

BIO-RAD

PLATELIA™ DENGUE NS1 AG

96 TESTS

72830

**QUALITATIVE OR SEMI-QUANTITATIVE DETECTION
OF DENGUE VIRUS NS1 ANTIGEN IN HUMAN SERUM
OR PLASMA BY ENZYME IMMUNOASSAY**

IVD

1- CLINICAL VALUE

Dengue is an endemic disease affecting tropical and subtropical regions around the world. It is considered as the most important arboviral disease in terms of morbidity, mortality and socio-economical costs. Global prevalence of dengue has increased dramatically in recent decades and the disease is now endemic in more than 100 countries, and potentially concern 40% of earth population. The World Health Organization estimates that there are about 50 to 100 million cases of dengue infections worldwide every year, which results in 250,000 to 500,000 severe complicated forms of the disease and 24,000 deaths each year.

Dengue virus is transmitted by mosquito, mainly *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. There are four distinct serotypes (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4). Primary infection induces a life-long protective immunity to the homologous serotype, but confers only partial and transient protection against the other three serotypes in case of re-infection (secondary infection).

Infection with dengue virus causes a broad spectrum of illnesses, ranging from asymptomatic infection, undifferentiated fever and classical dengue fever (DF), to the more severe forms, dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS) with high rates of morbidity and mortality. DF is characterised by fever lasting 3-5 days, headache, muscle and joint pain, rash, but usually patient recovery. DHF or DSS, which mainly occur in patient previously infected with the virus, present similar symptoms to DF, but are followed by increased vascular permeability and hemorrhagic signs leading to reduce blood pressure, hypovolemia, vascular collapse and death.

The most challenging problem associated with infected patient management is rapid and specific detection of dengue virus during acute phase in order to implement timely clinical treatment. Isolation and identification of the virus or detection of viral nucleic acid allow early diagnostic during febrile phase, but both methods need a specialized laboratory and results are not immediate. Detection of dengue virus-specific antibodies are commonly used for routine diagnostic. However, antibodies appear after symptoms onset. In primary infection, IgM and IgG arise approximately 5 and 14 days respectively after symptom onset.

In secondary infection, IgM levels are low or undetectable while IgG rise 1-2 days after symptom onset with higher levels than in primary infection. More recently, detection in patients sera of circulating dengue virus nonstructural protein NS1 has been described as an alternative method for early diagnosis. NS1 antigen was found circulating from the first day and up to 9 days after the onset of fever, with comparable levels observed in primary and secondary infections.

2- PRINCIPLE

Platelia™ Dengue NS1 Ag is a one step sandwich format microplate enzyme immunoassay for the qualitative or semi-quantitative detection of Dengue virus NS1 antigen in human serum or plasma. The test uses murine monoclonal antibodies (MAb) for capture and revelation.

Samples and controls are directly and simultaneously incubated with the conjugate for 90 minutes at 37°C within the microplate wells sensitised with MAb. If NS1 antigen is present in the sample, an immune-complex MAb - NS1 - MAb/peroxydase will be formed. After a washing step, the presence of immune-complex is demonstrated by distribution in each well of a chromogenic solution initiating a color development reaction. After 30 minutes of incubation at room temperature, the enzymatic reaction is stopped by addition of an acid solution. The optical density reading obtained with a spectrophotometer set at 450/620 nm is proportional to the amount of NS1 antigen present in the sample. The presence of NS1 antigen in an individual sample is determined by comparing the optical density reading of the sample to the optical density of the calibrator.

3- PRODUCT INFORMATION

	Label	Nature of reagents	Presentation
R1	Microplate	Microplate (Ready-to-use): 12 strips with 8 wells each, coated with anti-NS1 MAb, in vacuum sealed bag	1
R2	Concentrated Washing Solution (20x)	Concentrated Washing Solution (20x): TRIS-NaCl buffer (pH 7.4), 2% Tween® 20 Preservative : < 1.5% ProClin™ 300	1 x 70 mL
R3	Negative Control	Negative Control: Human serum negative for Dengue NS1 antigen. Preservative: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 1.0 mL
R4	Calibrator	Calibrator: TRIS-NaCl buffer (pH 8.0), Dengue NS1 antigen, bovine serum albumin, glycérol, E102, E122. Preservative: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 1.5 mL
R5	Positive Control	Positive Control: TRIS-NaCl buffer (pH 8.0), Dengue NS1 antigen, bovine serum albumin, glycérol, E102, E122. Preservative: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 1.0 mL
R6	Conjugate (50x)	Conjugate (50x): Anti-NS1 MAb coupled with horseradish peroxidase. Preservative: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 0.5 mL
R7	Diluent	Diluent (Ready-to-use): Phosphate buffer, Tween® 20, fetal calf serum. Preservative: < 1.5% ProClin™ 300	1 x 22 mL
R9	Chromogen TMB	Chromogen (Ready-to-use): 3.3'.5.5' tetramethylbenzidine (< 0.1%), H2O2 (<1%)	1 x 28 mL
R10	Stopping Solution	Stopping Solution (Ready-to-use): 1N sulfuric acid solution	1 x 28 mL
		Adhesive films	4

For storage conditions and expiration date, refer to the indications mentioned on the box.

4- WARNINGS AND PRECAUTIONS

The reliability of the results depends on correct implementation of the following Good Laboratory Practices:

- Do not use expired reagents.
- Do not mix reagents from different lots within a given test run.

REMARK: *For Washing Solution (R2, label identification: 20x colored green), Chromogen (R9, label identification: TMB colored turquoise) and Stopping Solution (R10, label identification: 1N colored red), it is possible to use other lots than those contained in the kit, provided these reagents are strictly equivalent and the same lot is used within a given test run.*

REMARK: *It is not permissible to use Diluent (R7) from lots other than provided in the kit.*

REMARK: *In addition, the Washing Solution (R2, label identification: 20x colored green) can be mixed with the 2 other washing solutions included in various Bio-Rad reagent kits (R2, label identifications: 10x colored blue or 10x colored orange) when properly reconstituted, provided only one mixture is used within a given test run.*

- Before use, allow reagents to reach room temperature (+18-30°C).
- Carefully reconstitute or dilute the reagents avoiding any contamination.
- Do not carry out the test in the presence of reactive vapors (acid, alkaline, aldehyde vapors) or dust that could alter the enzyme activity of the conjugate.
- Use glassware thoroughly washed and rinsed with deionized water or preferably, disposable material.
- Do not allow the microplate to dry between the end of the washings operation and the reagent distribution.
- The enzyme reaction is very sensitive to metal ions. Consequently, do not allow any metal element to come into contact with the various conjugate or substrate solutions.
- Chromogen Solution (R9) should be colorless. The appearance of a blue color indicates that the reagent cannot be used and must be replaced.
- Use a new pipette tip for each sample.
- Washing the microplate is a critical step in the procedure: follow the recommended number of washings cycles and make sure that all wells are completely filled and then completely emptied. Incorrect washings may lead to inaccurate results.
- Never use the same container to distribute conjugate and development solution.

- Check the pipettes and other equipment for accuracy and correct operations.
- Do not change the assay procedure.

HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

- Human origin material used in the preparation of the reagents has been tested and found non-reactive for hepatitis B surface antigen (HBs Ag), antibodies for hepatitis C virus (anti-HCV) and to human immunodeficiency virus (anti-HIV1 and anti-HIV2). Because no method can absolutely guarantee the absence of infectious agents, handle reagents of human origin and patient samples as potentially capable of transmitting infectious diseases.
- Any material, including washings solution, that comes directly in contact with samples and reagents containing materials of human origin, should be considered capable of transmitting infectious diseases.
- Wear disposable gloves when handling reagents.
- Do not pipette by mouth.
- Avoid spilling samples or solutions containing samples. Spills must be rinsed with bleach diluted to 10%. In the event of a spill with an acid, it must be first neutralized with sodium bicarbonate, then cleaned with bleach diluted at 10% and dried with absorbent paper. The material used for cleaning must be discarded in a contaminated residue container.
- Samples of human origin, as well as contaminated material and products should be discarded after decontamination, either by immersion in bleach at the final concentration of 5% of sodium hypochloride for 30 minutes, or by autoclaving at 121°C for 2 hours minimum. Autoclaving for at least one hour at 121°C is the best method to inactivate the HIV viruses and the HB viruses.

CAUTION: Do not introduce solutions containing sodium hypochloride into the autoclave

- Avoid any contact of the substrate buffer, chromogen and stopping solution with skin and mucosa (risk of toxicity, irritation or burn).
- Chemicals should be handled and disposed of in accordance with Good Laboratory Practices.



Xi - Irritant

Caution: Some of the reagents contain ProClin™ 300 < 1.5%

R43: May cause sensitisation by skin contact

S28-37: After contact with skin, wash immediately with plenty of water and soap. Wear suitable gloves.

5- SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

1. Serum and plasma (EDTA, citrate, heparin) are the recommended sample types.
2. Observe the following recommendations for handling, processing and storing blood samples:
 - Collect all blood samples observing routine precaution for venipuncture.
 - For serum, allow samples to clot completely before centrifugation.
 - Keep tubes stoppered at all times.
 - After centrifugation, separate the serum or plasma from the clot or red cells in a tightly stoppered storage tube.
 - The specimen can be stored at +2-8°C if test is performed within 24 hours.
 - If the test will not be completed within 24 hours, or for shipment of samples, freeze at -20°C or colder.
 - Do not use samples that have been thawed more than three times. Previously frozen specimens should be thoroughly mixed after thawing prior to testing.
3. Samples containing 100 mg/L bilirubin and lipemic samples containing the equivalent of 36 g/L triolein (triglyceride) do not affect the results. Presence of albumin at 90g/L or hemolysed samples containing 10mg/mL of hemoglobin can potentially increase ratio of negative samples.
4. Do not heat the samples.

6- ASSAY PROCEDURE

6.1. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Vortex mixer.
- Microplate reader equipped with 450 nm and 620 nm filters (*).
- Water bath or equivalent microplate incubator thermostatically set at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ (*).
- Manual, semi-automatic or automatic microplate washer (*).
- Container for biohazard waste.
- Sodium hypochloride (bleach) and sodium bicarbonate.
- Sterile distilled or deionized water.
- Graduated cylinders of 25 mL, 50 mL, 100 mL and 1000 mL capacity.
- Disposable latex gloves.
- Goggles or safety glasses.
- Absorbent paper.
- Automatic or semi-automatic, adjustable or preset, pipettes or multi-pipettes to measure 50 μL , 100 μL , 300 μL and 1000 μL .

- Disposable tubes.

(*) Consult our technical department for detailed information about the recommended equipment.

6.2. REAGENTS RECONSTITUTION

- **R1:** Bring at room temperature (+18-30°C) before opening the bag. Return unused strips in the bag immediately and check the presence of desiccant. Carefully re-seal the bag and store it at +2-8°C.
- **R2:** Dilute 1/20 the Washing Solution R2 in distilled water: for example 50 mL of R2 and 950 mL of distilled water to get the ready-to-use Washing Solution. Prepare 350 mL of diluted Washing Solution for one plate of 12 strips if washing manually.
- **R6+R7:** Conjugate (R6) is concentrated 50x and must be homogenise before use. Dilute 1/50 with Diluent (R7). For one strip, dilute 20 µL of R6 qsp. 1.0 mL of R7. Multiply these volumes by 12 for one microplate.

6.3. STORAGE OF OPENED AND/OR RECONSTITUTED REAGENTS

The kit must be stored at +2-8°C. When the kit is stored at +2-8°C before opening, each component can be used until the expiration date indicated on the outer label of the kit.

- **R1:** Once opened, the strips remain stable for up to six weeks if stored at +2-8°C in the same carefully closed bag containing the desiccant.
- **R2:** Once diluted, the Washing Solution can be kept for 2 weeks at +2-30°C. Once opened, the concentrated Washing Solution stored at +2-30°C, in absence of contamination, is stable until the expiration date indicated on the label.
- **R6+R7:** Once diluted, the reconstituted solution is stable 8 hours at room temperature (+18-30°C).
- **R3, R4, R5, R6, R7, R10:** Once opened, reagents stored at +2-8°C, in absence of contamination, are stable until the expiration date indicated on the label.
- **R9:** Once opened and without any contamination, the reagent stored at +2-8°C is stable for up to 8 weeks.

6.4. PROCEDURE

Strictly follow the assay procedure.

Before use, allow reagents to reach room temperature (+18-30°C).

Use one negative control (R3), two calibrators (R4) and one positive control (R5) in each run to validate the assay results.

- Carefully establish the distribution and identification plan for calibrator, controls and patient samples (S1, S2...) as indicated below:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5										
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

- Take the carrier tray and the strips (R1) out of the protective pouch (Refer to section 6.2).
- Strictly following the indicated distribution sequence, distribute successively in the wells :
 - 50µL of diluent (R7)
 - 50µL of samples (calibrator, controls or patients)
 - 100µL of diluted conjugate (R6+R7)

N.B: Diluent, sample and conjugate distributions can be visually controlled at this step of the manipulation. When adding the neat sample to the diluent, the color turns from yellow to orange. After adding the conjugate, the color turns from orange to green. This control could be altered when using diluted samples.

- Cover the reaction microplate with an adhesive plate sealer, pressing firmly onto the plate to ensure a tight seal.
- Incubate the microplate in a thermostat controlled water bath or microplate incubator for 90 ± 5 minutes at $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Prepare the dilution of the washing solution (R2) (Refer to section 6.2).
- At the end of the incubation period, remove the adhesive plate sealer. Aspirate the contents of all wells into a container for biohazard waste (containing sodium hypochloride). Wash microplate 6 times with washing solution (R2). Invert microplate and gently tap on absorbent paper to remove remaining liquid.

Note: It is important to avoid reagent splashing during aspiration and washing steps.

- Quickly distribute into each well and away from light 200 µL of Chromogen solution (R9). Allow the reaction to develop in the dark for 30 ± 5 minutes at room temperature (+18-30°C). Do not use adhesive plate sealer during this incubation.

9. Stop the enzymatic reaction by adding 100 μL of Stopping Solution (R10) in each well. Use the same sequence and rate of distribution as for the development solution.
10. Carefully wipe the plate bottom. Read the optical density at 450/620 nm using a plate reader within 30 minutes after stopping the reaction (The strips must always be kept away from light before reading).
11. Check all results for agreement between the reading and the distribution and identification of plate and samples.

7- CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

7.1. CALCULATION OF THE CUT-OFF VALUE

The cut-off value CO corresponds to the mean value of the optical densities of the calibrator duplicates (R4).

7.2. CALCULATION OF THE SAMPLE RATIO

Sample result is expressed by Ratio using the following formula, where S is the optical density (OD) obtained on the sample:

- Sample Ratio = S/CO

7.3. QUALITY CONTROL

For validation of the assay, the following criteria must be met:

- Optical density values:
 - $CO > 0,200$
- Ratios:
 - R3 Ratio $< 0,40$ (R3 Ratio = OD_{R3} / CO)
 - R5 Ratio $> 1,50$ (R5 Ratio = OD_{R5} / CO)

If those specifications are not met, the test run should be repeated.

7.4. INTERPRETATION OF RESULTS

Refer to the table below for results interpretation.

Sample Ratio	Result	Interpretation and recommendations
Ratio < 0.50	Negative	The sample is considered non reactive for Dengue NS1 antigen.
$0.50 \leq$ Ratio < 1.00	Equivocal	The sample is considered equivocal for Dengue NS1 antigen.
Ratio ≥ 1.00	Positive	The sample is considered reactive for Dengue NS1 antigen.

Remark: ODs obtained on highly reactive samples could reach the maximum OD readable on the spectrophotometer.

7.5. TROUBLE SHOOTING GUIDE

Non validated or non repeatable reactions are often caused by :

- Inadequate microplate washings.
- Contamination of negative samples by serum or plasma with a high concentration.
- Contamination of the development solution by oxidizing agents (bleach, metal ions...)
- Contamination of the stopping solution.

8- PERFORMANCES

8.1. SENSITIVITY – SPECIFICITY

• Sensitivity

Sensitivity was evaluated on 177 retrospective sera from patients with current dengue infection confirmed by RT-PCR. On this panel, the Platelia™ Dengue NS1 Ag assay was positive in 91% of cases (95% confidence interval: 85,8%-94,8%). By comparison, the sensitivity obtained with a commercialized Dengue IgM EIA assay was 17,5%.

Sensitivity was significantly higher in IgG negative samples from primary infection (sensitivity of 98,5%, n= 66) than in IgG positive samples (sensitivity of 85,6%, n=90) (χ^2 test, p=0,004).

No significative difference was observed related to dengue serotypes as summarized in Table 1 below:

Table 1: Sensitivity of Platelia™ Dengue NS1 Ag related to virus serotype (n=177).

Serotype	Number of sera	Sensitivity of Platelia™ Dengue NS1 Ag (95% CI)
1	93	88.9% (85.8% - 94.8%)
2	31	87.1% (70.1% - 96.3%)
3	24	100.0% (85.6% - 100.0%)
4	29	93.3% (77.9% - 97.9%)

The sensitivity of Platelia™ Dengue NS1 Ag was studied on sera from patients for which the onset of fever was documented. Highest sensitivities are obtained as soon as the clinical signs appear and stay high during febrile episodes as shown in Table 2.

Table 2: Sensitivity of Platelia™ Dengue NS1 Ag related to clinical signs apparition (n=177).

Days after beginning of fever	Number of sera	Sensitivity of Platelia™ Dengue NS1 Ag	Sensitivity of Dengue IgM EIA
0	10	100.0%	0.0%
1	33	87.8%	5.1%
2	40	92.5%	6.1%
3	20	95.0%	15.0%
4	27	96.3%	48.1%
5	19	52.6%	94.1%
≥ 6	28	35.7%	100.0%

- **Specificity**

Specificity was evaluated on 618 specimens including samples from 563 blood donors and 55 hospitalized patients. No positive results were observed in the studied population, providing a specificity of 100.0% (95% confidence interval: 99.4% - 100.0%).

8.2. PRECISION

- **Intra-assay precision (repeatability)**

In order to evaluate intra-assay repeatability, one negative and three positive samples were tested 30 times during the same assay. The ratio (S/CO) was determined for each sample. Mean Ratio, Standard Deviation (SD), and Coefficient of Variation (%CV) for each of the four specimens are listed in Table 3 below.

Table 3: Intra-assay precision.

N=30	Negative Sample	Weak Positive Sample	Medium Positive Sample	High Positive Sample
	Sample Ratio (S/CO)			
Mean	0.10	1.32	3.79	6.24
SD	0.01	0.08	0.29	0.45
% CV	13.1	6.2	7.7	7.2

- **Inter-assay precision (reproducibility)**

In order to evaluate inter-assay reproducibility, each of four specimens (one negative and three positive samples) was tested in duplicate, two runs a day, over a twenty day period. The ratio (S/CO) was determined for each sample. Mean Ratio, Standard Deviation (SD), and Coefficient of Variation (%CV) for each of the four specimens are listed in Table 4 below.

Table 4: Inter-assay precision.

N=40	Negative Sample	Weak Positive Sample	Medium Positive Sample	High Positive Sample
	Sample Ratio (S/CO)			
Mean	0.10	1.17	3.85	6.20
SD	0.03	0.21	0.67	0.96
% CV	33.8	17.8	17.4	15.5

8.3. CROSS REACTIVITY

A panel of 38 sera with potential interfering substances like antinuclear antibodies (n=10), rheumatoid factor (n=9), heterophilic antibodies (n=9) as well as patients with myeloma (n=10) were tested with the Platelia™ Dengue NS1 Ag. Another panel of 162 sera from patients with confirmed diseases other than dengue (West Nile, Yellow fever, CMV, HSV, VZV, etc...) was tested. All 200 samples were found to be negative with the Platelia™ Dengue NS1 Ag assay.

9- LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Diagnosis of recent infection by Dengue virus can only be established on the basis of a combination of clinical and biological datas. The result obtained on a single sample does not constitute a sufficient proof for diagnostic of recent infection.

10-QUALITY CONTROL OF THE MANUFACTURER

All manufactured reagents are prepared according to our Quality System, starting from reception of raw material to the final commercialization of the product. Each lot is submitted to quality control assessments and is only released to the market, after conforming to pre-defined acceptance criteria. The records relating to production and control of each single lot are kept within Bio-Rad.

11-REFERENCES

1. ALCON, S., TALARMIN, A., DEBRUYNE, M., FALCONAR, A., DEUBEL, V., FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 non structural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.* 2002 Feb;40(2):376-81.
2. LINDEGREN, G., VENE, S., LUNDKVIST, A., FALK, K.I., Optimized diagnosis of acute dengue fever in swedish travelers by a combination of reverse transcription-PCR and immunoglobulin M detection. *J. Clin. Microbiol.* 2005 Jun;43(6):2850-5.
3. LOLEKHA, R., CHOKEPHAIBULKIT, K., YOKSAN, S., VANPRAPAR, N., PHONGSAMART, W., CHEARSKUL, S. Diagnosis of dengue infection using various diagnostic tests in the early stage of illness. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2004 Jun;35(2):391-5.
4. SHU, P., HUANG, J. Current advances in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004 Jul;11(4):642-50.
5. TELES, F., PRAZERES, D, LIMA-FILHO, J.L. Trends in dengue diagnosis. *Rev. Med. Virol.* 2005 Sep-Oct;15(5):287-302.

BIO-RAD

PLATELIA™ DENGUE NS1 AG

96 TESTS

72830

**DETECTION QUALITATIVE OU SEMI-QUANTITATIVE
DE L'ANTIGENE NS1 DU VIRUS DE LA DENGUE
DANS LE SERUM OU LE PLASMA HUMAIN PAR
METHODE IMMUNOENZYMATIQUE**

IVD

1- INTERET CLINIQUE

La dengue est une maladie endémique présente dans toutes les zones tropicales et subtropicales du monde. Elle est considérée comme la plus importante des arboviroses en termes de morbidité, mortalité et d'impact socio-économique. La prévalence globale de la dengue a dramatiquement augmenté ces dernières années et la maladie est désormais endémique dans plus de 100 pays, où elle concerne potentiellement 40% de la population mondiale. L'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'il y a chaque année entre 50 et 100 millions de cas d'infection par le virus de la dengue, entraînant entre 250.000 et 500.000 formes sévères et 24.000 décès.

Le virus de la dengue est transmis par des moustiques, appartenant principalement aux espèces *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Il existe quatre sérotypes distincts (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4). L'infection primaire par le virus de la dengue entraîne une immunité protectrice définitive vis-à-vis du sérotype homologue, mais ne confère qu'une protection partielle et passagère contre les trois autres sérotypes en cas de ré-infection (infection secondaire).

L'infection par le virus de la dengue peut revêtir différents tableaux cliniques, allant de l'infection asymptomatique, la fièvre indifférenciée ou la classique dengue fébrile, aux formes plus sévères que sont la dengue hémorragique et la dengue avec syndrome de choc, pour lesquelles on observe des taux élevés de morbidité et de mortalité. La dengue se caractérise par une fièvre durant 3 à 5 jours, des maux de têtes, des douleurs musculaires et articulaires, un rash cutané, mais avec en général une issue favorable pour le patient. La dengue hémorragique et la dengue avec syndrome de choc se rencontrent surtout chez des patients préalablement infectés par le virus. Les symptômes sont similaires à ceux de la dengue fébrile, mais s'accompagnent également d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et de signes hémorragiques aboutissant à une hypotension, une hypovolémie, un collapsus vasculaire et le décès du patient.

Le principal challenge associé à la prise en charge des patient infectés est la rapidité et la spécificité de la détection du virus de la dengue pendant la phase aiguë, de façon à mettre en œuvre un traitement efficace le plus rapidement possible. L'isolement et l'identification du virus ou la détection de l'acide nucléique viral permettent un diagnostic précoce pendant la phase fébrile, mais ces méthodes nécessitent un environnement de laboratoire spécialisé et les résultats ne sont pas obtenus immédiatement.

La détection des anticorps spécifiques dirigés contre le virus de la dengue sont des méthodes classiquement utilisées en routine. Cependant, ces anticorps n'apparaissent qu'après la survenue des premiers symptômes. Lors de l'infection primaire, les anticorps de type IgM et IgG s'élèvent respectivement environ 5 et 14 jours après l'apparition des premiers symptômes. Lors de l'infection secondaire, les taux d'IgM sont faibles voire indétectables, tandis que les IgG s'élèvent 1 à 2 jours après l'apparition des symptômes avec des taux très supérieurs à ceux observés au cours d'une infection primaire. Plus récemment, la détection de la protéine virale non structurale NS1 dans le sérum de patients a été décrite comme une méthode alternative pour le diagnostic précoce de l'infection. L'antigène NS1 est retrouvé dans la circulation dès le premier et jusqu'au neuvième jour qui suit l'apparition de la fièvre, et les taux observés sont comparables dans les formes primaires et secondaires d'infection.

2- PRINCIPE

Le test Platelia™ Dengue NS1 Ag est une méthode immunoenzymatique en une étape de type sandwich, en format microplaque, pour la détection qualitative ou semi-quantitative de l'antigène NS1 du virus de la dengue dans le sérum ou le plasma humain. Le test utilise des anticorps monoclonaux de souris (AcM) pour la capture et la révélation.

Les échantillons de patients et les étalons sont incubés directement et simultanément avec le conjugué pendant 90 minutes à 37°C dans les cupules de la microplaque sensibilisée par les AcM. En présence d'antigène NS1 dans l'échantillon, un complexe immunitaire AcM - NS1-AcM/peroxydase est formé. Après les lavages pratiqués en fin d'incubation, la présence du complexe immunitaire est révélée par l'addition dans chaque cupule d'une solution de révélation enzymatique induisant le développement d'une réaction colorée. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la réaction enzymatique est arrêtée par l'addition d'une solution d'acide. La densité optique obtenue à 450/620 nm est proportionnelle à la quantité d'antigène NS1 présente dans l'échantillon testé. La présence de l'antigène NS1 dans un échantillon individuel est déterminée par comparaison de la densité optique lue sur cet échantillon et celle obtenue sur le calibrateur.

3- COMPOSITION DE LA TROUSSE

Etiquetage		Nature des réactifs	Présentation
R1	Microplate	Microplaque (prêt à l'emploi): 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées par AcM anti-NS1, en sachets scellés sous-vide	1
R2	Concentrated Washing Solution (20x)	Solution de lavage (20x) : Tampon TRIS-NaCl (pH 7,4), 2% Tween® 20. Conservateur : < 1,5% ProClin™ 300	1 x 70 mL
R3	Negative Control	Contrôle négatif : Sérum humain négatif pour l'antigène Dengue NS1. Conservateur : < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R4	Calibrator	Calibrateur : Tampon TRIS-NaCl buffer (pH 8,0), antigène Dengue NS1, sérum albumine bovine, glycérol, E102, E122. Conservateur : < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,5 mL
R5	Positive Control	Contrôle Positif : Tampon TRIS-NaCl buffer (pH 8,0), antigène Dengue NS1, sérum albumine bovine, glycérol, E102, E122. Conservateur : < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R6	Conjugate (50x)	Conjugué (50x) : AcM anti-NS1 couplé à la peroxydase. Conservateur : < 1,5% ProClin™ 300	1 x 0,5 mL
R7	Diluent	Diluant (prêt à l'emploi) : Tampon phosphate, Tween® 20, sérum de veau foetal. Conservateur : < 1,5% ProClin™ 300	1 x 22 mL
R9	Chromogen TMB	Chromogène (prêt à l'emploi): 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine (< 0,1%), H ₂ O ₂ (<1%)	1 x 28 mL
R10	Stopping Solution	Solution d'arrêt (prêt à l'emploi): Acide sulfurique 1N	1 x 28 mL
		Films adhésifs.	4

Se reporter aux indications mentionnées sur le coffret pour les conditions de conservation et les dates d'expiration des réactifs.

4- PRECAUTIONS D'UTILISATION

La qualité des résultats dépend du respect des Bonnes Pratiques de Laboratoire suivantes :

- Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration.
- Ne pas mélanger, ni associer au cours d'une même série, des réactifs provenant de trousse portant des numéros de lots différents.

REMARQUE : *Il est possible d'utiliser d'autres lots de Solution de Lavage (R2 identifié 20x en vert), de Chromogène (R9 identifié TMB en turquoise) et de Solution d'Arrêt (R10 identifié 1N en rouge) que ceux fournis avec la trousse, sous réserve d'utiliser des réactifs strictement équivalents d'un seul et même lot au cours d'une même série..*

REMARQUE : *Il n'est pas possible d'utiliser de Diluant (R7) provenant d'autres lots que celui fourni avec le coffret.*

REMARQUE : *De plus, la Solution de Lavage (R2 identifié 20x en vert) peut être mélangée avec l'une des deux autres Solutions de Lavage incluses dans les différents kits réactifs Bio-Rad (R2 identifié 10x en bleu ou 10x en orange) et correctement reconstituées, à condition qu'un seul mélange soit utilisé au cours d'une même série.*

- Avant utilisation, laisser les réactifs atteindre la température ambiante (+18-30°C).
- Reconstituer ou diluer soigneusement les réactifs en évitant toute contamination.
- Ne pas réaliser le test en présence de vapeurs réactives (acides, alcalines, aldéhydes) ou de poussières qui pourraient altérer l'activité enzymatique du conjugué.
- Utiliser une verrerie parfaitement lavée et rincée à l'eau distillée ou de préférence du matériel à usage unique.
- Ne pas laisser la plaque sécher entre la fin des lavages et la distribution des réactifs.
- La réaction enzymatique est très sensible à tous métaux ou ions métalliques. Par conséquent, aucun élément métallique ne doit entrer en contact avec les différentes solutions contenant le conjugué ou la solution substrat.
- Le Chromogène (R9) doit être incolore. L'apparition d'une coloration bleue indique que le réactif est inutilisable et doit être remplacé.
- Utiliser un cône de distribution neuf pour chaque sérum.

- Le lavage des cupules est une étape essentielle de la manipulation: respecter le nombre de cycles de lavages prescrits, et s'assurer que toutes les cupules soient complètement remplies puis vidées. Un mauvais lavage peut entraîner des résultats incorrects.
- Ne jamais utiliser le même récipient pour distribuer le conjugué et la solution de révélation.
- Vérifier l'exactitude des pipettes et le bon fonctionnement des appareils utilisés.
- Ne pas modifier le protocole opératoire.

CONSIGNES D'HYGIENE ET SECURITE

- Les matériels d'origine humaine utilisés dans la préparation des réactifs ont été testés et trouvés non-réactifs pour l'antigène de surface de l'hépatite B (Ag HBs), les anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-VHC) et les anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1 et anti-VIH2). Du fait qu'aucune méthode ne peut garantir de façon absolue l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs d'origine humaine ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage.
- Considérer le matériel directement en contact avec les échantillons et les réactifs d'origine humaine, ainsi que les solutions de lavage, comme des produits contaminés.
- Porter des gants à usage unique lors de la manipulation des réactifs.
- Ne pas pipeter à la bouche.
- Eviter les éclaboussures d'échantillons ou des solutions les contenant. Les surfaces souillées seront nettoyées par de l'eau de javel diluée à 10%. Si le liquide contaminant est un acide, les surfaces souillées seront neutralisées au préalable avec du bicarbonate de soude, puis nettoyées avec de l'eau de javel et séchées avec du papier absorbant. Le matériel utilisé pour le nettoyage devra être jeté dans un conteneur spécial pour déchets contaminés.
- Les échantillons d'origine humaine ainsi que le matériel et les produits contaminés seront éliminés après décontamination, soit par immersion dans de l'eau de javel à la concentration finale de 5% d'hypochlorite de sodium pendant 30 minutes, soit par autoclavage à 121°C pendant 2 heures minimum. L'autoclave à 121°C, pendant une heure minimum, est le meilleur procédé d'inactivation des virus HIV et du virus de l'hépatite B.

ATTENTION : Ne pas introduire dans l'autoclave de solutions contenant de l'hypochlorite de sodium

- Eviter tout contact du tampon substrat, du chromogène et de la solution d'arrêt avec la peau et les muqueuses (risque de toxicité, d'irritations et de brûlures).

- La manipulation et l'élimination des produits chimiques doivent être effectuées selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Attention : certains réactifs contiennent du ProClin™ 300 < 1,5%



Xi - Irritant

R43: Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.

S28-37: Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et du savon. Porter des gants appropriés.

5- RECUEIL, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

1. Les tests sont effectués sur des échantillons de sérum ou des échantillons de plasma prélevés sur EDTA, citrate, ou héparine.
2. Respecter les consignes suivantes pour le prélèvement, le traitement et la conservation de ces échantillons :
 - Recueillir les échantillons de sang selon les pratiques en usage.
 - Pour les prélèvements sur sérum, laisser le caillot se former complètement avant centrifugation.
 - Conserver les tubes fermés.
 - Après centrifugation, extraire le sérum ou le plasma et le conserver en tube fermé.
 - Les échantillons seront conservés à +2-8°C si les tests sont effectués dans les 24 heures.
 - Si les tests ne sont pas effectués dans les 24 heures, ou pour tout envoi, les échantillons seront de préférence congelés à -20°C (ou plus froid).
 - Ne pas utiliser d'échantillons ayant subi plus de trois cycles de congélation / décongélation. Avant d'être testés, les échantillons devront être soigneusement homogénéisés après décongélation (vortex).
3. Les résultats ne sont pas affectés par les échantillons contenant 100 mg/L de bilirubine et les échantillons lipémiques contenant l'équivalent de 36 g/L de trioléine (triglycéride). Une augmentation du ratio des échantillons négatifs est possible avec des concentrations en albumine de 90g/L ou sur des échantillons hémolysés contenant 10mg/mL d'hémoglobine.
4. Ne pas chauffer les échantillons.

6- MODE OPERATOIRE

6.1. MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Agitateur de type vortex.
- Appareil de lecture pour microplaques (équipés de filtres 450/620 nm).(*)
- Bain-marie ou incubateur sec pour microplaques thermostaté à 37±1°C.(*)
- Système de lavage manuel, semi-automatique ou automatique pour microplaques.(*)

- Conteneur de déchets contaminés.
- Hypochlorite de sodium (eau de javel) et bicarbonate de soude.
- Eau distillée ou désionisée stérile.
- Epprouvettes graduées de 25 mL, 50 mL, 100 mL et 1000 mL.
- Gants à usage unique.
- Lunettes de protection.
- Papier absorbant.
- Pipettes ou multipipettes, automatique ou semi-automatique, réglables ou fixes, pouvant mesurer 50 μ L, 100 μ L, 300 μ L et 1000 μ L.
- Tubes à usage unique.

(*) Nous consulter pour une information précise concernant les appareils validés par nos services techniques.

6.2. RECONSTITUTION DES REACTIFS

- **R1** : Laisser revenir à température ambiante (+18-30°C) avant ouverture du sachet. Replacer immédiatement dans le sachet les barrettes non utilisées en vérifiant la présence du dessicant. Refermer soigneusement le sachet et le conserver à +2-8°C.
- **R2** : Diluer au 1/20 la solution R2 avec de l'eau distillée : 50 mL de R2 dans 950 mL d'eau distillée. On obtient ainsi la solution prête à l'emploi. Prévoir 350 mL de solution de lavage diluée pour une plaque entière de 12 barrettes en lavage manuel.
- **R6+R7** : Le conjugué (R6) est présenté sous forme liquide concentrée 50 fois. Homogénéiser avant utilisation. Diluer au 1/50 avec le diluant (R7). Pour une barrette, diluer 20 μ L de R6 qsp. 1,0 mL de R7. Multiplier les volumes par 12 pour une plaque complète.

6.3. CONSERVATION DES REACTIFS OUVERTS ET/OU RECONSTITUES

La trousse doit être conservée à +2-8°C. Chaque élément de la trousse conservée avant ouverture à +2-8°C peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

- **R1** : Après ouverture, les barrettes conservées dans le sachet bien refermé sont stables pendant 6 semaines à +2-8°C (vérifier la présence du dessicant).
- **R2** : Après dilution, la Solution de Lavage se conserve 2 semaines à +2-30°C. Après ouverture et en l'absence de contamination, la Solution de Lavage concentrée peut être conservée à +2-30°C jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette.
- **R6+R7** : Après dilution, la solution reconstituée est stable 8 heures à température ambiante (+18-30°C).

- **R3, R4, R5, R6, R7, R10** : Après ouverture et en l'absence de contamination, les réactifs conservés à +2-8°C sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.
- **R9**: Après ouverture et en l'absence de contamination, le réactif conservé à +2-8°C est stable pendant 8 semaines.

6.4. PROCEDURE

Suivre strictement le protocole proposé.

Avant utilisation, laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante (+18-30°C).

Utiliser un contrôle négatif (R3), deux calibrateurs (R4) et un contrôle positif (R5) dans chaque série pour valider les résultats du dosage.

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification du calibrateur, des contrôles et des échantillons de patients. (S1, S2...) tel qu'indiqué ci-dessous :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5										
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

2. Sortir le cadre support et les barrettes (R1) de l'emballage protecteur (se référer au chapitre 6.2).
3. Suivre strictement la séquence de distribution suivante en déposant successivement dans les cupules :
 - 50µL de diluant (R7)
 - 50µL d'échantillons (calibrateur, contrôles ou patients)
 - 100µL du conjugué dilué (R6+R7)

N.B: La distribution du diluant, des échantillons et du conjugué peut être contrôlée visuellement à ce stade du protocole. L'ajout de l'échantillon pur au diluant se traduit par un changement de couleur du jaune au orange. L'ajout du conjugué se traduit ensuite par un changement de couleur de l'orange au vert. Ce contrôle peut ne pas être effectif en cas d'utilisation d'échantillons dilués.

- Couvrir la microplaque d'un film adhésif en appuyant bien sur toute la surface pour assurer l'étanchéité.
- Incuber la microplaque dans un bain-marie ou un incubateur sec thermostaté pendant 90 ± 5 minutes à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Préparer la solution de lavage diluée (R2) (*se référer au chapitre 6.2*).
- A la fin de l'incubation, retirer le film adhésif, aspirer le contenu de toutes les cupules dans un conteneur pour déchets contaminés (contenant de l'hypochlorite de sodium). Laver la microplaque 6 fois avec la solution de lavage (R2). Sécher la plaque par retournement sur une feuille de papier absorbant.
Note: Il est important d'éviter les éclaboussures de réactifs pendant les étapes d'aspiration et de lavage.
- Distribuer rapidement, et à l'abri de la lumière vive, 200 μL du Chromogène (R9) dans toutes les cupules. Laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant 30 ± 5 minutes à température ambiante ($+18-30^\circ\text{C}$). Lors de cette incubation, ne pas utiliser de film adhésif.
- Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant 100 μL de la Solution d'Arrêt (R10) dans chaque cupule. Adopter la même séquence et le même rythme de distribution que pour la solution de révélation.
- Essuyer soigneusement le dessous des plaques. Lire la densité optique à 450/620 nm à l'aide d'un lecteur de plaque dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction (Conserver les barrettes à l'abri de la lumière avant la lecture).
- S'assurer avant la transcription des résultats de la concordance entre la lecture et le plan de distribution et d'identification des plaques et des échantillons.

7- CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

7.1. CALCUL DE LA VALEUR SEUIL

La valeur seuil CO correspond à la valeur moyenne des densités optiques des duplicates du Calibrateur (R4).

7.2. CALCUL DU RATIO ECHANTILLON

Les résultats sont exprimés sous forme d'un ratio à l'aide de la formule suivante, dans laquelle S est la densité optique (DO) obtenue pour l'échantillon :

- Ratio Echantillon = S/CO

7.3. CONTROLE DE QUALITE

Pour valider la manipulation, les critères suivants doivent être respectés :

- Valeur de densité optique :
 - $CO > 0,200$

- Ratios:
 - Ratio R3 < 0,40 (Ratio R3 = DO_{R3} / CO)
 - Ratio R5 > 1,50 (Ratio R5 = DO_{R5} / CO)

Si ces spécifications ne sont pas respectées, recommencer la manipulation.

7.4. INTERPRETATION DES RESULTATS

Se référer au tableau suivant pour l'interprétation des résultats.

Ratio	Résultat	Interprétation
Ratio < 0,50	Négatif	L'échantillon est considéré non réactif pour l'antigène NS1 du virus de la dengue.
$0,50 \leq \text{Ratio} < 1,00$	Equivoque	L'échantillon est considéré douteux pour l'antigène NS1 du virus de la dengue.
Ratio $\geq 1,00$	Positif	L'échantillon est considéré réactif pour l'antigène NS1 du virus de la dengue.

Remarque : Les densités optiques obtenues sur des échantillons fortement réactifs peuvent atteindre la densité optique maximale pouvant être lue par le spectrophotomètre.

7.5. EXPERTISE DES CAUSES D'ERREURS

L'origine des réactions non validées ou non reproductibles est souvent en relation avec les causes suivantes :

- Lavage insuffisant des microplaques.
- Contamination des échantillons négatifs par un sérum ou un plasma fortement concentré.
- Contamination ponctuelle de la solution de révélation par des agents chimiques oxydants (eau de javel, ions métalliques...)
- Contamination ponctuelle de la solution d'arrêt.

8- PERFORMANCES

8.1. SENSIBILITE – SPECIFICITE

• Sensibilité

La sensibilité a été évaluée par analyse rétrospective de 177 sérums de patients souffrant d'infection aiguë par le virus de la dengue confirmée par RT-PCR. Sur cette population, le test Platelia™ Dengue NS1 Ag s'est avéré positif dans 91% des cas (intervalle de confiance à 95%: 85,8%-94,8%). Comparativement, la sensibilité obtenue avec un test commercialisé Dengue IgM EIA était de 17,5%.

La sensibilité était significativement plus élevée dans la population d'échantillons négatifs en IgG issus d'infections primaires (sensibilité de 98,5%, n= 66) que dans celle d'échantillons positifs en IgG (sensibilité de 85,6%, n=90) (Test du χ^2 , p=0,004).

Aucune différence significative n'a été observée en fonction du sérotype de virus de la dengue responsable (cf. Tableau 1).

Tableau 1 : Sensibilité du test Platelia™ Dengue NS1 Ag en fonction du sérotype (n=177).

Sérotype	Nombre de sérums	Sensibilité du test Platelia™ Dengue NS1 Ag (IC 95%)
1	93	88,9% (85,8% - 94,8%)
2	31	87,1% (70,1% - 96,3%)
3	24	100,0% (85,6% - 100,0%)
4	29	93,3% (77,9% - 97,9%)

La précocité du diagnostic à l'aide du test Platelia™ Dengue NS1 Ag a été étudié sur des sérums de patients pour lesquels la date d'apparition de la fièvre était documentée. Les sensibilités les plus élevées sont obtenues dès l'apparition des signes cliniques et demeurent élevées pendant toute la durée de l'épisode fébrile (cf. Tableau 2).

Tableau 2 : Sensibilité du test Platelia™ Dengue NS1 Ag en fonction de l'apparition des signes cliniques (n=177).

Jours après l'apparition de la fièvre	Nombre de sérums	Sensibilité du test Platelia™ Dengue NS1 Ag	Sensibilité du test Dengue IgM EIA
0	10	100,0%	0,0%
1	33	87,8%	5,1%
2	40	92,5%	6,1%
3	20	95,0%	15,0%
4	27	96,3%	48,1%
5	19	52,6%	94,1%
≥ 6	28	35,7%	100,0%

- **Spécificité**

La spécificité a été évaluée sur 618 échantillons, comprenant 563 échantillons prélevés chez des donneurs de sang et 55 échantillons prélevés chez des patients hospitalisés. Aucun résultat positif n'a été observé dans la population étudiée, soit une spécificité du test de 100,0% (intervalle de confiance à 95% : 99,4% - 100,0%).

8.2. PRECISION

- **Précision intra-essai (répétabilité)**

Afin d'évaluer la répétabilité intra-essai, un échantillon négatif et trois échantillons positifs ont été testés à 30 reprises dans une même série. Le ratio (S/CO) a été déterminé pour chaque échantillon testé. La moyenne, l'écart-type (SD) et le coefficient de variation (%CV) pour chacun des quatre échantillons sont donnés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Précision intra-essai.

N=30	Echantillon négatif	Echantillon faiblement Positif	Echantillon moyennement positif	Echantillon fortement positif
	Ratio échantillon (S/CO)			
Moyenne	0,10	1,32	3,79	6,24
SD	0,01	0,08	0,29	0,45
% CV	13,1	6,2	7,7	7,2

- **Précision inter-essai (reproductibilité)**

Afin d'évaluer la reproductibilité inter-essai, les quatre échantillons (un négatif et trois positifs) ont chacun été testés en duplicate, dans deux séries par jour, sur une période totale de vingt jours. Le ratio (S/CO) a été déterminé pour chaque échantillon testé. La moyenne, l'écart-type (SD) et le coefficient de variation (%CV) pour chacun des quatre échantillons sont donnés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Précision inter-essai.

N=40	Echantillon négatif	Echantillon faiblement Positif	Echantillon moyennement positif	Echantillon fortement positif
Ratio échantillon (S/CO)				
Moyenne	0,10	1,17	3,85	6,20
SD	0,03	0,21	0,67	0,96
% CV	33,8	17,8	17,4	15,5

8.3. REACTIVITE CROISEE

Un panel de 38 sérums contenant des substances potentiellement interférentes a été testé avec le test Platelia™ Dengue NS1 Ag : anticorps antinucléaires (n=10), facteur rhumatoïde (n=9), anticorps hétérophiles (n=9), sérums de patients atteints de myélome (n=10). Par ailleurs, un panel de 162 sérums de patients atteints d'autres maladies que la dengue (West Nile, fièvre jaune, CMV, HSV, VZV, etc...) a également été testé. Les 200 échantillons testés se sont tous avérés négatifs avec le test Platelia™ Dengue NS1 Ag.

9- LIMITES DU TEST

Le diagnostic d'une infection récente par le virus de la dengue ne peut être définitivement établi que sur un ensemble de données cliniques et biologiques. Le résultat d'un seul test ne constitue pas en soit une preuve suffisante pour le diagnostic d'une infection récente.

10-CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

11-REFERENCES

Voir version Anglaise.

BIO-RAD

PLATELIA™ DENGUE NS1 AG

96 ENSAYOS

72830

**DETECCIÓN CUALITATIVA O SEMICUANTITATIVA
DEL ANTÍGENO NS1 DEL VIRUS DEL DENGUE EN
EL SUERO O EN EL PLASMA HUMANO MEDIANTE
EL MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO**

IVD

1- INTERES CLINICO

El dengue es una enfermedad endémica presente en todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Se considera la más importante de las arbovirosis en términos de morbilidad, mortalidad e impacto socioeconómico. La prevalencia global del dengue ha aumentado considerablemente en estos últimos años y la enfermedad es ahora endémica en más de 100 países, por lo que afecta potencialmente al 40% de la población mundial. La Organización Mundial de la Salud estima que cada año resultan infectados por el virus del dengue entre 50 y 100 millones de personas, lo que supone entre unos 250.000 y 500.000 enfermos graves y 24.000 fallecimientos.

El virus del dengue es transmitido por los mosquitos, principalmente por las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Existen cuatro serotipos distintos (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4). La infección primaria por el virus del dengue comporta una inmunidad protectora definitiva frente al serotipo homólogo, pero sólo confiere una protección parcial y pasajera contra los otros tres serotipos en caso de repetirse la infección (infección secundaria).

La infección por el virus del dengue puede revestir diversos cuadros clínicos, desde la infección asintomática, la fiebre indiferenciada o el típico dengue febril, a unas formas más graves como el dengue hemorrágico y el dengue con síndrome de shock, en los que se observan unos índices elevados de morbilidad y de mortalidad. El dengue se caracteriza por una fiebre que dura de 3 a 5 días, con dolor de cabeza, dolores musculares y articulares y erupción cutánea, pero en general con un resultado positivo para el paciente. El dengue hemorrágico y el dengue con síndrome de shock se observan sobre todo en pacientes anteriormente infectados por el virus. Los síntomas son similares a los del dengue febril pero van acompañados de un aumento de la permeabilidad vascular y de signos hemorrágicos que desembocan en una hipotensión, una hipovolemia, un colapso vascular y el fallecimiento del paciente.

El principal reto asociado al tratamiento de los pacientes infectados es la rapidez y la especificidad de la detección del virus del dengue durante la fase aguda, con el objeto de aplicar un tratamiento eficaz lo antes posible. El aislamiento y la identificación del virus o la detección del ácido nucleico viral permiten un diagnóstico precoz durante la fase febril, pero estos métodos requieren un laboratorio especializado y la obtención de los resultados no es inmediata. La detección de los anticuerpos específicos dirigidos contra el virus del dengue son los métodos que se utilizan siempre en la rutina.

No obstante, estos anticuerpos sólo surgen después de la aparición de los primeros síntomas. En la infección primaria, los anticuerpos de tipo IgM e IgG aparecen a los 5 y 14 días posteriores a la aparición de los primeros síntomas. En la infección secundaria, los índices de IgM son muy escasos, casi indetectables, mientras que los IgG aparecen al día siguiente o a los 2 días de la aparición de los síntomas con unos índices muy superiores a los observados en el transcurso de una infección primaria. Recientemente, la detección de la proteína viral no estructural NS1 en el suero de los pacientes ha sido descrita como un método alternativo para el diagnóstico precoz de la infección. El antígeno NS1 se encuentra en la circulación desde el primero hasta el noveno día siguiente a la aparición de la fiebre, y los índices observados son comparables en las formas primarias y secundarias de infección.

2- PRINCIPIO

La prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag es un método inmunoenzimático en una etapa de tipo sándwich, en formato microplaca, para la detección cualitativa o semicuantitativa del antígeno NS1 del virus del dengue en el suero o en el plasma humano. La prueba utiliza anticuerpos monoclonales de ratón (AcM) para su captura y revelación.

Las muestras de pacientes y los patrones son incubados directa y simultáneamente con el conjugado durante 90 minutos a 37°C en las cúpulas de la microplaca sensibilizada por los AcM. En presencia de antígeno NS1 en la muestra, se forma un complejo inmune AcM - NS1 - AcM/peroxidasa. Tras los lavados practicados al final de la incubación, la presencia del complejo inmune es revelada mediante el añadido en cada cúpula de una solución de revelación enzimática que induce el desarrollo de una reacción coloreada. A los 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción enzimática es interrumpida mediante la adición de una solución ácida. La densidad óptica obtenida a 450/620 nm es proporcional a la cantidad de antígeno NS1 presente en la muestra ensayada. La presencia del antígeno NS1 en una muestra individual se establece mediante la comparación de la densidad óptica leída en esta muestra con la obtenida en el calibrador.

3- COMPOSICION DEL EQUIPO REACTIVO

Etiquetado		Naturaleza de los reactivos	Presentación
R1	Microplate	Microplaca (lista para su uso): 12 barritas de 8 cúpulas sensibilizadas por AcM anti-NS1, en bolsas herméticas al vacío	1
R2	Concentrated Washing Solution (20x)	Solución de lavado (20x): TRIS-NaCl (pH 7,4), 2% Tween® 20 Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 70 mL
R3	Negative Control	Control negativo : Suero humano negativo para el antígeno Dengue NS1 Conservante : < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R4	Calibrator	Calibrador : Tampón TRIS-NaCl buffer (pH 8,0), antígeno Dengue NS1, suero albúmina bovina, glicerol E102, E122 Conservante : < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,5 mL
R5	Positive Control	Control Positivo : Tampón TRIS-NaCl buffer (pH 8,0), antígeno Dengue NS1, suero albúmina bovina, glicerol E102, E122 Conservante : < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R6	Conjugate (50x)	Conjugado (50x): AcM anti-NS1 combinado con peroxidasa Conservante : < 1,5% ProClin™ 300	1 x 0,5 mL
R7	Diluent	Diluyente (listo para su uso): Tampón fosfato, Tween® 20, suero de feto de ternera Conservante : < 1,5% ProClin™ 300	1 x 22 mL
R9	Chromogen TMB	Cromógeno (listo para usar): 3,3',5,5' tetrametilbencidina (< 0,1%), H ₂ O ₂ (<1%)	1 x 28 mL
R10	Stopping Solution	Solución de parada (lista para su uso): Ácido sulfúrico 1N	1 x 28 mL
		Películas adhesivas	4

Consultar las instrucciones que figuran en la caja referentes a la conservación y a las fechas de caducidad de los reactivos.

4- INSTRUCCIONES DE USO

La calidad de los resultados depende de la observancia de las Buenas Prácticas de Laboratorio siguientes :

- No utilizar los reactivos con posterioridad a la fecha de caducidad.
- No mezclar ni combinar en una misma serie reactivos procedentes de cajas con números de lotes distintos.

OBSERVACIÓN: *Es posible utilizar otros lotes de solución de lavado (R2 identificado 20x en color verde), de cromógeno (R9 identificado TMB en color turquesa) y de solución de parada (R10 identificado 1N en color rojo) que los que se suministran en el kit, a condición de utilizar reactivos estrictamente equivalentes de un mismo y único lote en el transcurso de una misma serie.*

OBSERVACIÓN: *No es posible usar Diluyente (R7) de otros lotes que no sean los incluidos en el kit.*

OBSERVACIÓN: *Además, la Solución de Lavado (R2, identificación en la etiqueta: 20X color verde) se puede mezclar con las otras 2 soluciones de lavado incluidas en los distintos kits de reactivos de Bio-Rad (R2, identificaciones en la etiqueta : 10X color azul o 10X color naranja) cuando se reconstituyen debidamente, siempre que se use sólo una mezcla en cada tanda de pruebas.*

- Antes de su uso, dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (+18-30°C).
- Reconstituir o diluir cuidadosamente los reactivos evitando su contaminación.
- No realizar el ensayo en presencia de vapores reactivos (ácidos, alcalinos, aldehídos) ni de polvo que puedan alterar la actividad enzimática del conjugado.
- Utilizar cristalería perfectamente lavada y aclarada con agua destilada o, preferentemente, material desechable.
- No dejar secar la placa entre el final de los lavados y la distribución de los reactivos.
- La reacción enzimática es muy sensible a todos los metales o iones metálicos. Por consiguiente, ningún elemento metálico deberá entrar en contacto con las diferentes soluciones que contengan el conjugado o la solución sustrato.

- El cromógeno (R9) debe ser incoloro. La aparición de un color azul indica que el reactivo no es utilizable y debe reemplazarse.
- Utilizar un cono de distribución nuevo para cada suero.
- El lavado de las cúpulas es una etapa fundamental de la manipulación: respetar el número de ciclos de lavados prescrito y comprobar que todas las cúpulas hayan sido totalmente llenadas y después vaciadas. Un lavado inadecuado puede comportar unos resultados incorrectos.
- No utilizar jamás el mismo recipiente para distribuir el conjugado y la solución de revelación.
- Comprobar la exactitud de las pipetas y el correcto funcionamiento de los aparatos utilizados.
- No modificar el protocolo operativo.

NORMAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD

- Los materiales de origen humano utilizados en la preparación de los reactivos han sido probados y han demostrado ser no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B (Ag HBs), para los anticuerpos dirigidos contra el virus de la hepatitis C (anti-VHC) y para los anticuerpos dirigidos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (anti-VIH1 y anti-VIH2). Debido a que ningún método puede garantizar con absoluta seguridad la ausencia de agentes infecciosos, los reactivos de origen humano, así como todas las muestras de los pacientes, deberán considerarse como potencialmente infecciosos y manipularlos con la mayor precaución.
- Llevar guantes desechables cuando se manipulen los reactivos.
- No pipetear con la boca.
- Evitar las salpicaduras de muestras o de las soluciones que las contengan. Las superficies manchadas serán lavadas con lejía diluida al 10%. Si el líquido contaminante es un ácido, las superficies manchadas serán neutralizadas previamente con bicarbonato sódico y a continuación serán lavadas con lejía y secadas con papel absorbente. El material utilizado para la limpieza deberá ser eliminado en un contenedor especial para residuos contaminantes.
- Las muestras de origen humano, así como el material y los productos contaminados serán eliminados tras su descontaminación, bien por inmersión en lejía con una concentración final de 5% de hipoclorito sódico durante 30 minutos, bien por autoclave a 121°C durante un mínimo de 2 horas.

El autoclave a 121°C, durante una hora como mínimo, es el mejor procedimiento de desactivación de los virus HIV y del virus de la hepatitis B.

ATENCIÓN : No introducir en el autoclave soluciones que contengan hipoclorito sódico.

- Evitar cualquier contacto del tampón sustrato, del cromógeno y de la solución de parada con la piel y las mucosas (riesgo de toxicidad, de irritaciones y de quemaduras).
- La manipulación y la eliminación de los productos químicos deberá efectuarse con arreglo a las Buenas Prácticas de Laboratorio.



Xi - Irritante

Cuidado: ciertos reactivos contienen ProClin™ 300 < 1.5%

R43: Perturbación de la sensibilidad por contacto con la piel.

S28-37: En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua y jabón. Úsense guantes adecuados.

5- RECOGIDA, PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Los ensayos se realizan en muestras de suero o en muestras de plasma tomadas de EDTA, citrato o heparina.
2. Seguir las siguientes instrucciones para la recogida, el tratamiento y la conservación de estas muestras:
 - Recoger las muestras de sangre con arreglo a las prácticas en uso.
 - Para las recogidas de suero, dejar que se forme totalmente el coágulo sanguíneo antes del centrifugado.
 - Conservar los tubos cerrados.
 - Tras el centrifugado, extraer el suero o el plasma y conservarlos en un tubo cerrado.
 - Las muestras se conservarán a +2-8°C si se realizan los ensayos en las 24 horas siguientes.
 - Si los ensayos no se realizan en las 24 horas siguientes, o en caso de envío, las muestras deberán congelarse a -20°C (o incluso a menor temperatura).
 - No utilizar muestras que hayan sido sometidas a tres ciclos de congelación/descongelación. Antes de iniciar el ensayo, las muestras deben ser cuidadosamente homogeneizadas tras la descongelación. (vórtex).
3. Los resultados no se ven afectados por las muestras que contengan 100 mg/L de bilirrubina y las muestras lipémicas que contengan el equivalente a 36 g/L de trioleína (triglicérido). Es posible que se produzca un aumento de la relación de muestras negativas con unas concentraciones de albúmina de 90 g/L o en muestras hemolizadas que contengan 10 mg/mL de hemoglobina.
4. No calentar las muestras.

6- MODO OPERATIVO

6.1. MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

- Agitador de tipo vórtex.
- Aparato de lectura para microplacas (equipados con filtros 450/620 nm (*)).
- Baño maría o incubadora seca para microplacas a una temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ (*).
- Sistema de lavado manual, semiautomático o automático para microplacas (*).
- Contenedor de residuos contaminantes.
- Hipoclorito sódico (lejía) y bicarbonato sódico.
- Agua destilada o desionizada estéril.
- Probetas graduadas de 25 mL, 50 mL, 100 mL y 1000 mL.
- Guantes desechables.
- Gafas de protección.
- Papel absorbente.
- Pipetas o multipipetas, automática o semiautomática, regulables o fijas, que puedan medir 50 μL , 100 μL , 300 μL y 1000 μL .
- Tubos desechables.

(*) Rogamos nos consulten para una información exacta en lo que respecta a los aparatos validados por nuestros servicios técnicos.

6.2. RECONSTITUCIÓN DE LOS REACTIVOS

- **R1:** Dejar que alcance la temperatura ambiente ($+18-30^{\circ}\text{C}$) antes de abrir la bolsa. Meter de nuevo inmediatamente las barritas no utilizadas en la bolsa y comprobar la presencia del desecante. Volver a cerrar con cuidado la bolsa y conservarla a $+2-8^{\circ}\text{C}$.
- **R2:** Diluir a 1/20 la solución R2 con agua destilada: 50 mL de R2 en 950 mL de agua destilada. Se obtiene de este modo la solución lista para usar. Tener previstos 350 mL de solución de lavado diluida para una placa entera de 12 tiras en modo de lavado manual.
- **R6+R7:** El conjugado (R6) se presenta en forma líquida concentrada 50 veces. Homogeneizar antes de su uso. Diluir a 1/50 con el diluyente (R7). Para una barrita, diluir 20 μL de R6 qsp. 1,0 mL de R7. Multiplicar los volúmenes por 12 para una placa completa.

6.3. CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS ABIERTOS Y/O RECONSTITUIDOS

El kit debe conservarse a +2-8°C. Cada elemento del kit conservado a +2-8°C antes de la apertura puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

- **R1:** Tras su apertura, las barritas conservadas en la bolsa herméticamente cerrada se mantienen estables durante 6 semanas a +2-8°C (comprobar la presencia del desecante).
- **R2:** Después de la dilución, la solución de lavado se conserva 2 semanas a +2-30°C. Después de abrir y si no hay presencia de contaminación, la solución de lavado concentrada puede conservarse a +2-30°C hasta la fecha indicada en la etiqueta.
- **R6+R7:** Tras la dilución, la solución reconstituida se mantiene estable durante 8 horas a temperatura ambiente (+18-30°C).
- **R3, R4, R5, R6, R7, R10:** Tras la apertura y en ausencia de contaminación, los reactivos conservados a +2-8°C se mantienen estables hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta.
- **R9:** Después de abrir y si no hay presencia de contaminación, el reactivo conservado a +2-8°C es estable durante 8 semanas.

6.4. PROCEDIMIENTO

Seguir estrictamente el protocolo propuesto.

Antes de su uso, dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (+18-30°C).

Utilizar un control negativo (R3), dos calibradores (R4) y un control positivo (R5) en cada serie para validar los resultados de la dosificación.

1. Establecer cuidadosamente el plan de distribución y de identificación del calibrador, de los sueros de control y de las muestras de pacientes (S1, S2...) tal como se indica a continuación:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5										
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

2. Sacar el soporte y las barritas (R1) del embalaje protector (consultar el capítulo 6.2).
3. Seguir estrictamente la secuencia de distribución siguiente y depositar sucesivamente en las cúpulas:
 - 50µL de diluyente (R7)
 - 50µL de muestras (calibrador, controles o pacientes)
 - 100µL de conjugado diluido (R6+R7)

NOTA: : *La distribución del diluyente, de las muestras y del conjugado puede controlarse visualmente en esta fase del protocolo. El añadido de la muestra pura al diluyente se traduce en un cambio de color de amarillo a naranja. El añadido del conjugado se traduce a continuación en un cambio de color naranja a verde. Este control no resultará eficaz en caso de que se utilicen muestras diluidas.*

4. Tapar la superficie completa de la microplaca con una película adhesiva para garantizar la estanqueidad.
5. Incubar la microplaca en el baño maría o en una incubadora seca durante 90 ± 5 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
6. Preparar la solución de lavado diluida (R2) (consultar el capítulo 6.2).
7. Al finalizar la incubación, retirar la película adhesiva y verter el contenido de todas las cúpulas en un contenedor de residuos contaminantes (que contengan hipoclorito sódico). Lavar la microplaca 6 veces con la solución de lavado (R2). Secar la placa sobre una hoja de papel absorbente.

Nota : es importante evitar las salpicaduras de reactivos durante las etapas de aspiración y de lavado.

8. Distribuir rápidamente, y al abrigo de la luz fuerte, 200 µL del cromógeno (R9) en todos los pocillos. Dejar la reacción desarrollarse en la oscuridad durante 30 ± 5 minutos a temperatura ambiente ($+18-30^\circ\text{C}$). Durante esta incubación, no utilizar el film adhesivo.
9. Detener la reacción enzimática añadiendo 100 µL de la solución de parada (R10) en cada cúpula. Adoptar la misma secuencia y el mismo ritmo de distribución que para la solución de revelado.
10. Secar cuidadosamente la parte de debajo de las placas. Leer la densidad óptica a 450/620 nm con la ayuda de un lector de placa dentro de los 30 minutos después de la parada de la reacción (Conservar las barritas protegidas de la luz antes de la lectura).
11. Cerciorarse antes de transcribir los resultados de la concordancia entre la lectura y el plan de distribución y de identificación de placas y muestras.

7- CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1. CÁLCULO DEL VALOR UMBRAL

El valor umbral CO corresponde al valor medio de las densidades ópticas de los duplicados del Calibrador (R4).

7.2. CÁLCULO DEL RELACIÓN MUESTRA

Los resultados se expresan en forma de Relación con la ayuda de la fórmula siguiente, en la que S es la densidad óptica (DO) obtenida para la muestra:

- Relación Muestra = S/CO

7.3. CONTROL DE CALIDAD

Para validar la manipulación, deberán cumplirse los siguientes criterios:

- Valor de densidad óptica:
 - $CO > 0,200$
- Relaciones :
 - Relación R3 $< 0,40$ (Relación R3 = DO_{R3} / CO)
 - Relación R5 $> 1,50$ (Relación R5 = DO_{R5} / CO)

Si no se cumplen estas especificaciones, deberá reiniciarse la manipulación.

7.4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Consultar la tabla mostrada a continuación para la interpretación de los resultados.

Relación	Resultado	Interpretación
Relación < 0.50	Negativo	La muestra es considerada no reactiva para el antígeno NS1 del virus del dengue
$0,50 \leq$ Relación < 1.00	Equívoco	La muestra es considerada dudosa para el antígeno NS1 del virus del dengue
Relación $\geq 1,00$	Positivo	La muestra es considerada reactiva para el antígeno NS1 del virus del dengue

Observación: Las densidades ópticas obtenidas en las muestras altamente reactivas pueden alcanzar la densidad óptica máxima que puede ser leída por el espectrofotómetro.

7.5. DOMINIO DE LAS CAUSAS DE ERRORES

El origen de las reacciones no validadas o no reproducibles se encuentra a menudo en las siguientes causas:

- Lavado insuficiente de las microplacas.
- Contaminación de las muestras negativas por un suero o un plasma muy concentrado.

- Contaminación puntual de la solución de revelación por agentes químicos oxidantes (lejía, iones metálicos...).
- Contaminación puntual de la solución de parada.

8- COMPORTAMIENTOS

8.1. SENSIBILIDAD – ESPECIFICIDAD

• Sensibilidad

La sensibilidad se ha evaluado mediante un análisis retrospectivo de 177 sueros de pacientes que sufren una infección aguda por el virus del dengue, confirmada por el RT-PCR. En esta población, la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag ha demostrado ser positiva en el 91% de los casos (intervalo de confianza del 95%: 85,8%-94,8%). Comparativamente, la sensibilidad obtenida con una prueba comercializada Dengue IgM fue del 17,5%.

La sensibilidad fue mucho más elevada en la población de muestras negativas en IgG afectados de infecciones primarias (sensibilidad del 98,5%, n=66) que en la de muestras positivas en IgG (sensibilidad del 85,6%, n=90) (Prueba del χ^2 , p=0,004).

No se observó ninguna diferencia significativa según el serotipo de virus del dengue responsable (véase Tabla 1).

Tabla 1: Sensibilidad de la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag según el serotipo (n=177).

Serotipo	Número de sueros	Sensibilidad de la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag (IC 95%)
1	93	88,9% (85,8% - 94,8%)
2	31	87,1% (70,1% - 96,3%)
3	24	100,0% (85,6% - 100,0%)
4	29	93,3% (77,9% - 97,9%)

Se estudió la precocidad del diagnóstico con la ayuda de la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag en los sueros de pacientes cuya fecha de aparición de la fiebre estaba debidamente documentada. Las sensibilidades más elevadas se obtuvieron a partir de la aparición de los síntomas clínicos y se mantuvieron elevadas durante la completa duración del episodio febril (véase Tabla 2).

Tabla 2: Sensibilidad de la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag en función de la aparición de los síntomas clínicos (n=177).

Días posteriores a la aparición de la fiebre	Número de sueros	Sensibilidad de la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag	Sensibilidad de la prueba Dengue IgM EIA
0	10	100,0%	0,0%
1	33	87,8%	5,1%
2	40	92,5%	6,1%
3	20	95,0%	15,0%
4	27	96,3%	48,1%
5	19	52,6%	94,1%
≥ 6	28	35,7%	100,0%

• Especificidad

Se evaluó la especificidad en 618 muestras, de ellas 563 muestras fueron extraídas a donantes de sangre y 55 muestras a pacientes hospitalizados. No se observó ningún resultado positivo en la población estudiada, es decir una especificidad de la prueba del 100,0% (intervalo de confianza del 95%: 99,4% - 100,0%).

8.2. PRECISIÓN

• Precisión entre ensayos (repetibilidad)

Con el objeto de evaluar la repetibilidad entre ensayos, se sometieron a prueba una muestra negativa y tres muestras positivas en 30 tomas en una misma serie. Se estableció la Relación (S/CO) para cada muestra sometida a prueba. En la Tabla 3 se muestra la media, la desviación típica (SD) y el coeficiente de variación (%CV) para cada una de las cuatro muestras.

Tabla 3: Precisión entre ensayos.

N=30	Muestra negativa	Muestra escasamente positiva	Muestra medianamente positiva	Muestra altamente positiva
	Relación muestra (S/CO)			
Media	0,10	1,32	3,79	6,24
SD	0,01	0,08	0,29	0,45
% CV	13,1	6,2	7,7	7,2

• Precisión entre ensayos (reproducibilidad)

Con el objeto de evaluar la reproducibilidad entre ensayos, se sometieron a prueba por duplicado cuatro muestras (una negativa y tres positivas), en dos series por día, en un período total de veinte días. Se estableció la Relación (S/CO) para cada muestra sometida a prueba. En la Tabla 4 se muestra la media, la desviación típica (SD) y el coeficiente de variación (%CV) para cada una de las cuatro muestras.

Tabla 4: Precisión entre pruebas.

N=40	Muestra negativa	Muestra escasamente positiva	Muestra medianamente positiva	Muestra altamente positiva
	Relación muestra (S/CO)			
Media	0,10	1,17	3,85	6,20
SD	0,03	0,21	0,67	0,96
% CV	33,8	17,8	17,4	15,5

8.3. REACTIVIDAD CRUZADA

Se sometió a prueba un panel de 38 sueros que contenían sustancias potencialmente interferentes con la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag : anticuerpos antinucleares (n=10), factor reumatoide (n=9), anticuerpos heterófilos (n=9), sueros de pacientes afectados por un mieloma (n=10). También se sometió a prueba un panel de 162 sueros de pacientes afectados por otras enfermedades distintas al dengue (Nilo Oeste, fiebre amarilla, CMV, HSV, VZV, etc...). Las 200 muestras sometidas a prueba demostraron ser todas negativas con la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag.

9- LÍMITES DEL ENSAYO

El diagnóstico de una infección reciente por el virus del dengue sólo puede establecerse de manera definitiva por un conjunto de datos clínicos y biológicos. El resultado de un solo ensayo no constituye por sí mismo una prueba suficiente para el diagnóstico de una infección reciente.

10- CONTROL DE CALIDAD DEL FABRICANTE

Todos los productos fabricados y comercializados por la empresa Bio-Rad se someten a un control de calidad desde el momento de la recepción de las materias primas hasta la comercialización de los productos acabados. Todos los lotes de productos acabados son objeto de un control de calidad y sólo se comercializan cuando se ajustan a los criterios de aceptación. El fabricante conserva la documentación relativa a la producción y al control de los lotes.

11- REFERENCIAS

Ver la versión Inglesa.

BIO-RAD

PLATELIA™ DENGUE NS1 AG

96 TESTS

72830

**QUALITATIVER BZW. SEMIQUANTITATIVER
NACHWEIS DES DENGUE-VIRUS- NS1-ANTIGENS
IN HUMANSERUM ODER -PLASMA MITTELS
ENZYMIMMUNOASSAY**

IVD

1- KLINISCHE BEDEUTUNG

Dengue ist eine endemische Krankheit, die in tropischen und subtropischen Regionen der Welt auftritt. Sie gilt als bedeutendste arbovirale Erkrankung hinsichtlich Morbidität, Mortalität und sozio-ökonomischer Kosten. Die globale Prävalenz von Dengue hat in den letzten Jahrzehnten drastisch zugenommen. Dengue ist mittlerweile in mehr als 100 Ländern endemisch, 40% der Weltbevölkerung sind potentiell von dieser Erkrankung betroffen. Die Weltgesundheitsorganisation WHO schätzt, dass jährlich weltweit 50 bis 100 Millionen Menschen infiziert werden. Bei 250.000 /bis 500.000 Infizierten tritt die schwere Form der Erkrankung auf, und 24.000 Menschen sterben jährlich an Dengue.

Das Dengue-Virus wird von Stechmücken, hauptsächlich von den Arten *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus*, übertragen. Es gibt vier verschiedene Serotypen (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4). Nach einer Primärinfektion besteht lebenslange Immunität gegen den homologen Serotyp. Gegen die anderen drei Serotypen besteht im Fall einer Reinfektion (Sekundärinfektion) jedoch nur ein vorübergehender und unvollständiger Schutz.

Die Infektion mit dem Dengue-Virus kann ein breites Spektrum an Symptomen verursachen, von asymptomatischer Infektion, undifferenziertem Fieber und klassischem Dengue-Fieber (DG) bis hin zu schwereren Formen wie dem hämorrhagischen Dengue-Fieber (DHF) und dem Dengue-Schock-Syndrom (DSS) mit höheren Morbiditäts- und Mortalitätsraten. Bei Dengue-Fieber (DF) treten Fieber (über 3–5 Tage), Kopfschmerzen, Muskel- und Gelenkschmerzen sowie Hautausschläge auf. Die Patienten werden in der Regel jedoch wieder gesund. Bei DHF (hämorrhagisches Dengue-Fieber) oder DSS (Dengue-Schock-Syndrom), die hauptsächlich bei Patienten vorkommen, die bereits mit dem Virus infiziert waren, zeigen sich ähnliche Symptome wie beim Dengue-Fieber (DF). Im Verlauf der Krankheit kommt es jedoch zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und hämorrhagischen Symptomen, die zu einer Absenkung des Blutdrucks, Hypovolämie, Gefäßkollaps /und zum Tod führen können.

Die größte Schwierigkeit bei der Behandlung von infizierten Patienten besteht in dem schnellen und spezifischen Nachweis des Dengue-Virus während der akuten Phase, damit rechtzeitig eine klinische Behandlung eingeleitet werden kann. Durch die Isolierung und Identifikation des Virus bzw. den Nachweis der viralen Nukleinsäure ist eine frühe Diagnose während der febrilen Phase möglich.

Für beide Methoden wird jedoch ein spezialisiertes Labor benötigt. Die Ergebnisse liegen zudem nicht sofort vor. Der Nachweis Dengue-Virus-spezifischer Antikörper wird in der Regel für Routine-Untersuchungen verwendet. Die Antikörper treten jedoch erst nach Einsetzen der Symptome auf. Bei einer Primärinfektion treten IgM- bzw. IgG-Antikörper ca. 5 bzw. 14 Tage nach Einsetzen erster Symptome auf. Bei einer Sekundärinfektion sind die IgM-Werte niedrig oder nicht nachweisbar, während die IgG-Antikörper 1 bis 2 Tage nach Einsetzen der Symptome höhere Werte als bei einer Primärinfektion erreichen. Der Nachweis des nicht-strukturellen Proteins NS1 des Dengue-Virus in Patientenseren wurde als alternative Methode für eine frühe Diagnose beschrieben. Das NS1-Protein wurde ab dem ersten Tag und bis zu 9 Tage nach Einsetzen des Fiebers mit vergleichbaren Werten bei Primär- und Sekundärinfektionen nachgewiesen.

2- TESTPRINZIP

Platelia™ Dengue NS1 Ag ist ein Ein-Schritt-Sandwich-Mikrotiterplatten-Enzymimmunoassay für den qualitativen und semiquantitativen Nachweis des Dengue-Virus-Antigens NS1 in Humanserum oder -plasma. Der Test verwendet monoklonale Maus-Antikörper (MAb) für Bindung und Entwicklung. Die Proben und Kontrollen werden direkt und gleichzeitig mit dem Konjugat über 90 Minuten bei 37°C in den mit Mausantikörper sensibilisierten Mikrotiterplattenvertiefungen inkubiert. Sofern NS1-Antigen in der Probe vorhanden ist, bildet sich ein MAb-NS1-MAb/Peroxydase-Immunkomplex. Nach einem Waschschrift wird das Vorliegen von Immunkomplex durch Verteilung einer Chromogenlösung in alle Vertiefungen und eine einsetzende Farbentwicklungsreaktion sichtbar gemacht. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Enzymreaktion durch Zugabe einer Säurelösung gestoppt. Die mittels Spektrophotometer bei 450/620 nm abgelesene optische Dichte ist proportional zu der NS1-Antigen-Menge in der Probe. Das Vorliegen von NS1-Antigen in einer Probe wird durch den Vergleich der optischen Dichte der Probe mit der optischen Dichte des Kalibrator bestimmt.

3- PRODUKTINFORMATIONEN

Etikett		Art der Reagenzien	Darreichungsform
R1	Microplate	Mikrotiterplatte : (gebrauchsfertig): 12 Streifen à 8 Vertiefungen, beschichtet mit Anti-NS1-Maus-Antikörper, in vakuumversiegeltem Beutel	1
R2	Concentrated Washing Solution (20x)	Konzentrierte Waschlösung (20x) : TRIS-NaCl-Puffer (pH 7,4), 2% Tween® 20 Konservierungsmittel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 70 mL
R3	Negative Control	Negative Kontrolle : Humanserum, negativ für Dengue-NS1-Antigen Konservierungsmittel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R4	Calibrator	Kalibrator : TRIS-NaCl-Puffer (pH 8,0), Dengue-NS1-Antigen, Rinder-Serumalbumin, Glycerin, E102, E122 Konservierungsmittel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,5 mL
R5	Positive Control	Positive Kontrolle : TRIS-NaCl-Puffer (pH 8,0), Dengue-NS1-Antigen, Rinder-Serumalbumin, Glycerin, E102, E122 Konservierungsmittel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R6	Conjugate (50x)	Konjugat (50x) : Anti-NS1-Maus-Antikörper, gebunden an Meerrettich-Peroxidase. Konservierungsmittel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 0,5 mL
R7	Diluent	Verdünnungsmittel (gebrauchsfertig) : Phosphatpuffer, Tween® 20, fetales Kälberserum. Konservierungsmittel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 22 mL
R9	Chromogen TMB	Chromogen (gebrauchsfertig): 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (< 0,1%), H ₂ O ₂ (<1%)	1 x 28 mL
R10	Stopping Solution	Stopplösung (gebrauchsfertig): 1N Schwefelsäurelösung	1 x 28 mL
		Klebefolie.	4

Informationen zur Lagerung sowie das Verfallsdatum sind auf der Packung angegeben.

4- WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse hängt von der Einhaltung folgender GLP-Richtlinien ab :

- Die Reagenzien nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden.
- Keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen innerhalb einer Messreihe vermischen.

ANMERKUNG: Für die Waschlösung (R2, Etiketten-Kennung: 20x, grüner), Chromogen (R9, Etiketten-Kennung: TMB, türkis) und die Stopplösung (R10, Etiketten-Kennung: 1N, rot) können Chargen aus unterschiedlichen Kits miteinander verwendet werden, sofern dies entsprechende Reagenzien sind und immer die gleiche Charge für einen bestimmten Testansatz verwendet wird.

ANMERKUNG: Es ist nicht möglich einen anderen Waschpuffer (diluent R7) zu verwenden als der von der charge des jeweiligen Testkits.

ANMERKUNG: Außerdem kann die Waschlösung (R2, mit grüner Aufschrift 20X) mit zwei anderen Waschlösungen aus den Bio-Rad Reagens-Kits (R2, mit blauer oder orangener Aufschrift 10X) vermischt werden, nachdem sie sorgsam rekonstituiert worden sind. Je Testlauf darf jedoch nur eine Mischung verwendet werden.

- Die Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (+18-30°C) bringen.
- Reagenzien vorsichtig auflösen oder verdünnen und jegliche Kontamination vermeiden.
- Den Test nicht in Gegenwart reaktiver Dämpfe (von Säuren, Alkalien, Aldehyden) oder Staub durchführen. Die Enzymaktivität des Konjugats könnte dadurch beeinträchtigt werden.
- Wenn möglich, Einmalartikel verwenden. Glaswaren müssen vor Gebrauch gründlich gereinigt und mit entionisiertem Wasser gespült werden.
- Die Mikrotiterplatte zwischen dem Ende der Waschschriffe und dem Pipettieren der Reagenzien nicht austrocknen lassen.
- Die enzymatische Reaktion weist gegenüber Metallen oder Metallionen eine hohe Sensitivität auf. Daher dürfen Metallelemente nicht mit den verschiedenen Konjugat- und Substratlösungen in Berührung kommen.
- Die Chromogenlösung (R9) sollte farblos sein. Ist eine Blaufärbung sichtbar, darf das Reagenz nicht verwendet und muss ersetzt werden.
- Bei jeder neuen Probe die Pipettenspitze wechseln.
- Sorgfältiges Waschen der Mikrotiterplatte ist von wesentlicher Bedeutung. Die vorgeschriebene Zahl der Waschzyklen ist unbedingt einzuhalten.

Weiterhin ist darauf zu achten, dass alle Vertiefungen vollständig gefüllt und danach wieder vollständig geleert werden. Nicht korrekt durchgeführte Waschschriffe können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

- Niemals dasselbe Gefäß für Konjugat- und Entwicklungslösung verwenden.
- Pipetten und Geräte auf Genauigkeit und korrekte Funktion prüfen.
- Die Testdurchführung nicht ändern.

SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

- Das Humanmaterial zur Vorbereitung der Reagenzien wurde getestet und als nicht reaktiv für Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBs Ag), Antikörper gegen das Hepatitis-C-Virus (anti-HCV) und gegen das humane Immundefizienz-Virus (anti-HIV1 und anti-HIV2) befunden. Da keine der bekannten Testmethoden gewährleisten kann, dass keine infektiösen Erreger vorhanden sind, sollte mit Reagenzien menschlichen Ursprungs und Patientenproben so umgegangen werden, als könnten Sie Infektionen übertragen.
- Alle Materialien einschließlich der Waschlösung, die mit Proben und Reagenzien, die Humanmaterial enthalten, in Berührung kommen, sollten als potentiell infektiös betrachtet werden.
- Beim Arbeiten mit den Reagenzien sind Einweghandschuhe zu tragen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Probenspritzer bzw. Spritzer probenhaltiger Lösungen vermeiden. Spritzer müssen mit 10%iger Natriumhypochloritlösung behandelt werden. Ist die verunreinigende Lösung eine Säure, die Oberflächen zunächst mit Natriumbicarbonat neutralisieren, dann mit 10%iger Natriumhypochloritlösung reinigen und mit Papiertüchern abtrocknen. Das zum Reinigen verwendete Material ist in einem Behälter für biologischen Abfall zu entsorgen.
- Proben, die Humanmaterial enthalten, sowie kontaminierte Materialien und Produkte sollten nach einer Dekontaminierung entsorgt werden, und zwar entweder durch Eintauchen in Natriumhypochloritlösung mit einer Natriumhypochlorit-Endkonzentration von 5% für die Dauer von 30 Minuten oder durch Autoklavieren bei 121°C für mindestens 2 Stunden. Autoklavieren für mindestens 1 Stunde bei 121°C ist die beste Methode zum Inaktivieren der HIV- und HB-Viren.

VORSICHT: Natriumhypochlorithaltige Lösungen nicht in den Autoklaven stellen

- Jeglicher Haut- und Schleimhautkontakt mit dem Substratpuffer, dem Chromogen und der Stopplösung ist zu vermeiden (Vergiftungs-, Reizungs- oder Verbrennungsgefahr).
- Chemikalien müssen gemäß den GLP-Richtlinien verwendet und entsorgt werden.

Vorsicht: Einige Reagenzien enthalten < 1,5% ProClin™ 300



Xi - Reizend

R43: Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.

S28-37: Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser und Seife abwaschen. Geeignete Schutzhandschuhe tragen.

5- ENTNAHME, VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER PROBEN

1. Empfohlene Probenmaterialien: Serum oder Plasma (EDTA, Citrat und Heparin).
2. Folgende Empfehlungen für die Handhabung, Vorbereitung und Lagerung der Blutproben beachten:
 - Alle Blutproben unter Beachtung der üblichen Vorsichtsmaßnahmen für Venenpunktion entnehmen.
 - Serumproben vor dem Zentrifugieren vollständig gerinnen lassen.
 - Probenröhrchen stets verschlossen halten.
 - Nach dem Zentrifugieren Serum oder Plasma vom Blutkuchen bzw. den Erythrozyten trennen und in einem fest verschlossenen Röhrchen aufbewahren.
 - Die Proben können bei +2-8°C aufbewahrt werden, sofern sie innerhalb von 24 Stunden getestet werden.
 - Wird der Test nicht innerhalb von 24 Stunden durchgeführt bzw. für den Versand die Proben bei -20°C oder kälter einfrieren.
 - Keine Proben verwenden, die mehr als dreimal eingefroren wurden. Zuvor tiefgefrorene Proben sollten nach dem Auftauen und vor der Analyse gründlich gemischt werden.
3. Proben mit einem Bilirubingehalt bis 100 mg/L sowie lipämische Proben mit einem Trioleingehalt (Triglyzeridgehalt) bis 36 g/L beeinträchtigen die Ergebnisse nicht. Ein Albumingehalt von 90 g/L oder hämolysierte Proben mit 10 mg/mL Hämoglobin können potentiell zu einem erhöhten Verhältnis negativer Proben führen.
4. Proben nicht erhitzen.

6- TESTVERFAHREN

6.1. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Rührgerät Typ Vortex.
- Mikrotiterplatten-Leser mit 450 nm- und 620 nm-Filtern (*).
- Wasserbad oder entsprechender Mikrotiterplatten-Inkubator mit Thermostat, auf 37°C ± 1°C einstellbar (*).
- Manuelles, halbautomatisches oder automatisches Waschsystem für Mikrotiterplatten (*).

- Behälter für infektiösen Abfall.
- Natriumhypochloritlösung (Natronbleichlaug) und Natriumbicarbonat.
- Steriles destilliertes oder entionisiertes Wasser.
- Messzylinder der Größe 25 mL, 50 mL, 100 mL und 1000 mL.
- Einmal-Latexhandschuhe.
- Schutzbrille.
- Saugfähige Papiertücher.
- Automatische oder halbautomatische, einstellbare oder voreingestellte Pipetten oder Multipipetten zum Abmessen von 50 μ L, 100 μ L, 300 μ L und 1000 μ L.
- Einmalröhrchen.

(*) Wenden Sie sich an unseren Kundendienst für detaillierte Informationen zu den empfohlenen Materialien.

6.2. REKONSTITUTION DER REAGENZIEN

- **R1** : Vor dem Öffnen des Beutels diesen auf Raumtemperatur (+18-30°C) bringen. Unbenutzte Streifen sofort wieder zurück in die Packung stecken. Prüfen, ob Trockenmittel in dem Beutel vorhanden ist. Den Beutel wieder sorgfältig verschließen und bei +2-8°C lagern.
- **R2** : Die Waschlösung R2 im Verhältnis 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnen: Um die gebrauchsfertige Waschlösung herzustellen, zum Beispiel 50 mL R2 mit 950 mL destilliertem Wasser verdünnen. Wenn manuell gewaschen wird, 350 mL verdünnte Waschlösung für eine Platte mit 12 Streifen vorbereiten.
- **R6+R7** : Das Konjugat (R6) ist 50fach konzentriert und muss vor Gebrauch homogenisiert werden. Im Verhältnis 1:50 mit Verdünnungsmittel (R7) verdünnen. Für einen Streifen 20 μ l R6 mit 1,0 mL R7 verdünnen. Diese Volumina für eine Mikrotiterplatte mit 12 multiplizieren.

6.3. LAGERUNG GEÖFFNETER BZW. REKONSTITUIERTER REAGENZIEN

Das Kit bei +2-8°C lagern. Bei dieser Lagertemperatur können alle Kitkomponenten bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

- **R1** : Nach dem Öffnen bleiben die Streifen bis zu sechs Wochen haltbar, sofern sie im sorgfältig wieder verschlossenen Beutel mit Trockenmittel bei +2-8°C gelagert werden.
- **R2** : Nach der Verdünnung kann die Waschlösung bei +2-30°C 2 Wochen lang aufbewahrt werden. Die konzentrierte Waschlösung kann bei +2-30°C ohne Kontamination bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum aufbewahrt werden.

- **R6+R7** : Nach Verdünnung ist die rekonstituierte Lösung bei Raumtemperatur (+18-30°C) 8 Stunden haltbar.
- **R3, R4, R5, R6, R7, R10** : Nach dem Öffnen sind die bei +2-8°C gelagerten Reagenzien ohne Kontamination bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- **R9**: Nach dem Öffnen ist das bei +2-8°C gelagerte Reagenz ohne Kontamination bis zu zwei Monate haltbar.

6.4. TESTDURCHFÜHRUNG

Die vorliegende Beschreibung ist strikt zu befolgen.

Die Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (+18-30°C) bringen.

Um die Ergebnisse zu validieren, in jeder Messreihe eine negative Kontrolle (R3), zwei Kalibratoren (R4) und eine positive Kontrolle (R5) verwenden.

1. Probenverteilung und Identifikationsplan für Kalibrator, Kontrollen und Testproben (S1, S2...) sorgfältig wie unten beschrieben festlegen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5										
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

2. Rahmen und Streifen (R1) aus der Schutzhülle nehmen (*siehe Abschnitt 6.2*).
3. Unter strikter Einhaltung der Reihenfolge nacheinander wie folgt in alle Vertiefungen pipettieren:
 - 50 µL Verdünnungsmittel (R7)
 - 50 µL Probe (Kalibrator, Kontrolle oder Patientenprobe)
 - 100 µL verdünntes Konjugat (R6+R7)

BITTE BEACHTEN: Die Verteilung von Verdünnungsmittel, Probe und Konjugat kann bei diesem Schritt optisch kontrolliert werden: Bei Zugabe der unverdünnten Probe zum Verdünnungsmittel kommt es zu einer Farbänderung von gelb in orange. Nach Zugabe des Konjugates erfolgt eine Farbänderung von orange in grün. Bei Verwendung von verdünnten Proben kann diese optische Kontrolle ineffizient sein.

4. Die Mikrotiterplatte mit Folie abdecken und fest auf die Platte drücken, damit sie fest versiegelt ist.
5. Die Mikrotiterplatte in einem Wasserbad mit Temperaturregelung oder in einem Mikrotiterplatten-Inkubator bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 90 ± 5 Minuten lang inkubieren.
6. Die verdünnte Waschlösung (R2) vorbereiten (*siehe Abschnitt 6.2*).
7. Nach Beendigung der Inkubationsphase die Klebefolie entfernen. Den Inhalt aller Vertiefungen in einen Behälter für infektiöse Abfälle (mit Natriumhypochlorit) absaugen. Die Mikrotiterplatte 6 Mal mit Waschlösung (R2) waschen. Die Mikrotiterplatte umdrehen und vorsichtig mit Papiertüchern abtupfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Anmerkung: Während des Ansaugens und der Waschschriffe Reagenzspritzer vermeiden.
8. 200 μL Chromogenlösung (R9) schnell und unter Lichtausschluss in alle Vertiefungen pipettieren. Für die Entwicklung der Reaktion die Platte lichtgeschützt bei Raumtemperatur ($+18\text{-}30^\circ\text{C}$) 30 ± 5 Minuten stehen lassen. Während dieser Inkubation keine Folie verwenden.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 μL Stopplösung (R10) in jede Vertiefung stoppen. In der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitrahmen wie die Entwicklungslösung verteilen.
10. Den Boden der Platte sorgfältig abwischen. Die Extinktion bei 450/620 nm innerhalb von 30 Minuten nach Abstoppen der Reaktion messen (die Streifen müssen vor dem Ablesen lichtgeschützt aufbewahrt werden).
11. Alle Ergebnisse hinsichtlich der Übereinstimmung zwischen den Werten sowie gegen die Platten- und Probenverteilung und den Identifikationsplan prüfen.

7- BERECHNUNG UND AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

7.1. BERECHNUNG DES GRENZWERTS

Der Grenzwert GW entspricht dem Mittelwert der optischen Dichte der in Doppelbestimmung getesteten Grenzwertkalibrator (R4).

7.2. BERECHNUNG DES PROBENVERHÄLTNISSSES

Das Probenverhältnis wird als Verhältnis unter Verwendung der folgenden Formel ausgedrückt, in der S die optische Dichte (OD) der Probe ist:

- Probenverhältnis = S/GW

7.3. QUALITÄTSKONTROLLE

Für die Validierung des Tests müssen folgende Kriterien erfüllt werden:

- Werte der optischen Dichte :
 - Grenzwert $> 0,200$

- Verhältnis :
 - Verhältnis von $R3 < 0,4$ (Verhältnis von $R3 = OD_{R3} / GW$)
 - Verhältnis von $R5 > 1,5$ (Verhältnis von $R5 = OD_{R5} / GW$)

Werden diese Spezifikationen nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

7.4. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Auswertung der Ergebnisse finden Sie in der folgenden Tabelle.

Probenverhältnis	Ergebnis	Auswertung
Verhältnis $< 0,50$	Negativ	Die Probe wird als nicht-reaktiv für Dengue-NS1-Antigen betrachtet.
$0,50 \leq$ Verhältnis $< 1,00$	Nicht eindeutig	Die Probe wird als nicht eindeutig für Dengue-NS1-Antigen betrachtet.
Verhältnis $\geq 1,00$	Positiv	Die Probe wird als reaktiv für Dengue-NS1-Antigen betrachtet.

Anmerkung : ODs von stark reaktiven Proben können die maximal auf einem Spektrophotometer ablesbare OD erreichen.

7.5. FEHLERBEHEBUNG

Nicht validierte oder nicht reproduzierbare Reaktionen haben häufig folgende Ursachen:

- Unzureichendes Waschen der Mikrotiterplatte.
- Verunreinigung der negativen Proben durch Serum oder Plasma mit hoher Konzentration.
- Verunreinigung der Entwicklungslösung durch Oxidationsmittel (Natronbleichlauge, Metallionen usw.).
- Verunreinigung der Stopplösung.

8- LEISTUNGSMERKMALE

8.1. SENSITIVITÄT – SPEZIFITÄT

• Sensitivität

Die Sensitivität wurde anhand von 177 retrospektiv untersuchten Seren von Patienten mit akuter, durch RT-PCR bestätigter Dengue-Infektion bestimmt. Bei diesem Panel war der Platelia™ Dengue NS1 Ag Assay in 91% der Fälle positiv (95%iges Konfidenzintervall: 85,8%-94,8%). Zum Vergleich: Bei einem im Handel erhältlichen Dengue IgM EIA lag die Sensitivität bei 17,5%.

Die Sensitivität war in IgG-negativen Proben von Primärinfektionen (Sensitivität 98,5%, n = 66) signifikant höher als bei IgG-positiven Proben (Sensitivität 85,6%, n = 90) (χ^2 Test, p = 0,004).

Wie in Tabelle 1 beschrieben wurde hinsichtlich der verschiedenen Dengue-Serotypen kein signifikanter Unterschied beobachtet:

Tabelle 1 : Sensitivität von Platelia™ Dengue NS1 Ag hinsichtlich der verschiedenen Virus-Serotypen (n=177).

Serotyp	Anzahl der Seren	Sensitivität von Platelia™ Dengue NS1 Ag (95% KI)
1	93	88,9% (85,8% - 94,8%)
2	31	87,1% (70,1% - 96,3%)
3	24	100,0% (85,6% - 100,0%)
4	29	93,3% (77,9% - 97,9%)

Die Sensitivität von Platelia™ Dengue NS1 Ag wurde mit Seren von Patienten bestimmt, bei denen das Einsetzen des Fiebers dokumentiert war. Die höchste Sensitivität wird erreicht, sobald die klinischen Symptome aufgetreten sind. Während der febrilen Phase bleibt die Sensitivität hoch (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 : Sensitivität von Platelia™ Dengue NS1 Ag hinsichtlich des Auftretens klinischer Symptome (n=177).

Tage nach Einsetzen des Fiebers	Anzahl der Seren	Sensitivität von Platelia™ Dengue NS1 Ag	Sensitivität von Dengue IgM EIA
0	10	100,0%	0,0%
1	33	87,8%	5,1%
2	40	92,5%	6,1%
3	20	95,0%	15,0%
4	27	96,3%	48,1%
5	19	52,6%	94,1%
≥ 6	28	35,7%	100,0%

• Spezifität

Die Spezifität wurde anhand von 618 Proben (Proben von 563 Blutspendern und 55 Krankenhauspatienten) bestimmt. In der untersuchten Population wurden keine positiven Ergebnisse ermittelt. Dies ergab eine Spezifität von 100,0% (95%iges Konfidenzintervall: 99,4% - 100,0%).

8.2. PRÄZISION

• Interassay-Präzision (Reproduzierbarkeit)

Zur Bestimmung der Intraassay-Reproduzierbarkeit wurden 3 positive und 1 negative Probe 30mal in einer Messreihe getestet. Für jede Probe wurde das Verhältnis (S/GW) bestimmt. In Tabelle 3 sind das mittlere Verhältnis, die Standardabweichung (SA) und der Variationskoeffizient (VK%) für jede der vier Proben angegeben.

Tabelle 3 : Intraassay-Präzision.

N=30	Negative Probe	Schwach positive Probe	Mäßig positive Probe	Stark positive Probe
	Verhältnis (Probe/Grenzwert)			
Grenzwert	0,10	1,32	3,79	6,24
Standardabweichung	0,01	0,08	0,29	0,45
VK %	13,1	6,2	7,7	7,2

• Interassay-Präzision (Reproduzierbarkeit)

Zur Bestimmung der Interassay-Reproduzierbarkeit wurde jede der 4 Proben (1 negative und 3 positive Proben) in Doppelbestimmung in zwei Messreihen pro Tag über einen Zeitraum von 20 Tagen getestet. Für jede Probe wurde das Verhältnis (S/GW) bestimmt. In Tabelle 4 sind das mittlere Verhältnis, die Standardabweichung (SA) und der Variationskoeffizient (VK%) für jede der vier Proben angegeben.

Tabelle 4: Interassay-Präzision.

N=40	Negative Probe	Schwach positive Probe	Mäßig positive Probe	Stark positive Probe
	Verhältnis (Probe /Grenzwert)			
Grenzwert	0,10	1,17	3,85	6,20
Standardabweichung	0,03	0,21	0,67	0,96
VK %	33,8	17,8	17,4	15,5

8.3. KREUZREAKTIVITÄT

Ein Panel mit 38 Seren mit potentiell interferierenden Substanzen wie antinukleäre Antikörper (n=10), Rheumafaktor (n=9), heterophile Antikörper (n=9) sowie Proben von Patienten mit Myelom (n=10) wurden mit Platelia Dengue NS1 Ag getestet. Ein weiteres Panel mit 162 Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen als Dengue (West-Nile-Fieber, Gelbfieber, CMV, HSV, VZV, usw.) wurde ebenfalls getestet. Alle 200 Proben wurden mit Platelia™ Dengue NS1 Ag als negativ befunden.

9- GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Diagnose einer zurückliegenden Infektion mit dem Dengue-Virus kann nur auf der Basis von klinischen und serologischen Daten gestellt werden. Das Ergebnis einer einzelnen Probe stellt keinen ausreichenden Beweis für die Diagnose einer rezenten Infektion dar.

10- QUALITÄTSKONTROLLE DES HERSTELLERS

Alle von der Firma Bio-Rad hergestellten Reagenzien unterliegen einem Qualitätssicherungssystem vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte. Jede Fertigproduktcharge wird einer Qualitätskontrolle unterzogen und nur dann verkauft, wenn sie den Freigabekriterien entspricht. Die Unterlagen bezüglich Herstellung und Kontrolle der einzelnen Chargen werden bei Bio-Rad aufbewahrt.

11- LITERATUR

Siehe Englische Version.

BIO-RAD

PLATELIA™ DENGUE NS1 AG

96 TESTS

72830

**RIVELAZIONE QUALITATIVA O SEMI-QUANTITATIVA
DELL'ANTIGENE NS1 DEL VIRUS DELLA DENGUE
NEL SIERO O NEL PLASMA UMANO MEDIANTE
DOSAGGIO IMMUNOENZIMATICO**

IVD

1- INTERESSE CLINICO

La dengue è una malattia endemica presente in tutte le zone tropicali e subtropicali del mondo. È considerata la più importante delle arbovirosi in termini di morbilità, mortalità e di impatto socio-economico. La prevalenza totale della dengue è aumentata drasticamente negli ultimi anni e la malattia è ormai endemica in oltre 100 paesi, dove interessa potenzialmente il 40% della popolazione mondiale. L'Organizzazione Mondiale della Sanità stima che ogni anno vi sono tra i 50 e i 100 milioni di casi di infezione da virus della dengue, che provocano tra i 250.000 e i 500.000 casi di forme gravi e 24.000 decessi.

Il virus della dengue si trasmette attraverso le zanzare appartenenti principalmente alle specie *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Ne esistono quattro distinti sierotipi (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4). L'infezione primaria da virus della dengue comporta un'immunità protettiva definitiva rispetto al sierotipo omologo, ma conferisce solo una protezione parziale e passeggera contro gli altri tre sierotipi in caso di nuova infezione (infezione secondaria).

L'infezione da virus della dengue può presentare diversi quadri clinici, che vanno dall'infezione asintomatica, alla febbre indifferenziata o la classica dengue febbrile, alle forme più gravi come la dengue emorragica e la dengue con sindrome di choc, per le quali si osservano tassi elevati di morbilità e mortalità. La dengue è caratterizzata da febbre della durata da 3 a 5 giorni, mal di testa, dolori muscolari e articolari, rash cutaneo, ma in generale con esito positivo per il paziente. La dengue emorragica e la dengue con sindrome di choc si riscontrano soprattutto in pazienti infettati in precedenza dal virus. I sintomi sono simili a quelli della dengue febbrile, ma si accompagnano anche a un aumento della permeabilità vascolare e a segni di emorragia che portano a ipotensione, ipovolemia, collasso vascolare e decesso del paziente.

La sfida principale associata al trattamento di pazienti infetti consiste nella rapidità e specificità della rivelazione del virus della dengue durante la fase acuta, in modo da adottare un trattamento efficace il più rapidamente possibile. L'isolamento e l'identificazione del virus o la rivelazione dell'acido nucleico del virus stesso consentono una diagnosi precoce durante la fase febbrile, ma questi metodi necessitano di un ambiente di laboratorio specializzato e non si ottengono risultati immediati. La rivelazione degli anticorpi specifici diretti contro il virus della dengue costituisce il metodo classicamente utilizzato di routine.

Tuttavia, tali anticorpi compaiono solo dopo l'apparizione dei primi sintomi. Nel corso dell'infezione primaria, gli anticorpi di tipo IgM e IgG aumentano rispettivamente 5 e 14 giorni dopo l'apparizione dei primi sintomi. Nel corso dell'infezione secondaria, i tassi di IgM sono bassi addirittura non rilevabili, mentre le IgG aumentano da 1 a 2 giorni dopo l'apparizione dei sintomi con tassi molto più elevati rispetto a quelli osservati nel corso di un'infezione primaria. In tempi più recenti, la rivelazione della proteina non strutturale del virus, la NS1, nel siero di pazienti è stata descritta come un metodo alternativo per la diagnosi precoce dell'infezione. L'antigene NS1 si riscontra nella circolazione fin dal primo giorno e fino al nono successivo alla comparsa della febbre e i tassi osservati sono comparabili nelle forme primarie e secondarie dell'infezione.

2- PRINCIPIO

Il test Platelia™ Dengue NS1 Ag è un metodo di dosaggio immunoenzimatico a sandwich, in formato micropiastra, per la rivelazione qualitativa o semi-quantitativa dell'antigene NS1 del virus della dengue nel siero o nel plasma umano. Il test utilizza anticorpi monoclonali di topo (AcM) per la cattura e rivelazione.

I campioni di pazienti i controlli vengono incubati direttamente e contemporaneamente con il coniugato per 90 minuti a 37 °C nei pozzetti della micropiastra sensibilizzata con gli AcM. In presenza dell'antigene NS1 nel campione, si forma un complesso immune AcM - NS1 - AcM/perossidasi. Dopo i lavaggi praticati alla fine dell'incubazione, la presenza del complesso immune viene rivelata mediante l'aggiunta in ciascun pozzetto di una soluzione di rivelazione enzimatica che induce lo sviluppo di una reazione colorata. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la reazione enzimatica viene bloccata mediante l'aggiunta di una soluzione di acido. La densità ottica ottenuta a 450/620 nm è proporzionale alla quantità di antigene NS1 presente nel campione testato. La presenza dell'antigene NS1 in un singolo campione è determinata per confronto della densità ottica letta su detto campione e quella ottenuta sul siero con valore calibratore.

3- COMPOSIZIONE DEL KIT

Etichettatura	Natura dei reagenti	Presentazione
R1	Microplate Micropiastra (pronta per l'uso): 12 strip da 8 pozzetti sensibilizzati con AcM anti NS1, in bustine sigillate sotto vuoto	1
R2	Concentrated Washing Solution (20x) Soluzione di lavaggio concentrata (20x): Tampone TRIS-NaCl (pH 7,4), 2% Tween® 20 Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 70 mL
R3	Negative Control Controllo negativo : Siero umano negativo per l'antigene Dengue NS1. Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R4	Calibrator Calibratore : Tampone TRIS-NaCl buffer (pH 8,0), antigene Dengue NS1, siero di albumina bovina, glicerolo, E102, E122 Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,5 mL
R5	Positive Control Controllo positivo : Tampone TRIS-NaCl buffer (pH 8,0), antigene Dengue NS1, siero di albumina bovina, glicerolo, E102, E122 Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R6	Conjugate (50x) Coniugato (50x) : AcM anti NS1 legato alla perossidasi Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 0,5 mL
R7	Diluent Diluente (pronto per l'uso) : Tampone fosfato, Tween® 20, siero fetale di vitello. Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 22 mL
R9	Chromogen TMB Cromogeno (Pronto per l'uso): 3.3'.5.5' tetrametilbenzidina (< 0,1%), H ₂ O ₂ (<1%)	1 x 28 mL
R10	Stopping Solution Soluzione bloccante (pronta per l'uso): Acido solforico 1N	1 x 28 mL
	Pellicole adesive	4

Per le condizioni per la conservazione e le date di scadenza dei reagenti fare riferimento alle indicazioni riportate sulla confezione.

4- PRECAUZIONI D'IMPIEGO

La qualità dei risultati dipende dal rispetto delle buone pratiche di laboratorio di seguito riportate:

- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.
- Non mescolare né associare, durante uno stesso test, i reagenti prelevati da kit con numeri di lotto diversi.

OSSERVAZIONE: *per la soluzione di lavaggio (R2, identificativo etichetta: 20x color verde), il Cromogeno (R9, identificativo etichetta: TMB color turchese) e la soluzione bloccante (R10, identificativo etichetta: 1N color rosso) è possibile utilizzare lotti diversi da quelli contenuti nel kit, a condizione che i reagenti siano strettamente equivalenti e venga utilizzato un unico lotto in una stessa seduta analitica.*

OSSERVAZIONE : *Non è possibile utilizzare il Diluente (R7) di lotti diversi da quello fornito con il Kit.*

OSSERVAZIONE: *Inoltre, la Soluzione di Lavaggio (R2, identificazione dell'etichetta : 20X di colore verde) può essere miscelata con le altre 2 soluzioni di lavaggio incluse in vari kit di reattivi Bio-Rad (R2, identificazioni delle etichette : 10x di colore blu o 10x di colore arancione) una volta adeguatamente ricostituite, a condizione che all'interno di una seduta analitica venga utilizzata solo una miscela.*

- Prima dell'uso, attendere che i reagenti abbiano raggiunto la temperatura ambiente (+18- 30°C).
- Ricostituire o diluire con cura i reagenti evitando qualunque contaminazione.
- Non eseguire il test in presenza di vapori reattivi (acidi, alcalini, aldeidi) o di polveri che potrebbero alterare l'attività enzimatica del coniugato.
- Utilizzare recipienti di vetro perfettamente lavati e risciacquati con acqua distillata o preferire materiale mono-uso.
- Non lasciare asciugare la piastra tra la fine dei lavaggi e la distribuzione dei reagenti.
- La reazione enzimatica è molto sensibile a tutti i metalli o ioni metallici. Di conseguenza, nessun elemento metallico deve venire a contatto con le diverse soluzioni contenenti il coniugato o la soluzione substrato.
- La soluzione di cromogeno (R9) deve essere incolore. La colorazione blu indica che il reagente non può essere utilizzato, pertanto dovrà essere sostituito.
- Utilizzare un puntale nuovo per ciascun siero.

- Il lavaggio dei pozzetti costituisce una fase essenziale della procedura: rispettare il numero di cicli di lavaggio prescritti e assicurarsi che tutti i pozzetti siano completamente riempiti, poi svuotarli. Un lavaggio eseguito in modo non corretto può produrre risultati non accurati.
- Non utilizzare mai lo stesso recipiente per dispensare il coniugato e la soluzione di rivelazione.
- Verificare la precisione delle pipette e il buon funzionamento degli strumenti utilizzati.
- Non modificare la procedura operativa.

ISTRUZIONI PER L'IGIENE E LA SICUREZZA

- I materiali di origine umana utilizzati nella preparazione dei reagenti sono stati sottoposti a test ed sono risultati non reattivi all'antigene di superficie del virus dell'epatite B (Ag HBs), agli anticorpi diretti contro il virus dell'epatite C (anti HCV) e agli anticorpi diretti contro il virus dell'immunodeficienza umana (anti HIV1 e anti HIV2). Poiché nessun metodo può dare la certezza assoluta dell'assenza di agenti infettivi, considerare sia i reagenti di origine umana sia tutti i campioni prelevati dai pazienti come potenzialmente infettivi e maneggiarli con le precauzioni d'uso.
- Considerare sia il materiale a diretto contatto con i campioni e i reagenti di origine umana sia le soluzioni di lavaggio come prodotti contaminati.
- Durante la manipolazione dei reagenti indossare guanti monouso.
- Non pipettare con la bocca.
- Evitare schizzi di campioni o di soluzioni che li contengono. Le superfici sporche devono essere pulite con candeggina diluita al 10%. Se il liquido contaminante è un acido, le superfici sporche devono essere neutralizzate prima con bicarbonato di sodio, poi lavate con candeggina e asciugate con carta assorbente. Il materiale utilizzato per pulire dovrà essere gettato in un contenitore speciale per residui contaminati.
- I campioni di origine umana così come il materiale e i prodotti contaminati dovranno essere eliminati dopo essere stati decontaminati, o per immersione in candeggina in concentrazione finale pari al 5% di ipoclorito di sodio per 30 minuti, oppure mediante autoclavaggio a 121°C per almeno 2 ore. L'autoclavaggio a 121 °C, per almeno un'ora, è il migliore procedimento per l'inattivazione del virus HIV e del virus dell'epatite B.

ATTENZIONE: Non introdurre nell'autoclave soluzioni contenenti ipoclorito di sodio.

- Evitare qualunque contatto del tampone substrato, del cromogeno e della soluzione bloccante con la pelle e le mucose (rischio di tossicità, irritazioni e ustioni).
- La manipolazione e l'eliminazione dei prodotti chimici devono essere effettuate attenendosi alle buone pratiche di laboratorio.

Attenzione: alcuni reagenti contengono ProClin™ 300 < 1,5%



Xi - Irritante

R43: Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle
S28-37: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e sapone. Usare guanti adatti.

5- PRELIEVO, PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

1. I test vengono eseguiti su campioni di siero o su campioni di plasma prelevati con EDTA, citrato o eparina.
2. Rispettare le istruzioni seguenti per il prelievo, il trattamento e la conservazione dei suddetti campioni:
 - Prelevare i campioni di sangue secondo le pratiche d'uso.
 - Per i prelievi con il siero, prima della centrifugazione, attendere che il coagulo sia completamente formato.
 - Conservare le provette chiuse.
 - Dopo la centrifugazione, estrarre il siero o il plasma e conservarlo in una provetta chiusa.
 - I campioni devono essere conservati a +2-8 °C se il test viene eseguito entro 24 ore.
 - Se il test non è completato entro le 24 ore, o per i campioni da spedire, è preferibile congelare i campioni a -20 °C (o a temperature inferiori).
 - I campioni sottoposti a più di tre cicli di congelamento/scongelo non devono essere utilizzati. Prima di essere testati, i campioni dovranno essere omogeneizzati con cura (vortex) dopo essere stati scongelati.
3. I risultati non sono influenzati dalla presenza di campioni contenenti 100 mg/l di bilirubina e di campioni lipemici contenenti l'equivalente di 36 g/l di trioleina (trigliceridi). Un aumento del rapporto dei campioni negativi è possibile in presenza di concentrazioni di albumina da 90 g/l o su campioni emolizzati contenenti 10 mg/mL di emoglobina.
4. Non riscaldare i campioni.

6- PROCEDURA OPERATIVA

6.1. MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO

- Agitatore tipo vortice.
- Apparecchio per la lettura di micropiastre (dotato di filtri da 450/620 nm). (*)
- Bagnomaria o incubatore a secco per micropiastre dotato di termostato a 37±1 °C. (*)
- Dispositivo per il lavaggio a mano, semi-automatico o automatico per micropiastre. (*)
- Contenitore per rifiuti contaminati.

- Ipoclorito di sodio (candeggina) e bicarbonato di sodio.
- Acqua distillata o deionizzata sterile.
- Provette graduate da 25 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL.
- Guanti monouso.
- Occhiali di protezione.
- Carta assorbente.
- Pipette o pipette multiple, automatiche o semi-automatiche, regolabili o fisse atte a distribuire da 50 μ L, 100 μ L, 300 μ L e 1000 μ L.
- Provette monouso.

(*) Consultateci per informazioni precise riguardo agli apparecchi approvati dai nostri servizi tecnici.

6.2. RICOSTITUZIONE DEI REAGENTI

- **R1** : Prima di aprire la bustina, lasciare che torni a temperatura ambiente (18-30 °C). Riporre immediatamente nella bustina le strip non utilizzate controllando che ci sia l'essiccante. Richiudere con cura la bustina e conservarla a +2-8 °C.
- **R2** : Diluire in rapporto 1/20 la soluzione di lavaggio R2 in acqua distillata: ad esempio 50 mL di R2 e 950 mL di acqua distillata per ottenere la soluzione di lavaggio pronta per l'uso. Preparare 350 mL di soluzione di lavaggio diluita per una piastra da 12 strip in caso di lavaggio manuale.
- **R6+R7** : Il coniugato (R6) si presenta in forma liquida, concentrato 50 volte. Omogeneizzare prima dell'uso. Diluire a 1:50 con il diluente (R7). Per una strip, diluire 20 μ L di R6 qsp. 1,0 mL di R7. Moltiplicare i volumi per 12 per una piastra completa.

6.3. CONSERVAZIONE DEI REAGENTI APERTI E/O RICOSTITUITI

Il kit deve essere conservato a 2-8°C. Se viene conservato a 2-8°C prima dell'apertura, ogni componente può essere utilizzato fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta riportata sul kit.

- **R1** : Una volta aperte, le strip conservate nella bustina ben chiusa rimangono stabili per 6 settimane a +2-8 °C (verificare la presenza di essiccante).
- **R2** : Dopo la diluizione, la soluzione di lavaggio si conserva per 2 settimane a +2-8 °C. In assenza di contaminazioni, la soluzione di lavaggio concentrata può essere conservata a +2-25 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
- **R6+R7** : Dopo la diluizione, la soluzione ricostituita è stabile per 8 ore a temperatura ambiente (+18-30 °C).
- **R3, R4, R5, R6, R7, R10** : Una volta aperti e in assenza di contaminazioni, i reagenti conservati a +2-8 °C si mantengono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

- **R9:** Dopo l'apertura e in assenza di contaminazione, i reagenti conservati a 2-8°C mantengono la stabilità fino a 8 settimane.

6.4. PROCEDURA

Attenersi rigorosamente al protocollo proposto.

Prima dell'uso, attendere che tutti i reagenti abbiano raggiunto la temperatura ambiente (+18-30 °C).

Utilizzare un controllo negativo (R3), due calibratori (R4) e un controllo positivo (R5) in ciascun ciclo per convalidare i risultati del dosaggio.

1. Stabilire accuratamente il piano di distribuzione e di identificazione dei campioni dei calibratori, dei controlli e dei pazienti (S1, S2, ecc.) secondo la tabella di seguito riportata:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5										
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

2. Estrarre il telaio supporto e le strip (R1) dall'imballaggio di protezione (fare riferimento al capitolo 6.2).
3. Seguire rigorosamente la sequenza di distribuzione seguente distribuendo successivamente nei pozzetti:
 - 50 µL di diluente (R7)
 - 50 µL di campioni (calibratori, controlli o pazienti)
 - 100 µL del coniugato diluito (R6+R7)

N.B : In questa fase del protocollo, la distribuzione del diluente, dei campioni e del coniugato può essere controllata ad occhio nudo. L'aggiunta del campione puro al diluente comporta un cambiamento di colore dal giallo all'arancione. L'aggiunta del coniugato comporta in seguito un cambiamento di colore dall'arancione al verde. Questo controllo può non essere efficace in caso di utilizzo di campioni diluiti.

4. Ricoprire la micropiastra con una pellicola autoadesiva esercitando una pressione omogenea su tutta la superficie per assicurare l'ermeticità.
5. Incubare la micropiastra a bagnomaria o in un incubatore a secco dotato di termostato per 90 ± 5 minuti a 37 ± 1°C.

6. Preparare la soluzione di lavaggio diluita (R2) (*fare riferimento al capitolo 6.2*).
7. Al termine dell'incubazione, staccare la pellicola adesiva, aspirare il contenuto di tutti i pozzetti in un contenitore per rifiuti contaminati (contenente ipoclorito di sodio). Lavare la micropiastra 6 volte con la soluzione di lavaggio (R2). Asciugare la piastra capovolgendola su un foglio di carta assorbente.
Nota: È importante evitare gli schizzi di reagente durante le fasi di aspirazione e di lavaggio.
8. Distribuire rapidamente in ogni pozzetto e al riparo dalla luce 200 μL di Cromogeno (R9). Far sviluppare la reazione al buio per 30 ± 5 minuti a temperatura ambiente ($18-30^\circ\text{C}$). Non utilizzare nastri sigillanti adesivi durante questo periodo di incubazione.
9. Bloccare la reazione enzimatica aggiungendo 100 μL di Soluzione bloccante (R10) in ogni pozzetto. Utilizzare la stessa sequenza e lo stesso ritmo di distribuzione utilizzati per la soluzione di sviluppo.
10. Asciugare accuratamente la parte inferiore delle piastre. Leggere la densità ottica a 450/620 nm per mezzo di un lettore di piastre entro i 30 minuti successivi al blocco della reazione (Conservare le strip al riparo dalla luce prima della lettura).
11. Verificare, prima della trascrizione dei risultati, la concordanza tra la lettura ed il piano di distribuzione e di identificazione delle piastre e dei campioni.

7- CALCOLO E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

7.1. CALCOLO DEL VALORE CUT-OFF

Il valore cut-off CO corrisponde al valore medio delle densità ottiche dei duplicati del calibratore (R4).

7.2. CALCOLO DEL RAPPORTO DEI CAMPIONI

I risultati sono espressi sotto forma di rapporto mediante la seguente formula, dove S è la densità ottica (DO) ottenuta per il campione:

- Rapporto campione = S/CO

7.3. CONTROLLO DI QUALITÀ

Per convalidare il test, è necessario che siano rispettati i seguenti criteri:

- Valore della Densità ottica :
 - $CO > 0,200$
- Rapporti :
 - Rapporto $R3 < 0,40$ (Rapporto $R3 = DO_{R3} / CO$)
 - Rapporto $R5 > 1,50$ (Rapporto $R5 = DO_{R5} / CO$)

Qualora tali specifiche non vengano rispettate, ripetere il dosaggio.

7.4. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Fare riferimento alla tabella seguente per l'interpretazione dei risultati.

Rapporto	Risultato	Interpretazione
Rapporto < 0,50	Negativo	Il campione è considerato non reattivo per l'antigene NS1 del virus della dengue.
$0,50 \leq$ Rapporto < 1,00	Equivoco	Il campione è considerato dubbio per l'antigene NS1 del virus della dengue.
Rapporto \geq 1,00	Positivo	Il campione è considerato reattivo per l'antigene NS1 del virus della dengue.

Nota : Le densità ottiche ottenute su campioni fortemente reattivi possono raggiungere la densità ottica massima che può essere letta dallo spettrofotometro.

7.5. CAUSE DI ERRORE

L'origine delle reazioni non convalidate o non riproducibili è spesso correlata alle seguenti cause:

- Lavaggio insufficiente delle micropiastre.
- Contaminazione dei campioni negativi da parte di un siero o un plasma molto concentrato.
- Contaminazione specifica della soluzione di rivelazione da parte di agenti chimici ossidanti (candeggina, ioni metallici, ecc.).
- Contaminazione specifica della soluzione bloccante.

8- PRESTAZIONI

8.1. SENSIBILITÀ - SPECIFICITÀ

• Sensibilità

La sensibilità è stata valutata mediante l'analisi retrospettiva di 177 sieri di pazienti affetti da infezione acuta da virus della dengue confermata da RT-PCR. Su questa popolazione, il test Platelia™ Dengue NS1 Ag si è rivelato positivo nel 91% dei casi (intervallo di confidenza del 95%: 85,8% - 94,8%). In confronto, la sensibilità ottenuta con un test in commercio Dengue IgM EIA era del 17,5%.

La sensibilità è risultata significativamente più alta nella popolazione di campioni negativi alle IgG derivati da infezioni primarie (sensibilità del 98,5%, n = 66) rispetto a quella di campioni positivi alle IgG (sensibilità dell'85,6%, n = 90) (Test del χ^2 , p = 0,004).

Non si sono osservate differenze significative in funzione del sierotipo di virus della dengue responsabile (si veda la Tabella 1).

Tabella 1 : Sensibilità del test Platelia™ Dengue NS1 Ag in funzione del sierotipo (n = 177).

Sierotipo	Numero di sieri	Sensibilità del test Platelia™ Dengue NS1 Ag (IC 95%).
1	93	88,9% (85,8% - 94,8%)
2	31	87,1% (70,1% - 96,3%)
3	24	100,0% (85,6% - 100,0%)
4	29	93,3% (77,9% - 97,9%)

La precocità della diagnosi mediante il test Platelia™ Dengue NS1 Ag è stata studiata su sieri di pazienti per i quali era documentata la data dell'insorgenza della febbre. Le sensibilità maggiori si sono ottenute fin dall'apparizione di segni clinici e sono rimaste elevate per tutta la durata dell'episodio febbrile (si veda la Tabella 2).

Tabella 2 : Sensibilità del test Platelia™ Dengue NS1 Ag in funzione della comparsa di sintomi clinici (n = 177).

Giorni successivi all'insorgenza della febbre	Numero di sieri	Sensibilità del test Platelia™ Dengue NS1 Ag	Sensibilità del test Dengue IgM EIA
0	10	100,0%	0,0%
1	33	87,8%	5,1%
2	40	92,5%	6,1%
3	20	95,0%	15,0%
4	27	96,3%	48,1%
5	19	52,6%	94,1%
≥ 6	28	35,7%	100,0%

• Specificità

La specificità è stata valutata su 618 campioni, tra cui 563 campioni prelevati da donatori di sangue e 55 campioni prelevati da pazienti ospedalizzati. Non si sono osservati risultati positivi nella popolazione studiata, vale a dire una specificità del test pari al 100,0% (intervallo di confidenza al 95% : 99,4% - 100,0%).

8.2. PRECISIONE

• Precisione intra-saggio (ripetibilità)

Per valutare la ripetibilità intra-saggio sono stati esaminati un campione negativo e tre campioni positivi per 30 volte nel corso dello stesso dosaggio. Il rapporto (S/CO) è stato determinato per ciascun campione testato. La media, lo scarto tipo (SD) e il coefficiente di variazione (% CV) per ciascuno dei quattro campioni sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3 : Precisione intra-saggio.

N=30	Campione negativo	Campione debolmente positivo	Campione mediamente positivo	Campione fortemente positivo
	Rapporto campione (S/CO)			
Media	0,10	1,32	3,79	6,24
SD	0,01	0,08	0,29	0,45
% CV	13,1	6,2	7,7	7,2

• Precisione inter-saggi (riproducibilità)

Al fine di valutare la riproducibilità inter-saggi, i quattro campioni (uno negativo e tre positivi) sono stati testati ciascuno in duplicato, in due dosaggi al giorno, per un periodo complessivo di venti giorni. Il rapporto (S/CO) è stato determinato per ciascun campione testato. La media, lo scarto tipo (SD) e il coefficiente di variazione (% CV) per ciascuno dei quattro campioni sono riportati nella Tabella 4.

Tabella 4: Precisione inter-saggi.

N=40	Campione negativo	Campione debolmente positivo	Campione mediamente positivo	Campione fortemente positivo
	Rapporto campione (S/CO)			
Media	0,10	1,17	3,85	6,20
SD	0,03	0,21	0,67	0,96
% CV	33,8	17,8	17,4	15,5

8.3. REATTIVITÀ CROCIATA

Un pannello di 38 sieri contenente sostanze potenzialmente interferenti è stato testato con il test Platelia™ Dengue NS1 Ag: anticorpi antinucleari (n = 10), fattore reumatoide (n = 9), anticorpi eterofili (n = 9), sieri di pazienti affetti da mieloma (n = 10). D'altra parte, è stato testato anche un panel di pazienti affetti da malattie diverse dalla dengue (West Nile, febbre gialla, CMV, HSV, VZV, ecc.). I 200 campioni testati si sono rivelati tutti negativi con il test Platelia™ Dengue NS1 Ag.

9- LIMITI DEL TEST

La diagnosi di infezione recente da virus della dengue può essere stabilita in maniera definitiva solo in base a un insieme di dati clinici e biologici. Il risultato di un solo test non costituisce di per sé una prova sufficiente per la diagnosi di un'infezione recente.

10- CONTROLLO DI QUALITÀ DEL PRODUTTORE

Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti ad un sistema di assicurazione di qualità dal ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo di qualità e viene messo in commercio soltanto se risulta conforme ai criteri di approvazione. La documentazione relativa alla produzione e al controllo di ciascun lotto è conservata presso il produttore.

11- BIBLIOGRAFIA

Vedere la versione Inglese.

BIO-RAD

PLATELIA™ DENGUE NS1 AG

96 TESTS

72830

**DETECÇÃO QUALITATIVA OU SEMI-QUANTITATIVA
DO ANTIGÉNIO NS1 DO VÍRUS DA DENGUE NO
SORO OU PLASMA HUMANO, PELO MÉTODO
IMUNOENZIMÁTICO**

IVD

1- INTERESSE CLÍNICO

A dengue é uma doença endémica presente em todas as zonas tropicais e subtropicais do mundo. É considerada como a mais importante das arboviroses em termos de morbilidade, mortalidade e impacto sócio-económico. A prevalência global da dengue aumentou dramaticamente nos últimos anos e a doença é actualmente endémica em mais de 100 países, onde afecta potencialmente 40% da população mundial. A Organização Mundial de Saúde calcula que, em cada ano, entre 50 e 100 milhões de casos de infecção pelo vírus da dengue venham a dar origem a um número entre 250.000 e 500.000 de formas graves e 24.000 mortes.

O vírus da dengue é transmitido por mosquitos, pertencentes principalmente às espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Existem quatro serotipos distintos (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4). A infecção primária pelo vírus da dengue provoca uma imunidade protectora definitiva em relação ao serotipo homólogo, mas não confere mais que uma protecção parcial e passageira contra os outros três serotipos em caso de re-infecção (infecção secundária)

A infecção pelo vírus da dengue pode revestir diferentes quadros clínicos, desde a infecção assintomática, a febre indiferenciada ou a clássica dengue febril, até formas mais graves como a dengue hemorrágica e a dengue com síndrome de choque, para as quais se observam taxas elevadas de morbilidade e de mortalidade. A dengue caracteriza-se por uma febre durante 3 a 5 dias, dores de cabeça, dores musculares e articulares, *rash* cutâneo, mas geralmente com um resultado favorável para o doente. A dengue hemorrágica e a dengue com síndrome de choque encontram-se sobretudo em doentes anteriormente infectados pelo vírus. Os sintomas são semelhantes aos da dengue febril, mas fazem-se acompanhar de um aumento da permeabilidade vascular e sinais hemorrágicos que levam a hipotensão, hipovolemia, colapso vascular e morte do doente.

O principal desafio associado ao tratamento de doentes infectados é a rapidez e a especificidade da detecção do vírus da dengue durante a fase aguda, de forma a instituir um tratamento eficaz, o mais rapidamente possível. O isolamento e a identificação do vírus ou a detecção de ácido nucleico viral permitem um diagnóstico precoce durante a fase febril, mas estes métodos requerem um ambiente de laboratório especializado e não é possível obter resultados imediatos. A detecção de anticorpos específicos dirigidos contra o vírus da dengue é o método classicamente utilizado no controlo de rotina.

No entanto, estes anticorpos surgem apenas após o aparecimento dos primeiros sintomas. Na infecção primária, os anticorpos de tipo IgM e IgG elevam-se respectivamente cerca de 5 a 14 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas. Na infecção secundária, as taxas de IgM são fracas ou até indetectáveis, enquanto que as de IgG se elevam, 1 a 2 dias após o aparecimento dos sintomas, com taxas muito superiores às observadas durante uma infecção primária. Mais recentemente, a detecção da proteína viral não estrutural NS1 no soro de doentes foi descrita como um método alternativo para diagnóstico precoce da infecção. O antigénio NS1 encontra-se na circulação desde o primeiro até ao nono dia seguinte ao aparecimento da febre, e as taxas observadas são comparáveis nas formas primárias e secundárias de infecção.

2- PRINCÍPIO DO TESTE

O teste Platelia™ Dengue NS1 Ag é um método imunoenzimático em uma fase, de tipo sandwich, em formato microplaca, para detecção qualitativa ou semi-quantitativa do antigénio NS1 do vírus da dengue no soro ou plasma humano. O testes utiliza anticorpos monoclonais de rato (AcM) para a captura e a revelação.

As amostras de doentes e os controlos são incubados directamente e em simultâneo com o conjugado, durante 90 minutos a 37°C, nos poços da microplaca sensibilizada pelos AcM. Em presença do antigénio NS1 na amostra, forma-se um complexo imune AcM - NS1 - AcM/peroxidase. Após as lavagens praticadas no final da incubação, a presença do complexo imune é revelada por adição, em cada poço, de uma solução de revelação enzimática que induz o desenvolvimento de uma reacção de coloração. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reacção enzimática é parada por adição de uma solução de ácido. A densidade óptica obtida a 450/620 nm é proporcional à quantidade de antigénio NS1 presente na amostra testada. A presença do antigénio NS1 numa amostra individual é determinada por comparação da densidade óptica lida nesta amostra e a obtida no soro do valor de calibrador.

3- COMPOSIÇÃO DO DISPOSITIVO

Etiquetagem		Natureza dos reagentes	Apresentação
R1	Microplate	Microplaca (pronta a utilizar): 12 tiras de 8 poços sensibilizados por AcM anti-NS1, em bolsas seladas no vácuo	1
R2	Concentrate d Washing Solution (20x)	Solução de lavagem concentrada (20x): Tampão TRIS-NaCl (pH 7,4), 2% Tween® 20. Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 70 mL
R3	Negative Control	Controlo negativo: Soro humano negativo para o antigénio dengue NS1 Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R4	Calibrator	Calibrador: Tampão TRIS-NaCl buffer (pH 8,0), antigénio dengue NS1, soro de albumina de bovino, glicerol, E102, E122 Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,5 mL
R5	Positive Control	Prontrolo positivo: Tampão TRIS-NaCl buffer (pH 8,0), antigénio dengue NS1, soro de albumina de bovino, glicerol, E102, E122 Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R6	Conjugate (50x)	Conjugado (50x): AcM anti-NS1 ligado à peroxidase Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 0,5 mL
R7	Diluent	Diluente (pronto a utilizar): Tampão fosfato, Tween® 20, soro de vitelo fetal Conservante: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 22 mL
R9	Chromogen TMB	Cromogénio (pronto para utilização): 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (< 0,1%), H ₂ O ₂ (<1%)	1 x 28 mL
R10	Stopping Solution	Solução de paragem (pronta a utilizar): Ácido sulfúrico 1N	1 x 28 mL
		Fita adesiva	4

Para informações sobre as condições de conservação e prazos de expiração dos reagentes é favor consultar as indicações incluídas na embalagem.

4- PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

A qualidade dos resultados depende do cumprimento das seguintes Boas Práticas de Laboratório:

- Não utilizar reagentes cujo prazo de validade tenha terminado.
- Não misturar nem associar, numa mesma série, reagentes provenientes de dispositivos que ostentem números de lote diferentes.

OBSERVAÇÃO: *Para a solução de lavagem (R2, identificação da etiqueta: 20x cor verde), Cromogénio (R9, identificação da etiqueta: TMB cor turquesa) e solução de paragem (R10, identificação da etiqueta: 1N cor vermelha), é possível utilizar outros lotes para além dos incluídos no kit, desde que estes reagentes sejam estritamente equivalentes e o mesmo lote seja utilizado dentro da mesma ocorrência de teste.*

OBSERVAÇÃO: *Não é possível usar o diluente (R7) provenientes de outros lotes.*

OBSERVAÇÃO: *Para além disso, a solução de lavagem (R2, identificação do rótulo : cor verde 20x) pode ser misturada com as outras 2 soluções de lavagem incluídas nos kits de reagentes Bio-Rad (R2, identificações dos rótulo: cor azul 10x ou cor laranja 10x) quando adequadamente reconstituídas, desde que apenas uma mistura seja utilizada num determinado ensaio.*

- Antes da utilização, aguardar até que os reagentes atinjam a temperatura ambiente (+18-30°C).
- Reconstituir ou diluir cuidadosamente os reagentes, evitando qualquer contaminação.
- Não efectuar o teste em presença de vapores reactivos (ácidos, alcalinos, aldeídos) ou de poeiras que possam alterar a actividade enzimática do conjugado.
- Utilizar recipientes em vidro perfeitamente lavados e enxaguados com água destilada ou, de preferência, material descartável.
- Não deixar secar a placa entre o final das lavagens e a distribuição dos reagentes.
- A reacção enzimática é muito sensível a todos os metais ou iões metálicos. Por conseguinte, nenhum elemento metálico deverá entrar em contacto com as diferentes soluções que contêm o conjugado ou a solução substrato.
- A solução de cromogénio (R9) deve ser incolor. A presença de uma cor azul indica que o reagente não pode ser utilizado, devendo este ser substituído.
- Utilizar uma ponta de distribuição nova para cada soro.

- A lavagem dos poços é uma etapa essencial da manipulação: respeitar o número de ciclos de lavagem prescritos e assegurar que todos os poços são completamente cheios e depois esvaziados. Uma lavagem deficiente pode dar origem a resultados incorrectos.
- Nunca utilizar o mesmo recipiente para distribuir o conjugado e a solução de revelação.
- Verificar a exactidão das pipetas e o bom funcionamento dos aparelhos utilizados.
- Não alterar o modo de procedimento.

INSTRUÇÕES DE HIGIENE E SEGURANÇA

- Os materiais de origem humana utilizados na preparação dos reagentes foram testados e comprovados como não reactivos em antigénio de superfície em relação ao vírus da hepatite B (Ag HBs), em anticorpos dirigidos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV) e em anticorpos dirigidos contra os vírus de imunodeficiência humana (anti-HIV1 e anti-HIV2). Pelo facto de nenhum método poder garantir, de forma absoluta, a ausência de agentes infecciosos, estes reagentes de origem humana, bem como as amostras dos doentes, deverão ser considerados como potencialmente infecciosos e, como tal, manipulados com as precauções habituais.
- Considerar o material directamente em contacto com as amostras e os reagentes de origem humana, bem como as soluções de lavagem, como produtos contaminados.
- Usar luvas descartáveis na manipulação dos reagentes.
- Não pipetar com a boca.
- Evitar qualquer derramamento das amostras ou das soluções que as contenham. As superfícies atingidas deverão ser lavadas com lixívia a uma diluição de 10%. Se o líquido contaminante for um ácido, as superfícies contaminadas deverão ser previamente neutralizadas com bicarbonato de sódio e depois lavadas com lixívia e secas com papel absorvente. O material utilizado para a limpeza deverá ser eliminado em contentor especialmente reservado a resíduos contaminados.
- As amostras de origem humana, bem como o material e os produtos contaminados, deverão ser eliminados após descontaminação, seja por imersão, durante 30 minutos, em lixívia à concentração final de 5% de hipocloreto de sódio, ou por esterilização em autoclave a 121°C durante um mínimo de 2 horas.

A esterilização em autoclave a 121°C, durante um mínimo de uma hora, é o melhor método para inactivar os vírus HIV e o vírus da hepatite B.

ATENÇÃO: Não introduzir na autoclave soluções contendo hipocloreto de sódio

- Evitar qualquer contacto do tampão substrato, do cromogénio e da solução de paragem com a pele e as mucosas (risco de toxicidade, irritações e queimaduras).
- A manipulação e eliminação dos produtos químicos deverão processar-se de acordo com as Boas Práticas de Laboratório.



Xi - Irritante

Atenção: Alguns reagentes contêm ProClin™ 300 < 1,5%

R43: Pode causar sensibilização em contacto com a pele

S28-37: Após contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com água e sabão. Usar luvas adequadas.

5- RECOLHA, PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

1. Os testes são efectuados em amostras de soro ou amostras de plasma recolhidas em EDTA, citrato ou heparina.
2. Respeitar as instruções que se seguem quanto à recolha, tratamento e conservação destas amostras:
 - Recolher as amostras de sangue segundo a prática habitual.
 - No caso das colheitas em soro, deixar que o depósito se forme completamente, antes de centrifugar.
 - Conservar os tubos fechados.
 - Após centrifugação, extrair o soro ou o plasma e conservá-lo em tubo fechado.
 - As amostras deverão ser conservadas a +2-8°C, se os testes forem realizados nas 24 horas seguintes.
 - Se os testes não se realizarem no prazo de 24 horas ou se for necessário transportar as amostras, estas deverão ser preferencialmente congeladas a -20°C (ou mais frio).
 - Não utilizar amostras que tenham sido submetidas a mais de três ciclos de congelação/descongelação. Antes de serem testadas, as amostras deverão ser cuidadosamente homogeneizadas após descongelação (vórtex).
3. Os resultados não são afectados por amostras que contenham 100 mg/l de bilirrubina e amostras lipémicas contendo o equivalente a 36 g/l de trioleína (triglicerido). Pode verificar-se um aumento do rácio de amostras negativas com concentrações em albumina de 90g/l ou em amostras hemolisadas contendo 10mg/mL de hemoglobina.
4. Não aquecer as amostras.

6- FUNCIONAMENTO

6.1. MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

- Agitador tipo vórtex.

- Aparelho de leitura para microplacas (equipado com filtros 450/620 nm). (*)
- Recipiente de banho-maria ou incubadora a seco para microplacas, com termóstato a $37\pm 1^\circ\text{C}$. (*)
- Sistema de lavagem manual, semi-automático ou automático para microplacas. (*)
- Contentor de resíduos contaminados.
- Hipocloreto de sódio (lixívia) e bicarbonato de sódio.
- Água destilada ou desionizada estéril.
- Provetas graduadas a 25 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL.
- Luvas descartáveis.
- Óculos de protecção.
- Papel absorvente.
- Pipetas ou multipipetas, automáticas ou semi-automáticas, reguláveis ou fixas, com capacidade de medição de 50 μL , 100 μL , 300 μL e 1000 μL .
- Tubos descartáveis.

(*) Para obter informações mais precisas relativamente aos aparelhos validados pelos nossos serviços técnicos é favor contactar-nos.

6.2. RECONSTITUIÇÃO DOS REAGENTES

- **R1:** Deixar estabilizar à temperatura ambiente ($+18\text{-}30^\circ\text{C}$) antes de abrir a bolsa. Colocar imediatamente na bolsa as tiras não utilizadas, verificando se contém o dessecante. Voltar a fechar cuidadosamente a bolsa e conservá-la a $+2\text{-}8^\circ\text{C}$.
- **R2:** Dilua 1/20 de solução de lavagem R2 em água destilada: por exemplo 50 mL de R2 e 950 mL de água destilada para obter a solução de lavagem pronta para utilização. Se lavar manualmente, prepare 350 mL de solução de lavagem diluída para uma placa de 12 tiras.
- **R6+R7:** O conjugado (R6) é apresentado sob a forma líquida, 50 vezes concentrado. Homogeneizar antes de utilizar. Diluir a 1/50 com o diluente (R7). Para uma tira, diluir 20 μL de R6 qsp. 1,0 mL de R7. Multiplicar os volumes por 12, para uma placa completa.

6.3. CONSERVAÇÃO DOS REAGENTES ABERTOS E/OU RECONSTITUÍDOS

O kit deve ser armazenado a uma temperatura entre $+2^\circ\text{C}$ e $+8^\circ\text{C}$. Quando o kit é armazenado entre $+2^\circ\text{C}$ e $+8^\circ\text{C}$ antes de ser aberto, cada componente pode ser utilizado até à data de validade indicada na etiqueta externa do kit.

- **R1:** Após a abertura, as tiras conservadas na bolsa devidamente fechada mantêm-se estáveis durante 6 semanas a $+2\text{-}8^\circ\text{C}$ (verificar se contém o dessecante).

- **R2:** Uma vez diluída, a solução de lavagem pode ser guardada durante 2 semanas a uma temperatura entre +2°C e +30°C. A solução de lavagem concentrada armazenada a uma temperatura entre +2°C e +30°C, na ausência de contaminação, é estável até à data de validade indicada na etiqueta.
- **R6+R7:** Após diluição, a solução reconstituída mantém-se estável durante 8 horas à temperatura ambiente. (+18-30°C).
- **R3, R4, R5, R6, R7, R10:** Após a abertura e na ausência de contaminação, os reagentes conservados a +2-8°C mantêm-se estáveis até ao termo do prazo de validade indicado na etiqueta.
- **R9:** Uma vez aberto e sem qualquer contaminação, o reagente armazenado a uma temperatura entre +2°C e +8°C é estável durante 8 semanas .

6.4. PROCEDIMENTO

Seguir estritamente o protocolo descrito.

Antes de utilizar, aguardar até que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (+18-30°C).

Utilizar um controlo negativo (R3), dois calibradores (R4) e um controlo positivo (R5) em cada série, para validar os resultados da quantificação.

1. Estabelecer cuidadosamente o plano de distribuição e identificação das amostras de calibrador, controlos e de doentes (S1, S2...) como indicado a seguir:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5										
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

2. Retirar o suporte e as tiras (R1) da embalagem de protecção (ver capítulo 6.2).
3. Seguir estritamente a sequência de distribuição descrita, depositando sucessivamente nos poços:
 - 50µL de diluente (R7)
 - 50µL de amostras (calibrador, controlos ou doentes)
 - 100µL do conjugado diluído (R6+R7)

Nota: : A distribuição do diluente, das amostras e do conjugado pode ser controlada visualmente nesta fase do protocolo. A adição da amostra em estado puro ao diluente traduz-se numa alteração de cor, de amarelo para laranja. A adição do conjugado traduz-se então numa alteração de cor de laranja para verde. Este controlo pode não ser eficaz, caso se utilizem amostras diluídas.

4. Cobrir a microplaca com uma fita adesiva, pressionando bem sobre toda a superfície para assegurar a estanqueidade.
5. Incubar a microplaca em banho-maria ou numa incubadora seca a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 90 ± 5 minutos.
6. Preparar a solução de lavagem diluída (R2) (ver capítulo 6.2).
7. No fim da incubação, retirar a fita adesiva, aspirar o conteúdo de todos os poços para um contentor de resíduos contaminados (contendo hipocloreto de sódio). Lavar a microplaca 6 vezes com a solução de lavagem (R2). Secar a placa por inversão sobre uma folha de papel absorvente.

Nota: É importante evitar qualquer derramamento dos reagentes durante as fases de aspiração e de lavagem.

8. Num local escuro, distribua rapidamente em cada poço 200 μL de solução de cromogénio (R9). Deixe a reacção ocorrer no escuro, durante 30 minutos \pm 5 minutos a uma temperatura ambiente (entre $+18^\circ\text{C}$ e $+30^\circ\text{C}$). Não utilize selante de placa adesivo durante esta incubação.
9. Pare a reacção enzimática adicionando 100 μL de solução de paragem (R10) em cada poço. Utilize a mesma sequência e proporção de distribuição da solução de desenvolvimento.
10. Secar cuidadosamente a superfície inferior das placas. Proceder à leitura da densidade óptica a 450/620 nm por meio de um leitor de placas, nos 30 minutos que se seguem à paragem da reacção (Conservar as tiras ao abrigo da luz, antes de efectuar a leitura).
11. Antes da transcrição dos resultados, assegurar a concordância entre os dados de leitura e o plano de distribuição e de identificação das placas e das amostras.

7- CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

7.1. CÁLCULO DO VALOR DE "CUT-OFF"

O valor de "cut-off" (CO) corresponde ao valor médio das densidades ópticas das duplicações do Calibrador (R4).

7.2. CÁLCULO DO RÁCIO DE AMOSTRAS

Os resultados são expressos sob a forma de um rácio com a ajuda da fórmula seguinte, em que S é a densidade óptica (DO) obtida para a amostra:

- Rácio Amostra = S/CO

7.3. CONTROLO DE QUALIDADE

Para validar a manipulação é necessário respeitar os critérios seguintes:

- Valor de densidade óptica:
 - $CO > 0,200$
- Rácios:
 - Rácio R3 $< 0,40$ (Rácio R3 = DO_{R3} / CO)
 - Rácio R5 $> 1,50$ (Rácio R5 = DO_{R5} / CO)

Se estas especificações não forem respeitadas, efectuar de novo a manipulação.

7.4. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Consultar o quadro seguinte para a interpretação dos resultados.

Rácio	Resultado	Interpretação
Rácio $< 0,50$	Negativo	A amostra é considerada não reactiva para o antígeno NS1 do vírus da dengue.
$0,50 \leq$ Rácio $< 1,00$	Equívoco	A amostra é considerada dúbia quanto ao antígeno NS1 do vírus da dengue.
Rácio $\geq 1,00$	Positivo	A amostra é considerada reactiva para o antígeno NS1 do vírus da dengue.

Observação: As densidades ópticas obtidas em amostras fortemente reactivas podem atingir a densidade óptica máxima susceptível de ser lida pelo espectrofotómetro.

7.5. EXPLICAÇÃO DAS CAUSAS DE ERRO

A origem de reacções não validadas ou não reprodutíveis está, muitas vezes, relacionada com as causas seguintes:

- Lavagem insuficiente das microplacas.
- Contaminação das amostras negativas por um soro ou um plasma fortemente concentrado.
- Contaminação pontual da solução de revelação por agentes químicos oxidantes (lixívia, iões metálicos ...).
- Contaminação pontual da solução de paragem.

8- DESEMPENHOS

8.1. SENSIBILIDADE - ESPECIFICIDADE

• Sensibilidade

A sensibilidade foi avaliada por análise retrospectiva de 177 soros de doentes que sofriam de infecção aguda pelo vírus da dengue, confirmada por RT-PCR. Nesta população, o teste Platelia™ Dengue NS1 Ag revelou ser positivo em 91% dos casos (intervalo de confiança a 95%: 85,8%-94,8%). Comparativamente, a sensibilidade obtida com um teste comercializado Dengue IgM EIA foi de 17,5%.

A sensibilidade era significativamente mais elevada na população de amostras negativas em IgG provenientes de infecções primárias (sensibilidade de 98,5%, n= 66) do que na de amostras positivas em IgG (sensibilidade de 85,6%, n=90) (Teste de χ^2 , p=0,004).

Não se observou qualquer diferença significativa em função do serotipo de vírus da dengue responsável (*ver Quadro 1*).

Quadro 1: Sensibilidade do teste Platelia™ Dengue NS1 Ag em função do serotipo (n=177).

Serotipo	Nº de soros	Sensibilidade do teste Platelia™ Dengue NS1 Ag (IC 95%)
1	93	88,9% (85,8% - 94,8%)
2	31	87,1% (70,1% - 96,3%)
3	24	100,0% (85,6% - 100,0%)
4	29	93,3% (77,9% - 97,9%)

A precocidade do diagnóstico com a ajuda do teste Platelia™ Dengue NS1 Ag foi estudada em soros de doentes para os quais a data de aparecimento da febre estava documentada. As sensibilidades mais elevadas são obtidas desde o aparecimento dos sinais clínicos e mantêm-se elevadas ao longo de todo o episódio febril (*ver Quadro 2*).

Quadro 2: Sensibilidade do teste Platelia™ Dengue NS1 Ag em função do aparecimento dos sinais clínicos (n=177).

Dias após o aparecimento da febre	Nº de soros	Sensibilidade do teste Platelia™ Dengue NS1 Ag	Sensibilidade do teste Dengue IgM EIA
0	10	100,0%	0,0%
1	33	87,8%	5,1%
2	40	92,5%	6,1%
3	20	95,0%	15,0%
4	27	96,3%	48,1%
5	19	52,6%	94,1%
≥ 6	28	35,7%	100,0%

• Especificidade

A especificidade foi avaliada em 618 amostras, compreendendo 563 amostras recolhidas em doadores de sangue e 55 amostras recolhidas em doentes hospitalizados. Não foi observado qualquer resultado positivo na população estudada, ou seja, a especificidade do teste é de 100,0% (intervalo de confiança a 95%: 99,4% - 100,0%).

8.2. PRECISÃO

• Precisão intra-ensaio (repetibilidade)

Para avaliar a repetibilidade intra-ensaio, uma amostra negativa e três amostras positivas foram testadas 30 vezes numa mesma série. O rácio (S/CO) foi determinado para cada amostra testada. A média, o desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação (%CV) para cada uma das quatro amostras estão indicados no Quadro 3.

Quadro 3: Precisão intra-ensaio.

N=30	Amostra negativa	Amostra fracamente positiva	Amostra medianamente positiva	Amostra fortemente positiva
	Rácio da amostra (S/CO)			
Média	0,10	1,32	3,79	6,24
SD	0,01	0,08	0,29	0,45
% CV	13,1	6,2	7,7	7,2

- **Precisão inter-ensaios (reprodutibilidade)**

Para avaliar a reprodutibilidade inter-ensaios, as quatro amostras (uma negativa e três positivas) foram individualmente testadas em duplicado, em duas séries por dia, ao longo de um período total de vinte dias. O rácio (S/CO) foi determinado para cada amostra testada. A média, o desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação (%CV) para cada uma das quatro amostras são indicados no Quadro 4.

Quadro 4: Precisão inter-ensaios.

N=40	Amostra negativa	Amostra fracamente positiva	Amostra medianamente positiva	Amostra fortemente positiva
	Rácio de amostra (S/CO)			
Média	0,10	1,17	3,85	6,20
SD	0,03	0,21	0,67	0,96
% CV	33,8	17,8	17,4	15,5

8.3. REACTIVIDADE CRUZADA

Um painel de 38 soros contendo substâncias potencialmente interferentes foi testado com o teste Platelia™ Dengue NS1 Ag: anticorpos antinucleares (n=10), factor reumatóide (n=9), anticorpos heterófilos (n=9), soros de doentes atingidos com mieloma (n=10). Além disso, um painel de 162 soros de doentes atingidos com outras doenças, que não a dengue (West Nile, febre amarela, CMV, HSV, VZV, etc...) foi igualmente testado. As 200 amostras testadas revelaram-se todas negativas com o teste Platelia™ Dengue NS1 Ag.

9- LIMITES DO TESTE

O diagnóstico de uma infecção recente pelo vírus da dengue só poderá ser definitivamente estabelecido quando acompanhado de um conjunto de dados clínicos e biológicos. O resultado de um único teste não constitui, só por si, prova suficiente para o diagnóstico de uma infecção recente.

10-CONTROLO DA QUALIDADE DE FABRICO

Todos os produtos fabricados e comercializados pela empresa Bio-Rad são submetidos a um sistema de garantia de qualidade, desde a recepção das matérias primas até à comercialização do produto final. Cada lote do produto final é objecto de um controlo da qualidade, sendo comercializado apenas quando em total conformidade com os critérios de aceitação. A documentação relativa à produção e controlo de cada lote é arquivada pelo fabricante.

11-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Veja a versão Inglesa.

BIO-RAD

PLATELIA™ DENGUE NS1 AG

96 TESTER

72830

**KVALITATIV ELLER SEMIKVANTITATIV DETEKTION
AV DENGUEVIRUS NS1-ANTIGEN I HUMANT SERUM
ELLER HUMAN PLASMA GENOM IMMUNOLOGISK
ENZYMANALYS**

IVD

1- KLINISK BETYDELSE

Dengue är en endemisk sjukdom som drabbar tropiska och subtropiska områden runt om i världen. Den anses vara den viktigaste arbovirala sjukdomen ifråga om morbiditet, mortalitet och socio-ekonomiska kostnader. Den globala prevalensen av dengue har ökat dramatiskt de senaste årtiondena och sjukdomen är nu endemisk i mer än 100 länder och berör potentiellt 40 % av jordens befolkning. Världshälsoorganisationen uppskattar att det inträffar omkring 50 till 100 miljoner fall av dengueinfektioner i världen varje år, vilka leder till 250 000 till 500 000 allvarliga, komplicerade former av sjukdomen och 24 000 dödsfall varje år.

Denguevirus överförs av mygg, huvudsakligen *Aedes aegypti* och *Aedes albopictus*. Det finns fyra distinkta serotyper (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4). Primärinfektionen ger livslång skyddande immunitet mot den homologa serotypen, men ger endast partiellt och övergående skydd mot de övriga tre serotyperna vid reinfektion (sekundärinfektion).

Infektion med denguevirus orsakar ett brett sjukdomsspektrum från asymtomatisk infektion, odifferentierad feber och klassisk denguefeber (DF) till allvarligare former, till exempel dengue hemorragisk feber (DHF) och dengue chocksyndrom (DSS) med hög frekvens av morbiditet och mortalitet. DF karakteriseras av feber som varar 3-5 dagar, huvudvärk, muskel- och ledsmärta, hudutslag, men vanligtvis återhämtar patienten sig. DHF eller DSS, som huvudsakligen drabbar patienter som tidigare infekterats med viruset, uppvisar samma symptom som DF men följs av ökad vaskulär permeabilitet och hemorragiska tecken som leder till sänkt blodtryck, hypovolemi, vaskulär kollaps och död.

Det problem som är mest svårhanterligt i samband med behandlingen av den infekterade patienten är snabb och specifik detektion av denguevirus under akutfasen så att klinisk behandling kan sättas in i rätt tid. Med hjälp av isolering och identifiering av viruset eller detektion av virusnukleinsyra erhåller man tidig diagnostik under feberfasen, men båda metoderna kräver ett speciallaboratorium och resultaten är inte omedelbara. Detektion av antikroppar som är specifika för denguevirus används vanligtvis för rutindiagnostik. Antikroppar uppträder emellertid efter att symptomen har visat sig. Vid primärinfektion stiger IgM och IgG ungefär 5 respektive 14 dagar efter att symptomen har visat sig. Vid sekundärinfektion är IgM-nivåerna låga eller ej detekterbara, medan IgG ökar 1-2 dagar efter att symptomen visat sig med högre nivåer än vid primärinfektionen.

På senare tid har användning av patientserum för detektion av icke-strukturellt denguevirusprotein NS1 i blodet beskrivits som en alternativ metod för tidig diagnos. NS1-antigen har påträffats i blodet från den första dagen och upp till 9 dagar efter debut av feber och jämförbara nivåer har iakttagits vid primär- och sekundärinfektioner.

2- TESTPRINCIP

Platelia™ Dengue NS1 Ag är en immunologisk mikroplattsenzymanalys av sandwich-typ i ett steg för kvalitativ eller semikvantitativ detektion av denguevirus NS1-antigen i humant serum eller human plasma. Testet använder murina monoklonala antikroppar (MAB) för insamling och framkallning.

Prover och kontroller inkuberas direkt och samtidigt med konjugatet i 90 minuter i 37 °C på mikroplattsbrunnar som har sensibiliserats med MAB. Om NS1-antigen förekommer i provet bildas ett immunkomplex MAB - NS1 - MAB/peroxidas. Efter tvättning påvisas förekomsten av immunkomplex genom att en kromogen lösning fördelas i brunnarna, vilken sätter igång en färgframkallningsreaktion. Efter 30 minuters inkubering i rumstemperatur avbryts den enzymatiska reaktionen genom tillsats av en syralösning. Den optiska densiteten, som avläses med hjälp av en spektrofotometer inställd på 450/620 nm, är proportionell till mängden NS1-antigen i provet. Förekomsten av NS1-antigen i ett enskilt prov bestäms genom att avläsningen av provets optiska densitet jämförs med avläsningen av gränsvärdeskalibratorserumets optiska densitet.

3- PRODUKTINFORMATION

	Märkning	Typ av reagens	Innehåll
R1	Microplate	Mikroplatta (färdig att använda): 12 remsor med vardera 8 brunnar belagda med anti-NS1 MAB i vakuumförluten påse	1
R2	Concentrated Washing Solution (20x)	Koncentrerad tvättlösning (20x) : TRIS-NaCl-buffert (pH 7,4), 2 % Tween® 20 Konserveringsmedel: < 1,5 % ProClin™ 300	1 x 70 mL
R3	Negative Control	Negativ kontroll : Humant serum negativt för Dengue NS1-antigen Konserveringsmedel: < 1,5 % ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R4	Calibrator	Kalibrator : TRIS-NaCl-buffert (pH 8,0), Dengue NS1-antigen, bovin serumalbumin, glycerol, E102, E122 Konserveringsmedel: < 1,5 % ProClin™ 300	1 x 1,5 mL
R5	Positive Control	Positiv kontroll : TRIS-NaCl-buffert (pH 8,0), Dengue NS1-antigen, bovin serumalbumin, glycerol, E102, E122 Konserveringsmedel: < 1,5 % ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R6	Conjugate (50x)	Konjugat (50x) : Anti-NS1 MAB kopplad med pepparrotsperoxidas Konserveringsmedel: < 1,5 % ProClin™ 300	1 x 0,5 mL
R7	Diluent	Spädningsvätska (färdig att använda) : Fosfatbuffert, Tween® 20, fosterkalvserum Konserveringsmedel: < 1,5 % ProClin™ 300	1 x 22 mL
R9	Chromogen TMB	Kromogen (färdig att användas): 3,3',5,5' tetrametylbenzidin (<0,1 %), H ₂ O ₂ (<1 %)	1 x 28 mL
R10	Stopping Solution	Stopplösning (färdig att använda): 1 N svavelsyralösning	1 x 28 mL
		Självhäftande film	4

Mer information om förvaringsvillkoren och utgångsdatum finns angiven på förpackningen.

4- VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Resultatets kvalitet är beroende av att god laboratoriesed (GLP) tillämpas:

- Använd inte reagenser då utgångsdatumet har passerats.
- Blanda inte reagenser från olika partier inom en bestämd testkörning.

KOMMENTAR: För tvättlösningen (R2, märknings-ID: 20x grönfärgad), kromogen (R9, märknings-ID: TMB turkosfärgad) och stopplösning (R10 märknings-ID: 1 N rödfärgad) kan du använda andra partier än de som ingår i testet om dessa reagenser är helt likvärdiga och om samma parti används inom en bestämd analysomgång.

KOMMENTAR: Det är inte tillåtet att använda spädningsmedel (R7) från andra partier än de som medföljer kitet.

KOMMENTAR: Dessutom kan tvättlösningen (R2, märknings-ID: 20X grönfärgad) blandas med de 2 andra tvättlösningarna som ingår i olika Bio-Rad-reagenskit (R2, märknings-ID: 10X blå- eller 10X orange-färgad) vid korrekt rekonstituering, förutsatt att endast en blandning används vid en given analysomgång.

- Låt reagenserna uppnå rumstemperatur (+18-30 °C) före användning.
- Rekonstituera och späd noggrant reagenserna och undvik all kontaminering.
- Utför inte testet i närvaro av reaktiva ångor (syraångor, alkaliska ångor, aldehydångor) eller damm som skulle kunna ändra konjugatets enzymatiska aktivitet.
- Använd glasgods som noggrant har diskats och sköljts med avjoniserat vatten, eller ännu hellre engångsmaterial.
- Se till att mikroplattan inte hinner torka efter tvättproceduren och innan reagensen har hållits i.
- Den enzymatiska reaktionen är mycket känslig för metalljoner. Därför får ingen metall komma i kontakt med de olika konjugat- eller substratlösningarna.
- Kromogenlösningen (R9) ska vara färglös. Om den är blåfärgad är detta en indikation på att reagenset inte kan användas utan måste ersättas.
- Använd en ny pipettspets för varje prov.
- Tvättningen av mikroplattan är ett kritiskt steg. Följ det rekommenderade antalet tvättcykler och se till att alla brunnar är helt fyllda och därefter helt tömda. Felaktig tvättning kan leda till felaktiga resultat.

- Använd aldrig samma behållare för fördelning av konjugat- och framkallningslösning.
- Kontrollera precisionen för pipetterna och annan utrustning och att de fungerar korrekt.
- Ändra inte testförloppet.

HÄLSO- OCH SÄKERHETSANVISNINGAR

- Material av humant ursprung som använts vid beredning av reagenserna har testats och befunnits icke-reaktivt för hepatit B-ytantigen (HBsAg), antikroppar mot hepatit C-virus (anti-HCV) och antikroppar mot humant immunbristvirus (anti-HIV1 och anti-HIV2). Eftersom ingen testmetod med säkerhet kan garantera frånvaron av smittsamma ämnen, ska reagenser av humant ursprung och patientprover hanteras som potentiellt smittsamma.
- Betrakta allt material, däribland tvättlösningen, som kommer i direkt kontakt med prover och reagenser av humant ursprung som potentiellt smittsamt.
- Använd engångshandskar vid reagenshantering.
- Pipettera inte med munnen.
- Undvik att spilla prover eller lösningar som innehåller prover. Spill måste sköljas med blekmedel som späts ut till 10 %. Vid spill av syra måste den först neutraliseras med natriumbikarbonat och därefter rengöras med blekmedel som späts ut till 10 %, och torkas upp med absorberande papper. Materialet som används för rengöring måste kastas i en behållare för smittfarligt avfall.
- Prover av humant ursprung liksom smittfarligt material och smittfarliga produkter måste kasseras efter dekontaminering enligt följande: antingen sänkas ned i blekmedel vid en slutkoncentration på 5 % natriumhypoklorit i 30 minuter eller autoklaveras i 121 °C i minst 2 timmar. Autoklavering i minst en timme i 121 °C är den bästa metoden för att inaktivera HIV-virus och HB-virus.

WARNING! Ställ inte in lösningar som innehåller natriumhypoklorit i autoklaven.

- Undvik all hud- och slemhinnekontakt med substratbuffert, kromogen- och stopplösning (risk för förgiftning, irritation eller brännskador).
- Hantering och kassering av kemiska produkter ska genomföras enligt rutiner för god laboratorised (GLP).



**Xi -
Irriterande**

Varning: Vissa av reagenserna innehåller ProClin™ 300 < 1,5 %

R43: Kan ge allergi vid hudkontakt

S28-37: Vid kontakt med huden, tvätta genast med mycket tvål och vatten. Använd lämpliga skyddshandskar.

5- PROVTAGNING, BEREDNING OCH FÖRVARING

1. Serum och plasma (EDTA, citrat, heparin) är rekommenderade provtyper.
2. Lägga märke till följande rekommendationer om hantering, bearbetning och förvaring av blodprover.
 - Ta alla blodprover med venpunktion och vidta vanliga försiktighetsåtgärder.
 - Låt serumproverna koagulera fullständigt före centrifugering.
 - Rören ska alltid vara förslutna.
 - Separera serum eller plasma från koaglet eller erythrocyterna och förvara i väl förslutet rör efter centrifugering.
 - Provet kan förvaras i +2-8 °C om testet utförs inom 24 timmar.
 - Om testet inte kommer att slutföras inom 24 timmar, eller om proverna ska transporteras, ska proverna frysas i -20 °C eller kallare.
 - Använd inte prover som tinats mer än tre gånger. Prover som har varit frysta ska blandas ordentligt efter upptining innan testet utförs.
3. Prover som innehåller 100 mg/l bilirubin och lipemiska prover som innehåller motsvarande 36 g/l triolein (triglycerid) påverkar inte resultaten. Förekomst av albumin på 90 g/l eller hemolyserade prover som innehåller 10 mg/mL hemoglobin kan eventuellt öka frekvensen negativa prover.
4. Värm inte proverna.

6- TESTFÖRFARANDE

6.1. NÖDVÄNDIGT MEN EJ BIFOGAT MATERIAL

- Vortexblandare.
- Avläsare för mikroplattor med 450 nm och 620 nm filter (*).
- Vattenbad eller motsvarande inkubator för mikroplattor, inställd med termostat på 37 ± 1 °C (*).
- Manuell, halvautomatisk eller automatisk tvättanordning för mikroplattor (*).
- Behållare för biologiskt riskavfall.
- Natriumhypoklorit (blekmedel) och natriumbikarbonat.
- Sterilt destillerat eller avjoniserat vatten.
- Graderade mätglas med volymerna 25 mL, 50 mL, 100 mL och 1 000 mL.
- Engångshandskar av latexgummi.
- Skyddsglasögon.
- Absorberande papper.
- Automatiska eller halvautomatiska, justerbara eller förinställda pipetter eller multipipetter för mätning av 50 µL, 100 µL, 300 µL och 1 000 µL.
- Engångsrör.

(*) Begär gärna mer information om den utrustning som vår tekniska avdelning rekommenderar.

6.2. REAGENSREKONSTITUERING

- **R1** : Låt påsen anta rumstemperatur (+18-30 °C) innan den öppnas. Lägg tillbaka oanvända remsor omedelbart i påsen och kontrollera att det finns torkmedel. Återförslut påsen noga och förvara den i +2-8 °C.
- **R2** : Spädd tvättlösningen R2 1:20 med destillerat vatten, till exempel 50 mL R2 och 950 mL destillerat vatten till en tvättlösning som är färdig att använda. Bered 350 mL utspädd tvättlösning för en platta med 12 remsor om tvättningen sker manuellt.
- **R6+R7** : Konjugat (R6) är koncentrerat 50x och måste homogeniseras före användning. Spädd 1/50 med spädningsvätska (R7). För en remsa späds 20 µL R6 resp. 1,0 mL R7. Multiplitera dessa volymer med 12 för en mikroplatta.

6.3. FÖRVARING AV ÖPPNADE OCH/ELLER REKONSTITUERADE REAGENSER

Testet måste förvaras vid +2-8 °C. När testet förvarats vid +2-8 °C innan det öppnas kan varje komponent användas till det bäst-före-datum som anges på testets yttre etikett.

- **R1** : Efter öppnandet är remsorna hållbara i upp till sex veckor om de förvaras i +2-8 °C i samma noga förslutna påse innehållande torkmedel.
- **R2** : Så snart tvättlösningen är utspädd kan den förvaras i 2 veckor i +2-30 °C. Den koncentrerade tvättlösningen är stabil till det bäst-före-datum som anges på etiketten om den förvaras i +2-30 °C utan att utsättas för kontaminering.
- **R6+R7** : Spädd rekonstituerad lösning är hållbar i upp till 8 timmar om den förvaras i rumstemperatur (+18-30 °C).
- **R3, R4, R5, R6, R7, R10** : När reagenserna väl har öppnats är de stabila till det utgångsdatum som finns angivet på etiketten om de förvaras i +2-8 °C utan att utsättas för kontaminering.
- **R9**: Om reagentet förvaras i +2-8 °C utan att utsättas för kontaminering är det stabilt i upp till 8 veckor.

6.4. METOD

Följ beskrivningen av testförfarandet noggrant.

Låt reagenserna uppnå rumstemperatur (+18-30 °C) före användning.

Validera analysresultaten genom att använda en negativ kontroll (R3), två kalibratorer (R4) och en positiv kontroll (R5) i varje omgång.

1. Fastställ fördelnings- och identifieringsplanen noggrant för kalibrator, kontroller och patientprover (S1, S2 osv.) enligt nedan:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5										
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

2. Ta ut brickan och remsorna (R1) ur skyddsförpackningen (se avsnitt 6.2).
3. Följ den angivna fördelningssekvensen noga och fördela i brunnarna i tur och ordning:
 - 50 µL spädningsvätska (R7)
 - 50 µL prov (kalibrator, kontroll eller patient)
 - 100 µL utspätt konjugat (R6+R7)

Obs! Fördelningen av spädningsvätska, prov och konjugat kan kontrolleras visuellt i den här fasen. När det rena provet tillsätts till spädningsvätskan skiftar färgen från gult till orange. Efter tillsats av konjugatet ändras färgen från orange till grönt. Denna kontroll kan ändras om spädda prover används.

4. Täck reaktionsmikroplattan med självhäftande film. Tryck till ordentligt på plattan för att garantera en tät förslutning.
5. Inkubera mikroplattan i ett termostatkontrollerat vattenbad eller i en inkubator för mikroplatta i 37 ± 1 °C i 90 ± 5 minuter.
6. Bered spädningsvätskan av tvättlösningen (R2) (se avsnitt 6.2).
7. När inkuberingsperioden är slut tas den självhäftande filmen bort. Aspirera samtliga brunnars innehåll till en behållare för biologiskt riskavfall (innehållande natriumhypoklorit). Tvätta mikroplattorna 6 gånger med tvättlösning (R2). Vänd mikroplattan upp och ned och slå med lätta slag mot det absorberande papperet för att ta bort resterande vätska.

Obs! Det är viktigt att undvika reagensstänk under aspirations- och tvättstegen.

8. Fördela snabbt, i skydd från ljus, 200 µL kromogenlösning (R9) i alla brunnar. **Låt reaktionen fortgå i mörker i 30 ± 5 minuter i rumstemperatur (+18-30 °C).** Använd inte självhäftande plattförslutare under denna inkubering.
9. Stoppa den enzymatiska reaktionen genom att tillsätta 100 µL stopplösning (R10) i varje brunn. Använd samma ordningsföljd och samma fördelningshastighet som för framkallningslösningen.

10. Torka noggrant av mikroplattans botten. Avläs den optiska densiteten vid 450/620 nm med hjälp av en plattavläsare inom 30 minuter efter det att reaktionen avslutats (remsorna måste alltid skyddas från ljus före avläsning).
11. Kontrollera alla resultat med avseende på överensstämmelse mellan avläsningen och fördelningen och identifieringen av platta och prover.

7- BERÄKNING OCH UTVÄRDERING AV RESULTAT

7.1. BERÄKNING AV GRÄNSVÄRDE

Gränsvärdet CO motsvarar medelvärdet av de optiska densitetsvärdena för kalibrator (R4) som testats i duplikat.

7.2. BERÄKNING AV PROVKVOT

Provresultatet uttrycks som en kvot med hjälp av följande formel, där S är den optiska densitet (OD) som erhållits på provet:

- $\text{Provkvot} = S/CO$

7.3. KVALITETSKONTROLL

För att analysen ska kunna valideras måste följande villkor uppfyllas:

- Värdet för optisk densitet :
 - $CO > 0,200$
- Kvoter :
 - R3-kvot $< 0,40$ ($R3\text{-kvot} = OD_{R3} / CO$)
 - R5-kvot $> 1,50$ ($R5\text{-kvot} = OD_{R5} / CO$)

Om dessa villkor inte är uppfyllda bör testomgången göras om.

7.4. UTVÄRDERING AV RESULTATEN

Se nedanstående tabell beträffande utvärdering av resultat.

Provkvot	Resultat	Utvärdering
Kvot $< 0,50$	Negativt	Provet anses vara icke-reaktivt för dengue NS1-antigen.
$0,50 \leq \text{Kvot} < 1,00$	Obestämbart	Provet anses vara obestämbart för dengue NS1-antigen.
Kvot $\geq 1,00$	Positivt	Provet anses vara reaktivt för dengue NS1-antigen.

Kommentar : OD som erhålls på mycket reaktiva prover kan nå den maximala OD som kan avläsas på spektrofotometern.

7.5. FELSÖKNING

Ikke validerade eller ikke repeterbara reaktioner orsakas ofta av följande:

- Otillräcklig tvättning av mikroplattan.
- Kontaminering av negativa prover med serum eller plasma med hög koncentration.
- Kontaminering av framkallningslösningen med oxidationsmedel (blekmedel, metalljoner etc.).
- Kontaminering av stopplösningen.

8- TESTRESULTAT

8.1. KÄNSLIGHET – SPECIFICITET

• Känslighet

Känsligheten utvärderades på 177 retrospektiva serumprover från patienter med aktuell dengueinfektion som bekräftats med RT-PCR. På denna panel var Platelia™ Dengue NS1 Ag-analysen positiv i 91 % av fallen (95 % konfidensintervall: 85,8 % - 94,8 %). Som jämförelse var känsligheten som erhöles med en annan Dengue IgM EIA-analys som förekommer på marknaden 17,5 %.

Känsligheten var signifikant högre för IgG-negativa prover från primärinfektion (känslighet på 98,5 %, n=66) än för IgG-positiva prover (känslighet på 85,6%, n=90) (χ^2 test, p=0,004).

Ingen signifikativ skillnad iaktogs i förhållande till dengueserotyper enligt sammanfattningen i tabell 1 nedan:

Tabell 1 : Känslighet för Platelia™ Dengue NS1 Ag i förhållande till virusserotyp (n=177).

Serotyp	Antal serumprover	Känslighet för Platelia™ Dengue NS1 Ag (95 % KI)
1	93	88,9% (85,8% - 94,8%)
2	31	87,1% (70,1% - 96,3%)
3	24	100,0% (85,6% - 100,0%)
4	29	93,3% (77,9% - 97,9%)

Känsligheten för Platelia™ Dengue NS1 Ag studerades på serumprover från patienter för vilka förekomst av feber dokumenterats. Högst känslighet erhålls så snart de kliniska tecknen visar sig och den är fortsatt hög under feberepisoder, vilket framgår av redovisningen i tabell 2.

Tabell 2 : Känslighet för Platelia™ Dengue NS1 Ag i förhållande till uppträdande av kliniska tecken (n=177).

Dagar efter att feber börjat	Antal serumprover	Känslighet för Platelia™ Dengue NS1 Ag	Känslighet för Dengue IgM EIA
0	10	100,0%	0,0%
1	33	87,8%	5,1%
2	40	92,5%	6,1%
3	20	95,0%	15,0%
4	27	96,3%	48,1%
5	19	52,6%	94,1%
≥ 6	28	35,7%	100,0%

- **Specificitet**

Specificiteten utvärderades på 618 prover som omfattade prover från 563 blodgivare och 55 sjukhuspatienter. Inga positiva resultat iakttog hos den studerade populationen, vilket ger en specificitet på 100,0 % (95 % konfidensintervall: 99,4 %–100,0 %).

8.2. PRECISION

- **Precision inom test (repetierbarhet)**

För att utvärdera repeterbarheten inom test testades ett negativt och tre positiva prover 30 gånger i samma analys. Kvoten (S/CO) bestämdes för varje prov. Medelkvoten, standardavvikelsen (SD) och variationskoefficienten (CV %) för alla fyra proverna redovisas i tabell 3 nedan.

Tabell 3 : Precision inom test.

N=30	Negativt prov	Svagt positivt prov	Medium-positivt prov	Högt positivt prov
	Provkvot (S/CO)			
Medelvärde	0,10	1,32	3,79	6,24
SD	0,01	0,08	0,29	0,45
% CV	13,1	6,2	7,7	7,2

• Precision mellan test (reproducerbarhet)

För att utvärdera reproducerbarheten mellan test testades alla fyra proverna (ett negativt och tre positiva prover) i duplikat, två omgångar per dag under en tjugodagarsperiod. Kvoten (S/CO) bestämdes för varje prov. Medelkvoten, standardavvikelsen (SD) och variationskoefficienten (CV %) för alla fyra proverna redovisas i tabell 4 nedan.

Tabell 4: Precision mellan test

N=40	Negativt prov	Svagt positivt prov	Medium-positivt prov	Högt positivt prov
	Provkvot (S/CO)			
Medelvärde	0,10	1,17	3,85	6,20
SD	0,03	0,21	0,67	0,96
% CV	33,8	17,8	17,4	15,5

8.3. KORSREAKTIVITET

En panel med 38 serumprover med potentiellt interfererande ämnen såsom antinukleära antikroppar (n=10), reumafaktor (n=9), heterofila antikroppar (n=9) liksom patienter med myelom (n=10) testades med Platelia Dengue NS1 Ag. En annan panel med 162 serumprover från patienter med andra bekräftade sjukdomar än dengue (West Nile, gula febern, CMV, HSV, VZV etc.) testades. Samtliga 200 prover befanns vara negativa med Platelia™ Dengue NS1 Ag-analysen.

9- METODENS BEGRÄNSNINGAR

Diagnos av nylig denguevirusinfektion kan endast fastställas med en kombination av kliniska och biologiska data som underlag. Det resultat som erhålls av ett enstaka prov är inte ett tillräckligt bevis för diagnos av en nyligen förvärvad infektion.

10-TILLVERKARENS KVALITETSKONTROLL

Alla reagenser tillverkas och bereds i enlighet med vårt kvalitetssystem, från mottagandet av råmaterial till den slutliga marknadsföringen av produkten. Varje parti genomgår en kvalitetskontroll och släpps endast ut på marknaden om det överensstämmer med fördefinierade acceptanskriterier. Handlingar som beskriver produktion och kontroll av varje enskilt parti sparas hos Bio-Rad.

11-REFERENSER

Se den Engelsk versionen.

BIO-RAD

PLATELIA™ DENGUE NS1 AG

96 TESTS

72830

**KVALITATIV ELLER SEMI-KVANTITATIV
KONSTATERING AF DENGUE-VIRUS
NS1-ANTIGEN I HUMANT SERUM ELLER PLASMA
VED ENZYMIMMUNANALYSE**

IVD

1- KLINISK VÆRDI

Dengue er en endemisk sygdom, som rammer de tropiske og subtropiske regioner i hele verden. Den anses for at være den vigtigste arbovirus-relaterede sygdom med hensyn til dødelighed og samfundsøkonomiske omkostninger. Den globale udbredelse af dengue er forøget dramatisk gennem de seneste årtier og sygdommen er nu endemisk i mere end 100 lande og truer potentielt 40 % af jordens befolkning. WHO (World Health Organization) anslår, at der er mere end ca. 50 til 100 millioner tilfælde af dengue-infektioner over hele verden hvert år, som resulterer i 250.000 til 500.000 alvorlige og komplicerede former for sygdommen og 24.000 dødsfald hvert år.

Dengue-virus overføres af moskitomyg, primært *Aedes aegypti* og *Aedes albopictus*. Der er fire markante serotyper (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4). Den primære infektion medfører en livslang beskyttende immunitet overfor den homologe serotype, men giver kun delvis og forbigående beskyttelse imod de andre tre serotyper i tilfælde af ny infektion (sekundærinfektion).

Infektion med dengue-virus forårsager et bredt spektrum af sygdomme, fra symptomfri infektioner, udifferentieret feber og klassisk dengue-feber (DF) til de mere alvorlige former, dengue hæmoragisk feber (DHF) og dengue-chocksyndrom (DSS) med højere forekomster af dødelighed. DF er karakteriseret ved feber, som varer 3-5 dage, hovedpine, muskel- og ledsmerter samt udslæt, men sædvanligvis helbredelse. I forbindelse med DHF eller DSS, som hovedsageligt forekommer hos patienter, som tidligere har været inficeret med virussen, forekommer symptomer lig DF-symptomer, men de efterfølges af forøget vaskulær permeabilitet og hæmoragiske manifestationer, som fører til reduceret blodtryk, hypovolæmi, vaskulær kollaps og død.

Det største problem i forbindelse med behandling af inficerede patienter er hurtigt og specifik konstatering af dengue-virus i den akutte fase for at kunne implementere rettidig klinisk behandling. Isolation og identifikation af virussen eller konstatering af viral cellekernesyre giver mulighed for en tidlig diagnosticering i løbet af den febrile fase, men begge metoder kræver et specialiseret laboratorium, og resultaterne forekommer ikke med det samme. Konstatering af dengue-virusspecifikke antistoffer anvendes normalt til rutinemæssig diagnosticering. Antistofferne forekommer dog først efter symptomernes start. I den primære infektion indtræffer IgM og IgG henholdsvis ca. 5 og 14 dage efter symptomernes start.

I den sekundære infektion er IgM-niveauer lave eller umulige at konstatere, mens IgG forekommer 1-2 dage efter symptomernes start med højere niveauer end i den primære infektion. I nyere tid er konstatering af den cirkulerende dengue-virus' ikke-strukturelle protein NS1 i patienters serum beskrevet som en alternativ metode til tidlig diagnostisering. Der blev konstateret et cirkulerende NS1-antigen fra den første dag og op til 9 dage efter starten på feberangrebet med sammenlignelige niveauer i den primære og den sekundære infektion.

2- PRINCIP

Platelia™ Dengue NS1 Ag er en et-trins mikropfadeenzymimmunanalyse af sandwich-typen til kvalitativ eller semi-quantitativ konstatering af Dengue-virus NS1-antigenet i humant serum eller plasma. Testen anvender murine monoklonale antistoffer (MAb) til fæstning og afsløring.

Prøver og kontroller inkuberes direkte og samtidigt med konjugatet i 90 minutter ved 37 °C i mikropfadebrøndene, som er sensibiliseret med MAb. Hvis NS1-antigenet forekommer i prøven, dannes et immunkompleks: MAb - NS1 - MAb/peroxidase. Efter et vasketrin demonstreres forekomsten af immunkompleks ved distributionen af en kromogenopløsning, der igangsætter en farveudviklingsreaktion, i hver brønd. Efter 30 minutters inkubation ved stuetemperatur, stoppes den enzymatiske reaktion ved tilsætning af en syreopløsning. Den optiske densitets aflæsning, som opnås med et spektrofotometer, der er indstillet til 450/620 nm, er proportional med den mængde NS1, der findes i prøven. Forekomsten af NS1-antigenet i en enkelt prøve bestemmes ved at sammenligne den optiske densitet for prøven med værdien for kalibratorserummet.

3- PRODUKTOPLYSNINGER

Mærkning		Reagenstype	Præsentation
R1	Microplate	Mikroplade (klar til brug): 12 strimler med hver 8 brønde, som er dækket med anti-NS1 MAb og pakket i en vakuumbæret pose	1
R2	Concentrated Washing Solution (20x)	Koncentreret vaskeopløsning (20x) : Tampon TRIS-NaCl (pH 7,4), 2 % Tween® 20. Konserveringsmiddel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 70 mL
R3	Negative Control	Negativ kontrol : Humant serum negativ for Dengue NS1-antigen Konserveringsmiddel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R4	Calibrator	Kalibrator : TRIS-NaCl-buffer (pH 8,0), Dengue NS1-antigen, albumin fra kvægserum, glycerol, E102 og E122 Konserveringsmiddel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,5 mL
R5	Positive Control	Positiv kontrol : TRIS-NaCl-buffer (pH 8,0), Dengue NS1-antigen, albumin fra kvægserum, glycerol, E102 og E122 Konserveringsmiddel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 1,0 mL
R6	Conjugate (50x)	Konjugat (50x) : Anti-NS1 MAb, der er bundet til peroxidase fra peberrod. Konserveringsmiddel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 0,5 mL
R7	Diluent	Fortynder (klar til brug) : Fosfatbuffer, Tween® 20, serum fra kalvefostre. Konserveringsmiddel: < 1,5% ProClin™ 300	1 x 22 mL
R9	Chromogen TMB	Kromogen (brugsklar): 3,3',5,5' tetramethylbenzidin (< 0,1 %), H ₂ O ₂ (<1 %)	1 x 28 mL
R10	Stopping Solution	Stopopløsning (klar til brug): 1N-svovlsyreopløsning	1 x 28 mL
		Selvkylende film	4

Opbevaringsbetingelser og udløbsdato fremgår af kassen.

4- ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

Resultaternes pålidelighed afhænger af en korrekt implementering af følgende regler for god laboratoriepraksis:

- Brug ikke reagenser efter udløbsdatoen.
- Bland ikke reagenser fra forskellige partier i samme testkørsel.

BEMÆRK: Det gælder for vaskeopløsning (R2, etiketidentifikation: 20x, grøn), kromogen (R9, etiketidentifikation: TMB, turkisfarvet) og stopopløsning (R10, etiketidentifikation: 1N, rød), at det er muligt at anvende andre partier end dem i dette sæt under forudsætning af, at reagenserne er fuldstændig tilsvarende, og at samme parti anvendes i hele kørslen.

BEMÆRK: Det er ikke muligt at anvende Diluent (R7) fra andre lot end dem, der leveres med sættet.

BEMÆRK: Desuden kan vaskeopløsningen (R2 identificeret 20x med grøn skrift på etiketten) blandes med en af de to andre vaskeopløsninger indeholdt i de forskellige Bio-Rad reagenskit (R2 identificeret 10x med blå skrift eller 10x med orangefarvet skrift på etiketten), når de rekonstitueres korrekt og på betingelse af at der kun bruges én blanding til et bestemt testforløb.

- Lad reagenserne stabilisere sig ved stuetemperatur (+18-30 °C), før de anvendes.
- Rekonstituer eller fortynd reagenserne forsigtigt for at undgå kontaminering.
- Undgå at udføre testen i nærheden af reaktive dampe (syre dampe, alkaliske dampe og aldehyddampe) eller støv, der kan påvirke konjugatets enzymaktivitet.
- Benyt engangsmateriale, eller hvis dette ikke er muligt, udstyr af glas, som er vasket grundigt og skyllet med demineraliseret vand.
- Undgå, at mikropladen tørrer mellem afvaskningerne og fordelingen af reagenset.
- Enzymreaktionen er meget følsom over for metalioner. Undgå derfor, at metalelementer kommer i berøring med de forskellige konjugat- eller substratopløsninger.
- Kromogenopløsningen (R9) bør være farveløs. Hvis farven bliver blå, kan reagenset ikke anvendes og skal udskiftes.
- Brug en ny pipettespids til hver prøve.
- Grundig afvaskning af mikropladen er et afgørende trin i proceduren: Udfør det anbefalede antal afvaskninger, og sørg for, at alle brønde bliver helt fyldt og derefter helt tomt. Ukorrekte afvaskninger kan medføre unøjagtige resultater.

- Brug aldrig den samme beholder til at fordele konjugat- og udviklingsopløsning.
- Kontroller, at pipetterne og andet udstyr er i orden og fungerer korrekt og nøjagtigt.
- Analyseproceduren må ikke ændres.

SUNDHEDS- OG SIKKERHEDSMÆSSIGE FORHOLDSREGLER

- Materiale af human oprindelse, der er brugt til forberedelse af reagenser, er blevet testet og fundet ikke-reaktivt for hepatitis B-overfladeantigen (HBs Ag), antistoffer mod hepatitis C-virus (anti-HCV) og antistoffer mod HIV 1 og HIV 2 (Human Immunodeficiency Virus). Eftersom ingen metode kan give fuld garanti for fravær af smitsomme stoffer, skal du håndtere reagenser af human oprindelse og patientprøverne som potentielt smittefarlige.
- Ethvert materiale, herunder vaskeopløsninger, der kommer i direkte kontakt med prøver og reagenser, som indeholder materiale af human oprindelse, skal betragtes som potentielt smittefarligt.
- Brug engangshandsker ved håndtering af reagenser.
- Afpipettér aldrig med munden.
- Undgå at spilde prøver eller opløsninger, der indeholder prøvemateriale. Hvis du spilder materiale, skal du rense efter med blegemiddel i en opløsning på 10 %. Hvis du spilder syre, skal du først neutralisere syren med natriumbikarbonat, derefter rengøre med blegemiddel i en 10% opløsning og derefter tørre med sugende papir. Det materiale, der anvendes til rengøringen, skal kasseres og placeres i en beholder til kontamineret affald.
- Prøver af human oprindelse samt kontaminede materialer og produkter skal kasseres efter desinficeringen, enten ved nedsænkning i blegemiddel med en slutkoncentration på 5 % natriumhypoklorit i 30 minutter eller ved autoklavering ved 121 °C i mindst 2 timer. Autoklavering i mindst en time ved 121 °C er den bedste metode til inaktivering af HIV- og HB-vira.

ADVARSEL! Benyt ikke opløsninger, der indeholder natriumhypoklorit, i autoklaven.

- Undgå, at hud og slimhinder kommer i kontakt med substratbufferen, kromogenet og stopopløsningen (fare for forgiftning, irritation eller forbrændinger).
- Kemikalier skal håndteres og kasseres ifølge god laboratoriepraksis.



**Xi -
Irriterende**

Advarsel: Nogle af reagenserne indeholder ProClin™ 300 < 1,5%

R43: Kan fremkalde irritation ved hudkontakt

S28-37: Efter hudkontakt afvaskes stoffet straks med rigeligt vand og sæbe. Brug egnede beskyttelseshandsker under arbejdet.

5- PRØVETAGNING, FORBEREDELSE OG OPBEVARING

1. Serum og plasma (EDTA, citrat og heparin) anbefales som prøvetyper.
2. Bemærk følgende anbefalinger for håndtering, behandling og opbevaring af blodprøver:
 - Tag alle blodprøver under overholdelse af de generelle forholdsregler vedrørende venepunktur.
 - Lad serumprøverne koagulere fuldstændigt, før de centrifugeres.
 - Sørg for, at rørene altid er lukkede.
 - Adskil serummet eller plasmaet fra de koagulerede eller røde blodlegemer i et tæt tillukket opbevaringsrør efter centrifugeringen.
 - Prøven kan opbevares ved +2-8 °C, hvis screeningen udføres inden for 24 timer.
 - Hvis testen ikke udføres inden for 24 timer, eller prøverne skal transporteres, skal de nedfryses til mindst -20 °C.
 - Prøver, der har været optøet mere end tre gange, må ikke anvendes. Tidligere nedfrosne prøver skal blandes grundigt efter optøning, før testen udføres.
3. Prøver, der indeholder 100 mg/l bilirubin, og lipæmiske prøver med mængder, der svarer til 36 g/l triolein (triglycerid), påvirker ikke resultaterne. Forekomst af albumin ved 90g/l eller hæmolyserede prøver, der indeholder 10mg/mL hæmoglobin, kan øge forholdet af negative prøver.
4. Prøverne må ikke opvarmes.

6- ANALYSEPROCEDURE

6.1. NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

- Vortex-mixer.
- Mikropladelæser med filtre på 450 nm og 620 nm (*).
- Vandbad eller tilsvarende varmeskab til mikroplader med termostatindstilling til 37 ± 1 °C (*).
- Manuel, halvautomatisk eller automatisk mikropladevasker (*).
- Beholder til farligt biologisk affald.
- Natriumhypoklorit (blegemiddel) og natriumbikarbonat.
- Sterilt destilleret eller demineraliseret vand.
- Graduerede cylindere med kapaciteter på hhv. 25 mL, 50 mL, 100 mL og 1.000 mL.
- Engangslatexhandsker.
- Beskyttelsesbriller.
- Sugende papir.
- Automatiske eller halvautomatiske, justerbare eller forudindstillede pipetter eller multipipetter til måling af 50, 100, 300 og 1000 µL.
- Engangsrør.

(*) Kontakt vores tekniske afdeling for at få detaljerede oplysninger om det anbefalede udstyr.

6.2. REKONSTITUERING AF REAGENSER

- **R1** : Lad mikropladen nå stuetemperatur (+18-30 °C) før posen åbnes. Læg straks de ubrugte teststrimler tilbage i posen, og sørg for at posen indeholder tørremiddel. Forsegl forsigtigt posen igen, og opbevar den ved +2-8 °C.
- **R2** : Fortynd vaskeopløsningen R2 i destilleret vand i forholdet 1:20, fx 50 mL R2 og 950 mL destilleret vand, for at få den brugsklare vaskeopløsning. Klargør 350 mL fortyndet vaskeopløsning til én plade med 12 strimler, hvis der foretages manuel vask.
- **R6+R7** : Konjugatet (R6) er koncentreret 50x og skal homogeniseres inden anvendelse. Fortynd reagentet i forholdet 1:50 med R7. Til en strimmel fortyndes 20 µL R6 qsp. 1,0 mL R7. Multipliser denne mængde med 12 til en mikroplade.

6.3. OPBEVARING AF ÅBNE OG/ELLER REKONSTITUERED E REAGENSER

Sættet skal opbevares ved +2-8°C. Hvis opbevaring sker ved +2-8°C før åbning, kan hver komponent anvendes frem til udløbsdatoen, der fremgår af yderetiketten på sættet.

- **R1** : Når posen er blevet åbnet, forbliver strimlerne holdbare i op til seks uger når de opbevares ved +2-8 °C i den samme omhyggeligt lukkede pose, som indeholder tørremiddel.
- **R2** : Efter fortynding kan vaskeopløsningen gemmes i 2 uger ved +2-30°C. Når den koncentrerede vaskeopløsning opbevares ved +2-30°C, er den stabil indtil udløbsdatoen på etiketten, forudsat at der ikke forekommer kontamination.
- **R6+R7** : Efter fortynding er opløsningen holdbar i op til 8 timer ved opbevaring ved stuetemperatur (+18-30 °C).
- **R3, R4, R5, R6, R7, R10** : Når reagenserne er åbnet, er de holdbare indtil udløbsdatoen på etiketten, hvis de opbevares ved +2-8 °C, og der ingen kontamination forekommer.
- **R9**: Efter åbning og uden kontamination er reagentet stabilt i op til 8 uger ved opbevaring ved +2-8°C.

6.4. PROCEDURE

Følg analyseproceduren nøje.

Lad reagenserne stabilisere sig ved stuetemperatur (+18 -30 °C), før de anvendes.

Anvend én negativ (R3), to kalibratorer (R4) og én positiv kontrol (R5) i hver kørsel til at validere analyseresultaterne.

1. Opret en nøje fordelings- og identifikationsplan for kalibrator, kontrol- og patientprøver (S1, S2...), som angivet nedenfor:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5										
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

2. Tag transportbakken og strimlerne (R1) ud af beskyttelsesposen (Se afsnit 6.2).
3. Fordel følgende i brøndene i den korrekte rækkefølge som angivet herunder:
- 50µL fortynder (R7)
 - 50µL prøvemateriale (kalibrator, kontrol- eller patientprøver)
 - 100µL fortyndet konjugat (R6+R7)

N.B: Fordelingen af fortynder, prøvemateriale og konjugat kan kontrolleres visuelt på dette stadie af manipulationen: Når det rene prøvemateriale tilsættes fortynderen, ændres farven fra gul til orange. Efter tilsætningen af konjugatet, ændres farven fra orange til grøn. Denne kontrol kan fremstå anderledes ved anvendelse af fortyndede prøver.

4. Afdæk reaktionsmikropladen med selvklæbende pladeforsegling, og pres den ned mod pladen, så den slutter helt til overalt.
5. Inkuber mikropladen i et termostatkontrolleret vandbad eller et varmeskab til mikroplader ved 37 ± 1 °C i 90 ± 5 minutter.
6. Forbered den fortyndede vaskeopløsning (R2) (se afsnit 6.2).
7. Fjern den selvklæbende pladeforsegling i slutningen af inkubationsperioden. Tøm indholdet af alle brønde op i en beholder til biologisk farligt affald (en beholder med natriumhypoklorit). Vask mikropladen 6 gange med vaskeopløsning (R2). Vend mikropladen, og dup den forsigtigt mod sugepapiret for at fjerne resterende væske.

Bemærk! Det er vigtigt at undgå at sprøjte reagensvæske under tømningen og vasketrinene.

8. Fordel hurtigt og i **mørke** 200 µL kromogenopløsning (R9) i hver brønd. **Lad reaktionen foregå i mørke i 30 ± 5 minutter ved stuetemperatur (+18-30°C).** Benyt ikke selvklæbende pladeforsegling til denne inkubation.

9. Stands enzymreaktionen ved at tilsætte 100 µL stopopløsning (R10) i hver brønd. Benyt samme rækkefølge og fordelingshastighed som for enzymsubstratet.
10. Tør undersiden af pladen omhyggeligt af. Aflæs den optiske densitet ved 450/620 nm ved hjælp af en mikropladelæser inden for 30 minutter efter reaktionen er stoppet (teststrimlerne må aldrig udsættes for lys før aflæsningen).
11. Kontroller, at alle resultater stemmer overens med hensyn til aflæsning, fordeling og identifikation af pladen og prøverne.

7- BEREGNING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

7.1. BEREGNING AF CUT-OFF-VÆRDI

Cut-off-værdien CO svarer til den gennemsnitlige værdi af dobbeltbestemmelserne af de optiske densiteter for kalibratorduplikaterne (R4).

7.2. BEREGNING AF PRØVEFORHOLD

Prøveresultatet udtrykkes som en ratio (et forhold) med følgende formel, hvor S er prøvens optiske densitet (OD):

- Prøve ratio = S/CO

7.3. KVALITETSKONTROL

For at validere analysen skal følgende kriterier være opfyldt:

- Værdier for optisk densitet
 - $CO > 0,200$
- Forhold:
 - R3-forholdet $< 0,40$ (R3-forholdet = OD_{R3} / CO)
 - R5-forholdet $> 1,50$ (R5-forholdet = OD_{R5} / CO)

Hvis disse specifikationer ikke opfyldes, skal testen køres igen.

7.4. FORTOLKNING AF RESULTATER

Se nedenstående tabel for oplysninger om fortolkning af resultaterne.

Prøves forhold	Resultat	Fortolkning
Forhold $< 0,50$	Negativ	Prøven betragtes som ikke-reaktiv for Dengue NS1-antigenet.
$0,50 \leq$ Forhold $< 1,00$	Tvivlsom	Prøven betragtes som tvivlsom for Dengue NS1-antigenet.
Forhold $\geq 1,00$	Positiv	Prøven betragtes som reaktiv for Dengue NS1-antigenet.

Bemærk! OD-værdier, som er opnået i meget reaktive prøver, kan nå den maksimale OD-værdi, som kan aflæses på spektrofotometeret.

7.5. HJÆLP TIL FEJLFINDING

Reaktioner, der ikke kan godkendes eller bekræftes ved gentagelse, skyldes ofte:

- Utilstrækkelig afvaskning af mikroplader.
- Kontamination af negative prøver med serum eller plasma med høj koncentration.
- Kontamination af udviklingsopløsningen med iltningmiddel (blegemiddel, metalioner ...).
- Kontamination af stopopløsningen.

8- YDEEVNE

8.1. SENSITIVITET – SPECIFICITET

• Sensitivitet

Sensitiviteten blev evalueret på 177 retrospektive sera fra patienter med aktiv dengue-infektion, bekræftet med RT-PCR. I dette panel var Platelia™ Dengue NS1 Ag-analysen positiv i 91% af tilfældene (95% konfidensinterval: 85,8%-94,8%). Til sammenligning var den sensitivitet, som blev opnået med en markedsført Dengue IgM EIA-analyse 17,5 %.

Sensitiviteten var signifikant højere i IgG-negative prøver fra den primære infektion (sensitivitet på 98,5%, n = 66) end i IgG-positive prøver (sensitivitet på 85,6%, n = 90) (χ^2 test, p = 0,004).

Der blev ikke observeret nogen større forskel i forhold til dengue-serotyper, hvilket vises i Tabel 1 nedenfor:

Tabel 1 : Sensitiviteten for Platelia™ Dengue NS1 Ag i forhold til virus-serotype (n = 177).

Serotype	Antal sera	Sensitivitet for Platelia™ Dengue NS1 Ag (95 % CI)
1	93	88,9% (85,8% - 94,8%)
2	31	87,1% (70,1% - 96,3%)
3	24	100,0% (85,6% - 100,0%)
4	29	93,3% (77,9% - 97,9%)

Sensitiviteten for Platelia™ Dengue NS1 Ag blev undersøgt på sera fra patienter med dokumenteret feberangreb. Den højeste sensitivitet opnås, så snart de kliniske tegn kommer til syne og forbliver høj under febertilfældene som vist i Tabel 2.

Tabel 2 : Sensitiviteten for Platelia™ Dengue NS1 Ag i forhold til fremkomst af kliniske tegn (n = 177).

Dage efter feberstart	Antal sera	Sensitivitet for Platelia™ Dengue NS1 Ag	Sensitivitet for Dengue IgM EIA
0	10	100,0%	0,0%
1	33	87,8%	5,1%
2	40	92,5%	6,1%
3	20	95,0%	15,0%
4	27	96,3%	48,1%
5	19	52,6%	94,1%
≥ 6	28	35,7%	100,0%

- **Specificitet**

Specificiteten blev evalueret for 618 prøver, herunder prøver fra 563 bloddonorer og 55 hospitalsindlagte patienter. Der blev ikke observeret positive resultater i den undersøgte befolkningsgruppe, hvilket giver en specificitet på 100,0 % (95 % konfidensinterval: 99,4 % - 100,0 %).

8.2. PRÆCISION

- **Gentagelsesnøjagtighed for intern analyse:**

Med henblik på at evaluere gentagelsesnøjagtigheden inden for analysen blev tre positive prøver og en negativ prøve testet 30 gange i løbet af den samme analyse. Forholdet/ratioen (S/CO) blev bestemt for hver prøve. Det gennemsnitlige forhold, standardafvigelsen (SD) og den procentvise variationskoefficient (%CV) for de fire prøver vises nedenfor i Tabel 3.

Tabel 3 : Præcision inden for analysen.

N=30	Negativ prøve	Svagt positiv prøve	Mellempositiv prøve	Høj positiv prøve
	Prøveforhold/ratio (S/CO)			
Gennemsnit	0,10	1,32	3,79	6,24
SD	0,01	0,08	0,29	0,45
% CV	13,1	6,2	7,7	7,2

• Krydskontrolleret nøjagtighed (reproducerbarhed)

Med henblik på at evaluere gentagelsesnøjagtigheden for krydskontrolleret analyse, gennemgik alle fire prøver (en negativ og tre positive prøver) dobbeltbestemmelser i to kørsler om dagen over en periode på 20 dage. Forholdet/ratioen (S/CO) blev bestemt for hver prøve. Det gennemsnitlige forhold, standardafvigelsen (SD) og den procentvise variationskoefficient (%CV) for de fire prøver vises nedenfor i Tabel 4.

Tabel 4: Krydskontrolleret nøjagtighed.

N=40	Negativ prøve	Svagt positiv prøve	Mellempositiv prøve	Høj positiv prøve
	Prøveforhold/ratio (S/CO)			
Gennemsnit	0,10	1,17	3,85	6,20
SD	0,03	0,21	0,67	0,96
% CV	33,8	17,8	17,4	15,5

8.3. KRYDSREAKTIVITET

Et panel på 38 sera med potentielle interfererende substanser, som f.eks. antinukleare antistoffer (n=10), reumatoid faktor (n=9), heterofile antistoffer (n=9) samt patienter med myeloma (n=10) blev testet med Platelia Dengue NS1 Ag. Et andet panel på 162 sera fra patienter med andre bekræftede sygdomme end dengue (West Nile-feber, gul feber, CMV, HSV, VZV, osv ...) blev også testet. Alle 200 prøver blev fundet negative med Platelia™ Dengue NS1 Ag-analysen.

9- PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Diagnosticering af nylig infektion med Dengue-virus kan kun fastlægges på baggrund af en kombination af kliniske observationer og biologiske data. Resultatet fra en enkelt prøve udgør ikke tilstrækkeligt bevis til en diagnosticering af en nylig infektion.

10- PRODUCENTENS KVALITETSKONTROL

Alle producerede reagenser fremstilles ifølge vores kvalitetssikringssystem, lige fra modtagelsen af råmaterialerne til markedsføringen af slutproduktet. Hvert parti af slutproduktet gennemgår kvalitetskontrol og markedsføres kun, hvis det opfylder de foruddefinerede kvalitetskriterier. Dokumentation vedrørende produktion og kontrol af hvert parti opbevares inden for virksomheden.

11- REFERENCER

Se den Engelsk version.



Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax.: +33 (0) 1 47 41 91 33



07/2008
code: 881033