious agents. Observe established precautions for microbiological risks throughout all procedures and standard guidelines for the appropriate disposal of specimens.
- The test kit contains products of animal origin. Certified knowledge of the origin and/or sanitary state of the animals does not completely guarantee the absence of transmissible pathogenic agents. It is therefore recommended that these products be treated as potentially infectious, and handled in accordance with usual safety precautions (e.g., do not ingest or inhale).
- Humidity and temperature can adversely affect test results.
- Used testing materials should be discarded according to local regulations.

8. Specimen Collection and Preparation

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test can be performed using whole blood, serum or plasma.

To collect fingerstick whole blood specimens:

- Wash the patient's hand with soap and warm water or clean it with an alcohol swab. Allow it to dry.
- Massage the hand without touching the puncture site by rubbing down the hand towards the fingertip of the middle or ring finger.
- Puncture the skin with a sterile lancet. Wipe away the first drop of blood.
- Gently rub the hand from wrist to palm to finger to form a rounded drop of blood over the puncture site.

Venipuncture whole blood specimens

For serum or plasma testing, separate serum or plasma from blood as soon as possible to avoid hemolysis. Use only clear, non-hemolysed specimens.

Testing should be performed immediately after specimen collection. Do not leave specimens at room temperature for prolonged periods of time. Serum and plasma specimens can be stored at 2-8°C for up to 3 days. For long-term storage, specimens should be kept below -20°C. Whole blood collected by venipuncture should be stored at 2-8°C if the test is to be run within 2 days of collection. Do not freeze whole blood specimens. Fingerstick whole blood should be tested immediately. Bring specimens to room temperature prior to testing. Frozen specimens should be completely thawed and mixed well prior to testing. Specimens should not be frozen and thawed repeatedly. If specimens are to be shipped, they

should be packed in compliance with federal regulations for transportation of etiologic agents.

9. Test Procedure

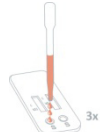
Bring tests, specimens, buffer and/or controls to room temperature (15-30°C) prior to testing.

1. Remove the test cassette from the sealed foil pouch and place it on a clean and level surface. The test cassette should be used immediately after opening the foil pouch. Label the test cassette with the patient or control identification.

2. a) For serum or plasma specimen:

For Dengue NS1 Ag:

Holding the provided 25 µl dropper vertically, add 3 drops (approximately 75 µl) of serum or plasma to the sample well (S) of the test cassette.



and

For anti-Dengue IgG/IgM:

I. To use a pipette:

Holding the provided 5 µl pipette vertically, draw serum or plasma specimen up to the first widening (approximately 5 µl) and add it to the specimen well (S) of the test cassette. Then add 1 drop (approximately 40 µl) of buffer to the sample well (S). **Avoid trapping air bubbles in the specimen well.**



or

II. To use a micropipette:

Using a micropipette, dispense 5 µl of serum or plasma into the specimen well (S) of the test cassette. Then add 1 drop (approximately 40 µl) of buffer to the sample well (S).

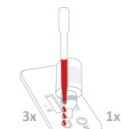


b) For fingerstick/venipuncture whole blood specimen:

For Dengue NS1 Ag:

I. To use a pipette:

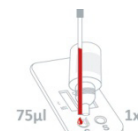
Holding the provided 25 µl dropper vertically, add 3 drops (approximately 75 µl) of whole blood to the sample well (S) of the test cassette. Then add 1 drop (approximately 40 µl) of buffer to the sample well (S).



or

II. To use a capillary tube:

Fill the capillary tube and transfer approximately 75 µl of fingerstick whole blood specimen into the sample well (S). Then add 1 drop (approximately 40 µl) of buffer to the sample well (S).



or

III. To use hanging drops:

Allow 3 hanging drops (approximately 75 µl) of fingerstick whole blood to fall into the sample well (S) of the test cassette. Then add 1 drop



(approximately 40 µL) of buffer to the sample well (S).

For anti-Dengue IgG/IgM:

I. To use a pipette:

Holding the provided 5 µL pipette vertically, draw whole blood specimen 1 cm above the first widening (approximately 10 µL) and add it to the specimen well (S) of the test cassette. Then add 1 drop (approximately 40 µL) of buffer to the sample well (S).



or



10 min

3. Start the timer.

4. Read the result after 10 minutes. Do not interpret the result after more than 20 minutes.

10. Result Interpretation

Positive for Dengue NS1 Ag:

One coloured line develops in each control line region 'C' and one coloured line develops in the test line region 'NS1'. The result may be indicative of current infection.



Positive for anti-Dengue IgG:

One coloured line develops in each control line region 'C' and one coloured line develops in the test line region 'IgG'. The result may be indicative of secondary dengue virus infection.



Positive for anti-Dengue IgM:

One coloured line develops in each control line region 'C' and one coloured line develops in the test line region 'IgM'. The result may be indicative of primary dengue virus infection.



Positive for anti-Dengue IgG/IgM:

One coloured line develops in each control line region 'C' and one coloured line develops in the test line region 'IgG' and 'IgM' respectively. The result may be indicative of secondary dengue virus infection. The color intensities of the lines do not have to match.



Note: A combination of positive results for various parameters is possible.

Negative:

One coloured line appears in each control line region 'C'. No coloured lines appear in the test line regions 'NS1', 'IgG' and 'IgM'.

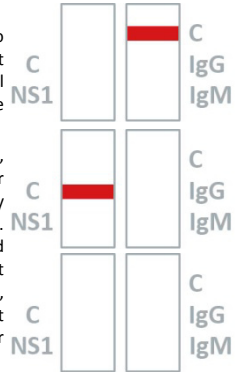


Invalid:

At least one control line 'C' fails to appear. Results from any test which has not produced all control lines at the specified reading time must be discarded.

Insufficient specimen volume, incorrect operating procedure or expired tests are the most likely reasons for control line failure. Please review the procedure and repeat the test with a new test cassette. If the problem persists, discontinue using the test kit immediately and contact your distributor.

Note: The colour intensity in the test line region 'NS1' and/or 'IgG' and/or 'IgM' may vary depending on the concentration of the Dengue NS1 antigens and/or IgG and/or IgM present in the specimen. Therefore, any shade of colour in the test line region should be considered positive.



11. Quality Control

An internal procedural control is included in the test cassette:

A coloured line appearing in each control line region (C) is considered an internal procedural control. It confirms sufficient specimen volume, adequate membrane wicking and correct procedural technique.

Good laboratory practice (GLP) recommends the use of control materials to ensure proper test kit performance.

12. Limitations

- The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test only detects the presence of dengue NS1 antigens and anti-dengue antibodies in the specimen and should not be used as the sole criterion for the diagnosis of dengue.
- The sections 'Test Procedure' and 'Result Interpretation' should be followed closely when testing for the presence of dengue antigen and anti-dengue antibody in whole blood, serum or plasma from individual subjects. Failure to follow the procedure may give inaccurate results.
- A negative test result for dengue NS1 antigens does not preclude the possibility of exposure to or infection with Dengue viruses.
- A negative test result for dengue NS1 antigens can occur if the quantity of dengue antigens present in the specimen is below the detection limit of the test or if the detected dengue antigens were not present during the stage of disease in which the sample was collected.
- Specimens containing unusually high titer of heterophile antibodies or rheumatoid factor may affect expected results.
- If symptoms persist, while the result obtained with the NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test is negative or non-reactive, it is recommended to re-sample the patient a few days later or test with an alternative testing method, such as PCR or ELISA.

- The results obtained with the NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test should only be interpreted in conjunction with other diagnostic procedures and clinical findings.
- After the early onset of fever, anti-dengue IgM concentrations may be below detectable levels. For primary infection, an IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA) showed that 80% of the tested dengue patients exhibited detectable levels of IgM by the fifth day after infection and 99% of the patients tested IgM positive by day 10. Therefore, it is recommended that patients be tested within this period of time. As for the secondary infection, a low molar fraction of anti-dengue IgM and a high molar fraction of anti-dengue IgG that are broadly reactive to flaviviruses, characterise the antibodies.⁵ The test line 'IgM' may be faint, and a cross-reaction in the test line region 'IgG' may occur.
- Serological cross-reactivity across the flavivirus group (Dengue 1, 2, 3 & 4, St. Louis encephalitis, West Nile virus, Japanese encephalitis and yellow fever viruses) is common.^{6,7,8} Positive results should be confirmed using other methods.
- The continued presence or absence of antibodies cannot be used to determine the success or failure of therapy.
- Results from immunosuppressed patients should be interpreted with caution.

13. Expected Values

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test has been compared with a leading commercially available Dengue Ag EIA. The correlation between the two systems is 96%.

Primary dengue infection is characterised by the presence of detectable IgM 3-5 days after the onset of infection. Secondary dengue infection is characterised by the elevation of dengue-specific IgG. In the majority of cases, this is accompanied by elevated levels of IgM.

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test has been compared with a leading commercially available Dengue ELISA, demonstrating sensitivity of 83.3% for IgM in primary infection and >99.9% for IgG in secondary infection.

14. Performance Characteristics

Sensitivity and Specificity

A seroconversion panel comprising clinical samples obtained from a population of symptomatic and asymptomatic individuals was tested for dengue NS1 antigens and anti-Dengue IgG/IgM, using the NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test. The results for Dengue NS1 Ag were confirmed by a leading, commercially available Dengue Ag EIA, whereas the results for anti-Dengue IgG/IgM were confirmed by a leading, commercially available Dengue ELISA.

The results for anti-Dengue IgG/IgM show that the overall relative sensitivity for the primary and secondary infection of the NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test is 95.7%, the relative specificity is >99.9% and the relative accuracy is 99.3%.

Dengue primary infection for IgG/IgM test results

		Dengue ELISA			
		Positive		Negative	
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Results		IgM		IgG
	Positive	IgM	15	0	0
		IgG	3	0	0
Negative		0	0	0	

Relative sensitivity (IgM): 83.3%

Dengue secondary infection for IgG/IgM test results

		Dengue ELISA			
		Positive		Negative	
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Results		IgM		IgG
	Positive	IgM	37	0	0
		IgG	15	52	0
Negative		0	0	0	

Relative sensitivity (IgM): 71.2%

Relative sensitivity (IgG): >99.9%

Non-dengue infection for IgG/IgM test results

		Dengue ELISA			
		Positive		Negative	
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Results		IgM		IgG
	Positive	IgM	0	0	0
		IgG	0	0	0
Negative		0	0	338	

Relative sensitivity (negative): >99.9%

Relative sensitivity: $(15+52)/(18+52) = 95.7\%$ (95%CI*: 88%~99.1%)

Relative specificity: $338/338 >99.9\%$ (95%CI*: 99.1%~100%)

Accuracy: $(15+52+338)/(18+52+338) = 99.3\%$ = (95%CI*: 97.9%~99.8%)

*Confidence Intervals

The results for Dengue NS1 Ag show that the relative sensitivity of the NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test is 95.8% and the relative specificity is 96.1%.

Dengue NS1 Ag test results:

		Dengue Ag ELISA		
		+	-	Total
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (NS1 antigens)	+	137	8	145
	-	6	200	206
	Total	143	208	351

Relative sensitivity: $137/143*100\% = 95.8\%$ (95%CI*: 91.1%~98.4%)

Relative specificity: $200/208*100\% = 96.1\%$ (95%CI*: 92.6%~98.4%)

Accuracy: $(137+208)/(137+6+8+200)*100\% = 96\%$ (95%CI*: 93.4%~97.8%)

*Confidence Intervals

Precision

Intra-Assay

Within-run precision has been determined by using 15 replicates of four specimens: a negative, a low positive, a middle positive and a high positive. The specimens were correctly identified >99% of the time.

Inter-Assay

Between-run precision has been determined by 15 independent assays on the same four specimens: a negative, a low positive, a middle positive and a high positive. Three different lots of the NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test were tested using these specimens. The specimens were correctly identified >99% of the time.

Cross-reactivity

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test has been tested with HAMA, RF, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Syphilis, HIV, HCV, *H. pylori*, MONO, CMV, Rubella and TOXO positive specimens. The results showed no cross-reactivity.

Interfering substances

The following potentially interfering substances were added to dengue negative and positive specimens.

Acetaminophen: 20 mg/dl	Caffeine: 20 mg/dL
Acetylsalicylic acid: 20 mg/dL	Gentisic acid: 20 mg/dL
Ascorbic acid: 2 g/dL	Albumin: 2 g/dL
Creatine: 200 mg/dL	Hemoglobin 1000 mg/dL
Bilirubin: 1 g/dL	Oxalic acid: 60 mg/dL

None of the substances at the concentration tested interfered in the assay.

15. References

1. Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. *Rev. Infect. Dis.* 1984; 6:251-264.
2. Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239:476-481.
3. Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Japanese J. Trop. Med. Hygiene* 1994; 22: 9-12.
4. Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. *Rev. Med. Micro.* 1995; 6:39-48.
5. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
6. Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jul; 10(4): 725-8.
7. Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr* (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
8. Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus. *Microbiol Immunol.* 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2016-09-06 OM/UJa

1. Domaine d'application

Le test rapide NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM est un immunodosage chromatographique pour la détection qualitative simultanée et pour la différenciation des antigènes de la dengue NS1 et des anticorps IgG et IgM anti-dengue dans les échantillons de sang total, de sérum et de plasma. Le test est une aide au diagnostic d'une infection à la dengue. Il est réservé à un usage professionnel.

2. Introduction et signification clinique

Le virus de la dengue fait partie de la famille des flavivirus. Il est transmis par les moustiques tiges *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Ce moustique est largement présent dans les régions tropicales et subtropicales du globe. Il est à l'origine de 100 millions d'infections par an. Les symptômes classiques des infections par la dengue sont une apparition soudaine de la fièvre, de forts maux de têtes, une myalgie, une arthralgie et des réactions cutanées.

Une infection primaire à la dengue provoque une augmentation des IgM jusqu'à atteindre une concentration détectable dans les 3 à 5 jours après apparition de la maladie. De manière générale, les IgM sont détectables de 30 à 90 jours.³ La plupart des patients touchés par la dengue résidents dans des régions endémiques sont atteints d'une infection secondaire.⁴ Ceci provoque une augmentation de la concentration en IgG spécifiques pouvant être accompagnée d'une réaction aux IgM.⁵ Ainsi, la détection des IgM anti-dengue spécifiques peut également permettre de différencier une infection primaire d'une infection secondaire.

L'antigène NS1 est une des sept protéines non structurales du virus de la dengue probablement responsables des répliques virales. Le NS1 existe en tant que monomère dans sa forme impure. Il est transformé dans le réticulum endoplasmique pour ainsi former un dimère stable. Une faible quantité de NS1 reste associée à des organelles intracellulaires où elle joue un rôle lors de la réplique virale. Le reste des protéines NS1 se lie soit à la membrane plasmique ou a un hexamère soluble. Le NS1 est donc essentiel pour la viabilité du virus, cependant sa fonction biologique exacte n'est, à ce jour, pas connue. Les anticorps formés lors de la réaction à l'infection virale peuvent provoquer des réactions croisées avec les antigènes de surface des cellules épithéliales et les plaquettes sanguines. Ceci a un impact direct sur le développement des fièvres hémorragiques de la dengue.

Le test rapide NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM utilise une combinaison spéciale d'anticorps de la dengue liés à des particules d'or immobilisés sur la bandelette pour la détection des antigènes NS1 de la dengue pour la détection des IgG et IgM anti-dengue dans les échantillons de sang total humain, de sérum et de plasma.

3. Principe du test

Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM est un immunodosage qualitatif à membrane pour la détection des anticorps anti-dengue et des antigènes NS1 du virus de la dengue dans le sang total, le sérum et le plasma.

Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM est composé de deux bandelettes (à gauche : test dengue NS1 Ag, côté droit : test combiné dengue IgG/IgM).

Le test dengue IgM/IgM est composé de deux éléments. Des anticorps anti-IgG humains sont immobilisés à hauteur de la ligne de test "IgG". Pendant le test, l'échantillon réagit avec les antigènes de la dengue-particules d'or immobilisés sur la cassette. Le mélange migre le long de la membrane par capillarité et réagit avec les anticorps anti-IgG humains immobilisés à hauteur de la zone de test "IgG". Si des anticorps IgG anti-dengue sont présents dans l'échantillon, une ligne colorée apparaît à hauteur de la zone de test "IgG".

Des anticorps anti-IgM humains sont immobilisés à hauteur de la zone de test "IgM". Si des anticorps IgM anti-dengue sont présents dans l'échantillon, ceux-ci réagissent aux antigènes de la dengue couplés à des particules d'or dans la cassette. Le complexe est saisi par les anticorps anti-IgM humains générant une ligne colorée à hauteur de la ligne de test "IgM".

Si l'échantillon ne contient aucun anticorps anti-dengue, aucune ligne de couleur n'apparaît à hauteur des lignes de test. Ceci indique un résultat négatif.

Test dengue NS1 Ag côte gauche :

Pendant la réalisation du test, l'échantillon réagit avec le conjugué anticorps-dengue sur la bandelette interne de la cassette. Les conjugués anticorps-particules d'or lient les antigènes de la dengue dans l'échantillon. Ceux-ci se lient à leur tour aux anticorps anti-dengue NS1 présents sur la membrane du test. Au moment où le mélange migre le long de la membrane par force capillaire, les anticorps anti-dengue NS1 se lient au complexe anticorps-antigènes générant une ligne de test rose clair à rose foncé sur la membrane. L'intensité de la couleur de la ligne de test dépend de la concentration en antigènes de l'échantillon. L'apparition de cette ligne rosée à hauteur de la zone de test est considérée comme un résultat positif.

Les deux lignes colorées qui apparaissent à hauteur des zones de contrôle (C) sont une procédure de contrôle interne. Ces lignes confirment que le volume d'échantillon était suffisant, que la manipulation a été correctement effectuée et que la membrane a été suffisamment imbibée.

4. Réactifs et matériel fournis

- 25 cassettes dengue NS1 Ag + IgG/IgM
- 25 pipettes à usage unique (5 µl)
- 25 pipettes à usage unique (25 µl)
- Les gouttes déposées par les pipettes livrées sont d'une quantité précise de 5 µl et 25 µl même si les pipettes peuvent contenir une quantité plus élevée de sang.
- 1 solution tampon "Buffer" (3 ml)
- 1 notice d'utilisation

5. Matériel supplémentaire nécessaire

- Récipient collecteur
- Centrifugeuse (sérum/plasma)
- Chronomètre
- Lancettes (pour sang total recueilli sur le bout du doigt)
- Éventuellement, tube capillaire 75 µl
- Éventuellement, micropipette

6. Péréemption et conservation des réactifs

Conservé le test à une température comprise entre 1 et 30°C dans son emballage d'origine jusqu'à la date de péréemption.

Les cassettes restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. Les cassettes devraient rester dans leur emballage fermé jusqu'à leur utilisation. Ne pas congeler les tests. Ne pas utiliser le test au-delà de la date de péremption.

7. Avertissement et précautions

- Test réservé au diagnostic *in-vitro* professionnel.
- Lire attentivement la note d'utilisation avant de réaliser le test.
- Ne pas utiliser le test après la date de péremption indiquée sur l'emballage.
- Ne pas utiliser le test si l'emballage est endommagé.
- Test à usage unique.
- Ne pas déposer de prélèvement sur la zone réactive (fenêtre de résultats).
- Ne pas toucher la zone réactive afin d'éviter toute contamination.
- Pour chaque prélèvement, utiliser un collecteur différent afin d'éviter tous risques de contaminations croisées.
- Ne pas manger, boire ou fumer à proximité de la zone de manipulation des tests.
- Utiliser des vêtements de protection tels qu'une blouse de laboratoire, des gants à usage unique et des lunettes de protection.
- Manipuler les échantillons en les considérant comme de potentiels réactifs infectieux. Respecter les précautions relatives aux risques microbiologiques pendant les manipulations ainsi que les directives locales en vigueur concernant l'élimination des déchets.
- Ce test contient des produits d'origine animale. La certification concernant l'origine et l'état sanitaire des animaux ne certifie pas l'absence totale d'agents pathogènes transmissibles. Tous les prélèvements et matériaux utilisés pour ce test doivent être considérés comme des matières infectieuses. Il est recommandé d'appliquer les mesures de précaution nécessaires (ne pas avaler ou inhaler.)
- L'humidité et les fortes températures peuvent altérer les résultats du test.
- Les composants du test doivent être éliminés selon les directives locales en vigueur.

8. Recueil, préparation et conservation des échantillons

Le test NADAL® NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM peut être réalisé avec des échantillons de sang total, de sérum ou de plasma.

Recueil des échantillons de sang total sur le bout du doigt

- Laver les mains du patient avec du savon et de l'eau chaude ou nettoyer soigneusement la zone de piqûre avec un tampon alcoolisé. Laisser sécher.
- Masser la main en direction du bout du majeur ou de l'annulaire sans toucher la zone de piqûre.
- Piquer dans le bout du doigt à l'aide d'une lancette stérile. Essuyer la première goutte de sang.
- Frotter la main du poignet à la paume et au doigt jusqu'à former une goutte de sang au niveau de la zone de piqûre.

Sang total pour ponction veineuse

Pour une analyse sur un échantillon sérum ou de plasma, séparer le sérum ou le plasma du sang dès que possible pour éviter une hémolyse. Utiliser exclusivement des échantillons clairs et non-hémolysés.

L'analyse devrait être réalisée juste après le recueil des échantillons. Ne pas conserver les échantillons à température ambiante pendant une période trop longue. Les échantillons de sérum et de plasma peuvent être conservés jusqu'à 3 jours à une température comprise entre 2 et 8°C. Lors d'une conservation plus longue, conserver les échantillons à -20°C. Le sang total veineux devrait être conservé à une température comprise entre 2 et 8°C si le test est réalisé dans les 2 jours qui suivent le recueil des échantillons. Ne pas congeler les échantillons de sang total. Les échantillons de sang total recueillis au bout du doigt devraient être testés dès que possible. Amener tous les échantillons à température ambiante avant la réalisation du test. Les échantillons congelés devraient être décongelés avant la réalisation du test et bien mélangés. Ne pas répéter les cycles de congélation-décongélation. Dans les cas où les échantillons doivent être expédiés, s'assurer que ceux-ci soient emballés selon les normes relatives au transport de matières éthologiques.

9. Procédure du test

Amener les tests, les échantillons et/ou les contrôles à température ambiante (15-30°C) avant la réalisation du test.

1. Retirer la cassette de son emballage d'origine et déposer la cassette sur une surface plane et propre. Utiliser la cassette immédiatement après l'ouverture de son emballage. Indiquer les identifiants du patient et du contrôle sur la cassette.
2. **a) Échantillons de sérum ou de plasma**

Pour dengue NS1 Ag :

Tenir la pipette à la verticale et déposer 3 gouttes (env. 75 µl) de l'échantillon de sérum et de plasma dans le puits de dépôt (S) de la cassette.



et

Pour anti-dengue IgG/IgM :

I. À l'aide de la pipette

Tenir la pipette de 5 µl à la verticale, recueillir les échantillons de sérum et de plasma jusqu'à atteindre l'élargissement de la pipette (env. 5 µl) puis déposer dans le puits de dépôt de la cassette. Pour finir, ajouter 1 goutte (env. 40 µL) de la solution tampon "Buffer". **Éviter la formation de bulles d'air dans le puits de dépôt.**



ou

II. À l'aide d'une micro-pipette

Déposer 5 µl de sérum ou de plasma dans le puits de dépôt de la cassette (S) à l'aide de la micro-pipette. Pour finir, ajouter 1 goutte (env. 40 µL) de la solution tampon "Buffer".

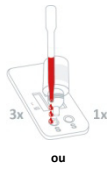


b) Échantillons de sang total par ponction veineuse

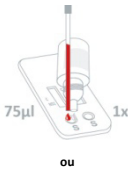
Pour dengue NS1 Ag :

I. À l'aide de la pipette

Tenir la pipette de 25 µl à la verticale et déposer 3 gouttes (env. 75 µl) de sang total dans le puits de dépôt (S) de la cassette. Pour finir, ajouter 1 goutte (env. 40 µl) de la solution tampon "Buffer".



ou



ou

II. Tubes capillaires

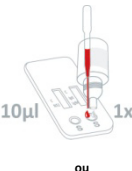
Recueillir un échantillon de sang avec le tube capillaire et déposer environ 75 µl dans le puits de dépôt (S) de la cassette. Pour finir, ajouter 1 goutte (env. 40 µl) de la solution tampon "Buffer".

III. Gouttes suspendues

Laisser tomber 3 gouttes suspendues (env. 75 µl de sang total dans le puits de dépôt (S) de la cassette. Pour finir, ajouter 1 goutte (env. 40 µl) de la solution tampon "Buffer".



et



ou



10 min

Pour anti-dengue IgG/IgM

I. À l'aide de la pipette

Tenir la pipette de 5 µl à la verticale, recueillir les échantillons de sang total jusqu'à 1 cm au dessus du premier élargissement de la pipette (env. 10 µl) puis déposer dans le puits de dépôt de la cassette. Pour finir, ajouter 1 goutte (env. 40 µl) de la solution tampon "Buffer".

II. A l'aide d'une micro-pipette

Déposer 10 µl de sang total dans le puits de dépôt de la cassette (S) à l'aide de la micropipette. Pour finir, ajouter 1 goutte (env. 40 µl) de la solution tampon "Buffer".

- Démarrer le chronomètre.
- Interpréter les résultats après 10 minutes. Ne plus interpréter les résultats après 20 minutes.

10. Interprétation des résultats

Positif à dengue NS1 Ag :

Une ligne colorée apparaît à hauteur de chaque zone de contrôle (C) et une ligne colorée apparaît à hauteur de la zone de test "NS1". Le résultat indique une possible infection.



Positif à IgG anti-dengue :

Une ligne colorée apparaît à hauteur de chaque zone de contrôle (C) et une ligne colorée apparaît à hauteur de la zone de test "IgG".



Le résultat indique une possible infection secondaire au virus de la dengue.

Positif à IgM anti-dengue :

Une ligne colorée apparaît à hauteur de chaque zone de contrôle (C) et une ligne colorée apparaît à hauteur de la zone de test "IgM". Le résultat indique une possible infection primaire au virus de la dengue.



Positif à IgG/IgM anti-dengue :

Une ligne colorée apparaît à hauteur de chaque zone de contrôle (C) et une ligne colorée apparaît à hauteur de la zone de test "IgG". Le résultat indique une possible infection secondaire au virus de la dengue. L'intensité de la couleur des lignes ne correspondent pas forcément aux résultats.



Remarque : Une combinaison de plusieurs résultats positifs pour plusieurs paramètres est possible.

Négatif :

Aucune ligne colorée n'apparaît à hauteur des zones de test "NS1", "IgG" et "IgM".



Non-valide :

Au moins une ligne de contrôle "C" n'apparaît pas. Les tests sur lesquels aucune ligne de contrôle n'est apparue dans le temps d'évaluation fixé doivent être jetés.



Un volume d'échantillon insuffisant, une mauvaise manipulation ou des tests périmés sont les principales causes d'absence de ligne de contrôle. Contrôler la procédure d'exécution du test et répéter le test avec une nouvelle cassette. Dans le cas où le problème persiste, ne plus utiliser le kit du test et contacter le distributeur.



Remarque : L'intensité de la couleur des lignes test "NS1" et/ou "IgG" et/ou "IgM" peut dépendre de la concentration en antigènes dengue NS1 et/ou en "IgG" et/ou "IgM" de l'échantillon. La moindre apparition d'une ligne colorée à hauteur de la zone de test doit être considérée comme un résultat positif.

11. Contrôle qualité

La cassette contient une procédure de contrôle interne.

La ligne colorée apparaissant au niveau de la zone de contrôle (C) est considérée comme un contrôle interne. Cette ligne confirme que le volume d'échantillon était suffisant, que la manipulation a été correctement effectuée et que la membrane a été suffisamment imbibée.

Les *Bonnes Pratiques de Laboratoire* (BPL) recommandent l'utilisation de matériel de contrôles afin de confirmer la fiabilité du test.

12. Limites du test

- Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM est réservé à la détection des antigènes NS1 de la dengue et des anticorps anti-dengue dans les échantillons et ne devrait pas être le seul critère lors du diagnostic de la dengue.
- Les paragraphes "Exécution du test" et "Interprétation des résultats" devraient être scrupuleusement respectés lors de la détection des antigènes dengue et des anticorps anti-dengue dans les échantillons de sang total, de sérum et de plasma. Le non-respect du procédé peut mener à de faux résultats.
- Un résultat négatif du test dengue NS1 Ag n'exclut pas la possibilité d'une exposition à une infection ou d'une infection au virus de la dengue.
- Un résultat négatif du test dengue NS1 Ag peut survenir si la quantité des antigènes dengue contenue dans l'échantillon se situe en deçà du seuil de détection du test ou si les antigènes ne sont pas présents au stade de la maladie lors de laquelle le test est réalisé.
- Les échantillons qui contiennent une concentration anormalement élevée en anticorps hétérophiles ou en facteurs rhumatoïdes peuvent influencer les résultats attendus.
- Dans le cas où les symptômes persistent et que les résultats du test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM sont négatifs ou non-réactifs, il est conseillé de recommencer le test après quelques jours ou de réaliser de plus amples analyses avec un test basé sur une autre méthode comme par exemple : PCR ou ELISA.
- Les résultats obtenus avec le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM doivent être interprétés en association avec une méthode de test alternative ou des données cliniques.
- Dans le cas d'une apparition précoce de la fièvre, la concentration en IgM anti-dengue peut se trouver en deçà du seuil de détection du test. Lors d'une infection primaire, la méthode de dosage immunoenzymatique des IgM spécifiques (MAC-ELISA) a montré que 80 % des patients testés à la dengue ont démontré des concentrations en IgM détectables au bout du cinquième jour après l'apparition de l'infection et que 99% des patients ont été testés positifs au bout du dixième jour. Il est donc conseillé de tester les patients dans cet intervalle de temps. Lors d'une infection secondaire, une faible fraction molaire d'IgM anti-dengue et une forte fraction molaire d'IgG anti-dengue réagissant contre de nombreux flavivirus caractérisent les anticorps.⁵ Il est possible que la ligne de test "IgM" soit de faible intensité et une réaction croisée est envisageable à hauteur de la zone de test "IgG".
- Les réactions croisées sérologiques engendrées par le groupe Flavivirus (Dengue 1, 2, 3 et 4, encéphalite de Saint-Louis, Virus du Nil occidental, Encéphalite japonaise et les virus de la fièvre jaune).^{6,7,8} Les résultats positifs devraient toujours être confirmés à l'aide de méthodes alternatives.
- La présence ou l'absence d'anticorps ne permettent pas de prouver le succès ou l'échec d'un traitement.

- Les résultats des patients immunodépressifs sont à interpréter avec prudence.

13. Résultats attendus

Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM a été testé en comparaison avec un test disponible dans le commerce de type dengue Ag EIA. La corrélation entre les deux systèmes est de 96%.

Une infection primaire à la dengue est définie par la présence d'IgM détectable dans les trois à cinq jours après le début de l'infection. Une infection secondaire à la dengue est liée à une augmentation des IgG spécifiques de la dengue. Dans la plupart de cas, les valeurs en IgM augmentent également.

Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test a été testé avec un test dengue ELISA disponible dans le commerce. Le test NADAL® a montré une sensibilité de 83,3% pour IgM et de 99,9% pour IgG dans le cas d'une infection secondaire.

14. Performance du test

Sensibilité et spécificité

Un panel de séroconversion composé d'un groupe de personnes avec et sans symptômes a été testé avec le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM à la recherche d'antigènes dengue NS1 et d'IgG et d'IgM anti-dengue. Les résultats obtenus avec le test dengue NS1 Ag ont été confirmés avec un test de type dengue Ag EIA disponible dans le commerce. Les résultats obtenus avec le test anti-dengue-IgG/IgM ont été confirmés avec un test disponible dans le commerce de type ELISA.

Les résultats pour anti-dengue-IgG/IgM ont montré que la sensibilité relative du test NADAL® Dengue IgG/IgM pour les infections primaires et secondaires est de 95,7 % et que la spécificité relative est de >99,9%. La concordance générale est de 99,3%.

Infection primaire au virus de la dengue pour IgG et IgM.

		Dengue ELISA				
		Positif		Négatif		
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM	Résultats		IgM		IgG	0
	Positif	IgM	15	0	0	
		IgG	3	0	0	
Négatif		0	0	0		

Sensibilité relative (IgM): 83,3%

Infection secondaire au virus de la dengue pour IgG et IgM.

		Dengue ELISA				
		Positif		Négatif		
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM	Résultats		IgM		IgG	0
	Positif	IgM	37	0	0	
		IgG	15	52	0	
Négatif		0	0	0		

Sensibilité relative (IgM): 71,2%

Sensibilité relative (IgG): >99,9%

Résultats des tests pour IgG/IgM lors d'une infection non-dengue

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG/IgM)	Dengue ELISA			
	Résultats	Positif		Négatif
		IgM	IgG	
	Positif	0	0	0
	Négatif	0	0	338

Sensibilité relative (Négatif): >99,9%

Sensibilité relative: $(15+52)/(18+52) = 95,7\%*$ (95%CI*: 88%~99,1%)

Spécificité relative: $338+338/(99,9+52) = 95,7\%*$ (95%CI*: 99,1%~100%)

Précision: $(15+52)/(52+95,7) = 95\%*$ (95%CI*: 97,9%~99,8%)

*Intervalle de confiance

Les résultats pour dengue NS1 Ag ont montré que la sensibilité relative du test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM est de 95,8% et que la spécificité relative est de 96,1%.

Dengue NS1 Ag

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM		Dengue Ag ELISA		
		+	-	Total
	+	137	8	145
	-	6	200	206
	Total	143	208	351

Sensibilité relative: $137+143/(95+100) = 95,8\%*$ (95%CI*: 91,1%~98,4%)

Spécificité relative: $200+208/(95+100) = 96,1\%*$ (95%CI*: 92,6%~98,4%)

Précision: $(137+208)/(8+137) = 6\%*$ (95%CI*: 93,4%~97,8%)

Intervalle de confiance

Précision

Intra - essai

La précision intra-lot a été calculée sur 4 échantillons testés 15 fois : un négatif, un faible-positif, un moyen-positif et un fort-positif. Les échantillons ont été correctement identifiés à > 99%.

Inter - essai

La précision entre plusieurs sessions a été déterminée en testant 15 fois 4 échantillons de manière indépendante : un négatif, un faible-positif, un moyen-positif et un fort-positif. Trois lots différents du test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM ont été testés sur ces échantillons. Les échantillons ont été correctement identifiés à > 99%.

Réactions croisées

Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM a été testé avec des échantillons positifs à HAMA, RF, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Syphilis, HIV, HCV, *H. pylori*, MONO, CMV, à la rubéole et à la toxoplasmose. Aucune réaction croisée n'a été observée.

Substances interférentes

Les substances suivantes potentiellement interférentes ont été ajoutées à des échantillons positifs et négatifs à la dengue:

Acétaminophène : 20 mg/dL	Cofféine : 20 mg/dL
Acide acétylsalicylique : 20 mg/dL	Acide gentisique : 20 mg/dL
Acide ascorbique : 2 g/dL	Albumine : 2 g/dL
Créatine : 200mg/dL	Hémoglobine, 1000 mg/dL
Bilirubine 1 g/dL	Acide oxalique : 60mg/dL

Aucune de ces substances n'interfèrent avec le test aux concentrations testées.

15. Bibliographie

- Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.
- Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
- Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese J. Trop. Med. Hygiene 1994; 22: 9-12.
- Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. Rev. Med. Micro. 1995; 6:39-48.
- Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
- Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4): 725-8.
- Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
- Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus. Microbiol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2016-09-06 PF

1. Uso previsto

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM es un inmunoensayo cromatográfico rápido para la detección cualitativa y diferenciación simultánea del antígeno NS1 del dengue y de IgG e IgM anti-virus del dengue en sangre completa, suero o plasma humanos. Este test sirve de ayuda en el diagnóstico de infecciones por dengue y solo está indicado para el uso profesional.

2. Introducción y significado clínico

El virus del dengue es un flavivirus transmitido por mosquitos tigre *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Está ampliamente distribuido a nivel mundial en las zonas tropicales y subtropicales¹, causando hasta 100 millones de infecciones cada año.² La infección clásica por dengue se caracteriza por una aparición repentina de fiebre, intenso dolor de cabeza, mialgia, artralgia y erupción cutánea.

La infección primaria por dengue provoca un aumento de IgM hasta un nivel detectable entre 3 y 5 días después de la aparición de la fiebre. El IgM persiste generalmente de 30 a 90 días.³ La mayoría de los pacientes con dengue en las regiones endémicas tienen infecciones secundarias,⁴ provocando niveles altos de IgG específico previa o simultáneamente a la respuesta de IgM.⁵ Por esta razón, la detección de IgM e IgG anti-dengue específicos también puede ayudar a distinguir entre infecciones primarias y secundarias.

La NS1 es una de las 7 proteínas no estructurales del virus del dengue, que se cree que participan en la replicación del virus. La NS1 existe como un monómero en su forma inmadura, pero se procesa rápidamente en el retículo endoplasmático hasta formar un dímero estable. Una pequeña cantidad de NS1 permanece asociada con organelos intracelulares, donde se cree que participan en la replicación viral. El resto de NS1 se encuentra asociado a la membrana plasmática o es secretado como hexámero soluble. La NS1 es esencial para la viabilidad viral pero se desconoce su función biológica precisa. Los anticuerpos producidos en respuesta a la NS1 en la infección viral pueden provocar reacciones cruzadas con antígenos de superficie celular en las células epiteliales y plaquetas. Esto tiene implicaciones en el desarrollo de la fiebre hemorrágica del dengue.

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM es una prueba rápida que utiliza una combinación de anticuerpos contra el dengue unidos a partículas coloreadas para la detección de antígenos NS1 del dengue, y antígenos de dengue unidos a partículas coloreadas para la detección de IgG e IgM anti-dengue en sangre completa, suero o plasma humanos.

3. Principio del test

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM es un inmunoensayo cualitativo basado en una membrana para la detección de anticuerpos anti-dengue y antígenos NS1 del dengue en sangre completa, suero o plasma humanos.

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM contiene dos tiras reactivas (lado izquierdo: test de dengue NS1 Ag; lado derecho: test de dengue IgG/IgM).

El test de dengue IgG/IgM del lado derecho consta de dos componentes. En el componente IgG, los anticuerpos IgG anti-humanos están recubiertos en la región "IgG" del test.

Durante la prueba, la muestra reacciona con partículas recubiertas de antígenos del dengue en el casete de test. La mezcla migra entonces cromatográficamente a lo largo de la membrana, por acción capilar y reacciona con los anticuerpos IgG anti-humanos en la región de la línea de test "IgG". Si la muestra contiene anti-dengue IgG, aparecerá una línea coloreada en la región de test "IgG".

En el componente IgM, los anticuerpos IgM anti-humanos están recubiertos en la región de test "IgM". Si hay anti-dengue IgM en la muestra, reaccionará con las partículas recubiertas de antígenos de dengue en el test. El complejo es capturado por los anticuerpos IgM anti-humanos, formando una línea coloreada en la región "IgM" del test.

Si la muestra no contiene anticuerpos contra el dengue, no aparecerá ninguna línea coloreada en las regiones de test, indicando un resultado negativo.

El test Dengue NS1 Ag en el lado izquierdo:

Durante la prueba, la muestra reacciona con conjugados de anticuerpos contra el dengue en la membrana de la tira reactiva interna. Los conjugados de anticuerpos y oro se unen a los antígenos del dengue en la muestra que, a su vez, se unen a los anticuerpos NS1 anti-dengue que recubren la membrana. Cuando la mezcla migra a lo largo de la membrana, los anticuerpos NS1 anti-dengue se unen al complejo antígeno-anticuerpo, produciendo una línea de color rosa pálido u oscuro en la región de test NS1 de la membrana. La intensidad del color de las líneas puede variar dependiendo de la cantidad de antígenos presentes en la muestra. La aparición de una línea rosa en la región de test 'NS1' se debe considerar como resultado positivo.

Si la muestra no contiene antígenos de dengue, no aparecerá ninguna línea coloreada en la región de test, indicando un resultado negativo.

La aparición de ambas líneas coloreadas en las regiones de control (C) sirve como control del procedimiento, indicando que el volumen de muestra añadido ha sido adecuado y que la membrana se ha empapado suficientemente.

4. Reactivos y materiales provistos

- 25 test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM en formato casete
- 25 pipetas desechables (5 µL)
- 25 pipetas desechables (25 µL)
(las pipetas suministradas de 5 µL y 25 µL dispensan respectivamente aproximadamente 5 µL y 25 µL en una gota, incluso si se aspira más sangre en la pipeta)
- 1 búfer (3 mL)
- 1 manual de instrucciones

5. Materiales adicionales

- Recipiente para recolectar la muestra
- Centrifugadora (para suero/plasma)
- Cronómetro
- Lanceta (solo para sangre completa obtenida por punción digital)
- Tubo capilar (75 µL, si fuera necesario)
- Micropipeta (si fuera necesaria)

6. Almacenamiento y conservación

Almacene los kits de test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM a 2-30 °C, y utilícelos antes de la fecha de caducidad impresa en el envase. El test se mantiene estable hasta la fecha de caducidad impresa en el envase de aluminio. Los cachetes deben permanecer en sus envases sellados hasta el momento de uso. No congele los test. No utilice los kits después de su fecha de caducidad.

7. Advertencias y precauciones

- Solo apto para 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 utilice el dispositivo de test si el envase de aluminio está dañado.
- No reutilice los test.
- No añada muestras en el área de reacción (región de resultados).
- Evite tocar el área de reacción (región de resultados), a fin de evitar posibles contaminaciones.
- Evite la contaminación cruzada de las muestras utilizando un nuevo recipiente recolector para cada una.
- No coma, beba o fume en la zona durante la manipulación de las muestras y la realización del test.
- Utilice ropa protectora como batas de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección, mientras manipule las muestras.
- 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 correcta eliminación de las muestras.
- El kit de test contiene productos de origen animal. El conocimiento certificado del origen y/o estado sanitario de los animales no garantiza completamente la ausencia de agentes patogénicos transmisibles. Por eso, se recomienda tratar estos productos como potencialmente infecciosos y seguir las medidas de seguridad habituales durante su manipulación (p.ej. no ingerir ni inhalar).
- La humedad y la temperatura pueden afectar negativamente a los resultados del test.
- La eliminación de los materiales utilizados debe realizarse de acuerdo con las regulaciones locales.

8. Recolección de muestras y preparación

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM se puede realizar con sangre completa, suero o plasma.

Para recolectar muestras de sangre completa obtenida por punción digital:

- Lave la mano del paciente con jabón y agua templada o límpiela con un hisopo con alcohol. Déjela secar.
- Realice un masaje en la mano, sin tocar el lugar de punción, frotándola hacia la punta del dedo medio o anular.
- Pinche la piel con una lanceta estéril y limpie la primera gota de sangre.
- Presione la mano desde la muñeca hasta la palma, y de ahí hasta el dedo para producir una gota redonda de sangre en la zona de punción.

Muestras de sangre completa obtenida por punción venosa

Para el análisis de suero o plasma, separe el suero o el plasma de la sangre lo antes posible para evitar hemólisis. Utilice solo muestras claras no hemolizadas.

Realice el test inmediatamente después de la recolección de la muestra. No deje las muestras a temperatura ambiente durante periodos de tiempo prolongados. Las muestras de suero o plasma se pueden almacenar a 2-8°C hasta 3 días. Si desea almacenarlas durante más tiempo, debe congelarlas por debajo de -20°C. La sangre completa recolectada por punción venosa se debe almacenar a 2-8°C siempre que el test se realice en los 2 días siguientes a la recolección. No congele las muestras de sangre completa. Realice la prueba inmediatamente si la sangre completa se ha obtenido por punción digital. Lleve las muestras a temperatura ambiente antes de realizar la prueba. Si se han congelado las muestras, debe descongelarlas y mezclarlas bien antes de realizar la prueba. Evite los ciclos repetidos de congelado y descongelado. Si las muestras se van a transportar, se deben empaquetar de acuerdo con las regulaciones vigentes para el transporte de agentes etiológicos.

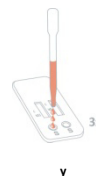
9. Procedimiento del test

Lleve los test, muestras, búfer y/o controles a temperatura ambiente (15-30°C) antes de realizar la prueba.

1. Retire el casete de test de su envase sellado y colóquelo sobre una superficie limpia y plana. Utilice el casete de test inmediatamente después de abrir el envase sellado. Etiquete el casete de test con la identificación del paciente o de control.
2. **a) Para muestras de suero o plasma:**

Para dengue NS1 Ag:

Sujetando verticalmente la pipeta de 25 µL, añada 3 gotas (aprox. 75 µL) de suero o plasma al pocillo para la muestra (S) del casete de test.



Para anti-dengue IgG/IgM:

I. Si utiliza una pipeta:

Sujetando verticalmente la pipeta de 5 µL, recolecte la muestra de suero o plasma hasta el primer ensanchamiento (aprox. 5 µL) y añádala al pocillo para la muestra (S) del casete de test. A continuación, añada 1 gota de búfer (aprox. 40 µL) al pocillo para la muestra (S). **Evite la formación de burbujas de aire en el pocillo para la muestra.**



II. Si utiliza una micropipeta:

Utilizando una micropipeta, dispense 5 µL de la muestra de suero o plasma en el pocillo (S) del casete de test. A continuación, añada 1 gota de búfer (aprox. 40 µL) al pocillo para la muestra (S).

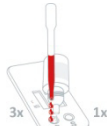


b) Para muestras de sangre completa obtenidas por punción digital o venosa:

Para Dengue NS1 Ag:

I. Si utiliza una pipeta:

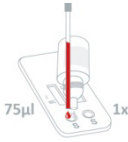
Sujetando verticalmente la pipeta de 25 µL suministrada, añada 3 gotas (aprox. 75 µL) de sangre completa al pocillo para la muestra (S) del casete de test. A continuación, añada 1 gota de búfer (aprox. 40 µL) al mismo pocillo para la muestra (S).



o bien

II. Si utiliza un tubo capilar:

Llene el tubo capilar y transfiera aproximadamente 75 µL de muestra de sangre completa obtenida por punción digital al pocillo para la muestra (S). A continuación, añada 1 gota de búfer (aprox. 40 µL) al mismo pocillo.



o bien

III. Mediante gotas colgantes:

Deje caer tres gotas (aprox. 75 µL) de sangre completa obtenida por punción digital en el pocillo para la muestra (S) del casete. A continuación, añada 1 gota de búfer (aprox. 40 µL) al pocillo para la muestra (S).



y

Para anti-dengue IgG/IgM:

I. Si utiliza una pipeta:

Sosteniendo verticalmente la pipeta suministrada de 5 µL, recolecte una muestra de sangre completa hasta 1 cm por encima del primer ensanchamiento (aprox. 10 µL) y añádalas al pocillo de la muestra (S) del casete. A continuación, añada 1 gota de búfer (aprox. 40 µL) al pocillo para la muestra (S).



o bien

II. Si utiliza una micropipeta:

Utilizando una micropipeta, dispense 10 µL de sangre completa en el pocillo para la muestra (S) del casete de test. A continuación, añada 1 gota de búfer (aprox. 40 µL) al pocillo para la muestra (S).



3. Active el cronómetro.

4. Lea los resultados del test después de 10 minutos. No interprete los resultados después de más de 20 minutos.



10 min

10. Interpretación del resultado

Positivo para dengue NS1 Ag:

Aparece una línea coloreada en cada región de control "C" y una línea coloreada en la región de test "NS1". El



resultado puede ser indicativo de una infección actual.

Positivo para anti-dengue IgG:

Aparece una línea coloreada en cada región de control "C" y una línea coloreada en la región de test "IgG". El resultado puede ser indicativo de una infección secundaria por el virus del dengue.



Positivo para anti-dengue IgM:

Aparece una línea coloreada en cada región de control "C" y una línea coloreada en la región de test "IgM". El resultado puede ser indicativo de infección primaria por el virus del dengue.



Positivo para anti-dengue IgG/IgM:

Aparece una línea coloreada en cada región de control "C" y una línea coloreada en la región de test "IgG" e "IgM" respectivamente. El resultado puede ser indicativo de una infección secundaria por el virus del dengue. Las intensidades de color de las líneas no tienen que coincidir.



Nota: es posible una combinación de resultados positivos para varios parámetros.

Negativo:

Aparece una línea coloreada en cada región de control "C". No aparecen líneas coloreadas en las regiones de test "NS1", "IgG" e "IgM".



No válido:

Al menos una de las líneas de control "C" no aparece. Si no aparecen todas las líneas de control dentro del tiempo de lectura especificado, los resultados del test deben descartarse.



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. 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.



Nota: la intensidad de color en la región de la línea de test "NS1" y/o "IgG" y/o "IgM" puede variar dependiendo de la concentración de los antígenos NS1 de dengue y/o IgG y/o IgM presentes en la muestra. Por eso, cualquier sombra

coloreada en la región de la línea de test se debe considerar positiva.

11. Control de calidad

El casete de test contiene un control interno del procedimiento.

La línea coloreada que aparece en cada región de control (C) se considera un control interno del procedimiento. Esta línea confirma que el volumen de muestra ha sido adecuado, que la membrana se ha empapado suficientemente y que la técnica del procedimiento ha sido correcta.

Las *Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)* recomiendan el uso de materiales de control para asegurar que el funcionamiento del test es correcto.

12. Limitaciones

- El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM solo detecta la presencia de antígenos del dengue NS1 y anticuerpos anti-dengue en la muestra, y no se debe utilizar como único criterio para el diagnóstico del dengue.
- Siga atentamente las indicaciones de las secciones "Procedimiento del test" e "Interpretación del resultado" durante la realización del test para detectar la presencia de antígenos del dengue y anticuerpos anti-dengue en sangre completa, suero o plasma de sujetos individuales. En caso contrario, se pueden producir resultados incorrectos.
- Un resultado negativo de test para antígenos de dengue NS1 no excluye la posibilidad de exposición o infección por el virus del dengue.
- Puede producirse un resultado negativo en el test para los antígenos NS1 del dengue si la cantidad de antígenos presente en la muestra está por debajo del punto de corte del test o si los antígenos de dengue detectados no estuvieron presentes durante la etapa de la enfermedad en la que se recolectó la muestra.
- Las muestras que contienen títulos inusualmente altos de anticuerpos heterófilos o factor reumatoide pueden afectar a los resultados esperados.
- Si el resultado obtenido con el test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM es negativo o no reactivo pero los síntomas persisten, se recomienda repetir el test unos días más tarde o con métodos alternativos, como PCR o ELISA.
- Los resultados obtenidos con este test solo se deben interpretar junto con otros procedimientos de diagnóstico y hallazgos clínicos.
- Tras la aparición temprana de fiebre, las concentraciones de IgM anti-dengue pueden estar por debajo de los niveles detectables. Para una infección primaria, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de captura de anticuerpos IgM (MAC-ELISA) mostró que el 80% de los pacientes con dengue examinados mostraron niveles detectables de IgM al quinto día de la infección, y que el 99% de ellos mostraron IgM positivo el día 10. Por esta razón, se recomienda realizar el test a los pacientes dentro de este periodo de tiempo. Al igual que en la infección secundaria, los anticuerpos están caracterizados por una fracción molar baja de IgM anti-dengue y una fracción molar alta de IgG anti-dengue ampliamente reactiva con los flavivirus.⁵ La línea de test "IgM" puede ser débil, y puede

producirse una reacción cruzada en la región de la línea de test "IgG".

- Son comunes las reacciones cruzadas serológicas con el grupo de *flavivirus* (Dengue 1, 2, 2 & 4, encefalitis de San Luis, virus del Nilo Occidental, encefalitis japonesa y virus de la fiebre amarilla).^{6,7,8} Se deben confirmar los resultados positivos utilizando otros métodos.
- La presencia o ausencia continuada de anticuerpos no se puede utilizar para determinar el éxito o fracaso de la terapia.
- Los resultados en pacientes inmunodeprimidos se deben interpretar con cautela.

13. Valores esperados

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM ha sido comparado con un EIA de dengue Ag líder en el mercado. La correlación entre los dos sistemas es del 96%.

La infección primaria por dengue se caracteriza por la presencia de IgM detectable 3-5 días después de la aparición de la infección. La infección secundaria por dengue se caracteriza por el aumento de IgG específica de dengue. En la mayoría de los casos, esto se acompaña de niveles elevados de IgM.

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM ha sido comparado con un ELISA de dengue líder en el mercado, demostrando una sensibilidad del 83,3% para la IgM en la infección primaria y >99,9% para IgG en la infección secundaria.

14. Características del rendimiento

Sensibilidad y especificidad

Se analizó un panel de seroconversión que comprende muestras clínicas obtenidas de una población de individuos sintomáticos y asintomáticos para antígenos NS1 de dengue e IgG/IgM anti-dengue, usando el test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM. Los resultados para dengue NS1 Ag fueron confirmados por un EIA de dengue Ag disponible y líder en el mercado, mientras que los resultados para IgG/IgM anti-dengue fueron confirmados por un ELISA de dengue también disponible comercialmente y líder de mercado.

Los resultados de IgG/IgM anti-dengue muestran que la sensibilidad relativa general para la infección primaria y secundaria del test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM es del 95,7%, la especificidad relativa es >99,9% y la precisión relativa es del 99,3%.

Resultados del test de IgG/IgM para una infección primaria por dengue

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG/IgM)	Resultados	Dengue ELISA		
		Positivo		Negativo
		IgM	IgG	
Positivo	IgM	15	0	0
	IgG	3	0	0
Negativo		0	0	0

Sensibilidad relativa (IgM): 83,3%

Resultados del test de IgG/IgM para una infección secundaria por dengue

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG/IgM)	Resultados		Dengue ELISA		
			Positivo		Negativo
	IgM	IgG	IgM	IgG	
Positivo	IgM	37	0	0	
	IgG	15	52	0	
Negativo		0	0	0	

Sensibilidad relativa (IgM): 71,2%

Sensibilidad relativa (IgG): >99,9%

Resultados del test de IgG/IgM para una no-infección por dengue

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG/IgM)	Resultados		Dengue ELISA		
			Positivo		Negativo
	IgM	IgG	IgM	IgG	
Positivo	IgM	0	0	0	
	IgG	0	0	0	
Negativo		0	0	338	

Sensibilidad relativa (negativo): >99,9%

Sensibilidad relativa: $(15+52)/(18+52) = 95,7\%$ (95%CI*: 88%~99,1%)

Especificidad relativa: $338/338 >99,9\%$ (95%CI*: 99,1%~100%)

Precisión: $(15+52+338)/(18+52+338) = 99,3\%$ = (95%CI*: 97,9%~99,8%)

*Intervalos de confianza

Los resultados para Dengue NS1 Ag muestran que la sensibilidad relativa del test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM es del 95,8% y la especificidad relativa es del 96,1%.

Resultados del test Dengue NS1 Ag:

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (antígenos NS1)	Resultados	Dengue Ag ELISA		
		+	-	Total
	+	137	8	145
-	6	200	206	
Total	143	208	351	

Sensibilidad relativa: $137/143*100\% = 95,8\%$ (95%CI*: 91,1%~98,4%)

Especificidad relativa: $200/208*100\% = 96,1\%$ (95%CI*: 92,6%~98,4%)

Precisión: $(137+208)/(137+6+8+200)*100\% = 96\%$ (95%CI*: 93,4%~97,8%)

*Intervalos de confianza

Precisión

Intraensayo

Se ha determinado la precisión de la prueba utilizando 15 repeticiones de cuatro muestras: una negativa, una débilmente positiva, una medianamente positiva y una altamente positiva. Las muestras fueron identificadas correctamente en más del 99% de los casos.

Interensayo

Se determinó la precisión interensayo mediante 15 ensayos independientes de las mismas cuatro muestras: una negativa, una débilmente positiva, una medianamente positiva y una altamente positiva. Se analizaron tres lotes diferentes de test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM utilizando esas muestras. Las muestras fueron identificadas correctamente en >99% de los casos.

Reacciones cruzadas

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM ha sido probado con muestras positivas para HAMA, FR, HBsAg, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Sifilis, VIH, VHC, *H. pylori*, MONO, Citomegalovirus (CMV), Rubéola y Toxo. Los resultados no mostraron reactividad cruzada.

Substancias interferentes

Se añadieron las siguientes sustancias potencialmente interferentes a muestras de dengue positivas y negativas.

Acetaminofeno: 20 mg/dL	Cafeína: 20 mg/dL
Ácido acetilsalicílico: 20 mg/dL	Ácido gástrico: 20 mg/dL
Ácido ascórbico: 2 g/dL	Albúmina: 2 g/dL
Creatina: 200 mg/dL	Hemoglobina 1000 mg/dL
Bilirrubina: 1 g/dL	Ácido oxálico: 60 mg/dL

No se produjo interferencia de las sustancias con el test a la concentración analizada.

15. Referencias

- Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.
- Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
- Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese J. Trop. Med. Hygiene 1994; 22: 9-12.
- Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. Rev. Med. Micro. 1995; 6:39-48.
- Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
- Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4): 725-8.
- Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
- Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus. Microbiol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2016-09-06 GP

1. Scopo del test

Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è un immunodosaggio cromatografico rapido per la rilevazione simultanea qualitativa e la differenziazione dell'antigene dengue NS1 e degli anti-IgG ed IgM del virus dengue in sangue intero umano, siero oppure plasma. Il test è concepito come supporto nella diagnosi di infezioni da dengue e solo per uso professionale.

2. Introduzione e Significato Clinico

Il virus Dengue è un flavivirus, trasmesso dalle zanzare tigre *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. È molto diffuso nelle aree tropicali e subtropicali del mondo¹ e causa fino a 100 milioni di infezioni all'anno.² L'infezione Dengue classica è caratterizzata da febbre improvvisa, intenso mal di testa, mialgia, artralgia e rash.

L'infezione primaria porta all'aumento degli IgM fino ad un livello rilevabile in 3-5 giorni dalla comparsa della febbre. L'IgM persiste generalmente tra 30 e 90 giorni.³ La maggior parte dei pazienti affetti da dengue nelle regioni endemiche hanno infezioni secondarie⁴ che risultano in un innalzamento dei livelli di IgG prima o simultaneamente alla risposta IgM⁵. Pertanto, la rilevazione di IgM ed IgG anti-dengue può aiutare anche a distinguere tra infezioni primarie e secondarie.

L'NS1 è uno dei 7 virus Dengue a proteine non-strutturali che si pensa siano coinvolti nella ripetizione virale. L'NS1 in forma immatura esiste come monomero ma è processato rapidamente nel reticolo endoplasmatico per formare un dimero stabile. Una piccola quantità di NS1 rimane associata agli organelli intracellulari dove si pensa sia coinvolto nella ripetizione virale. Il resto di NS1 si pensa sia associato o alla membrana del plasma oppure secreto come hexadimer solubile. L'NS1 è fondamentale per la sopravvivenza virale ma la sua precisa funzione biologica è sconosciuta. Gli anticorpi prodotti in risposta all'infezione virale da NS1 possono portare ad una reazione incrociata con gli antigeni di superficie delle cellule epiteliali e delle piastrine. Questo può contribuire allo sviluppo della febbre emorragica dengue.

Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è un test rapido che utilizza una combinazione di anticorpi rivestiti dengue legati a particelle colorate per la rilevazione degli IgG ed IgM anti-dengue in campioni di sangue intero, siero oppure plasma.

3. Principio del Test

Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test è un immunodosaggio qualitativo basato su membrana per la rilevazione degli anticorpi anti-dengue e degli antigeni dengue NS1 in campioni di sangue intero, siero oppure plasma.

Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM contiene due linee del test (lato sinistro: Test Dengue NS1 Ag; lato destro: Test Dengue IgG/IgM).

Il Test Dengue IgG/IgM sul lato destro consiste di due componenti. Nel componente IgG, gli IgG anti-umani sono priverestiti nella regione della linea del test 'IgG'. Durante il test, il campione reagisce con le particelle priverestite da antigeni-dengue nel test a cassetta. Il composto migra poi cromatograficamente lungo la membrana per azione capillare e reagisce con gli anticorpi anti-IgG umani nella regione della

linea del test 'IgG'. Se il campione contiene IgG anti-dengue, compare una linea nella regione della linea del test 'IgG'.

Nel componente IgM, gli anticorpi anti-IgM umani sono priverestiti sulla regione della linea del test 'IgM'. Se nel campione sono presenti IgM anti-dengue, questi reagiscono con le particelle dengue rivestite di antigeni presenti nel test a cassetta. Il complesso viene poi catturato dagli anticorpi IgM anti-umani formando una linea colorata nella regione della linea del test 'IgM'.

Se il campione non contiene gli anticorpi dengue, non compare alcuna linea colorata in nessuna delle regioni delle linee del test, indicando un risultato negativo.

Il test Dengue NS1 Ag sul lato sinistro:

Durante il test, il campione reagisce con gli anticorpi dengue-coniugati sulla membrana del test a striscia interno. Gli anticorpi coniugati oro si legano agli antigeni dengue presenti nel campione che sono legati a turno dagli anticorpi anti-dengue NS1 di cui la membrana è priverestita. Quando il composto migra lungo la membrana, gli anticorpi anti-dengue NS1 si legano al complesso anticorpo-antigene portando alla comparsa di una linea rosa chiaro o rosa scuro nella regione della linea del test "NS1" della membrana. L'intensità del colore delle linee varia in base alla quantità di antigeni presenti nel campione. La comparsa della linea rosa nella regione della linea del test 'NS1' va considerata come indicativa di un risultato positivo.

Se il campione non contiene antigeni dengue, non compare alcuna linea nella regione della linea del test, indicando un risultato negativo.

La presenza di entrambe le linee colorate nelle regioni delle linee di controllo (C) funge da controllo procedurale interno indicando che è stato utilizzato il corretto volume di campione e che la migrazione lungo la membrana è avvenuta correttamente.

4. Reagenti e Materiali Forniti

- 25 Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM, test a cassetta
- 25 pipette monouso (5 µl)
- 25 pipette monouso (25 µl)
- (Le pipette fornite da 5 µl e 25 µl versano rispettivamente circa 5 µl e 25 µl in una goccia anche se viene aspirato più sangue nella pipetta)
- 1 Soluzione (3 ml)
- 1 istruzioni per l'uso

5. Altri materiali richiesti

- Contenitore di raccolta del campione
- Centrifuga (per siero/plasma)
- Timer
- Bisturi (solo per il prelievo di sangue intero)
- Tubo capillare (75 µl, se necessario)
- Micropipette (se necessario)

6. Conservazione e Stabilità

I kit di Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM vanno conservati a 2-30°C ed utilizzati prima della data di scadenza riportata sulla confezione. I test a cassetta rimangono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. I test a cassetta vanno conservati nella loro confezione fino al loro

utilizzo. Non congelare. Non utilizzare i test oltre la data di scadenza.

7. Avvertenze e Precauzioni

- Esclusivamente per uso diagnostico professionale *in-vitro*.
- Leggere attentamente la procedura del test prima di eseguirlo.
- Non utilizzare il test oltre la data di scadenza riportata sulla confezione.
- Non utilizzare il test se la confezione dovesse risultare danneggiata.
- Non riutilizzare i test.
- Non aggiungere i campioni all'area di risultato (result area).
- Al fine di evitare la contaminazione non toccare l'area di risultato (result area).
- Evitare il rischio di contaminazione incrociata utilizzando sempre un nuovo contenitore di raccolta per ogni campione.
- Non mangiare, bere o fumare nei luoghi in cui vengono trattati i campioni ed i test.
- Indossare abiti protettivi quali camici da laboratorio, guanti monouso ed occhiali protettivi quando vengono trattati i campioni.
- Considerare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Osservare le normali precauzioni contro rischi microbiologici e seguire le procedure standard per il corretto smaltimento dei campioni.
- Il kit fornito contiene prodotti di origine animale. La conoscenza certificata della provenienza e/o condizione sanitaria degli animali non esclude del tutto l'assenza di agenti patogeni trasmissibili. Si raccomanda, pertanto, che questi prodotti vengano trattati come potenzialmente infettivi ed utilizzati nel rispetto delle normali pratiche di sicurezza (ad esempio, non ingerire o inalare).
- Umidità o temperature elevate possono influenzare in maniera negativa i risultati del test.
- I materiali utilizzati nello svolgimento del test vanno smaltiti nel rispetto delle regolamentazioni locali.

8. Preparazione e Raccolta del Campione

Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM può essere eseguito utilizzando sangue intero, siero oppure plasma.

Campioni di sangue intero, prelievo venoso o puntura del polpastrello:

- Lavare la mano del paziente con sapone ed acqua calda o pulire con alcol la zona da incidere. Fare asciugare.
- Massaggiare la mano del paziente senza toccare la zona del prelievo sfregando la mano verso il basso in direzione del dito medio o dell'anulare.
- Incidere la punta del dito utilizzando un bisturi sterile. Asciugare la prima goccia di sangue.
- Sfregare leggermente la mano del paziente dal polso al palmo fino al dito inciso affinché si formi una nuova goccia di sangue.

Campioni di sangue intero, prelievo venoso

Per l'analisi di siero oppure plasma separare siero e plasma immediatamente al fine di evitare emolisi. Utilizzare solo campioni chiari non emolizzati.

Eeguire il test immediatamente dopo la raccolta del campione. Non lasciare il test a temperatura ambiente per lunghi periodi di tempo. Campioni di siero e plasma possono essere conservati tra 2-8°C per un massimo di 3 giorni. Per conservazioni prolungate, i campioni vanno conservati a -20°C. I campioni di sangue intero raccolti attraverso prelievo venoso vanno conservati a 2-8°C nel caso in cui il test venga svolto entro 2 giorni dalla raccolta del campione. Non congelare i campioni di sangue intero. I campioni di sangue intero raccolti attraverso puntura del polpastrello, andrebbero testati immediatamente. Portare i campioni a temperatura ambiente prima di eseguire il test. I campioni congelati vanno fatti scongelare completamente e mescolati adeguatamente prima di eseguire il test. Evitare episodi ripetuti di congelamento e scongelamento dei campioni. Nel caso in cui si intenda spedire i campioni, questi andrebbero imballati seguendo le regolamentazioni locali in materia di trasporto di agenti eziologici.

9. Procedura del Test

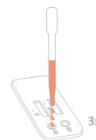
Portare i test, i campioni, soluzioni e/o controlli a temperatura ambiente (15-30°) prima di eseguire il test.

1. Rimuovere il test a cassetta dalla confezione ed utilizzarlo nel più breve tempo possibile. Il test a cassetta andrebbe utilizzato immediatamente dopo l'apertura della confezione. Etichettare il test a cassetta con l'identificativo del paziente o controllo.

2. a) Per i campioni di siero o plasma:

Per Dengue Ag NS1:

Mantenendo verticalmente il contagocce da 25 µl fornito, aggiungere 3 gocce (circa 75 µl) di siero oppure plasma nel pozzetto di raccolta del campione (S) del test a cassetta.



Per anti-Dengue IgG/IgM:

I. Utilizzare una pipetta:

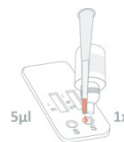
Mantenendo verticalmente la pipetta da 5 µl fornita, aspirare il campione di siero oppure plasma fino al primo allargamento (circa 5 µl) e aggiungerlo nel pozzetto di raccolta del campione (S) del test a cassetta. Poi, mantenendo il flacone verticalmente, aggiungere 1 goccia (circa 40 µl) di soluzione nel pozzetto di raccolta del campione (S). **Evitare la formazione di bolle d'aria nel pozzetto di raccolta del campione.**



oppure

II. Usare una micropipetta:

Utilizzando una micropipetta versare 5 µl di siero oppure plasma nel pozzetto di raccolta del campione (S) del test a cassetta. Poi, mantenendo il flacone verticalmente, aggiungere 1 goccia (circa 40 µl) di soluzione nel pozzetto di raccolta del campione (S).

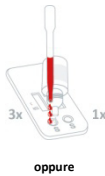


b) Per campioni di sangue intero raccolti tramite prelievo venoso/ puntura del polpastrello:

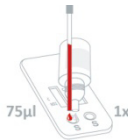
Per Dengue Ag NS1:

I. Usare una pipetta:

Mantenendo verticalmente il contagocce da 25 µl, aggiungere 3 gocce (circa 75 µl) di sangue intero nel pozzetto di raccolta del campione (S) del test a cassetta. Poi, mantenendo il flacone verticalmente, aggiungere 1 goccia (circa 40 µl) di soluzione nel pozzetto di raccolta del campione (S).



oppure



oppure



e

II. Utilizzare il tubo capillare:

Riempire il tubo capillare e trasferire circa 75 µl di sangue intero prelevato tramite puntura del polpastrello nel pozzetto di raccolta (S) del test a cassetta. Poi, mantenendo il flacone verticalmente, aggiungere 1 goccia (circa 40 µl) di soluzione nel pozzetto di raccolta del campione (S).

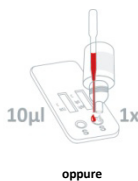
III. Trasferire direttamente le gocce di sangue:

Aggiungere 3 gocce di sangue (circa 75 µl) di sangue intero tramite puntura del polpastrello facendole cadere direttamente nel pozzetto di raccolta del campione (S) del test a cassetta. Poi, mantenendo il flacone verticalmente, aggiungere 1 goccia (circa 40 µl) di soluzione nel pozzetto di raccolta del campione (S).

Per anti-Dengue IgG/IgM:

I. Usare una pipetta:

Mantenendo verticalmente la pipetta da 5 µl, aspirare il sangue intero 1 cm al di sopra del primo ingrandimento (circa 10 µl) e aggiungerlo al pozzetto di raccolta del campione (S) del test a cassetta. Poi, mantenendo il flacone verticalmente, aggiungere 1 goccia (circa 40 µl) di soluzione nel pozzetto di raccolta del campione (S).



oppure



II. Usare una micropipetta:

Utilizzando una micropipetta, versare 10 µl di sangue intero nel pozzetto di raccolta del campione (S) del test a cassetta. Poi, mantenendo il flacone verticalmente, aggiungere 1 goccia (circa 40 µl) di soluzione nel pozzetto di raccolta del campione (S).

3. Avviare il timer.

4. Leggere il risultato del test entro 10 minuti. Non interpretare i risultati dopo più di 20 minuti.



10 min

10. Interpretazione dei risultati

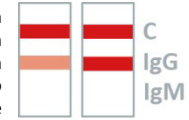
Positivo a Dengue Ag NS1:

Compare una linea colorata in corrispondenza di ogni regione della linea di controllo (C) ed una linea colorata si sviluppa nella regione della linea del test "NS1". Il risultato è indicativo di una infezione in corso.



Positivo a IgG anti-Dengue:

Compare una linea colorata in corrispondenza di ogni regione della linea di controllo (C) ed una linea colorata si sviluppa nella regione della linea del test (T) per "IgG". Il risultato può essere indicativo di infezione secondaria da virus dengue.



Positivo per IgM anti-Dengue:

Compare una linea colorata in corrispondenza di ogni regione della linea di controllo (C) ed una linea colorata si sviluppa nella regione della linea del test (T) per "IgM". Il risultato può essere indicativo di infezione primaria da virus Dengue.



Positivo per anti-Dengue IgG/IgM:

Compare una linea colorata in corrispondenza di ogni regione della linea di controllo (C) ed una linea colorata si sviluppa rispettivamente nella regione della linea del test "IgG" ed "IgM". Il risultato può essere indicativo di infezione secondaria da virus dengue. L'intensità di colore delle linee non deve essere la stessa.



Nota bene: È possibile una combinazione di risultati positivi per vari parametri.

Negativo:

Si sviluppa una linea colorata nella regione della linea di controllo (C). Non compare nessuna linea colorata nelle regioni delle linee del test "NS1", "IgG" e "IgM".



Non valido:

Almeno una delle linee di controllo 'C' non compare. I risultati di qualsiasi test che non abbia prodotto alcuna linea di controllo entro i tempi di lettura indicati, non vanno presi in considerazione.



Un volume insufficiente di campione, procedure operative scorrette o test scaduti sono tra le principali cause che potrebbero impedire la comparsa della linea di controllo. In tal caso si consiglia di



rivedere la procedura e ripetere il test utilizzando un nuovo test a cassetta. Se il problema persiste, si consiglia di interrompere immediatamente l'utilizzo dello stesso lotto di test e contattare il proprio distributore.



Nota bene: l'intensità di colore della linea del test nella regione "NS1" e/o 'IgG' e/o "IgM" può variare in base alla concentrazione degli antigeni Dengue NS1 e/o IgG e/o IgM presenti nel campione. Pertanto, qualsiasi sfumatura di colore nell'area della linea del test (T) va considerata come indicativa di risultato positivo.

11. Controllo Qualità

Un controllo procedurale interno è inserito nel test a cassetta:

La linea colorata che compare in corrispondenza della regione della linea di controllo (C) è da considerarsi un controllo procedurale interno. Ciò conferma che è stato aggiunto il giusto volume di campione, che la migrazione lungo la membrana è avvenuta correttamente e che sono state applicate le corrette tecniche procedurali.

La *Buona Pratica di Laboratorio (GLP)* raccomanda l'impiego di metodi di controllo al fine di confermare la corretta performance del kit di test.

12. Limiti del Test

- Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM rileva solo la presenza degli antigeni dengue NS1 e degli anticorpi anti-dengue nel campione e non dovrebbe essere utilizzata come unico criterio per la diagnosi di dengue.
- Le sezioni 'Procedura del Test' e 'Interpretazione dei risultati' dovrebbero essere seguite attentamente quando si utilizza il test per la presenza di antigeni dengue e anticorpi anti-dengue in campioni di sangue intero, siero oppure plasma prelevati da soggetti singoli. La mancata osservazione delle procedure consigliate potrebbe portare a risultati imprecisi.
- Un risultato negativo del test per gli antigeni dengue NS1 non preclude la possibilità di esposizione al virus o infezione da virus Dengue.
- Un risultato negativo potrebbe verificarsi se la quantità di antigeni dengue NS1 presenti nel campione è al di sotto dei limiti di rilevazione del test, oppure se gli antigeni dengue rilevati non erano presenti allo stadio della malattia durante il quale il campione è stato raccolto.
- Alcuni campioni contenenti concentrazioni stranamente elevate di anticorpi eterofili o fattore reumatoide potrebbero influenzare i risultati attesi.
- Se i sintomi persistono, ma il risultato del Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è negativo oppure non reattivo è raccomandabile raccogliere un nuovo campione dallo stesso paziente pochi giorni dopo oppure utilizzare un metodo di analisi alternativo quale PCR oppure ELISA.
- Si consiglia di interpretare i risultati ottenuti con il test NADAL® Dengue NS1 Ag-1 IgG/IgM, solo in congiunzione con altre procedure diagnostiche ed indagini cliniche.
- In seguito alla comparsa di febbre, la concentrazione di IgM potrebbe essere al di sotto dei livelli rilevabili. Per le

infezioni primarie, il saggio immunoassorbente anticorpo di cattura legato ad un enzima (MAC-ELISA) ha mostrato che l'80% dei pazienti testati per la dengue hanno riportato livelli rilevabili di IgM dal quinto giorno dopo l'infezione e il 99% dei pazienti testati era positivo agli IgM a partire dal giorno 10. Pertanto, è raccomandabile che i pazienti vengano testati in questo periodo di tempo. Come per l'infezione secondaria, un basso titolo anticorpale di IgM ed un titolo anticorpale alto di IgG anti-dengue che sono ampiamente reattivi ai flavivirus caratterizza l'infezione.⁵ La linea del test "IgM" può essere debole e potrebbe verificarsi una reazione incrociata nella regione della linea del test "IgG".

- Reazioni incrociate serologiche tra il gruppo dei *flavivirus* (Dengue 1, 2, 3 & 4, encefalite di St. Louis, virus del Nilo occidentale, encefalite giapponese e virus della febbre gialla) sono comuni.^{6,7,8} I risultati positivi potrebbero essere confermati utilizzando altri metodi.
- La presenza continua oppure l'assenza degli anticorpi non può essere utilizzata per determinare il successo o il fallimento della terapia.
- I risultati provenienti da pazienti immunodepressi vanno interpretati con cura.

13. Risultati attesi

Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è stato comparato con uno dei test comunemente reperibili in commercio, Dengue Ag EIA. La correlazione tra i due sistemi è del 96%.

L'infezione primaria da dengue è caratterizzata dalla presenza di IgM rilevabili 3-5 giorni dopo la comparsa dell'infezione. L'infezione secondaria invece è caratterizzata dall'aumento degli IgG-dengue specifici. Nella maggior parte dei casi questa è accompagnata da livelli elevati di IgM.

Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è stato comparato con un ELISA Dengue comunemente reperibile in commercio dimostrando una sensibilità IgM dell'83,3% per l'infezione primaria e >99% per IgG nell'infezione secondaria.

14. Caratteristiche Tecniche

Sensibilità e specificità

Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è stato utilizzato per analizzare un panel di sierconversione per la rilevazione di antigeni dengue NS1 ed IgG/IgM anti-Dengue comprendente campioni clinici ottenuti da una popolazione di individui sintomatici ed asintomatici. I risultati per Dengue NS1 Ag sono stati confermati con un test comunemente reperibile in commercio Dengue Ag EIA. Mentre i risultati per anti-Dengue IgG/IgM sono stati confermati con un altro test comunemente reperibile in commercio Dengue ELISA.

I risultati anti-Dengue IgG/IgM mostrano che la sensibilità relativa generale del Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM per l'infezione primaria e secondaria è 95,7%, la specificità relativa è >99,9% e la precisione relativa è del 99,3%.

Risultati del test per l'infezione primaria Dengue IgG/IgM

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Risultati		Dengue ELISA		
			Positivo		Negativo
	Positivo	IgM	IgG	0	
		IgM	15		0
	IgG	3	0	0	
	Negativo	0	0	0	

Sensibilità Relativa (IgM): 83,3%

Risultati del test per l'infezione secondaria Dengue IgG/IgM

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Risultati		Dengue ELISA		
			Positivo		Negativo
	Positivo	IgM	IgG	0	
		IgM	37		0
	IgG	15	52	0	
	Negativo	0	0	0	

Sensibilità Relativa (IgM): 71,2%

Sensibilità Relativa (IgG): >99,9%

Risultati del test per l'infezione Non-dengue IgG/IgM

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG/IgM)	Risultati		Dengue ELISA		
			Positivo		Negativo
	Positivo	IgM	IgG	0	
		IgM	0		0
	IgG	0	0	0	
	Negativo	0	0	338	

Sensibilità Relativa (negativo): >99,9%

Sensibilità Relativa: $(15+52)/(18+52) = 95.7\%$ (95%CI*: 88%~99,1%)Specificità Relativa: $338+338)/(99,9+52) = 95.7\%$ (95%CI*: 99,1%~100%)Precisione: $(15+52)/(52+95.7) = 95\%$ (95%CI*: 97,9%~99,8%)

* Intervalli di confidenza

I risultati per Dengue NS1 Ag mostrano che la sensibilità relativa del Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è 95,8% e la specificità relativa è 96,1%.

Risultati del test Dengue Ag NS1 Ag:

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (antigeni NS1)	Dengue Ag ELISA			
		+	-	Totale
	+	137	8	145
-	6	200	206	
Totale	143	208	351	

Sensibilità Relativa: $137+143)/(95+100) = 95,8\%$ (95%CI*: 91,1%~98,4%)Specificità Relativa: $200+208)/(95+100) = 96,1\%$ (95%CI*: 92,6%~98,4%)Precisione: $(137+208)/(8+137) = 6\%$ (95%CI*: 93,4%~97,8%)

* Intervalli di confidenza

Precisione**Intra-lotto**

La precisione intra-lotto è stata determinata utilizzando 15 ripetizioni di quattro campioni: uno negativo, uno basso positivo, uno medio positivo ed uno alto positivo. I campioni sono stati identificati correttamente in più del 99% dei casi (>99%).

Inter-lotto

La precisione inter-lotto è stata determinata utilizzando 15 saggi indipendenti sugli stessi quattro campioni: uno negativo, uno basso positivo, uno medio positivo ed uno alto positivo. Sono stati analizzati tre lotti differenti del Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM utilizzando questi campioni. I campioni sono stati identificati correttamente in più del 99% dei casi (>99%).

Reattività incrociata

Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è stato analizzato con campioni positivi a HAMA, RF, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HbCAb, HbCAb, Sifilide, HIV, HCV, H. pylori, MONO, CMV, Rosolia e TOXO. I risultati non hanno mostrato alcuna reattività incrociata.

Sostanze interferenti

Le seguenti sostanze potenzialmente interferenti sono state aggiunte a campioni positivi e negativi.

Acetaminofene: 20 mg/dl	Caffeina: 20 mg/dL
Acido Acetilsalicilico: 20 mg/dL	Acido Gentisico: 20 mg/dL
Acido Ascorbico: 2 g	Albumina: 2 g
Creatina: 200 mg/dL	Emoglobina 1000 mg/dL
Bilirubina: 1 g/dL	Acido Ossalico: 60 mg/dL

Nessuna delle sostanze alla concentrazione testata ha interferito con l'analisi.

15. Bibliografia

- Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.
- Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
- Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese J. Trop. Med. Hygiene 1994; 22: 9-12.
- Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. Rev. Med. Micro. 1995; 6:39-48.
- Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
- Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4): 725-8.
- Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
- Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus. Microbiol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2016-09-06 BN

1. Zastosowanie

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM jest szybkim testem immunochromatograficznym do równoczesnego oznaczania i rozróżniania antygenów Dengue-NS1 oraz IgG i IgM wirusa przeciw Dengue w ludzkiej krwi pełnej, surowicy lub osoczu. Test ten służy jako środek pomocniczy przy diagnozie infekcji dengi i przeznaczony jest wyłącznie do profesjonalnego użytku.

2. Wprowadzenie i znaczenie diagnostyczne

Denga jest flawiwirusem, przenoszonym przez komary tygrysie *Aedes aegypti* i *Aedes albopictus*. Jest on rozpowszechniony w tropikalnych i subtropikalnych regionach świata¹ i wywołuje każdego roku do 100 milionów infekcji.² Klasyczne infekcje dengi charakteryzują się nagłą gorączką, silnymi bólami głowy, bólami mięśni i stawów oraz wysypką.

Infekcje pierwotne dengi powodują wzrost IgM do wykrywalnych stężeń w okresie od 3 do 5 dni po pojawieniu się gorączki. IgM obecne są zwykle od 30 do 90 dni.³ Większość pacjentów Dengue w obszarach endemicznych ma infekcje wtórne,⁴ które mogą prowadzić do wysokich koncentracji specyficznych IgG, przed lub jednocześnie z reakcją IgM.⁵ Dlatego oznaczenie specyficznych przeciwciał IgM i IgG przeciw Dengue może prowadzić do rozróżnienia pomiędzy infekcjami pierwotnymi a wtórnymi.

NS1 jest jedną z siedmiu niestrukturalnych protein wirusa dengi, które biorą udział przy wirusowych replikacjach. NS1 występuje jako monomer w jego niedojrzałej formie, zostaje za to przetworzony w retikulum endoplazmatycznym, aby wytworzyć stabilny dimer. Niewielka ilość NS1 związana jest z wewnątrzkomórkowymi organellami, gdzie bierze udział przy wirusowej replikacji. Reszta proteiny NS1 wiąże się z membraną plazmową lub wydziela się w postaci rozpuszczonego heksadimeru. NS1 jest niezbędna dla wirusowej żywotności, jednak jego dokładna funkcja biologiczna nie jest znana. Przeciwciała, które zostają utworzone jako reakcja na NS1 przy infekcjach wirusowych, mogą wchodzić w reakcje krzyżowe z antygenami na powierzchni komórek nabłonkowych i płytek krwi. Ma to znaczenie na rozwój gorączki krwotocznej dengi.

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM jest szybkim testem, który stosuje kombinację powleczonych i połączonych z kolorowymi cząsteczkami przeciwciał Dengue, do oznaczania antygenów Dengue NS1 oraz połączonych z kolorowymi cząsteczkami antygenami przeciw Dengue IgG i przeciw Dengue IgM w ludzkich próbkach krwi pełnej, surowicy lub osocza.

3. Zasada działania testu

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM jest jakościowym membranowym testem immunologicznym do oznaczania przeciwciał przeciw Dengue oraz antygenów Dengue NS1 w próbkach krwi pełnej, surowicy i osoczu.

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM zawiera dwa paski testowe (lewa strona: test Dengue NS1 Ag, prawa strona: kombinowany test Dengue IgG/IgM).

Test Dengue IgG/IgM po prawej stronie składa się z dwóch elementów. W części składowej IgG powleczona są anty-ludzkie przeciwciała w obszarze linii testowej „IgG”. Podczas

badania próbka reaguje z powleczonymi cząsteczkami antygenów dengi na płytce testowej. Następnie mieszanina wędruje chromatograficznie przy pomocy sił kapilarnych wzdłuż membrany i reaguje z anty-ludzkimi przeciwciałami IgG w obszarze linii testowej „IgG”. Jeżeli w próbce zawarte jest IgG przeciw Dengue, to w obszarze linii testowej „IgG” pojawi się kolorowa linia.

W części składowej IgM powleczona są anty-ludzkie przeciwciała IgM w obszarze linii testowej. Jeżeli w próbce znajduje się IgM, to reagują one również z powleczonymi cząsteczkami antygenów Dengue w kasecie testowej. Kompleks zostaje wówczas wyłapany przez anty-ludzkie przeciwciała IgM i dzięki temu powstaje kolorowa linia w obszarze linii testowej „IgM”.

Jeżeli próbka nie zawiera przeciwciał Dengue, nie pojawią się kolorowe linie w obszarze linii testowej, co wskazuje na wynik negatywny.

Test Dengue NS1 Ag po lewej stronie:

Podczas badania próbka reaguje z koniugatami przeciwciał dengi na wewnętrznym pasku testowym. Złote koniugaty przeciwciała wiążą antygeny Dengue w próbce, które związane są z powleczonymi na membranie przeciwciałami przeciw Dengue NS1. Gdy mieszanina wędruje wzdłuż membrany, przeciwciała przeciw Dengue NS1 wiążą kompleks przeciwciała-antygen, przez co wytworzona zostaje jasno-różowa lub ciemnoróżowa linia w obszarze linii testowej (T) na membranie. Intensywność koloru linii w obszarze linii testowej (T) może różnić się w zależności od ilości antygeny w próbce. Pojawienie się różowej linii w obszarze linii testowej (T) należy traktować jako wyniki pozytywne.

Pojawienie się obydwóch kolorowych linii w obszarze linii kontrolnej (C) służy jako kontrola procesowa i wskazuje na to, że dodana została wystarczająca ilość próbki oraz że membrana jest wystarczająco nasączona.

4. Materiały zawarte w zestawie

- 25 testów kasetowych Dengue NS1 Ag + IgG/IgM
 - 25 pipet jednorazowych (5 µl)
 - 25 pipet jednorazowych (25 µl)
- (dostarczone pipety o pojemności 5 µl i 25 µl przenoszą każdorazowo ok 5 µl i 25 µl w jednej kropli nawet jeżeli pobrano więcej krwi).
- 1 bufor „Buffer” (3 ml)
 - 1 instrukcja obsługi

5. Dodatkowo potrzebne materiały

- Pojemniki na próbki
- Wirówka (tylko dla surowicy/osocza)
- Stoper
- Lanceta (dla krwi pełnej z nakłucia palca)
- ew. kapilara 75 µl
- ew. mikropipeta

6. Data ważności i przechowywanie odczynników

Zestawy testowe NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM powinny być przechowywane w temperaturze 2-30°C i stosowane do daty użyteczności podanej na opakowaniu. Kasety testowe są stabilne, do daty użyteczności podanej na opakowaniu. Kasety testowe powinny pozostać w zamkniętym opakowaniu

foliowym do momentu przeprowadzenia badania. Nie zamrażać testów. Testów nie używać po upływie daty ważności.

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Tylko do profesjonalnej diagnostyki *in-vitro*.
- Przed przeprowadzeniem testu należy dokładnie przeczytać całą instrukcję obsługi.
- Nie używać testu po upływie daty użyteczności podanej na opakowaniu.
- Nie używać testu, jeżeli opakowanie foliowe jest uszkodzone.
- Nie używać ponownie tych samych testów.
- Nie pipetować próbek na pole reakcyjne (pole wyniku).
- Aby uniknąć zanieczyszczenia, nie należy dotykać pola reakcyjnego (pola wyniku).
- W celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego należy używać każdorazowo nowej probówki dla każdej próbki.
- Nie jeść, nie pić i nie palić papierosów w obszarze, w którym pracuje się z próbkami oraz zestawami testowymi.
- Podczas kontaktu z próbkami stosować odzież ochronną, taką jak fartuch, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne.
- Traktować wszystkie próbki tak, jakby zawierały zakaźne odczynniki. Należy zwrócić uwagę na zaistniałe środki ostrożności dla mikrobiologicznego ryzyka, podczas wszystkich procesów jak również standardowych dyrektyw dla odpowiedniej utylizacji próbek.
- Test ten zawiera produkty pochodzenia zwierzęcego. Certyfikowana wiedza o pochodzeniu i/lub o stanie sanitarnym zwierząt nie gwarantują braku przenoszonych patogenów. Dlatego zaleca się, aby te produkty były traktowane jako potencjalnie zakaźne. Posługując się nimi, należy przestrzegać standardowych środków ostrożności (np. unikać połknięcia lub wdychania).
- Wilgoć oraz wysokie temperatury mogą mieć wpływ na wyniki testu.
- Zużyte materiały testowe powinny być zutilizowane zgodnie z lokalnymi zaleceniami.

8. Pobieranie, przygotowywanie i przechowywanie próbek

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM może być przeprowadzony z krwi pełnej, surowicy lub osocza.

Pobieranie krwi pełnej z nakłucia palca

- Umyć dłonie pacjenta przy pomocy mydła i ciepłej wody, a następnie przemyć wacikiem nasączonym alkoholem. Pozostawić do osuszenia.
- Masować dłoń, nie dotykając przy tym miejsca nakłucia, w taki sposób, aby pocierać dłoń w kierunku opuszka palca środkowego lub serdecznego.
- Nakłuć skórę przy pomocy sterylnej lancety. Wytrząść pierwszą kroplę krwi.
- Pocierać ostrożnie dłoń od nadgarstka do powierzchni dłoni i do palca tak, aby w punkcie nakłucia wytworzyła się okrągła kropla.

Krew pełna z nakłucia żyłnego

W celu badania surowicy lub osocza, należy jak najszybciej oddzielić surowicę lub osocze z krwi, w celu uniknięcia

hemolizy. Używać wyłącznie przejrzystych i niehemolitycznych próbek.

Przeprowadzenie testu powinno nastąpić bezpośrednio po pobraniu próbki. Nie przechowywać próbek w temperaturze pokojowej przez dłuższy okres czasu. Próbki surowicy/osocza mogą być przechowywane przy temperaturze 2-8°C do 3 dni. W celach dłuższego przechowywania próbki powinny być przechowywane w temperaturze poniżej -20°C. Krew pełna z żyły powinna być przechowywana przy temperaturze 2-8°C, jeżeli test zostanie przeprowadzony w ciągu 2 dni po pobraniu próbki. Nie zamrażać próbek z krwi pełnej. Próbki krwi pełnej z palca powinny być przebadane bezpośrednio. Przed przeprowadzeniem testu, należy doprowadzić próbki do temperatury pokojowej. Zamrożone próbki powinny zostać całkowicie rozmrożone i dobrze wymieszane, przed rozpoczęciem testu. Próbki nie mogą być ponownie zamrażane i rozmrażane. Jeżeli próbki mają być wysłane, to powinny zostać zapakowane zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi środków etiologicznych.

9. Przeprowadzenie testu

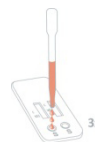
Przed przeprowadzeniem testu, doprowadzić wszystkie testy, próbki i/albo kontrole do temperatury pokojowej (15-30°C).

1. Wyciągnąć kasetę testową z zamkniętego opakowania foliowego i położyć ją na czystą i równą powierzchnię. Kasetka testowa musi być użyta bezpośrednio po otwarciu opakowania foliowego. Oznaczyć kasetę testową danymi pacjenta oraz identyfikacją kontrolną.

2. a) Próbki surowicy lub osocza:

Dla Dengue NS1 Ag:

Trzymać dostarczoną pipetę 25 µl pionowo i dodać 3 krople (ok. 75 µl) surowicy lub osocza do zagłębienia próbki (S) kasety testowej.



Dla anty-Dengue IgG/IgM:

I. Przy pomocy pipety:

Trzymać dostarczoną pipetę 5 µl pionowo, przy jej pomocy wysać próbkę surowicy lub osocza do poziomu pierwszego zgrubienia (ok. 5 µl) i dodać ją do zagłębienia próbki (S) kasety testowej. Następnie dodać 1 kroplę bufora (ok. 40 µl). **Unikać wytwarzania się pęcherzyków powietrza.**



II. Przy pomocy mikropipety:

Dodać przy pomocy mikropipety 5 µl surowicy lub osocza do zagłębienia próbki (S) kasety testowej. Następnie dodać 1 kroplę (ok. 40 µl) bufora.

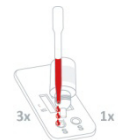


b) Próbki krwi pełnej z nakłucia palca / żyły

Dla Dengue NS1 Ag:

I. Przy pomocy pipety:

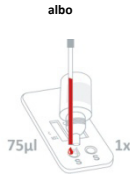
Trzymać dostarczoną pipetę 25 µl pionowo i dodać 3 krople krwi pełnej (ok. 75 µl) do zagłębienia próbki (S)



kasyety testowej. Następnie dodać 1 kroplę (ok. 40 µL) bufora.

II. Przy pomocy kapilary

Napełnić kapilarę próbką krwi i dodać ok. 75 µL do zagłębienia próbki (S) kasyety testowej. Następnie dodać 1 kroplę (ok. 40 µL) bufora.



albo



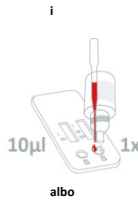
III. Przy pomocy zwisających kropeł

Pozwolić opaść 3 zwisającym kropełom (ok. 75 µL) krwi pełnej z nakłucia palca do zagłębienia próbki (S) kasyety testowej. Następnie dodać 1 kroplę (ok. 40 µL) bufora.

Dla anti-Dengue IgG/IgM:

I. Przy pomocy pipety:

Trzymać dostarczoną pipetę 5 µl pionowo, przy jej pomocy wyssać próbkę do poziomu 1 cm ponad pierwsze zgrubienie (ok. 10 µl) i dodać ją do zagłębienia próbki (S) kasyety testowej. Następnie dodać 1 kroplę (ok. 40 µL) bufora.



albo



II. Przy pomocy mikropipety:

Dodać przy pomocy mikropipety 10 µl krwi pełnej do zagłębienia próbki (S) kasyety testowej. Następnie dodać 1 kroplę (ok. 40 µL) bufora.

3. Włączyć stoper.

4. Wynik interpretować dokładnie po 10 minutach. Po upływie więcej jak 20 minut nie interpretować wyniku.



10 min

10. Interpretacja wyników

Pozytywny Dengue NS1 Ag:

Kolorowa linia pojawi się w obszarze linii kontrolnej „C” i kolorowa linia pojawi się w obszarze linii testowej „T” dla „NS1”. Wynik może wskazywać na aktualną infekcję.



Pozytywny dla anti-Dengue IgG:

Kolorowa linia pojawi się w każdym obszarze linii kontrolnej „C” i kolorowa linia pojawi się w obszarze linii testowej „T” dla IgG”.

Wynik może wskazywać na wtórną infekcję wirusem Dengue.



Pozytywny dla anti-Dengue IgM:

Kolorowa linia pojawi się w obszarze linii kontrolnej „C” i kolorowa linia pojawi się w obszarze linii testowej „T” dla IgM”.

Wynik może wskazywać na pierwotną infekcję wirusem Dengue.



Pozytywne dla anti-Dengue IgG/IgM:

Odpowiednia kolorowa linia pojawi się w obszarze linii kontrolnej „C” i odpowiednia kolorowa linia pojawi się w obszarze linii testowej „T” dla „IgM” oraz „IgG”. Wynik może wskazywać na infekcję wtórną wirusem Dengue. Intensywności kolorów linii nie muszą być jednakowe.



Wskazówka: kombinacja pozytywnych wyników dla różnych parametrów jest możliwa.

Negatywny:

Pojawi się jedynie tylko jedna kolorowa linia w każdym obszarze linii kontrolnej „C”. Nie pojawią się kolorowe linie w obszarze linii testowej „T” dla „NS1”, „IgG” i „IgM”.



Nieważny:

Przynajmniej jedna linia kontrolna „C” nie pojawi się. Wyniki testów, które po ustalonym czasie odczytu nie wytworzyły linii kontrolnych, muszą zostać odrzucone.

Niewystarczająca objętość próbki, przeterminowane testy lub niewłaściwy sposób użytkowania testu, są najprawdopodobniejszymi przyczynami niepojawienia się linii kontrolnej. Sprawdzić przebieg procesu i powtórzyć badanie przy pomocy nowej kasyety testowej. Jeżeli problem będzie występował nadal, nie używać już tego zestawu testowego i skontaktować się z dystrybutorem.



Wskazówka: Intensywność kolorów w obszarze linii testowej „NS1” i/lub „IgG” i/lub „IgM” może różnić się, w zależności od stężenia antygenów Dengue NS1 i/lub „IgG” i/lub „IgM”, zawartych w próbce. Dlatego każdy odcień w obszarze linii testowej powinien być traktowany jako pozytywny wynik.

11. Kontrola jakości

Test kasetowy zawiera wewnętrzną kontrolę procesową:

każdorazowo pojawiająca się kolorowa linia w obszarze linii kontrolnej (C) uznawana jest za wewnętrzną pozytywną kontrolę procesową. Potwierdza ona dodanie wystarczającej ilości próbki, prawidłowe przeprowadzenie testu oraz wystarczające nasączenie membrany.

Dobra praktyka laboratoryjna zaleca stosowanie materiałów kontrolnych do oznaczania poprawnej wydajności zestawu testowego.

12. Ograniczenia testu

• Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM wykazuje jedynie obecność antygenów Dengue-NS1 oraz przeciwciał przeciw Dengue w próbce i nie powinien być wykorzystywany jako jedyne kryterium do diagnozowania Dengue.

- Rozdziały „Przeprowadzanie testu” oraz „Interpretacja wyników” powinny być przestrzegane podczas badania na obecność antygenów Dengue oraz przeciwciał przeciw Dengue w krwi pełnej, surowicy lub osoczu. Nieprzestrzeganie procesów może prowadzić do fałszywych wyników.
- Negatywny wynik testu dla Dengue NS1 Ag nie wyklucza możliwości ekspozycji na infekcję lub infekcji wirusem dengi.
- Negatywny wynik testu dla Dengue NS1 Ag może wystąpić również wtedy, gdy ilość antygenów wirusa Dengue w próbce znajduje się poniżej granicy wykrywalności testu albo gdy wykryte antygeny nie istniały, podczas stadium choroby, w którym próbka została pobrana.
- Próbkę, wykazującą niezwykle wysokie miana heterofilnych przeciwciał lub czynników reumatoidalnych, mogą wpływać na oczekiwane wyniki testów.
- Jeżeli objawy pozostaną niezmiennie, podczas gdy wynik otrzymany przy pomocy testu NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM jest negatywny lub niereaktywny, zaleca się kilka dni później, przeprowadzić ponownie badanie pacjenta lub dodatkowe badania oparte na alternatywnych metodach testowych, jak np. PCR lub ELISA.
- Osiągnięte wyniki przy pomocy testu NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM powinny być interpretowane jedynie w połączeniu z innymi diagnostycznymi procesami i wynikami klinicznymi.
- Po wczesnym wystąpieniu gorączki, stężenia IgM przeciw Dengue mogą leżeć poniżej wykrywalnych stężeń. Dla infekcji pierwotnych test MAC-ELISA (Antibody-Capture-IgM-Enzyme-linked Immunosorbent Assay) wykazał, że 80% wszystkich przebadanych pacjentów, wykazało wykrywalne stężenia IgM w piątym dniu po infekcji i 99% wszystkich pacjentów zostało przebadanych pozytywnie pod kątem IgM dziesiątego dnia. Dlatego zaleca się, aby pacjenci byli badani w ciągu tego okresu. Przy infekcjach wtórnych, przeciwciała charakteryzuje niski ułamek molowy IgM przeciw Dengue oraz wysoki ułamek molowy przeciw Dengue IgG, które w dużym stopniu są reaktywne na flawiwirusy.⁵ Linia testowa „IgM” może być słaba i w obszarze linii testowej „IgG” może wystąpić reakcja krzyżowa.
- Serologiczne reakcje krzyżowe grupy flawiwirusów (Dengue 1, 2, 3 & 4, St. zapalenie mózgu St. Louis, Wirus Zachodniego Nilu, Japońskie zapalenie mózgu oraz wirusy żółtej gorączki) są zwyczajowe.^{5,7,8} Pozytywne wyniki powinny być potwierdzone przy pomocy innych metod.
- Trwająca obecność lub nieobecność przeciwciał, nie może być używana do określania sukcesu lub niepowodzenia leczenia.
- Wyniki od pacjentów z obniżoną odpornością powinny być interpretowane z ostrożnością.

13. Oczekiwane wartości

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM został porównany z wiodącym komercyjnie dostępnym testem Dengue Ag EIA. Korelacja pomiędzy dwoma systemami wynosi >96%.

Pierwotna infekcja Dengue charakteryzuje się wykrywalnymi IgM 3-5 dni po rozpoczęciu infekcji. Wtórna infekcja Dengue powiązana jest ze wzrostem Dengue specyficznych IgG.

W większości przypadków ma to związek z podwyższonymi wartościami IgM.

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM został porównany z wiodącym, komercyjnie dostępnym testem Dengue ELISA i wykazał czułość na poziomie 83,3% dla IgM przy infekcjach pierwotnych oraz >99,9% dla IgG przy infekcjach wtórnych.

14. Charakterystyka testu

Czułość i swoistość

Panel serokonwersyjny, który zawierał kliniczne próbki grupy osób z objawami i osób bez objawów, został przebadany przy pomocy testu NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM pod kątem wykrycia antygenów Dengue-NS1 oraz przeciw Dengue IgG/IgM. Wyniki dla Dengue NS1 Ag zostały potwierdzone z wiodącym, komercyjnie dostępnym testem Dengue Ag EIA, a wyniki dla przeciw Dengue IgG/IgM potwierdzone zostały wiodącym, komercyjnie dostępnym testem Dengue ELISA.

Wyniki dla anty Dengue IgG/IgM wykazały, że całkowita relatywna czułość dla zakażeń pierwotnych i wtórnych testu NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM wyniosła 95,7%, całkowita relatywna swoistość >99,9%, a całkowita relatywna dokładność 99,3%.

Zakażenie pierwotne Dengue dla wyników testów IgG/IgM

		Dengue ELISA			
		Pozytywny		Negatywny	
Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG/IgM)	Wyniki		IgM		IgG
	Pozytywny	IgM	15	0	0
		IgG	3	0	0
Negatywny		0	0	0	

Relatywna czułość (IgM): 83,3%

Zakażenie wtórne Dengue dla wyników testów IgG/IgM

		Denga ELISA			
		Pozytywny		Negatywny	
Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG/IgM)	Wyniki		IgM		IgG
	Pozytywny	IgM	37	0	0
		IgG	15	52	0
Negatywny		0	0	0	

Relatywna czułość (IgM): 71,2%

Relatywna czułość (IgG): >99,9%

Brak zakażenia Dengue dla wyników testów IgG/IgM

		Denga ELISA			
		Pozytywny		Negatywny	
Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG/IgM)	Wyniki		IgM		IgG
	Pozytywny	IgM	0	0	0
		IgG	0	0	0
Negatywny		0	0	338	

Relatywna czułość (Negatywny): >99,9%

Relatywna czułość: $(15+52)/(18+52) = 95,7\%$ (95%CI*: 88%~99,1%)

Relatywna swoistość: $338/338 >99,9\%$ (95%CI*: 99,1%~100%)

Dokładność: $(15+52+338)/(18+52+338) = 99,3\% = (95\%CI^*: 97,9\% \sim 99,8\%)$

*Przedziały ufności

Wyniki dla Denga NS1 Ag wykazały, że czułość testu NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM wynosi 95,8% a swoistość wynosi 96,1%.

Wyniki testu Dengue NS1 Ag:

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM	Dengue Ag ELISA			Suma
		+	-	
	+	137	8	
-	6	200	206	
Suma	143	208	351	

Relatywna czułość: $137/143 * 100\% = 95,8\%$ (95%CI*: 91,1%~98,4%)

Relatywna swoistość: $200/208 * 100\% = 96,1\%$ (95%CI*: 92,6%~98,4%)

Dokładność: $(137+208)/(137+6+8+200) * 100\% = 96\%$ (95%CI*: 93,4%~97,8%)

* Przedziały ufności

Precyzyjność

Badanie śródtestowe

Precyzyjność wewnątrz poszczególnych przepływów została ustalona na podstawie 15 niezależnych testów czterech próbek: negatywnej, nisko pozytywnej, średnio pozytywnej i wysoko pozytywnej. Probki zostały w >99% przypadków właściwie zidentyfikowane.

Badanie międzylubowe

Precyzyjność pomiędzy poszczególnymi przepływami została ustalona na podstawie 15 niezależnych testów, tych samych czterech próbek: negatywnej, nisko pozytywnej, średnio pozytywnej i wysoko pozytywnej. Trzy różne serie testu NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM zostały przebadane przy pomocy tych próbek. Probki zostały w >99% przypadków właściwie zidentyfikowane.

Reakcje krzyżowe

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM został przetestowany przy pomocy próbek, które są pozytywne dla, HAMA, RF, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HbCAb, Syphilis, HIV, HCV, *H. pylori*, MONO, CMV, różyczki i TOXO. Wyniki nie wykazały żadnych reakcji krzyżowych.

Substancje interferujące

Następujące potencjalnie interferujące substancje zostały dodane do negatywnych i pozytywnych próbek Dengi:

Paracetamol: 20 mg/dl	Kofeina: 20 mg/dL
Kwas acetylosalicylowy: 20 mg/dL	Kwas gentyzynowy: 20 mg/dL
Kwas askorbinowy: 2 g/dL	Albumina: 2 g/dL
Kreatyna: 200 mg/dL	Hemoglobina, 1000 mg/dL
Bilirubina: 1 g/dL	Kwas szczawowy: 60 mg/dL

Żadna z wyżej wymienionych substancji nie wchodziła w reakcję krzyżową z testem.

15. Bibliografia

1. Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.

2. Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
3. Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese J. Trop. Med. Hygiene 1994; 22: 9-12.
4. Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. Rev. Med. Micro. 1995; 6:39-48.
5. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
6. Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4): 725-8.
7. Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
8. Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus. Microbiol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2016-09-06 AM

1. Uso Previsto

O NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test é um imunoensaio rápido cromatográfico para a detecção qualitativa simultânea e diferenciação do antígeno NS1 da dengue e o vírus anti-dengue IgG e IgM no sangue total, soro ou plasma humano. O teste foi concebido para auxiliar no diagnóstico da infecção da dengue e apenas para utilização profissional.

2. Introdução e Significado Clínico

O vírus da dengue é um flavivírus, transmitido pelos mosquitos Tigre *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. É amplamente distribuído em todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo¹ e causa até 100 milhões de infecções anualmente.² Uma infecção clássica de Dengue é caracterizada por um aparecimento súbito de febre, dor de cabeça intensa, mialgia, artralgia e erupção cutânea.

A infecção por dengue primária provoca o aumento da IgM a um nível detectável em 3 a 5 dias após o início da febre. IgM geralmente persiste por 30 a 90 dias.³ A maioria dos pacientes com dengue em regiões endémicas têm infecções secundárias,⁴ resultando em altos níveis da IgG específica antes ou em simultâneo com a resposta da IgM.⁵ Portanto, a detecção da IgM anti-dengue específica e IgG pode também ajudar a distinguir entre infecções primárias e secundárias.

NS1 é uma das sete proteínas não estruturais do vírus da Dengue, que se pensa estarem envolvidas na replicação viral. NS1 existe como um monómero, na sua forma imatura, mas é rapidamente transformado no retículo endoplasmático de modo a formar um dímero estável. Uma pequena quantidade de NS1 permanece associado com organelos intracelulares onde se pensa estar envolvida na replicação viral. O resto de NS1 é encontrado, quer para ser associado com a membrana do plasma ou para ser segregada como um hexâmero solúvel. NS1 é essencial para a viabilidade viral, mas a sua função biológica exacta é desconhecida. Os anticorpos produzidos em resposta à infecção viral NS1 podem reagir de forma cruzada com antígenos de superfície celular em células epiteliais e plaquetas. Isto tem implicações no desenvolvimento da febre hemorrágica de dengue.

O NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test é um teste rápido que utiliza uma combinação de anticorpos de dengue revestidos ligados a partículas coloridas para a detecção de antígenos NS1 da dengue e antígenos da dengue ligados a partículas coloridas para a detecção de IgG anti-dengue e IgM anti-dengue em sangue total, soro ou plasma humano.

3. Princípio do Teste

O NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test é um imunoensaio qualitativo à base de membrana para a detecção de anticorpos anti-dengue e antígenos NS1 de dengue em sangue total, soro ou plasma humano.

O NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test contém duas tiras de teste (lado esquerdo: Teste Dengue NS1 Ag; lado direito: Teste Dengue IgG/IgM).

O teste Dengue IgG/IgM no lado direito consiste em dois componentes. No componente IgG, os IgG-anti-humano são pré-revestidos na região da linha de teste 'IgG'. Durante o teste, a amostra reage com partículas revestidas com antígenos de dengue no teste cassete. De seguida, a mistura

migra ao longo da membrana cromatograficamente por acção de capilaridade e reage com os anticorpos IgG anti-humano, na região da linha de teste "IgG". Se a amostra contém IgG anti-dengue, uma linha colorida surge na região da linha de teste "IgG".

No componente de IgM, os anticorpos IgM anti-humano são pré-revestidos na região da linha de teste "IgM". Se os IgM anti-dengue estão presentes na amostra, eles reagem com as partículas revestidas com antígenos de dengue do teste cassete. O complexo é então capturado pelos anticorpos IgM anti-humano, formando uma linha colorida na região da linha de teste "IgM".

Se a amostra não contém anticorpos dengue, nenhuma linha colorida surge em qualquer uma das regiões da linha de teste, o que indica um resultado negativo.

O Teste Dengue NS1 Ag no lado esquerdo:

Durante o teste, a amostra reage com os conjugados de anticorpos de dengue sobre a membrana da tira de teste interna. Os conjugados de ouro de anticorpos ligam-se aos antígenos de dengue na amostra, que por sua vez estão ligados por anticorpos NS1 anti-dengue pré-revestidos na membrana. À medida que a mistura se move ao longo da membrana, os anticorpos NS1 anti-Dengue ligam-se ao complexo anticorpo-antígeno, causando a formação de uma linha cor de rosa pálido ou escuro na região da linha de teste 'NS1' da membrana. A intensidade da cor das linhas pode variar dependendo da quantidade de antígenos presentes na amostra. O aparecimento de uma linha cor de rosa na região da linha de teste 'NS1' deve ser considerado como um resultado positivo.

Se a amostra não contém anticorpos dengue, nenhuma linha colorida aparece em qualquer uma das regiões da linha de teste, o que indica um resultado negativo.

A formação de ambas as linhas coloridas na região da linha de controlo (C) serve como controlo de procedimento, indicando que foi adicionado o volume indicado de amostra e que a membrana ficou corretamente embebida.

4. Reagentes e Materiais Fornecidos

- 25 testes cassete NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM
- 25 pipetas descartáveis (5 µl)
- 25 pipetas descartáveis (25 µl)
- (As pipetas fornecidas de 5 µl e 25 µl dispensam aproximadamente 5 µl e 25 µl, respectivamente, em uma gota, mesmo que seja aspirado mais sangue para a pipeta)
- 1 solução Tampão (3 ml)
- 1 folheto informativo

5. Material Adicional Necessário

- Recipientes de recolha de amostras
- Centrifugadora (para soro/plasma)
- Cronómetro
- Lanceta (apenas para sangue total por picada no dedo)
- Tubo capilar (75 µl, se necessário)
- Micropipeta (se necessário)

6. Armazenamento e Estabilidade

Os kits de teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM devem ser armazenados entre 2-30°C e usados antes de expirada a data

de validade impressa na embalagem. Os testes cassete encontram-se estáveis até à data de validade indicada na embalagem. Os testes cassete devem permanecer selados nas embalagens até serem utilizados. Não congelar os testes. Não utilizar os testes após o prazo de validade.

7. Avisos e Precauções

- Apenas para utilização profissional de diagnóstico *in-vitro*.
- Ler atentamente o procedimento de teste antes de realizar o teste.
- Não utilizar o teste após expirada a data de validade indicada na embalagem.
- Não utilizar o teste caso a embalagem se encontre danificada.
- Não reutilizar os testes.
- Não adicionar amostras à área de reacção (área de resultados).
- De modo a evitar uma contaminação, não tocar na área de reacção (área de resultados).
- Evitar contaminação cruzada utilizando um recipiente de recolha de amostras novo para cada amostra obtida.
- Não comer, beber ou fumar na área de manuseamento de amostras e kits de testes.
- Utilizar vestuário de protecção como batas, luvas descartáveis e protecção ocular durante o manuseamento das amostras.
- Manusear todas as amostras como potenciais agentes infecciosos. Observar as regulamentações estabelecidas respeitantes a riscos microbiológicos durante todos os procedimentos e respeitar as directrizes padrão para a eliminação apropriada das amostras.
- O kit de teste contém produtos de origem animal. O certificado de origem e/ou estado sanitário dos animais não garante completamente a ausência de agentes patogénicos transmissíveis. Portanto, é recomendado que todos estes produtos sejam tratados como potencialmente infecciosos e manuseados de acordo com as precauções de segurança habituais (p.e., não ingerir ou inalar).
- Humidade e temperatura podem afectar adversamente os resultados do teste.
- Materiais de testes usados devem ser descartados de acordo com as regulamentações locais.

8. Recolha e Preparação de Amostras

O NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test pode ser realizado utilizando sangue total, soro ou plasma.

Para recolher amostras de sangue total por picada no dedo:

- Lavar a mão do paciente com sabão e água morna ou limpar com um algodão embebido em álcool. Deixar secar.
- Massajar a mão sem tocar no local da punção esfregando a mão em direção à ponta do dedo médio ou anular.
- Perfurar a pele com uma lanceta estéril. Limpar a primeira gota de sangue.
- Esfregar suavemente do pulso para a palma da mão e, em seguida, para o dedo para formar uma gota de sangue arredondada no local da punção.

Amostras de sangue total por punção venosa

Para testar soro ou plasma, separar o soro ou o plasma do sangue o mais rapidamente possível para evitar hemólise. Utilizar apenas amostras límpidas, não hemolisadas.

O teste deve ser realizado imediatamente após a recolha da amostra. Não deixar amostras à temperatura ambiente por um período prolongado. Amostras de soro e plasma podem ser armazenadas entre 2-8°C até 3 dias. Para armazenamento a longo prazo, as amostras deverão ser mantidas a temperaturas inferiores a -20°C. O sangue total recolhido por punção venosa deve ser armazenado entre 2-8°C se o teste for realizado dentro de 2 dias após a recolha. Não congelar amostras de sangue total. As amostras de sangue total obtidas através de picada no dedo devem ser testadas imediatamente. Colocar as amostras à temperatura ambiente antes de realizar o teste. Amostras congeladas deverão encontrar-se completamente descongeladas e bem misturadas antes de realizar o teste. As amostras não devem ser congeladas e descongeladas repetidamente. Se as amostras forem transportadas, deverão ser embaladas de acordo com as regulamentações locais para o transporte de agentes etiológicos.

9. Procedimento do teste

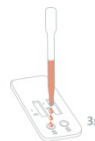
Permitir que os testes, amostras, solução tampão e/ou controlos atinjam a temperatura ambiente (15-30°C) antes da sua utilização.

1. Retirar o teste cassete da embalagem selada, e coloque-o numa superfície limpa e nivelada. O teste cassete deve ser utilizado imediatamente após a abertura da embalagem. Etiquetar o teste cassete com a identificação do paciente ou de controlo.

2. a) Para a amostra de soro ou plasma:

Para Dengue NS1 Ag:

Segurando na vertical a pipeta fornecida de 25 µl, adicionar 3 gotas (cerca de 75 µl) de soro ou plasma para o poço da amostra (S) do teste cassete.



Para anti-Dengue IgG/IgM:

I. Para usar uma pipeta:

Segurando na vertical a pipeta fornecida de 5 µl, acrescentar a amostra de soro ou plasma até ao primeiro alargamento (aproximadamente 5 µl) e adicionar ao poço de amostra (S) do teste cassete. Adicionar 1 gota (aproximadamente 40 µl) de solução tampão no poço da amostra (S). **Evite bolhas de ar no poço da amostra.**



ou

II. Para utilizar uma micropipeta:

Ao usar uma micropipeta, dispensar 5 µl de soro ou plasma no poço da amostra (S) do teste cassete. De seguida, adicionar 1 gota (aproximadamente 40 µl) de solução tampão no poço da amostra (S).

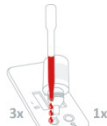


b) Para a amostra de sangue total por picada no dedo/punção venosa:

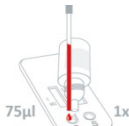
Para Dengue NS1 Ag:

I. Para usar uma pipeta:

Segurando na vertical a pipeta fornecida de 25 µl, adicionar 3 gotas (cerca de 75 µl) de sangue total no poço da amostra (S) do teste cassete. De seguida, adicionar 1 gota (aproximadamente 40 µl) de solução tampão no poço da amostra (S).



ou



ou



II. Para usar um tubo capilar:

Preencher o tubo capilar e transferir aproximadamente 75 µl da amostra de sangue total por picada no dedo no poço da amostra (S). De seguida, adicionar 1 gota (aproximadamente 40 µl) de solução tampão no poço da amostra (S).

III. Para usar gotas pendentes:

Permitir que 3 gotas pendentes (aproximadamente 75 µl) de sangue total por picada no dedo caiam no poço da amostra (S) do teste cassete. De seguida, adicionar 1 gota (aproximadamente 40 µl) de solução tampão no poço da amostra (S).

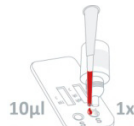
Para anti-Dengue IgG/IgM:

I. Para usar uma pipeta:

Segurando na vertical a pipeta fornecida de 5 µl, acrescentar amostra de sangue total 1 cm acima do primeiro alargamento (aproximadamente 10 µl) e adicioná-la ao poço da amostra (S) do teste cassete. De seguida, adicionar 1 gota (aproximadamente 40 µl) de solução tampão no poço da amostra (S).



ou



II. Para usar uma micropipeta:

Ao usar uma micropipeta, dispensar 10 µl de sangue total no poço de amostra (S) do teste cassete. Adicionar 1 gota (aproximadamente 40 µl) de solução tampão no poço da amostra (S).

3. Iniciar o cronómetro.

4. Ler o resultado após 10 minutos. Não interpretar os resultados após decorridos mais de 20 minutos.



10 min

10. Interpretação dos Resultados

Positivo para Dengue NS1 Ag:

Uma linha colorida surge em cada zona de controlo "C" e uma linha colorida desenvolve-se na região da linha de



teste 'NS1'. O resultado pode ser indicativo de infecção atual.

Positivo para anti-Dengue IgG:

Uma linha colorida surge em cada zona de controlo "C" e uma linha colorida desenvolve-se na região da linha de teste 'IgG'. O resultado pode ser indicativo de infecção secundária do vírus da dengue.



Positivo para anti-Dengue IgM:

Uma linha colorida surge em cada zona de controlo "C" e uma linha colorida desenvolve-se na região da linha de teste 'IgM'. O resultado pode ser indicativo de infecção primária do vírus da dengue.



Positivo para anti-Dengue IgG/IgM:

Uma linha colorida surge em cada zona de controlo "C" e uma linha colorida desenvolve-se nas regiões da linha de teste 'IgG' and 'IgM' respectivamente. O resultado pode ser indicativo de infecção secundária do vírus da dengue. As intensidades de cor das linhas não têm que coincidir.



Nota: É possível uma combinação de resultados positivos para vários parâmetros.

Negativo:

Uma linha colorida surge na região da linha de controlo "C". Não surgem linhas coloridas nas regiões de linha de teste 'NS1', 'IgG' and 'IgM'.



Inválido:

Pelo menos uma linha de controlo 'C' não surge. Resultados de qualquer teste no qual não tenha surgido uma linha de controlo no tempo de leitura especificado deverão ser descartados.



As razões mais prováveis para um resultado inválido são o volume da amostra, erros de procedimento ou testes expirados. Por favor, rever o procedimento e repetir o teste com um novo teste cassete. Se o problema persistir, interromper a utilização do kit de teste e contactar o seu distribuidor.



Nota: A intensidade da cor na região da linha de teste 'NS1' e/ou 'IgG' e/ou 'IgM' pode variar dependendo da concentração de antígenos NS1 da Dengue e/ou IgG e/ou IgM presentes na amostra. Qualquer sombra de cor na zona da linha de teste deve ser considerada positiva.

11. Controlo de qualidade

Um controlo interno de procedimento encontra-se incluído no teste cassette:

A linha colorida que surge na região da linha de controlo (C), é considerada um controlo interno de procedimento. Isto confirma um volume de amostra suficiente, uma saturação de membrana adequada e um procedimento técnico correto.

As *Boas Práticas Laboratoriais (BPL)* recomendam a utilização de materiais de controlo para garantir um desempenho do teste apropriado.

12. Limitações

- O NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test só detecta a presença de antígenos NS1 da dengue e anticorpos anti-dengue na amostra e não deve ser usado como o único critério para o diagnóstico da dengue.
- As secções "Procedimento de Teste" e "Interpretação de Resultados" devem ser seguidas de perto ao efectuar o teste para a presença de antígenos da dengue e anticorpos anti-dengue no sangue total, soro ou plasma de sujeitos individuais. O não seguimento do procedimento poderá levar a resultados não precisos.
- Um teste negativo para os antígenos NS1 da dengue não exclui a possibilidade de exposição a ou infecção com vírus Dengue.
- Um resultado negativo para os antígenos NS1 da dengue pode ocorrer se a quantidade de antígenos da dengue presente na amostra for inferior ao limite de detecção do teste, ou se os antígenos da dengue detectados não estavam presentes durante o estágio da doença em que a amostra foi recolhida.
- Amostras que contenham anormalmente elevados, os títulos de anticorpos heterófilos ou fator reumatóide podem afetar os resultados esperados.
- Se os sintomas persistirem, enquanto o resultado obtido com o NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test for negativo ou não reactivo, recomenda-se a recolha de uma nova amostra do paciente poucos dias mais tarde, ou um teste com um método de ensaio alternativo, tal como PCR ou ELISA.
- Os resultados obtidos com o NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test devem apenas ser interpretados em conjunto com outros procedimentos de diagnóstico e análises clínicas.
- Após o início precoce da febre, a concentração de IgM anti-dengue pode estar abaixo dos níveis detectáveis. Para a infecção primária, um ensaio de IgM de captura de anticorpo ligado a enzima imunosorvente (MAC-ELISA) mostrou que 80% dos pacientes testados com dengue apresentaram níveis detectáveis de IgM no quinto dia após a infecção e 99% dos pacientes testados com IgM positiva no dia 10. Portanto, recomenda-se que os pacientes sejam testados dentro deste período de tempo. Quanto à infecção secundária, uma fração molar baixa de IgM anti-dengue e uma fração molar elevada de IgG-anti-dengue que é amplamente reactiva para flavivírus caracteriza os anticorpos.⁵ A linha de teste 'IgM' pode ser fraca, e uma reacção cruzada na região da linha de teste "IgG" pode ocorrer.

- A reactividade cruzada serológica entre o grupo flavivírus (Dengue 1, 2, 3 e 4, a encefalite de St. Louis, o vírus do Nilo Ocidental, a encefalite japonesa e vírus da febre amarela) é comum.^{6,7,8} Resultados positivos devem ser confirmados utilizando outros métodos.
- A presença contínua ou ausência de anticorpos não pode ser utilizada para determinar o sucesso ou insucesso da terapia.
- Os resultados de pacientes imunossuprimidos devem ser interpretados com cautela.

13. Valores Esperados

O NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test foi comparado a uma EIA Dengue AG, líder e comercialmente disponível. A correlação entre estes dois sistemas é superior a 96%.

Infecção por dengue primária é caracterizada pela presença de IgM detectáveis 3-5 dias após o início da infecção. Infecção por dengue secundária é caracterizada pela elevação de IgG específicos de dengue. Na maioria dos casos, esta é acompanhada por elevados níveis de IgM.

O NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test foi comparado com um ensaio Dengue ELISA, líder e comercialmente disponível, demonstrando sensibilidade de 83,3% para IgM na infecção primária e >99,9% para a infecção secundária de IgG.

14. Características de Desempenho

Sensibilidade e Especificidade

Um painel de seroconversão que compreende amostras clínicas obtidas a partir de uma população de indivíduos sintomáticos e assintomáticos foi testado para antígenos NS1 da dengue e para IgG/IgM anti-Dengue, usando o NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test. Os resultados para os Ag NS1 da Dengue foram confirmados por uma EIA Dengue AG, líder e comercialmente disponível, enquanto que os resultados para os IgG/IgM anti-Dengue foram confirmados por um ensaio Dengue ELISA, líder e comercialmente disponível.

Os resultados para os IgG/IgM anti-Dengue mostram que a sensibilidade relativa global para a infecção primária e secundária do NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test é 95,7%, e que a especificidade relativa é >99,9% e que a precisão relativa é de 99,3%.

Infecção primária de dengue para os resultados do teste IgG/IgM

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Resultados	Dengue ELISA		
		Positivo		Negativo
		IgM	IgG	
Positivo	IgM	15	0	0
	IgG	3	0	0
Negativo		0	0	0

Sensibilidade relativa: (IgM): 83,3%

Infecção secundária de dengue para os resultados do teste IgG/IgM

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM teste (IgG/IgM)	Resultados		Dengue ELISA		
			Positivo		Negativo
	Positivo	IgM	IgG		
		IgM	37	0	0
	IgG	15	52	0	
	Negativo	0	0	0	

Sensibilidade relativa (IgM): 71,2%

Sensibilidade relativa (IgG): >99,9%

Resultados de testes IgG/IgM para a ausência de infecção por dengue

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM teste (IgG/IgM)	Resultados		Dengue ELISA		
			Positivo		Negativo
	Positivo	IgM	IgG		
		IgM	0	0	0
	IgG	0	0	0	
	Negativo	0	0	338	

Sensibilidade relativa (negativo): >99,9%

Sensibilidade relativa: $(15+52)/(18+52) = 95,7\%*$ (95%CI*: 88%~99,1%)

Especificidade relativa: $338/338 >99,9\%$ (95%CI*: 99,1%~100%)

Precisão: $(15+52+338)/(18+52+338) = 99,3\%$ (95%CI*: 97,9%~99,8%)

*Intervalos de Confiança

Os resultados para os Ag NS1 da Dengue mostram que a sensibilidade relativa do NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test é 95,8% e a especificidade relativa é 96,1%.

Resultados do teste Dengue NS1 Ag

		Dengue Ag ELISA		
		+	-	Total
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (antígenos NS1)	+	137	8	145
	-	6	200	206
	Total	143	208	351

Sensibilidade relativa: $137/143*100\% = 95,8\%$ (95%CI*: 91,1%~98,4%)

Especificidade relativa: $200/208*100\% = 96,1\%$ (95%CI*: 92,6%~98,4%)

Precisão: $(137+208)/(137+6+8+200)*100\% = 96\%$ (95%CI*: 93,4%~97,8%)

*Intervalos de Confiança

Precisão

Intra-ensaio

A precisão dentro da mesma determinação foi calculada usando 15 replicados de quatro amostras: uma negativa, uma baixa positiva, uma média positiva e uma alta positiva. As amostras foram correctamente identificadas >99% das vezes.

Inter-ensaio

A precisão entre determinações foi calculada usando 15 ensaios independentes sobre as mesmas quatro amostras: uma negativa, uma baixa positiva, uma média positiva e uma alta positiva. Três lotes diferentes do NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test foram testados usando estas amostras. As amostras foram correctamente identificadas >99% das vezes.

Reactividade Cruzada

O NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test foi testado com amostras positivas de HAMA, RF, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Sífilis, VIH, HCV, *H. pylori*, MONO, CMV, Rubéola e TOXO. Os resultados mostraram ausência de reacção cruzada.

Substâncias interferentes

As seguintes substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas a amostras negativas e positivas de Dengue.

Acetaminofeno: 20 mg/dL	Cafeína: 20 mg/dL
Ácido acetilsalicílico: 20 mg/dL	Ácido genticílico: 20 mg/dL
Ácido ascórbico: 2 g/dL	Albumina: 2 g/dL
Creatina: 200 mg/dL	Hemoglobina 1000 mg/dL
Bilirrubina: 1 g/dL	Ácido oxálico: 60 mg/dL

Nenhuma das substâncias na concentração testada interferiram no ensaio.

15. Referências

- Halstead SB. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.
- Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
- Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese J. Trop. Med. Hygiene 1994; 22: 9-12.
- Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. Rev. Med. Micro. 1995; 6:39-48.
- Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
- Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4): 725-8.
- Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
- Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus Microbiol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2016-09-06 JC

1. Účel použití

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM je rychlý imunochromatografický test určený k současně kvalitativní detekci a rozlišení antigenu dengue NS1 a IgG a IgM proti viru dengue ve vzorcích lidské plné krve, séra nebo plazmy. Test slouží jako pomůcka ke stanovení diagnózy infekcí dengue a je určen pouze k profesionálnímu použití.

2. Úvod a klinický význam

Dengue virus je flavivirus, který je přenášen komárem tygrovaným *Aedes albopictus* a komárem tropickým *Aedes aegypti*. Je široce rozšířen v tropických a subtropických oblastech světa¹ a způsobí ročně až 100 miliónů infekcí.² Klasická infekce dengue se vyznačuje náhlou horečkou, silnými bolestmi hlavy, myalgii, artralgií a vyrážkou.

Primární infekce dengue způsobí zvýšení IgM na detekovatelnou koncentraci do 3 až 5 dnů po nástupu horečky. IgM obvykle setrvávají po dobu 30 až 90 dnů.³ Většina pacientů postižených infekcí dengue v endemických oblastech trpí sekundárními infekcemi,⁴ které vedou k vysokým hodnotám specifických IgG před nebo zároveň s IgM reakcí.⁵ Detekce specifických IgM a IgG proti dengue může proto přispět k rozlišení mezi primárními a sekundárními infekcemi.

NS1 je jeden ze 7 nestrukturálních proteinů viru Dengue, který se zřejmě podílí na virové replikaci. NS1 existuje jako monomer ve své nezralé formě, je ale rychle zpracován v endoplazmatickém retikulu, aby se z něho vytvořil stabilní dimer. Malé množství NS1 zůstane sdružené s intracelulárními organelami, kde se zřejmě podílí na virové replikaci. Zbylé NS1 se buď napojuje na plazmatickou membránu nebo je vyloučen jako rozpustný hexadimer. NS1 je nezbytný k životaschopnosti viru, avšak jeho přesná biologická funkce není známa. Protilátky, které se při virové infekci vytvoří jako reakce na NS1, mohou zkráceně reagovat s antigeny na buněčném povrchu epitelových buněk a krevních destiček. Toto má vliv na vývoj hemoragické horečky dengue.

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM je rychlý test, který využívá k detekci NS1 antigenů dengue kombinaci potažených protilátek proti dengue navázaných na barevné částice, jakož i na barevné částice navázané antigeny dengue k detekci IgG proti dengue a IgM proti dengue v lidské plné krvi, séru nebo plazmě.

3. Princip testu

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM je kvalitativní membránový imunotest určený k detekci protilátek proti dengue a NS1 antigenů dengue v lidské plné krvi, séru nebo plazmě.

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM obsahuje dva testovací proužky (levá strana: test Dengue NS1 Ag; pravá strana: test Dengue IgG/IgM).

Test Dengue IgG/IgM na pravé straně se skládá ze dvou částí. V IgG části jsou proti lidské IgG předem naneseny v oblasti testovací linie 'IgG'. Během testování reaguje vzorek s částicemi potaženými antigenem dengue na testovací kazetě. Směs dále chromatograficky putuje membránou působením kapilárních sil a reaguje s proti lidskými protilátkami IgG v oblasti testovací linie 'IgG'. Pokud vzorek obsahuje IgG proti dengue, zobrazí se barevná linie v oblasti testovací linie 'IgG'.

V IgM části jsou předem naneseny proti lidské protilátce IgM v oblasti testovací linie 'IgM'. Pokud jsou ve vzorku přítomny IgM proti dengue, reagují tyto s částicemi potaženými antigenem dengue na testovací kazetě. Tento komplex je poté zachycen proti lidskými protilátkami IgM a vytvoří tak barevnou linii v oblasti testovací linie 'IgM'.

Pokud vzorek neobsahuje protilátce proti dengue, nezobrazí se barevná linie ani v jedné z oblastí testovací linie, což poukazuje na negativní výsledek.

Test Dengue NS1 Ag na levé straně:

Během testování vzorek reaguje s konjugáty protilátek proti dengue na membráně vnitřního testovacího proužku. Konjugáty protilátek a zlata se navážou na antigeny dengue ve vzorku, které se poté navážou na protilátce proti dengue NS1 předem nanesené na membránu. Když pak směs putuje membránou, navážou se protilátce proti dengue NS1 na komplex protilátek a antigenu, což způsobí vytvoření světla až tmavě růžové linie v oblasti testovací linie 'NS1' na membráně. Barevná intenzita linie se může lišit v závislosti na množství antigenů přítomných ve vzorku. Zobrazení růžové linie v oblasti testovací linie 'NS1' by mělo být považováno za pozitivní výsledek.

Pokud vzorek neobsahuje antigeny dengue, nezobrazí se barevná linie v oblasti testovací linie, což poukazuje na negativní výsledek testu.

Zobrazení barevné linie v oblasti kontrolní linie (C) slouží jako procedurální kontrola a potvrzuje, že bylo přidáno dostatečné množství vzorku a že došlo k promočeni membrány.

4. Činidla a dodávané materiály:

- 25 NADAL® Dengue Ag + IgG/IgM testovacích kazet
- 25 jednorázových pipet (5 µl)
- 25 jednorázových pipet (25 µl)
(dodávané 5 µl a 25 µl pipety přenesou každá cca 5 µl a 25 µl v jedné kapce i v případě, že se do pipety nasaje více krve)
- 1 pufr (3 ml)
- 1 návod k použití

5. Další potřebný materiál

- Nádobu pro odběr vzorku
- Odstředivka (pouze pro sérum/plazmu)
- Stopky
- Lancety (pouze pro plnou krev z prstu)
- příp. kapilára (75 µl)
- příp. mikropipeta

6. Skladování a trvanlivost

Testovací sady NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM by měly být skladovány při teplotě 2-30°C a použity před uplynutím data expirace uvedeného na obalu. Testovací kazety jsou trvanlivé do data uvedeného na fóliovém obalu. Testovací proužky by měly až do doby použití zůstat v uzavřeném obalu. Test nezmrazujte. Nepoužívejte po uplynutí data expirace.

7. Upozornění a bezpečnostní opatření

- Pouze pro profesionální *in-vitro* diagnostiku.
- Před testováním si pečlivě přečtěte návod k použití.
- Nepoužívejte test po uplynutí data expirace, které je uvedeno na obalu.

- Test nepoužívejte, je-li ochranná fólie poškozena.
- Pouze z jednorázovému použití.
- Nenanášejte vzorek do reakční oblasti (výsledková oblast).
- Aby se zamezilo kontaminaci, nedotýkejte se reakční oblasti (výsledková oblast).
- Aby se zabránilo křížovým kontaminacím vzorků, používejte pro každý odebraný vzorek novou nádobu.
- V místě provádění testu nejzte, nepijte ani nekuřte.
- Během testování vzorků používejte ochranný oděv jako laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle.
- Se všemi vzorky zacházejte jako s potenciálně infekčními. V průběhu všech testovacích kroků dodržujte zavedená opatření pro prevenci mikrobiologických rizik a řiďte se standardními předpisy pro správnou likvidaci vzorků.
- Testovací souprava obsahuje produkty živočišného původu. Znalost původu a/nebo zdravotního stavu zvířat doložená certifikátem zcela nezaručuje absenci přenosných patogenů. Je tudíž doporučeno s těmito produkty zacházet jako s potenciálně infekčními a podle běžných bezpečnostních opatření (např. nepolykejte nebo nevedechněte).
- Vlhkost a teplota mohou nepříznivě ovlivnit výsledky testu.
- Použité testovací materiály by měly být zlikvidovány v souladu s místními předpisy.

8. Odběr a příprava vzorku

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM může být proveden se vzorky plné krve, séra nebo plazmy.

Odebrání vzorku plné krve z prstu:

- Omyjte pacientovu ruku mýdlem a teplou vodou nebo ji očistěte tampónem namočeném v alkoholu. Nechte oschnout.
- Aniž byste se dotkli místa vpichu masírujte ruku třením směrem dolů ke špičce prostředníčku nebo prsteníčku.
- Propíchněte kůži sterilní lancetou. První kapku krve setřete.
- Jemně třete ruku od zápěstí k dlaní a k prstu tak, aby se nad místem vpichu vytvořila ucelená kapka krve.

Plná krev z žíly

Při testování séra nebo plazmy oddělte sérum nebo plazmu od krve co nejdříve, aby se předešlo hemolýze. Používejte pouze čiré, nehemolyzované vzorky.

Testování by mělo proběhnout ihned po odebrání vzorku. Nenechávejte vzorek po delší dobu při pokojové teplotě. Sérum a plazma by měly být skladovány při teplotě 2-8°C po dobu nejdéle 3 dnů. Při dlouhodobém skladování udržujte vzorky při teplotě -20°C. Pokud bude test proveden do 2 dnů od odběru vzorku, měla by být plná krev odebraná ze žíly skladována při teplotě 2-8°C. Vzorky plné krve nezmrazujte. Plná krev z prstu by měla být testována okamžitě. Před testováním nechte vzorky dosáhnout pokojové teploty. Zmražené vzorky by měly být před testováním řádně rozmrazeny a promíchány. Vzorky opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte. V případě přepravy by vzorky měly být zabaleny v souladu s předpisy pro přepravu etiologických agens.

9. Provedení testu

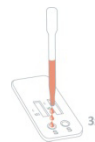
Testy, vzorky, pufr a/nebo kontroly nechte před testováním dosáhnout pokojové teploty (15-30°C).

1. Vyjměte testovací kazetu ze zapečetěné fólie a položte ji na čistou, rovnou plochu. Testovací kazeta by měla být použita neprodleně po rozpečetění fóliového obalu. Poznamenejte na testovací kazetu identifikaci pacienta nebo kontroly.

2. a) Pro vzorky séra nebo plazmy:

Pro Dengue NS1 Ag:

Držte dodávanou pipetu 25 µl svísele a přidejte 3 kapky (cca 75 µl) séra nebo plazmy do otvoru pro vzorek (S) na testovací kazetě.



Pro IgG/IgM proti Dengue:

I. Při použití pipety:

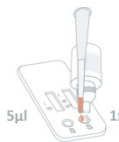
Držte dodávanou pipetu 5 µl svísele, natáhněte sérum nebo plazmu až do prvního rozšíření pipety (cca 5 µl) a přidejte do otvoru pro vzorek (S) na testovací kazetě. Poté přidejte 1 kapku (cca 40 µl) pufru do otvoru pro vzorek (S). Zamezte utváření vzduchových bublin v otvoru pro vzorek.



nebo

II. Při použití mikropipety:

Pomocí mikropipety přidejte 5 µl séra nebo plazmy do otvoru pro vzorek (S) na testovací kazetě. Přidejte 1 kapku (cca 40 µl) pufru do otvoru pro vzorek (S).

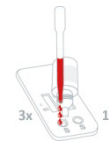


b) Pro vzorek plné krve z prstu / z žíly:

Pro Dengue NS1 Ag:

I. Při použití pipety

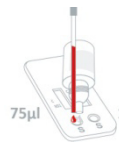
Držte přiloženou pipetu (25 µl) svísele a přidejte 3 kapky (cca 75 µl) plné krve do otvoru pro vzorek (S) na testovací kazetě. Poté přidejte 1 kapku (cca 40 µl) pufru do otvoru pro vzorek (S).



nebo

II. Při použití kapilární trubičky:

Naplňte kapilární trubičku a přeneste cca 75 µl vzorku plné krve z prstu do otvoru pro vzorek (S). Poté přidejte 1 kapku (cca 40 µl) pufru do otvoru pro vzorek (S).



nebo

III. Při použití visící kapky:

Nechte 3 visící kapky (cca 75 µl) plné krve z prstu skápnout do otvoru pro vzorek (S) na testovací kazetě. Poté přidejte 1 kapku (cca 40 µl) pufru do otvoru pro vzorek (S).

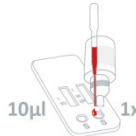


a

Pro IgG/IgM proti Dengue:

I. Při použití pipety:

Držte přiloženou pipetu (5 µl) svísele, natáhněte vzorek plné krve až do 1 cm nad prvním rozšířením pipety



(cca 10 µl) a přidejte do otvoru pro vzorek (S) na testovací kazetě. Poté přidejte 1 kapku (cca 40 µl) pufru do otvoru pro vzorek (S).

II. Při použití mikropipety:

Za použití mikropipety naneste 10 µl vzorku mlé krve do otvoru pro vzorek (S) na testovací kazetě. Poté přidejte 1 kapku (cca 40 µl) pufru do otvoru pro vzorek (S).

3. Spusťte stopky.

4. Po 10 minutách odečtete výsledky. Po 20 minutách již výsledek nevyhodnocujte.



10. Vyhodnocení výsledků

Pozitivní pro dengue NS1 Ag:

V každé oblasti kontrolní linie 'C' se vytvoří jedna barevná linie a jedna barevná linie se dále objeví v oblasti testovací linie 'NS1'. Výsledek může poukazovat na momentální infekci.



Pozitivní pro IgG proti dengue:

V každé oblasti kontrolní linie 'C' se vytvoří jedna barevná linie a jedna barevná linie se dále objeví v oblasti testovací linie 'IgG'. Výsledek může poukazovat a sekundární virovou infekci dengue.



Pozitivní pro IgM proti dengue:

Jedna barevná linie se vytvoří v každé oblasti kontrolní linie 'C' a jedna barevná linie se dále vytvoří v oblasti testovací linie 'IgM'. Výsledek může poukazovat na primární virovou infekci dengue.



Pozitivní pro IgG/IgM proti dengue:

Jedna barevná linie se vytvoří v každé oblasti kontrolní linie 'C' a v oblastech testovací linie 'IgG' a 'IgM' se objeví vždy jedna barevná linie. Výsledek může poukazovat a sekundární virovou infekci dengue. Barevné intenzity linií nemusí korespondovat. **Poznámka:** Může dojít ke kombinaci pozitivních výsledků pro různé parametry.



Negativní:

Jedna barevná linie se objeví v každé oblasti kontrolní linie 'C'. V oblastech testovací linie 'NS1', 'IgG' a 'IgM' se nezobrazí žádné barevné linie.



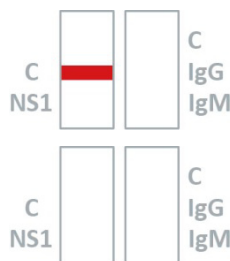
Neplatný:

Nezobrazí se alespoň jedna z kontrolních linií 'C'. Výsledky jakéhokoliv testu, na kterém se v určeném čase pro odečítání



neutvořily kontrolní linie, musí být znehodnoceny.

Nedostatečné množství vzorku, nesprávný postup při testování nebo prošlý test jsou nejpravděpodobnější důvody k nezobrazení kontrolní linie. Revidujte prosím postup a zopakujte test s novou testovací kazetou. Pokud problém přetrvává, přestaňte ihned používat testovací sadu a kontaktujte Vašeho distributora.



Poznámka: Barevná intenzita v oblasti testovací linie 'NS1' a/nebo 'IgG' a/nebo 'IgM' se může lišit v závislosti na koncentraci antigenů dengue NS1 a/nebo IgG a/nebo IgM přítomných ve vzorku. Každý barevný odstín v oblasti testovací linie by proto měl být považován za pozitivní výsledek.

11. Kontrola kvality

Součástí testovací kazety je interní procedurální kontrola: Barevná linie, která se objeví v oblasti kontrolní linie (C) je považována za interní, procedurální kontrolu. Potvrzuje, že bylo přidáno dostatečné množství vzorku, že došlo k řádnému promočení membrány a že byl dodržen správný postup při testování.

Správná laboratorní praxe (SPL) doporučuje používání kontrolních materiálů k ověření správné výkonnosti testovací sady.

12. Omezení

- Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM detekuje pouze přítomnost NS1 antigenů dengue a protilátek proti dengue ve vzorku a neměl by sloužit jako jediné kritérium ke stanovení diagnózy dengue.
- Při testování přítomnosti antigenu dengue a protilátky proti dengue v plné krvi, séru nebo plazmě se řiďte přesně pokyny v oddělech 'Provedení testu' a 'Vyhodnocení výsledků'. Nedodržení těchto postupů může zapříčinit nesprávné výsledky.
- Negativní výsledek testu pro NS1 antigeny dengue nevylučuje možnost vystavení nebo infekce viru dengue.
- Negativní výsledek testu pro NS1 antigeny dengue se může zobrazit v i případě, že množství antigenů dengue přítomných ve vzorku se nachází pod hranicí detekce testu nebo pokud antigeny nebyly přítomny ve fázi nemoci, ve které byl vzorek odebrán.
- Vzorky, které obsahující nezvykle vysoký titr heterofilních protilátek nebo revmatoidních faktorů, mohou ovlivnit očekávané výsledky.
- Pokud symptomy přetrvávají i přesto, že výsledek testu NADAL® Dengue Ag + IgG/IgM byl negativní nebo nereaktivní, je doporučeno odebrat od pacienta jiný vzorek o pár dní později, anebo použít alternativní testovací metodu jako např. PCR nebo ELISA.
- Výsledky získané testem NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM by měly být vyhodnoceny pouze ve spojení s dalšími diagnostickými postupy a klinickými nálezy.
- Po časném nástupu horečky se koncentrace IgM proti dengue mohou nacházet pod hranicí detekce. V případě primární infekce prokázala enzymová imunisorpční analýza

založená na zachycení protilátek IgM (MAC-ELISA), že 80% pacientů testovaných na dengue pátý den po infekci vykázali detekovatelné hodnoty IgM a 99% pacientů byli 10. dne pozitivní na IgM. Doporučuje se proto, aby pacienti byli testováni v tomto časovém období. V případě sekundární infekce jsou nízký molární podíl IgM proti dengue a vysoký molární podíl IgG proti dengue, které jsou převážně reaktivní na flaviviry, charakteristickými pro protilátky.⁵ Testovací linie 'IgM' může být slabá a může dojít ke křížové reakci v oblasti testovací linie 'IgG'.

- Serologická křížová reaktivita ve skupině flavovirů (Dengue 1, 2, 3 & 4, St. Louis encephalitis, virus západonilské horečky, Japonská encefalitida a viry žluté zimnice) je běžná.^{6,7,8} Pozitivní výsledky by proto měly být potvrzeny za použití jiných metod.
- V případě pokračující přítomnosti nebo nepřítomnosti protilátek nemůže být stanoven úspěch či neúspěch léčby.
- Výsledky imunosupresivních pacientů by měly být vyhodnoceny s opatrností.

13. Očekávané hodnoty

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM byl porovnán s vedoucím komerčně dostupným EIA Dengue Ag. Korelace mezi těmito dvěma systémy činí 96%.

Primární infekce dengue je charakterizována přítomností detekovatelných IgM 3-5 dní po nástupu infekce. Sekundární infekce dengue je charakterizována zvýšenou koncentrací IgG specifických pro dengue. Ve většině případů je toto doprovázeno zvýšenými hodnotami IgM.

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM byl porovnán s vedoucím komerčně dostupným testem ELISA Dengue a prokázal senzitivitu 83.3% pro IgM při primární infekci a >99.9% pro IgG při sekundární infekci.

14. Výkonnostní charakteristiky

Senzitivita a specifita

Sérokonverzní panel zahrnující klinické vzorky obdržené od skupiny symptomatických a asymptomatických jedinců byl testován na antigeny dengue NS1 a IgG-IgM proti dengue za použití testu NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM. Výsledky pro Dengue NS1 Ag byly potvrzeny vedoucím, komerčně dostupným EIA Dengue Ag, přičemž výsledky pro IgG/IgM proti Dengue byly potvrzeny vedoucím, komerčně dostupným ELISA Dengue.

Výsledky pro IgG/IgM proti dengue prokázaly, že celková relativní senzitivita testu NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM v případě primární a sekundární infekce činí 95.7%, relativní specifita činí >99.9% a relativní přesnost činí 99.3%.

Výsledky testu IgG/IgM v případě primární infekce dengue

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG/IgM)	Dengue ELISA				
	Výsledky		Pozitivní		Negativní
	Pozi- tivní	IgM	IgG		
	IgM	15	0	0	
	IgG	3	0	0	
	Negativní	0	0	0	

Relativní senzitivita (IgM): 83,3%

Výsledky testu IgG/IgM v případě sekundární infekce dengue

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgM)	Dengue ELISA				
	Výsledky		Pozitivní		Negativní
	Pozi- tivní	IgM	IgG		
	IgM	37	0	0	
	IgG	15	52	0	
	Negativní	0	0	0	

Relativní senzitivita (IgM): 71,2%

Relativní senzitivita (IgG): >99,9%

Výsledky testu IgG/IgM v případě nepřítomnosti infekce dengue

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG/IgM)	Dengue ELISA				
	Výsledky		Pozitivní		Negativní
	Pozi- tivní	IgM	IgG		
	IgM	0	0	0	
	IgG	0	0	0	
	Negativní	0	0	338	

Relativní senzitivita: (negativní): >99,9%

Relativní senzitivita: $(15+52)/(18+52) = 95.7\%$ (95%CI*: 88%~99.1%)

Relativní specifita: $338/338 >99.9\%$ (95%CI*: 99.1%~100%)

Přesnost: $(15+52+338)/(18+52+338) = 99.3\%$ = (95%CI*: 97.9%~99.8%)

*Intervaly spolehlivosti

Výsledky testu Dengue NS1 Ag prokázaly, že relativní senzitivita testu NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM činí 95.8% a relativní specifita činí 96.1%.

Výsledky testu Dengue NS1 Ag:

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (NS1 antigeny)	Dengue Ag ELISA			
		+	-	Celkem
	+	137	8	145
	-	6	200	206
	Celkem	143	208	351

Relativní senzitivita: $137/143 * 100\% = 95.8\%$ (95%CI*: 91.1%~98.4%)

Relativní specifita: $200/208 * 100\% = 96.1\%$ (95%CI*: 92.6%~98.4%)

Přesnost: $(137+208)/(137+6+8+200) * 100\% = 96\%$ (95%CI*: 93.4%~97.8%)

*Intervaly spolehlivosti

Přesnost

Intra-assay

Přesnost v rámci jedné šarže byla stanovena za použití 15 replikací čtyř vzorků: negativních, slabě pozitivních, středně pozitivních a silně pozitivních. Vzorky byly správně identifikovány v >99% případů.

Inter-assay

Přesnost mezi různými šaržemi byla stanovena pomocí 15 nezávislých testů za použití stejných čtyř vzorků: negativní, slabě pozitivní, středně pozitivní a silně pozitivní. Tři různé šarže testu NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM byly testovány za použití těchto vzorků. Vzorky byly správně identifikovány v >99% případů.

Křížová reaktivita

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM byl testován se vzorky pozitivními na HAMA, RF, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Syfilis, HIV, HCV, *H. pylori*, MONO, CMV, zarděnky a TOXO. Výsledky nevykázaly žádnou křížovou reaktivitu.

Interferující látky

Následující potencionálně interferující látky byly přidány do vzorků negativních a pozitivních na dengue.

Acetaminofen: 20 mg/dl	Kofein: 20 mg/dL
Kyselina acetylsalicylová: 20 mg/dL	Kyselina gentisová: 20 mg/dL
Kyselina askorbová: 2 g/dL	Albumin: 2 g/dL
Kreatin: 200 mg/dL	Hemoglobin 1000
Billirubin: 1 g/dL	Kyselina šťávelová: 60 mg/dL

Žádná z těchto látek neinterferovala při uvedených koncentracích s testem.

15. Reference

1. Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.
2. Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
3. Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese J. Trop. Med. Hygiene 1994; 22: 9-12.
4. Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. Rev. Med. Micro. 1995; 6:39-48.
5. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
6. Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4): 725-8.
7. Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
8. Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus Microbiol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2016-09-06 AG

1. Käyttötarkoitus

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testi on nopea kromatografinen immunomääritys Dengue NS1 antigeenin ja dengue viruksen vasta-aineen IgG ja IgM samanaikaiseen laadulliseen havaitsemiseen ihmisen kokoverestä, seerumista tai plasmasta. Testi on tarkoitettu apuvälineeksi dengueinfektion diagnosoimissa, ja vain ammattikäyttöön.

2. Johdanto ja kliiniset merkitykset

Denguevirus kuuluu flaviviruksiin. Sitä levittävät tiikerihyttys *Aedes aegypti* ja *Aedes albopictus*. Se on levinnyt laajalti trooppisilla- ja subtrooppisilla alueilla¹, aiheuttaen noin 100 miljoonaa tartuntatapausta vuosittain.² Denguekuumeen ominaisia tunnusmerkkejä ovat äkillinen kuumeen nousu, voimakas päänsärky, lihaskipu, sekä ihottuma.

Dengueinfektio aiheuttaa immunoglobuliini M:n (IgM) tason nousun havaittavalle tasolle 3-5 päivän kuluttua kuumeen alkamisesta. IgM taso pysyy yleensä kohonneena 30-90 päivää.³ Valtaosa endeemisillä alueilla elävistä denguepotilaista saa myös toissijaisen infektion⁴. Tämä aiheuttaa spesifisen IgG:n nousun ennen, tai samaan aikaan IgM:n tason nousun kanssa.⁵ Spesifisten dengue IgM ja IgG vas-aineiden havaitsemisen avulla pystytään erottamaan toisistaan ensi- ja toissijainen dengueinfektio.

NS1 on yksi seitsemästä Dengueviruksen ei-rakenteellisista proteiineista, joiden uskotaan olevan osa viruksen replikaatiota. NS1 esiintyy monomeerinä epäkyvyssä muodossaan, mutta käsitellään nopeasti endoplasmisessa verkkokalvossa, muodostaen vakaan dimeerin. Pieni määrä NS1:tä pysyy kiinnittyneenä solunsisäisiin organelleihin, missä sen uskotaan osallistuvan viruksen replikaatioon. Jäljellä oleva NS1 kiinnittyy joko plasmakalvoon tai erittyä liukoisena heksadimeerinä. NS1 on keskeinen viruksen elinkelpoisuudelle, mutta sen tarkkaa biologista funktiota ei tunneta. NS1:tä vastaan tuotetut vasta-aineet voivat ristikkäisreakoida solujen pinta antigeenien kanssa epiteelisoluisissa, sekä verihitaleissa. Tällä on vaikutuksia denguen verenvuotokuumeen kehitykseen.

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM pikatesti joka hyödyntää dengue vasta-aineilla päälylystettyjä partikkeleita, jotka sitoutuvat värillisiin partikkeleihin dengue NS1 antigeenien ja dengue antigeenien havaitsemiseen ihmisen kokoveri, seerumi, tai plasmanäytteistä.

3. Testiperiaate

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testi on laadullinen immunomääritys anti-dengue, sekä dengue NS1 vasta-aineiden havaitsemiseen ihmisen kokoveri, seerumi, tai plasmanäytteistä.

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testi sisältää kaksi testiliuskaa (vasemmalla: Dengue NS1 Ag testi; oikealla: Dengue IgG/IgM testi).

Oikeanpuoleinen Dengue IgG/IgM sisältää kaksi osaa. IgG osassa Testin aikana, näyte reagoi testikasetilla olevien dengue antigeeneilla päälylystettyjen partikkeleiden kanssa. Tämän jälkeen seos imeytyy kromatografisesti kalvoa pitkin kapillaarireaktion tukemana. Seos reagoi ihmiselle spesifisten IgG vasta-aineiden kanssa testiviiva-alueella 'IgG'. Mikäli seos

sisältää anti-dengue IgG, ilmestyy testiviiva-alueelle 'IgG' värillinen viiva.

IgM osassa, ihmiselle spesifiset IgM vasta-aineet ovat esipäälylystettyinä testiviiva-alueella 'IgM'. Mikäli näytteessä havaitaan IgM, reagoivat ne dengue antigeeneilla päälylystettyjen partikkeleiden kanssa testikasetilla. Yhdiste kiinnittyy sitten ihmiselle spesifisiin IgM vasta-aineisiin, muodostaen värillisen viivan testiviiva-alueelle 'IgM'.

Mikäli näyte ei sisällä dengue vasta-aineita, ei värillistä viivaa kehity kummallekaan testiviiva-alueelle. Tämä osoittaa negatiivisen tuloksen.

Dengue NS1 Ag testi vasenpuoli:

Testin aikana, näyte reagoi dengue vasta-aine konjugaattien kanssa testikasetin kalvolla. Kulta-vasta-aine konjugaatit sitoutuvat näytteen dengue antigeeneihin. Nämä ovat sitoutuneina anti-dengue NS1 vasta-aineisiin testikasetin kalvolla. dengue-kuume vasta-aineet -antigeeni testi. Viivojen värin voimakkuus voi vaihdella näytteessä olevien antigeenien tason mukaan. Vaalenpunaisen viivan kehittyminen testiviiva-alueelle 'NS1' tulkitaan positiiviseksi tulokseksi.

Mikäli näyte ei sisällä dengue antigeeneja, ei testiviiva-alueelle kehity värillistä viivaa. Tämä osoittaa negatiivisen tuloksen.

Kontrollialueille (C) ilmaantuva värillinen viiva toimii testin sisäänrakennettuna kontrollina, ja varmistaa riittävän näytämäärän, sekä kalvon oikeanlaisen toiminnan.

4. Reagenssit ja toimitettavat materiaalit

- 25 NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testikasettia
- 25 kertakäyttöistä pipettiä (5 µl)
- 25 kertakäyttöistä pipettiä (25 µl)
(mukana toimitettu 5 µl ja 25 µl pipetit annostelevat noin 5 µl ja 25 µl yhdessä pisarassa, vaikka enemmän verta on kerätty pipettiin)
- 1 pullo puskuriliuosta (3 ml)
- 1 pakkauslasele

5. Vaaditut lisämateriaalit

- Näyteenkeräysastioita
- Sentrifugi (seerumi/plasmanäytteille)
- Ajastin
- Lansetti (vain sormenpäntä kokoverinäytteille)
- Kapillaariputki (75 µl, tarvittaessa)
- Mikropipetti (tarvittaessa)

6. Säilytys & Stabiiliisuus

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testipakkaus tulee säilyttää 2-30°C lämpötilassa, ja käyttää ennen pakkauksessa ilmoitettua viimeistä voimassaolopäivää. Testikasetit ovat käyttökelpoisia ilmoitettuun viimeiseen

voimassaolopäivään asti. Testikasetit tulee säilyttää suljetuissa pakkauksissaan käyttöön asti. Älä jäädytä testikasetteja. Älä käytä viimeisen voimassaolopäivän jälkeen.

7. Varoitukset ja varoittimet

- Vain ammattimaiseen *in vitro* diagnostiikan käyttöön.
- Lue käyttöohjeet huolellisesti ennen testin suorittamista.
- Älä käytä testiä pakkauksessa ilmoitetun viimeisen käyttöpäivän jälkeen.
- Älä käytä testejä, mikäli foliopakkaus on vahingoittunut.

- Älä uudelleenkäytä testejä.
- Älä lisää näytettä reaktioalueelle (tulosalue).
- Välttääksesi saastumisen, älä koske reaktioalueeseen (tulosalue).
- Vältä näytteiden ristiinsaastumista käyttämällä uutta näytteenkeräjäjä jokselle näytteelle.
- Älä syö, juo tai tupakoi alueella, jossa näytteitä käsitellään.
- Käytä suojavarusteita, kuten laboratoriotakkeja, hanskoja ja suojalaseja käsitellessäsi näytteitä.
- Käsittele kaikkia näytteitä mahdollisina tartuntalähteinä. Noudata mikrobiologisia vaaroja koskevia varotoimia testaamisen aikana ja noudata asianmukaisia määräyksiä koskien näytteiden hävittämistä.
- Testipakkaus sisältää eläinperäisiä tuotteita. Sertifioitu tieto alkuperästä ja/tai eläinten terveydentilasta ei täysin takaa tarttuvien taudinaiheuttajien puuttumista. Tuotteita suositellaan täten käsiteltävän mahdollisesti tartuttavina (älä niele tai hengitä).
- Kosteus ja lämpötilan vaihtelut voivat vaikuttaa testitulokseen.
- Käytetyt testausmateriaalit tulee hävittää paikallisten säännösten mukaisesti

8. Näytteenotto ja valmistelu

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testi voidaan suorittaa käyttäen kokoverta, seerumia, tai plasmata.

Kokoverinäytteen kerääminen sormenpästä:

- Pese potilaan käsi saippualla ja lämpimällä vedellä, tai puhdista käyttämällä alkoholipyyhettä. Anna käden kuivua.
- Hiero kättä kohti keskisormen sormenpäätä tai nimetöntä välttää koskemasta lävistyskohtaan.
- Lävistä iho käyttämällä steriiliä lansettia. Pyyhi pois ensimmäinen tippa verta.
- Hiero kättä hellästi ranteesta kohti kämmentä ja sormea muodostaaksesi pyöreän pisaran verta lävistyskohtaan.

Injektiokanyyli kokoverinäytteen kerääminen

Seerumi- tai plasmanäytteille, erota seerumi tai plasma verestä mahdollisimman nopeasti hemolyysin välttämiseksi. Käytä vain kirkkaita, ei hemolysoituneita näytteitä.

Testi tulee suorittaa heti näytteen keräämisen jälkeen. Älä jätä näytteitä huoneenlämpöön pitkäksi ajaksi. Seeruminäytteet voidaan säilyttää 2-8°C lämpötilassa enintään 3 päivän ajan. Pidempiaikaisessa säilytyksessä näytteet tulee säilyttää alle -20°C asteessa. Injektiokanyyllillä kerätyt kokoverinäytteet tulee säilyttää 2-8°C lämpötilassa mikäli testi suoritetaan 2 päivän sisällä näytteen keräämisestä. Älä pakasta kokoverinäytteitä. Sormenpästä kerätyt kokoverinäytteet tulee testata välittömästi. Tuo näytteet huoneenlämpöön ennen testausta. Jäädetyt näytteen tulee sulattaa täysin, ja sekoittaa ennen testin suorittamista. Älä pakasta ja sulata näytteitä toistuvasti Mikäli näytteitä aiotaan kuljettaa, tulee ne pakata noudattaen paikallisia etiologisten aineiden kuljettamista koskevia säännöksiä.

9. Testin suorittaminen

Tuo testit, reagenssit, näytteet, ja/tai kontrollit huoneenlämpöön (15-30°C) ennen testin suorittamista.

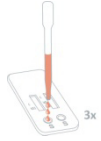
1. Poista testikasetti pakkauksestaan ja aseta se puhtaalle, tasaiselle alustalle. Testikasetti tulee käyttää välittömästi

pakkauksen avaamisen jälkeen. Merkitse testikasettiin potilaan tiedot.

2. a) Seerumi tai plasmanäytteille:

Dengue NS1 Ag:

Pitäen 25 µl tiputinta pystysuorassa, lisää 3 pisaraa (noin 75 µL) seerumia tai plasmanäytettä testikasetin näytekaivoon (S).



ja

Anti-Dengue IgG/IgM:

I. Käyttäen pipettiä:

Pitäen 5 µl pipettiä pystysuorassa, kerää seerumi- tai plasmanäytettä Lisää tämän jälkeen 1 pisara (noin 40 µL) puskuriliuosta näytekaivoon (S). **Vältä ilmakuplien muodostumista näytekaivoon.**



tai

II. Käyttäen mikropipettiä:

Käyttäen mikropipettiä, lisää 5 µl seerumi- tai plasmanäytettä testikasetin näytekaivoon (S). Tämän jälkeen, lisää 1 pisara (noin 40 µL) puskuriliuosta näytekaivoon (S).



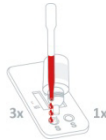
b) Injektiokanyyli

kokoverinäytteille:

Dengue NS1 Ag:

I. Käyttäen pipettiä:

Pitäen mukana toimitettua 25 µl tiputinta pystysuorassa, lisää 3 pisaraa (noin 75 µL) kokoverta testikasetin näytekaivoon (S). Tämän jälkeen, pitäen pulloa pystysuorassa, lisää 1 pisara (noin 40 µL) puskuriliuosta näytekaivoon (S).



tai

II. Kapillaariputkea käyttäen:

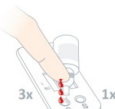
Täytä kapillaariputki ja lisää noin 75 µL sormenpästä kerättyä kokoverta testikaivoon (S). Lisää tämän jälkeen 1 pisara (noin 40 µL) puskuriliuosta näytekaivoon (S).



tai

III. Tiputtamalla pisaroita:

Tiputa 3 pisaraa kokoverta sormenpästä (noin 75 µL) testikasetin näytekaivoon (S). Lisää tämän jälkeen 1 pisara (noin 40 µL) puskuriliuosta näytekaivoon (S).

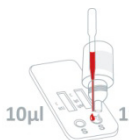


ja

Anti-Dengue IgG/IgM:

I. Pipettiä käyttäen:

Pitäen 5 µl pipettiä pystysuorassa, kerää kokoverinäytettä 1 cm ensimmäisen levennyksen (noin 10 µl kohdalle) ja lisää se testikasetin näytekaivoon (S). Tämän jälkeen, pitäen pulloa pystysuorassa, lisää 1 pisara (noin 40 µL) puskuriliuosta näytekaivoon (S).



tai

II. Mikropipettiä käyttäen:

Käyttäen mikropipettiä, lisää 10 µl kokoversta testikasetin näytekaivoon (S). Tämän jälkeen, pidään pulloa pystyasuorassa, lisää 1 pisara (noin 40 µl) puskuriliuosta näytekaivoon (S).

3. Käynnistä ajastin.

4. Lue tulokset 10 minuutin kuluttua.

Älä tulkitse tuloksia enää 20 minuutin jälkeen.



10. Tuloksien tulkinta

Positiivinen Dengue NS1 Ag:

Kontrolliviiva-alueelle 'C' muodostuu yksi värillinen viiva, lisäksi värillinen viiva kehittyä testiviiva-alueelle 'NS1'. Tulos ilmaisee mahdollisen käynnissä olevan infektion.



Positiivinen anti-Dengue IgG:

Värillinen viiva kehittyä kontrollialueelle (C) ja toinen viiva kehittyä testiviiva-alueelle 'IgG'. Tulos ilmaisee mahdollisen toissijaisen denguevirus infektion.



Positiivinen anti-Dengue IgM:

Värillinen viiva kehittyä kontrollialueelle (C) ja toinen viiva testiviiva-alueelle 'IgM'. Tulos ilmaisee mahdollisen ensisijaisen denguevirus infektion.



Positiivinen anti-Dengue IgG/IgM:

Värillinen viiva kehittyä kontrollialueelle 'C'. Sekä testiviiva-alueille 'IgG' ja 'IgM' kehittyä myös värilliset viivat. Tulos ilmaisee mahdollisen toissijaisen denguevirus infektion. Viivojen värivoimakkuuden ei tarvitse olla yhdenmukainen.



Huom: Yhdistelmät positiivisia tuloksia ovat mahdollisia eri parametreille.

Negatiivinen:

Vain yksi värillinen viiva kehittyä kontrollialueelle 'C'. Testiviiva-alueille 'NS1', 'IgG', ja 'IgM' ei kehity värillistä viivaa.



Mitätön:

Vähintään yksi kontrolliviiva 'C' ei kehity. Testikasetit joihin ei kehity kaikkia kontrolliviivoja tulee hävittää.



Riittämätön näytteen määrä ja väärä testin tekotapa ovat yleisimpiä syitä kontrolliviivan puuttumiseen. Lue käyttöohjeet huolellisesti uudelleen ja tee testi uudella



testikasetilla. Jos ongelma jatkuu, lopeta testien käyttö välittömästi ja ota yhteys jakelijasi.



Huom: Testiviiva-alueen NS1' ja/tai 'IgG' ja/tai 'IgM' värin voimakkuus saattaa vaihdella riippuen näytteessä olevien Dengue NS1 antigeenien ja/tai IgG ja/tai IgM pitoisuudesta näytteessä. Vaikka testiviivan voimakkuus olisi heikko, luetaan testin tulos silti positiiviseksi.

11. Laaduntarkkailu

Testikasetti sisältää sisäenrakennetun laadunkontrollin.

Värillisen viivan ilmestyminen kontrollialueelle (C) vahvistaa testin oikeanlaisen toiminnan. Sillä varmistetaan näytteen riittävyys, oikea tekniikka ja näytteen riittävä imeytyminen testikalvolle.

Hyvä laboratorio käytäntö (GLP) suosittelee käyttämään ulkoisia kontrollimateriaaleja oikeanlaisen testin suorituksen varmistamiseen.

12. Rajoitukset

- NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testi havaitsee ainoastaan dengue NS1 antigeenin ja anti-dengue vasta-aineiden esiintyvyyden näytteessä. Testin tulosta ei yksinään tule käyttää lopullisen denguekuume diagnoosin tekemiseen.
- Kohtia 'Testin suorittaminen' ja 'Tulosten tulkinta' tulee noudattaa tarkasti testin aikana. Ohjeiden noudattamatta jättäminen voi johtaa väärin tuloksiin.
- Negatiivinen tulos dengue NS1 antigeeneille ei poissulje mahdollisuutta altistaa Dengueviruksille.
- Negatiivinen tulos dengue NS1 antigeeneille on mahdollinen mikäli dengue antigeenin määrä näytteessä on alle testin havaitsemisrajan, tai jos havaitut dengue antigeenit eivät oleet läsnä näytteenoton hetkellä.
- Tavanomaista korkeamman tiitterin heterofiilisiä vasta-aineita tai reumatekijöitä sisältävät näytteet voivat vaikuttaa testin tuloksiin.
- Mikäli oireet jatkuvat negatiivisesta tuloksesta huolimatta, suositellaan ottamaan uusi näyte muutaman päivän kuluttua ja suoritaa testi vaihtoehtoisia menetelmiä, kuten PCR tai ELISA, käyttäen.
- NADAL® Dengue NS1 Ag-1 IgG/IgM testin tulokset tulisi lukea vain yhdessä muiden diagnostisten- ja kliinisten löydösten kanssa.
- Kuumeen alkuvaiheessa, anti-dengue IgM pitoisuus saattaa olla testin havaitsemistason alapuolella. Ensisijaisen havaitsemiseen, IgM vasta-aine linkittynyt entsyymi immunosorbenttimääritys (MAC-ELISA) osoitti 80% testatuista dengue potilaista olevan havaittavia tasoja IgM viidenteen päivään mennessä, ja 99% potilaista osoitti positiivisen IgM tuloksen kymmenentenä päivänä. Täten, potilaita suositellaan testattavaksi tämän ajan sisällä. Toissijaiseninfektion kohdalla, matala molaarinen fraktio anti-dengue IgM ja korkea molaarinen fraktio anti-dengue IgG ovat laajalti reaktiivisia flaviviruksille⁵. Testiviivan 'IgM' voimakkuus saattaa olla heikko, ja ristikkäisreaktio testiviivan 'IgG' alueella on mahdollinen.

- Serologinen ristikkäisreaktiivisuus *flavivirus* ryhmässä ((Dengue 1, 2, 3 & 4, St. Louis encephalitis, West Nile virus, Japanese encephalitis and yellow fever virukset) ovat yleisiä.^{6,7,8} Positiiviset tulokset tulee varmistaa käyttäen muita metodeja.
- Vasta-aineiden jatkuvaa läsnä-tai poissaoloa ei pystytä käyttämään hoidon tehokkuuden arviointiin.
- Immunosuppressiopotilaiden tuloksia tulee tulkita huolellisesti.

13. Odotetut arvot

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testiä verrattiin johtavaan kaupallisesti saatavaan Dengue Ag EIA testiin. Testien välinen korrelaatio oli 96%.

Ensisijaiselle dengueinfektioille on ominaista havaittavien IgM pitoisuksien nousu 3-5 päivää infektion alkamisen jälkeen. Toissijaiselle dengueinfektioille on ominaista denguelle spesifisen IgG:n pitoisuuden nousu. Valtaosassa tapauksista, myös IgM:n pitoisuus kohoaa.

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testiä on verrattu johtavaan kaupallisesti saatavaan Dengue ELISA testiin. Tulokset osoittivat herkkyyden olevan 83.3% IgM:lle ensisijaisteninfektioiden ja >99.9% IgG:lle toissijaisteninfektioiden tapauksissa.

14. Ominaisuudet

Herkkyyks ja tarkkuus

Oireellisista ja oireettomista potilaista otetuista näytteistä muodostettu serokonversio paneeli testattiin d Dengue NS1 Ag tulokset varmistettiin käyttämällä johtavaa kaupallisesti saatavaa Dengue Ag EIA testiä. Tulokset anti-Dengue IgG/IgM varmistettiin käyttämällä johtavaa kaupallisesti saatavaa Dengue ELISA testiä.

Tulokset anti-Dengue IgG/IgM osoittivat yleisen herkkyyden ensi- ja toissijaiselle infektiolle olevan NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testille olevan 95.7%, relatiivisen spesifisyyden ollessa >99.9% ja relatiivisen tarkkuuden ollessa 99.3%.

Ensisijaisen Dengueinfektion tulokset IgG/IgM

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testi (IgG/IgM)	Dengue ELISA				
	Tulokset		Positiivinen		Negatiivinen
	Positiivinen	IgM	IgG		
	IgM	15	0	0	
	IgG	3	0	0	
	Negatiivinen	0	0	0	

Relatiivinen herkkyys (IgM): 83.3%

Toissijaisen Dengueinfektion tulokset IgG/IgM

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testi (IgG/IgM)	Dengue ELISA				
	Tulokset		Positiivinen		Negatiivinen
	Positiivinen	IgM	IgG		
	IgM	37	0	0	
	IgG	15	52	0	
	Negatiivinen	0	0	0	

Relatiivinen herkkyys (IgM): 71.2%

Relatiivinen herkkyys (IgG): >99.9%

Ei-dengueinfektion IgG/IgM testin tulokset

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testi (IgG/IgM)	Dengue ELISA				
	Tulokset		Positiivinen		Negative
	IgM	IgG	IgM	IgG	
	IgM	0	0	0	
	IgG	0	0	0	
	Negatiivinen	0	0	338	

Relatiivinen herkkyys (negatiivinen): >99,9%

Relatiivinen herkkyys: $(15+52)/(18+52) = 95.7\%$ (95%CI*: 88%~99.1%)

Relatiivinen tarkkuus: $338/338 >99.9\%$ (95%CI*: 99.1%~100%)

Tarkkuus: $(15+52+338)/(18+52+338) = 99.3\%$ = (95%CI*: 97.9%~99.8%)

* Luottamusväli

Tulokset Dengue NS1 Ag osoittavat relatiivisen herkkyyden NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testille olevan 95.8%, sekä relatiivisen spesifisyyden olevan 96.1%.

Dengue NS1 Ag testin tulokset

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testi (NS1 antigeenit)	Dengue Ag ELISA		
	+	-	Yhteensä
	+	137	8
-	6	200	206
Yhteensä	143	208	351

Relatiivinen herkkyys: $137/143*100\% = 95.8\%$ (95%CI*: 91.1%~98.4%)

Relatiivinen tarkkuus: $200/208*100\% = 96.1\%$ (95%CI*: 92.6%~98.4%)

Tarkkuus: $(137+208)/(137+6+8+200)*100\% = 96\%$ (95%CI*: 93.4%~97.8%)

*Luottamusvälit

Tarkkuus

Erän-sisäinen

Erän-sisäinen tarkkuus määritettiin käyttäen 15 kopiota neljästä näytteestä: negatiivinen, matala-positiivinen, keski-positiivinen, sekä korkea-positiivinen. Näytteet tunnistettiin onnistuneesti >99% tapauksissa.

Erien välinen

Erien välinen tarkkuus määritettiin käyttäen 15 itsenäistä määrittystä samoilla neljällä näytteellä: negatiivinen, matala-positiivinen, keski-positiivinen, ja korkea-positiivinen. Kolme erillistä erää NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testiä testattiin käyttäen näitä näytteitä. Näytteet tunnistettiin onnistuneesti >99% tapauksissa.

Ristikkäisreaktiivisuus

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testiä on testattu HAMA, RF, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Syphiilis, HIV, HCV, *H. pylori*, MONO, CMV, Rubella ja TOXO positiivisella näytteellä. Tulokset eivät osoittaneet ristikkäisreaktiivisuutta.

Testin toimintaa häiritsevät aineet

Seuraavat mahdollisesti häiritsevät aineet lisättiin dengue negatiivisiin ja positiivisiin näytteisiin.

Parasetamoli: 20 mg/dL	Kofeiini: 20 mg/dL
Asetyyilisalisylihapo: 20 mg/dL	Gentisiinihappoliuos: 20 mg/dL
Askorbiinihapo: 2 g/dL	Albumiini: 2 g/dL
Kreatiini: 200 mg/dL	Hemoglobiin 1000 mg/dL
Bilirubiini: 1 g/dL	Oksaalihapto: 60 mg/dL

Yllämainittujen aineiden ei havaittu vaikuttavan testin tuloksiin ilmoitetuilla pitoisuuksilla.

15. Lähteet

1. Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.
2. Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
3. Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese J. Trop. Med. Hygiene 1994; 22: 9-12.
4. Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. Rev. Med. Micro. 1995; 6:39-48.
5. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
6. Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4): 725-8.
7. Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
8. Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus Microbiol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2016-09-06 BM

1. Avsedd användning

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test är en snabbkromatografisk immunanlys för både kvalitativ detektion och differentiering av dengue NS1-antigenet och anti-denguevirus-IgG och IgM i humant helblod, serum eller plasma. Testet är avsett att användas som hjälp vid diagnosen av dengue-infektioner och endast gjord för professionellt bruk.

2. Introduktion och klinisk betydelse

Dengue virus är ett flavivirus, överfört av tigermyggorna *Aedes aegypti* och *Aedes albopictus*. Den sprider sig i stor utsträckning över de tropiska och subtropiska områdena i världen¹ och orsakar upp till 100 miljoner infektioner årligen.² Klassisk Dengue-infektion kännetecknas av en plöslig feber, intensiv huvudvärk, myalgi, artralgi och utslag.

Primär dengueinfektion orsakar IgM att öka till en detekterbar nivå inom 3 till 5 dagar efter att febern startat. IgM stannar kvar i allmänhet i 30 till 90 dagar.³ De flesta denguepatienterna i endemiska regioner har sekundära infektioner,⁴ som resulterar i höga nivåer av specifikt IgG före eller samtidigt som IgM respons.⁵ Därför kan detektionen av specifikt anti-dengue IgM och IgG också bidra till att skilja mellan primära och sekundära infektioner.

NS1 är ett av 7 Dengue virus icke-strukturella proteiner som anses vara involverade i viral replikation. NS1 existerar som en monomer i sin omogna form, men bearbetas snabbt i endoplasmatiskt retikulum för att bilda en stabil dimer. En liten mängd NS1 förblir associerad med intracellulära organeller där det anses vara involverat i viral replikation. Resten av NS1 finns antingen associerad med plasmamembranet eller utsöndras som en löslig hexadimer. NS1 är väsentlig för viruslevnad men den exakta biologiska funktionen är okänd. Antikroppar som produceras som svar på NS1 vid viral infektion kan korsreagera med cellytantigener på epitelceller och blodplättar. Detta har konsekvenser i utvecklingen av dengue hemorragisk feber.

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test är ett snabbt test som använder en kombination av belagda dengueantikroppar bundna till färgade partiklar för detektering av dengue NS1-antigenen och dengueantigener bundna till färgade partiklar för detektering av anti-dengue IgG och anti-dengue IgM i humant helblod, serum eller plasma.

3. Testprincip

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test är en kvalitativ membranbaserad immunoanalys för detektering av anti-dengueantikroppar och dengue NS1-antigenen i humant helblod, serum eller plasma.

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test innehåller två testremor (vänster sida: Dengue NS1 Ag Test; höger sida: Dengue IgG/IgM Test).

Dengue IgG/IgM Test på höger sida består av två komponenter. I IgG-komponenten är anti-human-IgG förbelagda i testlinjeområdet "IgG". Under provningen reagerar provet med dengue-antigenbelagda partiklar i testkassetten. Blandningen migrerar därefter längs membranet kromatografiskt genom kapillärverkan och reagerar med anti-humana IgG-antikroppar i testlinjeområdet "IgG". Om provet

innehåller anti-dengue IgG, visas en färgad linje i testlinjeområdet "IgG".

I IgM-komponenten är de anti-humana IgM-antikropparna förbelagda i testlinjeområdet "IgM". Om anti-dengue IgM är närvarande i provet reagerar de med dengue-antigenbelagda partiklarna i testkassetten. Komplexet fångas sedan av anti-humana IgM-antikropparna som bildar en färgad linje i testlinjeområdet "IgM".

Om provet inte innehåller dengue-antikroppar, förekommer ingen färgad linje i någon av testlinjeområdena, vilket indikerar ett negativt resultat.

Dengue NS1 Ag Test på vänster sida:

Under provningen reagerar provexemplaret med dengue-antikropp-konjugat på membranet på den inre testremsen. Guld-antikroppskonjugaten binds till dengueantigener i provet, vilka i sin tur är bundna av anti-dengue NS1-antikroppar förbelagda på membranet. När blandningen rör sig längs membranet binder anti-dengue NS1-antikropparna till antikropp-antigenkomplexet, vilket orsakar en blek eller mörk rosa linje att bildas i testlinjeområdet "NS1" i membranet. Linjens färgintensitet kan variera beroende på mängden antigen som finns i provexemplaret. Utseendet på en rosa linje i testlinjeområdet "NS1" bör betraktas som ett positivt resultat.

Om provet inte innehåller dengueantigener förekommer ingen färgad linje i testlinjeområdet, vilket indikerar ett negativt resultat.

Förekomsten av båda färgade linjerna i kontroll linjeområdet (C) tjänar som en procedurstyrning, vilket indikerar att korrekt volym av provet har tillsatts och membranvättning har uppstått.

4. Reagenser och Material som kommer med

- 25 NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM testkassetter
- 25 engångspipetter (5 µl)
- 25 engångspipetter (25 µl)
- (De försedda 5 µl och 25 µl pipetter avger ca 5 µl respektive 25 µl i en droppe, även om mer blod sugts in i pipetten)
- 1 Buffert (3 ml)
- 1 bruksanvisning

5. Ytterligare material som behövs

- Provtagningsbehållare
- Centrifug (för serum/plasma)
- Tidtagarur
- Lansett (endast för fingerstick helblod)
- Kapillärrör (75 µl om det behövs)
- Mikropipette (om det behövs)

6. Förvaring & hållbarhet

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test kit bör förvaras vid 2-30°C och användas före utgångsdatumet som anges på förpackningen. Testkassetterna är stabila fram till utgångsdatumet som skrivs ut på foliepåse. Testkassetterna ska förbli i förseglade påsar tills de används. Frys inte ner testerna. Använd inte test utöver utgångsdatumet.

7. Varningar och försiktighetsåtgärder

- Endast för professionellt *in-vitro*-diagnostisk användning.
- Läs noga igenom testproceduren innan testet sätts igång.

- Använd inte testet efter passerat utgångsdatum som anges på förpackningen.
- Använd inte testet om förpackningen är skadad.
- Använd inte samma test flera gånger.
- Tillsätt inte prov i reaktionsfältet (resultatfältet).
- För att undvika kontamination bör inte reaktionsfältet (resultatfältet) vidröras.
- Undvik korskontaminering av prover genom att använda en ny provuppsamlingsbehållare för varje prov som erhållits.
- Ät, drick eller rök ej i området där provexemplar och testkit hanteras.
- Bär skyddsklädsel som exempelvis laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon när proverna analyseras.
- Hantera samtliga provexemplar som om de skulle innehålla smittosamma medel. Observera etablerade försiktighetsåtgärder för mikrobiologiska risker genom hela proceduren och standardriktlinjerna för en korrekt avfallshantering av provexemplaren.
- Testkitet innehåller produkter av animaliskt ursprung. Certifierad kunskap om djurs ursprung och/eller sanitära tillstånd garanterar inte fullständigt frånvaron av överförbara patogena ämnen. Det rekommenderas därför att dessa produkter behandlas som potentiellt infektiösa och hanteras i enlighet med vanliga säkerhetsåtgärder (t.ex. skall inte intas eller inandas).
- Fuktighet och temperatur kan ha stor påverkan på testresultaten.
- Använt testmaterial bör kasseras enligt lokala regleringar.

8. Provtagning och förberedelser

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test kan utföras med helblod, serum eller plasma.

Att samla fingerstick helblodsprover:

- Tvätta patientens hand med tvål och varmt vatten eller rengör det med en alkoholpinne. Låt det torka.
- Massera handen utan att röra vid punkteringsplatsen genom att gnugga ner handen mot fingertoppen på mitt- eller ringfingret.
- Punktera huden med en steril lansett. Torka bort den första droppen blod.
- Gnid försiktigt handen från handleden till handflatan till fingret för att bilda en rundad bloddropp över punkteringsplatsen.

Venipunktur helblodsprover

För serum- eller plasma-test, separera serum eller plasma från blod så snart som möjligt för att undvika hemolys. Använd endast klara, ej hemoliserade prover.

Provning bör utföras omedelbart efter provtagning. Lämnar inte prov i rumstemperatur under längre perioder. Serum- och plasmaprover kan förvaras vid 2-8°C i upp till 3 dagar. För långvarig lagring bör proverna hållas under -20°C. Helblod som uppsamlas genom venipunktur ska förvaras vid 2-8°C om testet görs inom 2 dagar efter insamling. Frys inte ner helblodsproverna. Helblodsprover med fingerstick bör testas omedelbart. Ta prov till rumstemperatur före provning. Frysta prov bör tinas helt och blandas väl före provningen. Proverna ska inte frysas och tinas upprepade gånger. Om prover ska

skickas ska de packas i enlighet med federala bestämmelser för transport av etiologiska medel.

9. Testprocedur

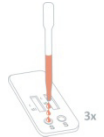
Ta testet, provexemplar, buffert och / eller kontroll-exemplar till rumstemperatur (15-30°C) före provningen.

1. Ta bort testkassetten från den försedda foliepåsen och placera den på en ren och jämn yta. Testkassetten ska användas omedelbart efter öppnandet av foliepåsen. Märk testkassetten med patienten eller kontrollidentifikationen.

2. a) För serum- eller plasmaprover:

För Dengue NS1 Ag:

Håll den försedda 25 µl-droppen vertikalt, tillsätt 3 droppar (cirka 75 µl) serum eller plasma till provbrunnen (S) i testkassetten.



och

För anti-Dengue IgG/IgM:

I. För att använda pipette:

Håll den försedda 5 µl pipetten vertikalt, dra serum- eller plasmaprovet upp till den första utvidgningen (ca 5 µl) och sätt den till provkassetten provbrunn (S). Därefter tillsättes 1 droppe (ca 40 µl) buffert till provbrunnen (S). **Undvik att fånga luftbubblor i provbrunnen.**



eller

II. För användningen av mikropipette:

Använd en mikropipett, fördela 5 µl serum eller plasma till provkassetten provbrunn (S). Tillsätt sedan 1 droppe (ca 40 µl) buffert till provbrunnen (S).

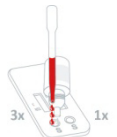


b) För fingerstick/venipunktur helblodprov:

För Dengue NS1 Ag:

I. För användningen av pipett:

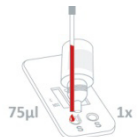
Håll den försedda 25 µl-droppen vertikalt, tillsätt 3 droppar (ca 75 µl) helblod till provbrunnen (S) i testkassetten. Tillsätt sedan 1 droppe (ca 40 µl) buffert till provbrunnen (S).



eller

II. För användningen av ett kapillärrör:

Fyll kapillärröret och överför ca 75 µl fingerstick helblodprov i provbrunnen (S). Tillsätt sedan 1 droppe (ca 40 µl) buffert till provbrunnen (S).



eller

III. För användningen av hängande droppar:

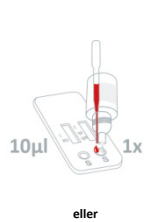
Låt 3 hängande droppar (ungefär 75 µl) av fingerstickblod falla in i provkassetten provbrunn (S). Tillsätt sedan 1 droppe (ca 40 µl) buffert till provbrunnen (S).



och

För anti-Dengue IgG/IgM:**I. För användningen av pipett:**

Håll den försedda 5 µl pipetten vertikalt, dra helblodprovet 1 cm över den första utvidgningen (ca 10 µl) och sätt den till provkassetts provbrunn (S). Tillsätt sedan 1 droppe (ca 40 µl) buffert till provbrunnen (S).



eller

**II. För användningen av mikropipette:**

Användningen av en mikropipett, fördela 10 µl helblod i provkassetts provbrunn (S). Tillsätt sedan 1 droppe (ca 40 µl) buffert till provbrunnen (S).

3. Starta timern.

4. Läs resultatet efter 10 minuter.
Tolka inte resultatet efter mer än 20 minuter.

10. Tolkning av resultat**Positiv för Dengue NS1 Ag:**

En färgad linje utvecklas i varje kontroll linjeområde 'C' och en färgad linje utvecklas i testlinjeområdet 'NS1'. Resultatet kan indikera en aktuell infektion.

**Positiv för anti-Dengue IgG:**

En färgad linje utvecklas i varje kontroll linjeområde 'C' och en färgad linje utvecklas i testlinjeområdet 'IgG'. Resultatet kan vara en indikation på sekundär denguevirusinfektion.

**Positiv för anti-Dengue IgM:**

En färgad linje utvecklas i varje kontroll linjeområde 'C' och en färgad linje utvecklas i testlinjeområdet 'IgM'. Resultatet kan vara en indikation på primär denguevirusinfektion.

**Positiv för anti-Dengue IgG/IgM:**

En färgad linje utvecklas i varje kontroll linjeområde 'C' och en färgad linje utvecklas i respektive testlinjeområde 'IgG' och 'IgM'. Resultatet kan vara en indikation på sekundär denguevirusinfektion. Linjernas färgintensiteter behöver inte överensstämma med varandra.



Obs! En kombination av positiva resultat för olika parametrar är möjlig.

Negativ:

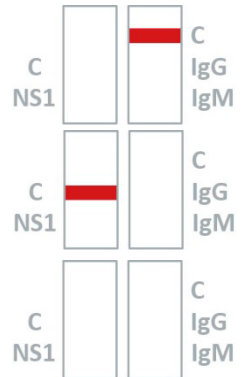
En färgad linje visas i varje kontroll linjeområde 'C'. Inga färgade linjer förekommer i testlinjeområdena "NS1", "IgG" och "IgM".

**Ogiltig:**

Åtminstone en kontroll linje 'C' misslyckas att visas. Resultat från ett test som inte har producerat alla kontroll linjer vid den angivna läsningstiden måste kasseras.

Otillräcklig provvolym, felaktigt driftsförfarande eller utlösta test är de mest troliga orsakerna till fel på kontroll linjen. Läs igenom proceduren och upprepa testet med en ny testkasset. Om problemet kvarstår, sluta använda testpaketet omedelbart och kontakta din distributör.

Obs! Färgintensiteten i testområdets linje region 'NS1' och/eller 'IgG' och/eller 'IgM' kan variera beroende på koncentrationen av Dengue NS1 Antigen och/eller IgG och/eller IgM närvarande i provet. Därför bör hurdan som helst färgskugga i testområdets linje anses vara positiv.

**11. Kvalitetskontroll**

En intern procedurkontroll ingår i testkassetten:

En färgad linje som visas i varje kontroll linjeområde (C) betraktas som en intern procedurkontroll. Den bekräftar tillräcklig volym av prov, adekvat fuktning av membranet och korrekt procedurkontroll.

God laboratoriepraxis (GLP) rekommenderar användning av kontrollmaterial för att säkerställa korrekt genomförande.

12. Begränsningar

- NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test detekterar endast närvaron av dengue NS1-antigen och anti-dengue-antikroppar i provet och bör inte användas som enda kriterium för diagnos av dengue.
- Avsnittet "Testprocedur" och "Resultattolkning" bör följas noggrant när man testar förekomsten av dengueantigen och anti-dengue-antikropp i helblod, serum eller plasma från enskilda personer. Misslyckande att följa proceduren kan ge felaktiga resultat.
- Ett negativt testresultat för dengue NS1 antigen utesluter inte risken för exponering för eller infektion med Denguevirus.
- Ett negativt testresultat för dengue NS1-antigen kan inträffa om mängden av dengueantigen som finns i provet ligger under detektionsgränsen för testet eller om de detekterade dengueantigenerna inte var närvarande under det sjukdomsstadiet då provet samlades in.
- Prov som innehåller ovanligt höga titrar av heterofila antikroppar eller reumatoid faktor kan påverka förväntade resultat.
- Om symtomen kvarstår, medan resultatet som erhållits med NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test är negativt eller icke-reaktivt, rekommenderas det att prova patienten några dagar senare eller prova med en alternativ testmetod, t.ex. PCR eller ELISA.

- Resultaten som erhållits med NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test bör endast tolkas i samband med andra diagnostiska förfaranden och kliniska fynd.
- Efter den tidiga början av feber kan anti-dengue IgM-koncentrationer ligga under detekterbara nivåer. För primär infektion visade en IgM-antikropp-fångad enzymsbunden immunsorbentanalys (MAC-ELISA) att 80% av de testade dengue-patienterna uppvisade detekterbara nivåer av IgM vid den femte dagen efter infektion och 99% av patienterna testade IgM-positiva under dag 10. Därför rekommenderas att patienter testas inom denna tidsperiod. När det gäller den sekundära infektionen karakteriserar en låg molarfraktion av anti-dengue IgM och en hög molarfraktion av anti-dengue-IgG som är väsentligen reaktiv mot flavivirus, antikropparna.⁵ Testlinjen "IgM" kan vara svag och en korsreaktion i testlinjeområdet "IgG" kan förekomma.
- Serologisk korsreaktivitet över flavivirusgruppen (Dengue 1, 2, 3 & 4, St. Louis encefalit, West Nile virus, japansk encefalit och gula febervirus) är vanligt.^{6,7,8} Positiva resultat bör bekräftas med andra metoder.
- Den fortsatta närvaron eller frånvaron av antikroppar kan inte användas för att bestämma framgången eller misslyckandet av behandlingen.
- Resultaten från immunsupprimerade patienter bör tolkas med försiktighet.

13. Förväntade värden

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test har jämförts med en ledande kommersiellt tillgänglig Dengue Ag EIA. Korrelationen mellan de två systemen är 96%.

Primär dengueinfektion kännetecknas av närvaron av detekterbar IgM 3-5 dagar efter infektionens början. Sekundär dengueinfektion kännetecknas av höjningen av dengue-specifika IgG. I de flesta fall åtföljs detta av förhöjda nivåer av IgM.

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test har jämförts med en ledande kommersiellt tillgänglig Dengue ELISA som demonstrerar känslighet av 83,3% för IgM vid primär infektion och > 99,9% för IgG vid sekundär infektion.

14. Prestandaegenskaper

Känslighet och Specificitet

En serokonversionspanel innefattande kliniska prov erhållna från en population av symptomatiske och asymptomatiske individer testades för dengue NS1-antigener och anti-Dengue IgG/IgM, med användning av NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test. Resultaten för Dengue NS1 Ag bekräftades av en ledande kommersiellt tillgänglig Dengue Ag EIA, medan resultaten för anti-Dengue IgG/IgM bekräftades av en ledande kommersiellt tillgänglig Dengue ELISA.

Resultaten för anti-Dengue IgG/IgM visar att den totala relativa känsligheten för primär och sekundär infektion i NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test är 95,7%, den relativa specificiteten är > 99,9% och den relativa noggrannheten är 99,3%.

Dengue primär infektion för IgG/IgM testresultat

		Dengue ELISA			
		Positiv		Negativ	
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Resultat		IgM		IgG
	Positiv	IgM	15	0	0
		IgG	3	0	0
Negativ		0	0	0	

Relativ sensitivitet: (IgM): 83,3%

Dengue sekundär infektion för IgG/IgM testresultat

		Dengue ELISA			
		Positiv		Negativ	
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Resultat		IgM		IgG
	Positiv	IgM	37	0	0
		IgG	15	52	0
Negativ		0	0	0	

Relativ sensitivitet: (IgM): 71,2%

Relativ sensitivitet: (IgG): >99,9%

Icke-dengue infektion IgG/IgM test resultat

		Dengue ELISA			
		Positiv		Negativ	
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG/IgM)	Resultat		IgM		IgG
	Positiv	IgM	0	0	0
		IgG	0	0	0
Negativ		0	0	338	

Relativ sensitivitet (negativ): >99,9%

Relativ sensitivitet: $(15+52)/(18+52) = 95.7\%$ (95%CI*: 88%~99,1%)

Relativ specificitet: $338/338 >99.9\%$ (95%CI*: 99,1%~100%)

Noggrannhet $(15+52+338)/(18+52+338) = 99.3\%$ = (95%CI*: 97,9%~99,8%)

*Konfidensintervaller

Resultaten för Dengue NS1 Ag visar att den relativa känsligheten hos NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG / IgM Test är 95,8% och den relativa specificiteten är 96,1%.

Dengue NS1 Ag testresultat:

		Dengue Ag ELISA		
		+	-	Totalt
NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (NS1 antigen)	+	137	8	145
	-	6	200	206
	Totalt	143	208	351

Relativ sensitivitet: $137/143*100\% = 95.8\%$ (95%CI*: 91.1%~98,4%)

Relativ specificitet: $200/208*100\% = 96.1\%$ (95%CI*: 92.6%~98,4%)

Noggrannhet (137+208)/(137+6+8+200)*100% = 96% (95%CI*: 93.4%~97.8%)

*Konfidensintervaller

Precision

Intra-Analys

Inomgående precision har bestämts genom att använda 15 replikat av fyra prover: En negativ, en svagt positiv, en medel positiv och en starkt positiv. Proverna identifierades korrekt > 99% av tiden.

Inter-Analys

Mellankörningsprecisionen har bestämts av 15 oberoende analyser på samma fyra exemplar: En negativ, en svagt positiv, en medel positiv och en starkt positiv. Tre olika delar av NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test testades med användning av dessa prov. Proverna identifierades korrekt > 99% av tiden.

Korsreaktion

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test har testats med HAMA, RF, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Syphilis, HIV, HCV, H. pylori, MONO, CMV, Rubella och TOXO-positiva prover. Resultaten visade ingen korsreaktivitet.

Interfererande ämnen

Följande potentiellt interfererande ämnen tillsattes till dengue-negativa och positiva prover.

Acetaminofen: 20 mg/dl	Koffein: 20 mg/dL
Acetylsalicylsyra: 20 mg/dL	Genetisinsyra: 20 mg/dL
Askorbinsyra: 2 g/dL	Albumin: 2 g/dL
Kreatin: 200 mg/dL	Hemoglobin 1000 mg/dl
Bilirubin: 1 g/dL	Oxalsyra: 60 mg/dL











Inget av ämnena vid den testade koncentrationen störde i analysen.

15. Referenser

1. Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.
2. Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
3. Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese J. Trop. Med. Hygiene 1994; 22: 9-12.
4. Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. Rev. Med. Micro. 1995; 6:39-48.
5. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
6. Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4): 725-8.
7. Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
8. Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus. Microbiol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2016-09-06 MM

Symbol	Deutsch	English	Français	Español	Italiano	Polski
	CE Konformitätszeichen	CE marking of conformity	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea	Znak zgodności CE
	Gebrauchsanweisung beachten	Consult instructions for use	Consulter la notice d'utilisation	Consúltense las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso	Przestrzegać instrukcji obsługi
	<i>in-vitro</i> -Diagnostika	<i>in-vitro</i> diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic <i>in-vitro</i>	Producto sanitario para diagnóstico <i>in-vitro</i>	Dispositivo medico-diagnostico <i>in-vitro</i>	Tylko do diagnostyki <i>in-vitro</i>
	Temperaturbegrenzung	Temperature limitation	Limites de température	Límite de temperatura	Limiti di temperatura	Temperatura przechowywania
	Chargenbezeichnung	Batch code	Numéro de lot	Código de lote	Codice lotto	Numer serii
	Nicht zur Wiederverwendung	Do not reuse	Ne pas réutiliser	No reutilizar	Non riutilizzare	Tylko do jednorazowego użytku
	Verwendbar bis	Use by	Utiliser jusqu'au	Fecha de caducidad	Utilizzare entro	Data ważności
	Bestellnummer	Catalogue Number	Référence du catalogue	Número de catálogo	Riferimento di Catalogo	Numer katalogowy
	Hersteller	Manufacturer	Fabricant	Fabricante	Fabbricante	Producent
	Ausreichend für <n> Ansätze	Sufficient for <n> tests	Suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> utilizations	Sufficiente per "n" saggi	Wystarczający na <n> Powtórzeń

Symbol	Português	Český	Suomi	Svenskt	Nederlands	Dansk	Norsk
	Conformidade com as normas europeias	CE certifikát	CE-merkitty	CE-märkning	CE-markering	CE-mærkning	CE standardisert
	Consultar as instruções de utilização	Viz návod k použití	Katso käyttöohjetta	Läs bruksanvisningen	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Se brugsanvisningen	Les bruksanvisning nøye
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in-vitro</i>	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in-vitro</i>	<i>in-vitro</i> - diagnostiikkaan tarkoitettu lääkinnällinen laite	Medicinteknisk produkt avsedd för <i>in-vitro</i> -diagnostik	Medisch hulpmiddel voor <i>in-vitro</i> diagnostiek	Medicinsk udstyr til <i>in-vitro</i> -diagnostik	<i>in-vitro</i> diagnostic medisinsk enhet
	Limites de temperatura	Teplotní omezení	Lämpötilarajat	Temperaturbegränsning	Temperatuurlimiet	Temperaturbegrænsning	Temperaturbegrensning
	Código do lote	Kód šarže	Eräkoodi	Satsnummer	Code van de partij	Batchkode	Merking
	Não reutilizar	Pro jednorázové použití	Kertäkäyttöinen	Får inte återanvändas	Niet opnieuw gebruiken	Må ikke genbruges	Må ikke brukes om igjen
	Prazo de validade	Spotřebuje do	Käytettävä viimeistään	Används före	Houdbaar tot	Udløbsdato	Tidtaking
	Número de catálogo	Katalogov číslo	Luettelonumero	Listnummer	Catalogus nummer	Best il l ingsnummer	Katalog nummer
	Fabricante	Výrobce	Valmistaja	Tillverkare	Fabrikant	Fabrikant	Produsent
	Suficiente para <n> test	Dostačuje pro <n> testů	Lukumäärä <n> test	Räcker till <n> test	Voldoende voor <n> test	Tilstrækkeligt til <n> test	Tilstrækkelig for <n> tester

Our Teams

Germany:

Regensburg

Tel: +49 941 290 10-0
Fax: +49 941 290 10-50

Moers

Tel: +49 2841 99820-0
Fax: +49 2841 99820-1

Austria:

Tel: +49 941 290 10-29
Free Tel: 0800 291 565
Fax: +49 290 10-50
Free Fax: 0800 298 197

UK & Ireland:

Tel: +49 941 290 10-18
Free Tel – UK: 0808 234 1237
Free Tel – IRE: 1800 555 080
Fax: +49 290 10-50

France:

France Tel: 0800 915 240
France Fax: 0800 909 493

Switzerland

Swiss Tel: 0800 564 720
Swiss Fax: 0800 837 476

Belgium

Belgium Tel: 0800 718 82
Belgium Fax: 0800 747 07

Luxembourg

Lux. Tel: 800 211 16
Lux. Fax: 800 261 79

Spain:

Tel: +49 941 290 10-759
Free Tel: 900 938 315
Fax: +49 941 290 10-50
Free Fax: 900 984 992

Italy:

Tel: +49 941 290 10-34
Fax: +49 941 290 10-50

Poland:

Tel: +49 941 290 10-44
Free Tel: 00 800 491 15 95
Fax: +49 941 290 10-50
Free Fax: 00 800 491 15 94

Portugal:

Tel: +49 941 290 10-735
Tel. Verde: 800 849 230
Fax: +49 941 290 10-50
Fax Verde: 800 849 229

Netherlands:

Tel: +31 30 75 600
Free Tel: 0800 0222 890
Fax: +31 70 30 30 775
Free Fax: 0800 024 9519

Nordic countries (Finland, Norway, Sweden, Denmark):

Tel: +31 703075 607
Free Tel: +45 80 88 87 53
Tax: +31 703030 775

Laboratory Diagnostics Team:

Tel: +49 941 290 10-40
Fax: +49 941 290 10-50



nal von minden GmbH

Carl-Zeiss-Strasse 12 • 47445 Moers • Germany

www.nal-vonminden.com • info@nal-vonminden.com

Fon: +49 2841 99820-0 • Fax: +49 2841 99820-1