

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

REF 532019N-10



de	Gebrauchsanweisung	2	Symbols	39
en	Instructions for use	7	Our Teams	40
fr	Instructions d'utilisation	12		
es	Instrucciones de uso	17		
it	Istruzioni per l'uso	22		
pl	Sposób użycia	27		
pt	Instruções de Utilização	32		



1. Verwendungszweck und Anwendungsbereich

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test ist ein chromatographischer Immunoassay im Lateral-Flow Format zum qualitativen Nachweis von Dengue-Virus-NS1-Antigenen sowie von anti-Dengue-Virus-IgG und -IgM in humanen Vollblut-, Serum- oder Plasmaproben (siehe Punkt 12. „Grenzen des Tests“). Der Test ist als Hilfsmittel bei der Diagnose von primären und sekundären Dengue-Infektionen bestimmt. Die Testdurchführung ist nicht automatisiert und erfordert keine spezielle Schulung oder Qualifikation. Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test ist nur für den professionellen Gebrauch ausgelegt.

2. Einleitung und Diagnostische Bedeutung

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

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

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

3. Testprinzip

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test ist ein chromatographischer Immunoassay im Lateral-Flow Format zum qualitativen Nachweis von Dengue-Virus-NS1-Antigenen sowie von anti-Dengue-Virus-IgG und -IgM in humanen Vollblut-, Serum- oder Plasmaproben.

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

Anti-Dengue-Virus-NS1-Antikörper sind im Testlinienbereich „T“ der Membran immobilisiert. Anti-human IgM und anti-human IgG sind im jeweiligen Testlinienbereich „IgM“ und „IgG“ der Membran immobilisiert.

Während der Testung binden Dengue-Virus-NS1-Antigene, falls in der Probe vorhanden, an anti-Dengue-Virus-NS1-Antikörper (aktiver Bestandteil der Nachweisreaktion: 0,6 - 0,8 µg/Test), die mit farbigen Partikeln konjugiert und auf dem Sample Pad der Testkassette vorbeschichtet sind. Falls spezifische anti-Dengue-Virus-IgM oder anti-Dengue-Virus-IgG in der Probe vorhanden sind, binden diese an die Dengue-Virus-Antigene (aktiver Bestandteil der Nachweisreaktion: 0,2 - 0,4 µg/Test), die mit farbigen Partikeln konjugiert und auf dem Sample Pad der Testkassette vorbeschichtet sind. Das Gemisch wandert dann chromatographisch durch Kapillarkraft die Membran entlang und reagiert mit den Reagenzien auf der Membran. Die Komplexe werden dann von anti-Dengue-Virus-NS1-Antikörpern (aktiver Bestandteil der Nachweisreaktion: 1,0 - 2,5 µg/Test) sowie von anti-human IgM (aktiver Bestandteil der Nachweisreaktion: 0,5 - 1,0 µg/Test) und anti-human IgG (aktiver Bestandteil der Nachweisreaktion: 1,5 - 3,0 µg/Test) in den Testlinienbereichen „T“ sowie auch „IgM“ und „IgG“ abgefangen. Überschüssige, farbige Partikel werden im jeweiligen Kontrolllinienbereich „C“ abgefangen. Das Vorhandensein einer farbigen Linie im Testlinienbereich „T“ und/oder „IgM“ und/oder „IgG“ deutet auf ein positives Ergebnis hin. Die Abwesenheit einer farbigen Linie im Testlinienbereich „T“ und/oder „IgM“ und/oder „IgG“ weist auf ein negatives Ergebnis hin.

Das Erscheinen einer farbigen Linie im Kontrolllinienbereich „C“ (linke Seite der Testkassette: Dengue NS1 Ag Test) und der Farbwechsel von einer blauen zu einer roten Linie im Kontrolllinienbereich „C“ (rechte Seite der Testkassette: Dengue IgG/IgM Test) dienen als Verfahrenskontrolle und weisen darauf hin, dass genügend Probenvolumen hinzugegeben wurde und dass die Membran ausreichend durchnässt ist.

4. Bestandteile der Testpackung

- 10 NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Testkassetten*, inkl. Einwegpipetten (25 µL) für Dengue NS1 Ag
- 10 Einwegpipetten (5 µL) für Dengue IgG/IgM
- 1 Puffer „Buffer“ (3 mL)**
- 1 Gebrauchsanweisung

*Enthält Konservierungsmittel Natriumazid: <0,1%

**Phosphatpuffer enthält folgende Konservierungsmittel: Natriumazid: <0,1%

Gemäß Verordnung (EC) Nr. 1272/2008 CLP ist keine Gefahrenkennzeichnung erforderlich. Die Konzentrationen sind unterhalb der Freigrenzen.

5. Zusätzlich benötigte Materialien

- Probensammelbehälter (geeignet für das zu testende Probenmaterial)
- Zentrifuge (nur für Serum- oder Plasmaproben)
- Alkoholpads
- Lanzetten (nur für Vollblutproben aus Fingerpunktion)
- Timer

6. Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Die Test-Kits sollten bei 2-30°C bis zum angegebenen Verfallsdatum gelagert werden. Die Testkassetten sind bis zum auf dem Folienbeutel angegebenen Verfallsdatum stabil. Die Testkassette muss bis zum Gebrauch im verschlossenen

Folienbeutel verbleiben. Frieren Sie die Test-Kits nicht ein. Verwenden Sie die Tests nicht nach dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum. Es ist darauf zu achten, dass die Bestandteile des Test-Kits vor Kontamination geschützt sind. Verwenden Sie die Bestandteile des Test-Kits nicht, wenn es Anzeichen einer mikrobiellen Kontamination oder einer Ausfällung gibt. Biologische Kontaminationen von Dosier- vorrichtungen, Behältern oder Reagenzien können zu falschen Ergebnissen führen.

7. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

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

8. Probenahme, -vorbereitung und -lagerung

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test kann mit Vollblut (aus Venen- oder Fingerpunktion), Serum oder Plasma durchgeführt werden.

Vollblutprobenentnahme aus Fingerpunktion

- Waschen Sie die Hand des Patienten mit Seife und warmem Wasser oder säubern Sie sie mit einem Alkoholpad. Lassen Sie sie trocknen.
- Massieren Sie die Hand ohne dabei die Einstichstelle zu berühren, indem Sie die Hand abwärts in Richtung der Kuppe des Mittel- oder Ringfingers reiben.

- Stechen Sie die Haut mit einer sterilen Lanzette. Wischen Sie den ersten Blutstropfen ab.
- Reiben Sie vorsichtig die Hand vom Handgelenk zur Handfläche und zum Finger, damit sich auf dem Einstichpunkt ein runder Tropfen bildet.

Vollblutproben aus Fingerpunktion sollten unverzüglich getestet werden.

Vollblutproben aus Venenpunktion

Für die Aufbereitung von venösem Vollblut oder Plasma- proben sollten Probensammelbehälter mit Antikoagulanzen, wie Natrium EDTA, Natriumcitrat, oder Natriumheparin verwendet werden.

Die Testung sollte unmittelbar nach der Probenentnahme durchgeführt werden. Bewahren Sie Proben nicht bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum auf.

Venöses Vollblut sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden, wenn der Test innerhalb von 3 Tagen nach Probenentnahme durchgeführt wird.

Frieren Sie die Vollblutproben nicht ein.

Serum- und Plasmaproben

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

Die Testung sollte unmittelbar nach der Probenentnahme durchgeführt werden. Bewahren Sie Proben nicht bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum auf. Serum- und Plasmaproben können bei 2-8°C bis zu 7 Tage gelagert werden. Für eine längere Lagerung sollten die Proben bei -20°C gelagert werden.

Bringen Sie Proben vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur. Eingefrorene Proben sollten vor Testdurchführung vollständig aufgetaut und gut gemischt werden. Proben sollten nicht wiederholt eingefroren und aufgetaut werden.

Wenn Proben versendet werden sollten, sollten diese unter Einhaltung von geltenden Vorschriften für den Transport ätiologischer Krankheitserreger verpackt werden.

Iktische, lipämische, hämolytische, wärmebehandelte oder kontaminierte Proben können zu falschen Testergebnissen führen.

9. Testdurchführung

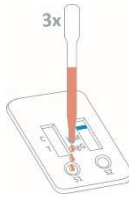
Bringen Sie alle Tests, Proben, Puffer und/oder Kontrollen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (15-30°C).

1. Entnehmen Sie die Testkassette dem Folienbeutel und verwenden Sie sie so schnell wie möglich. Die besten Ergebnisse werden erhalten, wenn der Test unverzüglich nach der Öffnung des Folienbeutels durchgeführt wird. Kennzeichnen Sie die Testkassette mit der Patienten- oder Kontrollidentifikation.
2. Legen Sie die Testkassette auf eine saubere und ebene Oberfläche.

3. a) Für Serum- oder Plasmaproben:

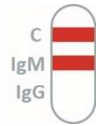
Dengue-Virus-NS1-Ag

Halten Sie die 25 µL-Pipette senkrecht, saugen Sie damit die Serum- oder Plasmaprobe auf und geben Sie 3 Tropfen (ca. 75 µL) in die Probenvertiefung (S1) der Testkassette. **Vermeiden Sie dabei die Bildung von Luftblasen.**



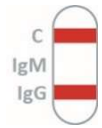
Positiv für anti-Dengue-Virus-IgM

Die blaue Linie im Kontrolllinienbereich „C“ färbt sich rot. Eine weitere rote Linie erscheint im Testlinienbereich „IgM“.



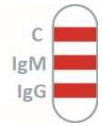
Positiv für anti-Dengue-Virus-IgG

Die blaue Linie im Kontrolllinienbereich „C“ färbt sich rot. Eine weitere rote Linie erscheint im Testlinienbereich „IgG“.



Positiv für anti-Dengue-Virus-IgG und -IgM

Die blaue Linie im Kontrolllinienbereich „C“ färbt sich rot. Eine rote Linie erscheint im Testlinienbereich „IgM“ und eine weitere im Testlinienbereich „IgG“.



Hinweis:

Die Farbintensität im Testlinienbereich „T“, „IgG“ oder „IgM“ kann abhängig von der in der Probe vorhandenen Konzentration der Dengue-Virus-NS1-Antigene bzw. anti-Dengue-Virus-Antikörper variieren. Daher sollte jede Farbtonung im Testlinienbereich „T“, „IgG“ oder „IgM“ als positives Ergebnis betrachtet werden. Beachten Sie, dass es sich bei diesem Test nur um einen qualitativen Test handelt und dass er die Analytkonzentration in der Probe nicht bestimmen kann.

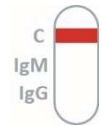
Negativ für Dengue-Virus-NS1-Ag

Es erscheint nur eine farbige Linie im Kontrolllinienbereich „C“. Im Testlinienbereich „T“ erscheint keine Linie.



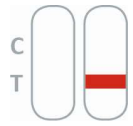
Negativ für anti-Dengue-Virus-IgG und -IgM

Die blaue Linie im Kontrolllinienbereich „C“ färbt sich rot. Keine Linien erscheinen im Testlinienbereich „IgM“ und „IgG“.



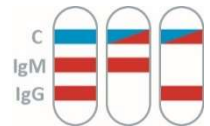
Ungültig für Dengue-Virus-NS1-Ag

Die Kontrolllinie „C“ erscheint nicht. Ergebnisse von Tests, die nach der festgelegten Auswertzeit keine Kontrolllinie gebildet haben, müssen verworfen werden.



Ungültig für anti-Dengue-Virus-IgG und -IgM

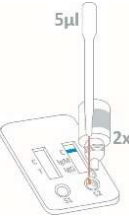
Ergebnisse von Tests, bei denen die blaue Linie im Kontrolllinienbereich „C“ nach der festgelegten Auswertzeit vollständig oder teilweise blau bleibt, müssen verworfen werden.



Überprüfen Sie den Verfahrensablauf und wiederholen Sie die Testung mit einer neuen Testkassette. Falls das Problem weiterbesteht, verwenden Sie das Test-Kit bitte nicht weiter und setzen Sie sich mit Ihrem Distributor in Verbindung.

anti-Dengue-Virus-IgG/IgM

- Halten Sie die 5 µL-Pipette senkrecht, saugen Sie damit die Serum- oder Plasmaprobe bis zur ersten Verbreiterung (ca. 5 µL) auf und geben Sie sie in die Probenvertiefung (S2) der Testkassette.
- Halten Sie das Pufferfläschchen senkrecht und geben Sie 2 Tropfen Puffer in die Probenvertiefung (S2) der Testkassette. **Vermeiden Sie dabei die Bildung von Luftblasen.**



b) Für Vollblutproben aus Venenpunktion/aus Fingerpunktion:

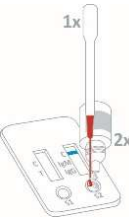
Dengue-Virus-NS1-Ag

- Halten Sie die 25 µL-Pipette senkrecht, saugen Sie damit die Vollblutprobe auf und geben Sie 2 Tropfen (ca. 50 µL) der Probe in die Probenvertiefung (S1) der Testkassette.
- Halten Sie das Pufferfläschchen senkrecht und geben Sie 1 Tropfen Puffer in die Probenvertiefung (S1) der Testkassette. **Vermeiden Sie dabei die Bildung von Luftblasen.**



anti-Dengue-Virus-IgG/IgM

- Halten Sie die 5 µL-Pipette senkrecht, saugen Sie damit die Vollblutprobe über die erste Verbreiterung hinaus auf und geben Sie 1 Tropfen (ca. 10 µL) in die Probenvertiefung (S2) der Testkassette.
- Halten Sie das Pufferfläschchen senkrecht und geben Sie 2 Tropfen Puffer in die Probenvertiefung (S2) der Testkassette. **Vermeiden Sie dabei die Bildung von Luftblasen.**



Alternativ kann auch eine Mikropipette verwendet werden.

- Starten Sie den Timer.
- Warten Sie darauf, dass die rote(n) Linie(n) erscheint/en. Werten Sie das Testergebnis nach genau 15 Minuten aus. Nach mehr als 30 Minuten keine Ergebnisse mehr auswerten.



10. Testauswertung

Positive für Dengue-Virus-NS1-Ag

Eine farbige Linie erscheint im Kontrolllinienbereich „C“ und eine weitere farbige Linie erscheint im Testlinienbereich „T“.



Ungenügendes Probenvolumen, abgelaufene Tests oder fehlerhafte Vorgehensweise sind die wahrscheinlichsten Ursachen dafür, dass die Kontrolllinie nicht erscheint.

11. Qualitätskontrolle

Die Testkassette beinhaltet eine interne Verfahrenskontrolle:

Eine im Kontrolllinienbereich „C“ erscheinende farbige Linie (linke Seite der Testkassette: Dengue NS1 Ag Test) sowie eine von blau zu rot wechselnde Linie (rechte Seite der Testkassette: Dengue IgG/IgM Test) werden als interne Verfahrenskontrolle betrachtet. Sie bestätigt ausreichendes Probenvolumen, eine korrekte Verfahrenstechnik und dass die Membran ausreichend durchnässt ist.

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

12. Grenzen des Tests

- Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test ist nur für den professionellen *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch ausgelegt und sollte nur zum qualitativen Nachweis von anti-Dengue-Antikörpern in humanen Vollblut-, Serum- oder Plasma-proben verwendet werden. Weder der quantitative Wert noch die Steigerungsrate der Konzentration von Dengue-Virus-NS1-Antigenen bzw. anti-Dengue-Antikörpern können mit diesem qualitativen Test bestimmt werden.
- Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test zeigt nur das Vorhandensein von Dengue-Virus-NS1-Antigenen und anti-Dengue-Antikörpern in der Probe und sollte nicht als einziges Kriterium für eine Diagnose von Dengue verwendet werden.
- Nach frühem Einsetzen des Fiebers können anti-Dengue IgM-Konzentrationen unterhalb von nachweisbaren Konzentrationen liegen. Für Primärinfektionen zeigte ein Antibody-Capture-IgM-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (MAC-ELISA), dass 80% aller getesteten Dengue-Patienten nachweisbare IgM-Konzentrationen am 5. Tag nach der Infektion aufwiesen und 99% aller Patienten am Tag 10 IgM-positiv getestet wurden. Daher empfiehlt es sich, dass die Patienten innerhalb dieses Zeitraums getestet werden. Was Sekundärinfektionen betrifft, kennzeichnen ein niedriger Stoffmengenanteil der anti-Dengue-IgM und ein hoher Stoffmengenanteil der anti-Dengue-IgG, welche weitgehend reaktiv zu Flaviviren sind, die Antikörper. Die Testlinie „IgM“ kann schwach sein und eine Kreuzreaktion kann im Testlinienbereich „IgG“ auftreten.
- Serologische Kreuzreaktivitäten durch die Flavivirus-Gruppe (St.-Louis-Enzephalitis, West-Nil-Virus, Japanische Enzephalitis und Gelbfieberviren) sind möglich. Positive Ergebnisse sollten unter Verwendung anderer Methoden bestätigt werden.
- Die andauernde An- oder Abwesenheit von Antikörpern kann nicht zur Bestimmung des Therapieerfolgs oder -versagens herangezogen werden.
- Ergebnisse von immunsupprimierten Patienten sollten mit Vorsicht ausgewertet werden.
- Wie bei allen diagnostischen Tests sollten alle Ergebnisse im Zusammenhang mit weiterer klinischer Information, die dem Arzt zur Verfügung steht, ausgewertet werden.

- Sollte das Testergebnis negativ ausfallen, klinische Symptome aber weiter anhalten, empfiehlt es sich, zusätzliche Testungen unter Verwendung anderer klinischer Methoden durchzuführen. Ein negatives Ergebnis schließt zu keinem Zeitpunkt eine kurz zurückliegende Dengue-Infektion aus.
- Ein negatives Testergebnis für Dengue NS1 Ag kann auftreten, wenn die Menge an Dengue-Antigenen in der Probe unter der Nachweisgrenze des Tests liegt oder wenn die nachgewiesenen Dengue-Virus-NS1-Antigene während des Krankheitsstadiums, in dem die Probe entnommen wurde, nicht vorhanden waren.
- Das Vorhandensein der nachweisbaren Dengue-Virus-NS1-Ag kann ein positives Ergebnis für eine frühe Dengue-Infektion bedeuten.
- Das Dengue-Virus-NS1-Antigen wird voraussichtlich 1 Tag nach Beginn des Fiebers nachgewiesen und kann sowohl bei primären als auch bei sekundären Dengue-Infektionen bis zu 9 Tage lang persistieren. Wenn jedoch anti-Dengue-Virus-NS1-Antikörper produziert werden, wird der Nachweis von Dengue-Virus-NS1-Antigenen gehemmt.

13. Leistungsmerkmale des Tests

Klinische Leistungsmerkmale

Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test wurde mit klinischen Proben evaluiert, deren Status für die rechte Seite der Testkassette (Dengue IgG/IgM Test) mittels ELISA und für die linke Seite der Testkassette (Dengue NS1 Ag Test) mittels Viruskultur bestätigt wurde.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgM) vs. ELISA

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgM)	Dengue IgM ELISA		
	Positiv	Negativ	Total
Positiv	59	0	59
Negativ	1	140	141
Total	60	140	200

Diagnostische Sensitivität: 98,3% (91,1% - 99,7%)*

Diagnostische Spezifität: >99,9% (97,3% - 100,0%)*

Gesamtübereinstimmung: 99,5% (97,2% - 99,9%)*

*95% Konfidenzintervall

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG) vs. ELISA

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG)	Dengue IgG ELISA		
	Positiv	Negativ	Total
Positiv	89	0	89
Negativ	1	150	151
Total	90	150	240

Diagnostische Sensitivität: 98,9% (94,0% - 99,8%)*

Diagnostische Spezifität: >99,9% (97,5% - 100,0%)*

Gesamtübereinstimmung: 99,6% (97,7% - 99,9%)*

*95% Konfidenzintervall

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (NS1 Ag) vs. Viruskultur

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (NS1 Ag)	Viruskultur			
		Positiv	Negativ	Total
	Positiv	104	3	107
Negativ	8	186	194	
Total	112	189	301	

Diagnostische Sensitivität: 92,9% (86,5% - 96,3%)*

Diagnostische Spezifität: 98,4% (95,4% - 99,5%)*

Gesamtübereinstimmung: 96,3% (93,6% - 97,9%)*

*95% Konfidenzintervall

Interferierende Substanzen

Negative, schwach positive anti-Dengue-Virus-IgG und -IgM Plasmaproben sowie schwach positive Dengue-Virus-NS1-Ag Plasmaproben wurden mit den folgenden interferierenden Substanzen versetzt und zeigten keine Interferenz mit dem NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test.

Acetylsalicylsäure	4,34 mmol/L
Ascorbinsäure	0,2 mg/mL
Albumin	60 g/L
Bilirubin	342 µmol/L
Chinin	148 µmol/L
Ethanol	86,8 mmol/L
HAMA	780,73 IU/mL
Hämoglobin	2 g/L
Ibuprofen	2425 µmol/L
Koffein	308 µmol/L
Metronidazol	701 µmol/L
Paracetamol	199 µmol/L
Rheumafaktoren	1035 IU/mL
Rifampicin	78,1 µmol/L
Triglyceride	37 mmol/L
γ Globulin	60 g/L

Kreuzreaktivität

Anti-HIV-, HBsAg-, anti-HCV-, anti-HAV IgM, anti-Rubella-Virus-IgM, anti-CMV IgM, anti-HSV-1 IgM, anti-HSV-2 IgM, Typhus, Gelbfieber, Zika-Virus, Chikungunya-Virus, anti-Toxoplasma gondii IgM, Syphilis und Tuberkulose-positive Proben wurden mit dem NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test getestet. Bei der Testung mit dem NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test wurde keine Kreuzreaktivität mit den Proben beobachtet.

Präzision

Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit

Die Präzision wurde durch das Testen von 10 Replikaten von 7 Proben bestimmt: einer negativen, einer schwach und einer stark positiven NS1 Ag-Probe, sowie schwach und stark positiver anti-Dengue-Virus-IgG- und -IgM-Proben.

Die Reproduzierbarkeit wurde durch das Testen von 7 Proben in 3 Testungen bestimmt: einer negativen, einer schwach und einer stark positiven NS1 Ag-Probe, sowie schwach und stark positiver anti-Dengue-Virus-IgG- und -IgM-Proben. Die Testungen wurden an 3 verschiedenen Tagen von 3 Anwendern mit 3 unabhängigen Chargen des NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Tests an 3 verschiedenen Standorten durchgeführt.

Der NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test zeigte eine akzeptable Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit. Die

negativen und positiven Werte wurden in >99% der Fälle richtig bestimmt.

14. Referenzen

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

Rev. 0, 2020-10-19 OM

1. Intended Use

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test is a lateral flow chromatographic immunoassay for the qualitative detection of dengue virus NS1 antigen as well as anti-dengue virus IgG and IgM in human whole blood, serum or plasma specimens (see section 12 'Limitations'). This test is intended for use as an aid in the diagnosis of primary and secondary dengue infections. The test procedure is not automated and requires no special training or qualification. The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test is designed for professional use only.

2. Introduction and Clinical Significance

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

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

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

3. Test Principle

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test is a lateral flow chromatographic immunoassay for the qualitative detection of dengue virus NS1 antigens as well as anti-dengue virus IgG and IgM in human whole blood, serum or plasma specimens.

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

Anti-dengue virus NS1 antibodies are immobilised in the test line region 'T' of the membrane. Anti-human IgM and anti-human IgG are immobilised in the test line regions 'IgM' and 'IgG', respectively, of the membrane.

During the test, dengue virus NS1 antigens, if present in the specimen, bind to anti-dengue virus NS1 antibodies (active ingredient of the detection reaction: 0.6 - 0.8 µg/test), which are conjugated to coloured particles and precoated onto the sample pad of the test cassette. If specific anti-dengue virus IgM or anti-dengue virus IgG are present in the specimen, they bind to the dengue virus antigens (active ingredient of the

detection reaction: 0.2 - 0.4 µg/test) conjugated to coloured particles and precoated onto the sample pad of the test cassette. The mixture then migrates along the membrane by capillary action and interacts with the reagents on the membrane. The complexes are then captured by anti-dengue virus NS1 antibodies (active ingredient of the detection reaction: 1.0 - 2.5 µg/test) as well as anti-human IgM (active ingredient of the detection reaction: 0.5 - 1.0 µg/test) and anti-human IgG (active ingredient of the detection reaction: 1.5 - 3.0 µg/test) in the test line regions 'T' as well as 'IgM' and 'IgG', respectively. Excess coloured particles are captured in each control line region 'C'. The presence of a coloured line in the test line region 'T' and/or 'IgM' and/or 'IgG' indicates a positive result. The absence of a coloured line in the test line region 'T' and/or 'IgM' and/or 'IgG' indicates a negative result.

The formation of a coloured line in the control line region 'C' (left side of the test cassette: Dengue NS1 Ag Test) and the colour change from a blue line to a red one in the control line region 'C' (right side of the test cassette: Dengue IgG/IgM Test) serve as a procedural control, indicating that the proper volume of specimen has been added and membrane wicking has occurred.

4. Reagents and Materials Supplied

- 10 NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM test cassettes*, incl. disposable pipettes (25 µL) for Dengue NS1 Ag
- 10 disposable pipettes (5 µL) for Dengue IgG/IgM
- 1 buffer (3 mL)**
- 1 package insert

*containing the preservative sodium azide: <0.1%

**Phosphate buffer containing the following preservatives: sodium azide: <0.1%

No hazard labelling is required according to Regulation (EC) № 1272/2008 CLP. Concentrations are below exemption threshold.

5. Additional Materials Required

- Specimen collection containers (appropriate for specimen material to be tested)
- Centrifuge (for serum or plasma specimens only)
- Alcohol pads
- Lancets (for fingerstick whole blood specimens only)
- Timer

6. Storage and Stability

Test kits should be stored at 2-30°C until the indicated expiry date. Test cassettes are stable until the expiry date printed on the foil pouches. Test cassettes must remain in the sealed foil pouches until use. Do not freeze the test kit. Do not use tests beyond the expiry date indicated on the packaging. Care should be taken to protect test kit components from contamination. Do not use test kit components if there is evidence of microbial contamination or precipitation. Biological contamination of dispensing equipment, containers or reagents can lead to inaccurate results.

7. Warnings and Precautions

- For professional *in-vitro* diagnostic use only.
- Carefully read through the test procedure prior to testing.

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

8. Specimen Collection and Preparation

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

To collect fingerstick whole blood specimens:

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

Fingerstick whole blood should be tested immediately.

Venipuncture whole blood specimens

Containers containing anticoagulants, such as sodium EDTA, sodium citrate or heparin sodium should be used for the preparation of venous whole blood or plasma specimens.

Testing should be performed immediately after specimen collection. Do not leave specimens at room temperature for prolonged periods of time.

If the test is to be run within 3 days of specimen collection, whole blood collected by venipuncture should be stored at 2-8°C.

Do not freeze whole blood specimens.

Serum and plasma specimens

Separate serum or plasma from blood as soon as possible to avoid haemolysis. Use only clear, non-haemolysed specimens.

Testing should be performed immediately after specimen collection. Do not leave specimens at room temperature for prolonged periods of time. Serum and plasma specimens can be stored at 2-8°C for up to 7 days. For long-term storage, specimens should be kept at -20°C.

Bring specimens to room temperature prior to testing. Frozen specimens should be completely thawed and mixed well prior to testing. Specimens should not be frozen and thawed repeatedly.

If specimens are to be shipped, they should be packed in compliance with all applicable regulations for the transportation of etiologic agents.

Icteric, lipemic, haemolysed, heat-treated and contaminated specimens may lead to inaccurate test results.

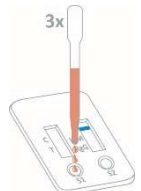
9. Test Procedure

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

1. Remove the test cassette from the foil pouch and use it as soon as possible. The best results will be obtained if the test is performed immediately after opening the foil pouch. Label the test cassette with the patient or control identification.
2. Place the test cassette on a clean and level surface.
3. **a) For serum or plasma specimens:**

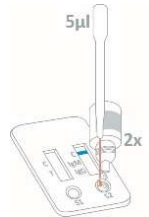
Dengue virus NS1 Ag

Holding the 25 µL-pipette vertically, draw up a serum or plasma specimen and add 3 drops (approximately 75 µL) of the specimen to the specimen well (S1) of the test cassette. **Avoid air bubbles forming.**



Anti-dengue virus IgG/IgM

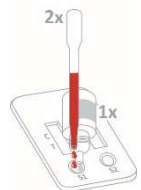
- Holding the 5 µL-pipette vertically, draw a serum or plasma specimen up to the first widening (approximately 5 µL) and add it to the specimen well (S2) of the test cassette.
- Holding the buffer bottle vertically, add 2 drops of buffer to the specimen well (S2). **Avoid air bubbles forming.**



b) For venepuncture/fingerstick whole blood specimens:

Dengue virus NS1 Ag

- Holding the 25 µL-pipette vertically, draw up a whole blood specimen and add 2 drops (approximately 50 µL) of the specimen to the specimen well (S1) of the test cassette.



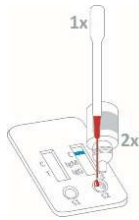
- Holding the buffer bottle vertically, add 1 drop of buffer to the specimen well (S1). **Avoid air bubbles forming.**

Anti-dengue virus IgG/IgM

- Holding the 5 µL-pipette vertically, draw a whole blood specimen up to above the first widening and add 1 drop (approximately 10 µL) of the specimen to the specimen well (S2) of the test cassette.
- Holding the buffer bottle vertically, add 2 drops of buffer to the specimen well (S2). **Avoid air bubbles forming.**

Alternatively, a micropipette may be used.

4. Start the timer.
5. Wait for the red line(s) to appear. Read the test result after exactly 15 minutes. Do not interpret the result after more than 30 minutes.



Negative for anti-dengue virus IgG and IgM

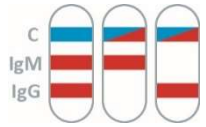
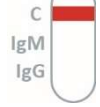
The blue line in the control line region 'C' turns red. No lines develop in the test line region 'IgM' and 'IgG'.

Invalid for dengue virus NS1 Ag

The control line 'C' fails to appear. Results from any test which has not produced a control line at the specified reading time must be discarded.

Invalid for anti-dengue virus IgG and IgM

Results from any test where the blue line in the control line region 'C' remains completely or partially blue at the specified reading time must be discarded.



Please review the procedure and repeat the test with a new test cassette. If the problem persists, discontinue using the test kit immediately and contact your distributor.

Insufficient specimen volume, incorrect operating procedure or expired tests are the most likely reasons for control line failure.

11. Quality Control

An internal procedural control is included in the test cassette: A coloured line appearing in the control line region 'C' (left side of the test cassette: Dengue NS1 Ag Test) as well as a blue line turning red (right side of the test cassette: Dengue IgG/IgM Test) are considered an internal procedural control. It confirms sufficient specimen volume, adequate membrane wicking and correct procedural technique.

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

12. Limitations

- The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test is for professional *in-vitro* diagnostic use only. It should be used for the qualitative detection of dengue virus NS1 antigens as well as anti-dengue virus IgG and IgM in human whole blood, serum or plasma specimens only. Neither the quantitative value nor the rate of increase in the concentration of dengue virus NS1 antigens or anti-dengue virus antibodies can be determined with this qualitative test.
- The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test only detects the presence of dengue virus NS1 antigens and anti-dengue virus antibodies in specimens and should not be used as the sole criterion for a diagnosis of dengue.
- Shortly after the onset of fever, anti-dengue virus IgM concentrations may be below detectable levels. For primary infection, an IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA) showed that 80% of the tested dengue patients exhibited detectable levels of IgM by the 5th day after infection and 99% of the patients tested

10. Result Interpretation

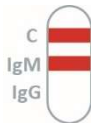
Positive for dengue virus NS1 Ag

A coloured line develops in the control line region 'C' and another coloured line develops in the test line region 'T'.



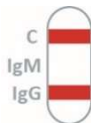
Positive for anti-dengue virus IgM

The blue line in the control line region 'C' turns red. Another red line develops in the test line region 'IgM'.



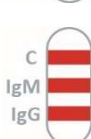
Positive for anti-dengue virus IgG

The blue line in the control line region 'C' turns red. Another red line develops in the test line region 'IgG'.



Positive for anti-dengue virus IgG and IgM

The blue line in the control line region 'C' turns red. A red line develops in the test line region 'IgM' and another one develops in the test line region 'IgG'.



Note: The colour intensity in the test line regions 'T', 'IgG' or 'IgM' may vary depending on the concentration of dengue virus NS1 antigens or anti-dengue virus antibodies in the specimen. Therefore, any shade of colour in the test line region 'T', 'IgG' or 'IgM' should be considered positive. Note that this is a qualitative test only and it cannot determine the analyte concentration in the specimen.

Negative for dengue virus NS1 Ag

A coloured line develops in the control line region 'C'. No line develops in the test line region 'T'.



IgM positive by the tenth day. Therefore, it is recommended that patients be tested within this period of time. As for secondary infection, a low molar fraction of anti-dengue virus IgM and a high molar fraction of anti-dengue virus IgG that are broadly reactive to flaviviruses characterise the antibodies. The test line 'IgM' may be faint, and a cross-reaction in the test line region 'IgG' may occur.

- Serological cross-reactivity across the flavivirus group (St. Louis encephalitis, West Nile virus, Japanese encephalitis and yellow fever viruses) is possible. Positive results should be confirmed using other methods.
- The continued presence or absence of antibodies cannot be used to determine the success or failure of therapy.
- Results from immunosuppressed patients should be interpreted with caution.
- As with all diagnostic tests, all results should be interpreted in conjunction with other clinical information available to the physician.
- If the test result is negative and clinical symptoms persist, additional testing using other clinical methods is recommended. A negative result does not at any time preclude the possibility of a recent dengue infection.
- A negative test result for dengue virus NS1 antigens can occur if the quantity of dengue virus NS1 antigens present in the specimen is below the detection limit of the test or if the detected dengue virus NS1 antigens were not present during the stage of disease in which the specimen was collected.
- The presence of detectable dengue virus NS1 Ag may mean a positive result for early dengue infection.
- Dengue virus NS1 antigen is expected to be detectable 1 day after the onset of fever and may persist for up to 9 days in both primary and secondary dengue infections. But if anti-dengue virus NS1 antibodies are produced, the detection of dengue virus NS1 antigens is inhibited.

13. Performance Characteristics

Clinical performance

Diagnostic sensitivity and specificity

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test was evaluated with clinical specimens whose status was confirmed using ELISA for the right side of the test cassette (Dengue IgG/IgM Test) and using viral culture for the left side of the test cassette (Dengue NS1 Ag Test).

The results are presented in the following tables:

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgM) vs. ELISA

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgM)	Dengue IgM ELISA			
	Positive	Negative	Total	
	Positive	59	0	59
	Negative	1	140	141
Total	60	140	200	

Diagnostic sensitivity: 98.3% (91.1% - 99.7%)*

Diagnostic specificity: >99.9% (97.3% - 100.0%)*

Overall agreement: 99.5% (97.2% - 99.9%)*

*95% confidence interval

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG) vs. ELISA

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (IgG)	Dengue IgG ELISA			
	Positive	Negative	Total	
	Positive	89	0	89
	Negative	1	150	151
Total	90	150	240	

Diagnostic sensitivity: 98.9% (94.0% - 99.8%)*

Diagnostic specificity: >99.9% (97.5% - 100.0%)*

Overall agreement: 99.6% (97.7% - 99.9%)*

*95% confidence interval

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (NS1 Ag) vs. viral culture

NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test (NS1 Ag)	Viral culture			
	Positive	Negative	Total	
	Positive	104	3	107
	Negative	8	186	194
Total	112	189	301	

Diagnostic sensitivity: 92.9% (86.5% - 96.3%)*

Diagnostic specificity: 98.4% (95.4% - 99.5%)*

Overall agreement: 96.3% (93.6% - 97.9%)*

*95% confidence interval

Interfering substances

Negative, low positive anti-dengue virus IgG and IgM plasma specimens as well as low positive dengue virus NS1 Ag plasma specimens spiked with the following interfering substances showed no interference with the NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test.

Acetylsalicylic acid	4.34 mmol/L
Ascorbic acid	0.2 mg/mL
Albumin	60 g/L
Bilirubin	342 µmol/L
Caffeine	308 µmol/L
Ethanol	86.8 mmol/L
Haemoglobin	2 g/L
HAMA	780.73 IU/mL
Ibuprofen	2425 µmol/L
Metronidazole	701 µmol/L
Paracetamol	199 µmol/L
Quinine	148 µmol/L
Rheumatoid factors	1035 IU/mL
Rifampicin	78.1 µmol/L
Triglycerides	37 mmol/L
γ globulin	60 g/L

Cross-reactivity

Anti-HIV, HBsAg, anti-HCV, anti-HAV IgM, anti-rubella virus IgM, anti-CMV IgM, anti-HSV-1 IgM, anti-HSV-2 IgM, typhoid fever, yellow fever, Zika virus, chikungunya virus, anti-Toxoplasma gondii IgM, syphilis and tuberculosis positive specimens were tested using the NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test. No cross-reactivity with the specimens was observed when tested using the NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test.

Precision

Repeatability and reproducibility

Precision was established by testing 10 replicates of 7 specimens: a negative, a low and a high positive NS1 Ag

specimen as well as low and high positive anti-Dengue virus IgG and IgM specimens.

Repeatability was established by testing 7 specimens in 3 assays: a negative, a low and a high positive NS1 Ag specimen as well as low and high positive anti-dengue virus IgG and IgM specimens. Testing was performed by 3 operators using 3 independent NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM test lots at 3 different sites on 3 separate days.

The NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM Test demonstrated acceptable repeatability and reproducibility. The negative and positive values were correctly identified >99% of the time.

14. References

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

Rev. 0, 2020-10-19 OM

1. Domaine d'application

Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM est un immunodosage chromatographique à flux latéral pour la détection qualitative des antigènes NS1 de la dengue et des anticorps IgG et IgM anti-dengue dans les échantillons de sang total, de sérum ou de plasma humain (cf. chapitre 12 « Limites du test »). Le test est une aide au diagnostic des infections primaires et secondaires à la dengue. Le test n'est pas automatisé et ne nécessite aucune formation ou qualification particulière. Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM est réservé à un usage professionnel.

2. Introduction et signification clinique

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

Les infections primaires à la dengue provoquent une augmentation des IgM jusqu'à atteindre une concentration détectable à partir de 5 jours environ après apparition de la fièvre. De manière générale, les IgM persistent de 30 à 90 jours. La plupart des patients touchés par la dengue qui résident dans des régions endémiques sont atteints d'infections secondaires qui peuvent provoquer une augmentation de la concentration en IgG spécifiques, avant ou en même temps qu'une réaction aux IgM. Ainsi, la détection des IgM et IgG anti-dengue spécifiques peut également permettre de différencier une infection primaire d'une infection secondaire.

L'antigène NS1 est l'une des sept protéines non structurales du virus de la dengue qui sont probablement toutes impliquées dans la réplication virale. Le NS1 existe en tant que monomère dans sa forme impure, mais il est transformé dans le réticulum endoplasmique pour former un dimère stable. Une faible quantité de NS1 reste associée à des organelles intracellulaires où elle joue un rôle lors de la réplication virale. Le reste des protéines NS1 se lie soit à la membrane plasmique ou est sécrété sous forme d'hexadimère solide. Le NS1 est essentiel pour la viabilité du virus, cependant sa fonction biologique exacte n'est pas connue. Les anticorps produits en réponse au NS1 lors d'infections virales peuvent provoquer des réactions croisées avec les antigènes de surface des cellules épithéliales et les plaquettes sanguines. Ceci a vraisemblablement un impact direct sur le développement des fièvres hémorragiques de la dengue.

3. Principe du test

Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM est un immunodosage chromatographique à flux latéral pour la détection qualitative des antigènes NS1 de la dengue et des anticorps IgG et IgM anti-dengue dans les échantillons de sang total, de sérum ou de plasma humain.

Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM contient deux bandelettes de test internes (côté gauche de la cassette : test dengue NS1 Ag, côté droit de la cassette : test dengue IgG/IgM).

Les anticorps anti-dengue NS1 sont immobilisés à hauteur de la zone de test « T » de la membrane. Les anti-IgM humaines et anti-IgG humaines sont immobilisées à hauteur de la zone de test « IgM et IgG » de la membrane.

Pendant le test, les antigènes NS1 de la dengue, s'ils sont présents dans l'échantillon, se lient aux anticorps anti-dengue NS1 (composant actif de la réaction de détection : 0,6 - 0,8 µg/test), qui sont conjugués à des particules colorées et immobilisés sur la zone de dépôt de l'échantillon de la cassette. Si des anticorps IgM anti-dengue ou IgG anti-dengue sont présents dans l'échantillon, ils se lient aux antigènes de la dengue (composant actif de la réaction de détection : 0,2 - 0,4 µg/test), qui sont conjugués à des particules colorées et immobilisés sur la zone de dépôt de l'échantillon de la cassette. Le mélange migre ensuite par capillarité chromatographique le long de la membrane et réagit avec les réactifs de la membrane. Les complexes sont ensuite immobilisés par des anticorps anti-dengue NS1 (composant actif de la réaction de détection de : 1,0 - 2,5 µg/test), ainsi que par des anti-IgM humaines (composant actif de la réaction de détection : 0,5 - 1,0 µg/test), et des anti-IgG humaines (composant actif de la réaction de détection : 1,5 - 3,0 µg/test) dans les zones de test « T » ainsi que « IgM » et « IgG ». Les particules colorées excédentaires sont immobilisées dans la zone de contrôle « C » respective. La présence d'une ligne colorée dans la zone de test « T » et/ou « IgM » et/ou « IgG » indique un résultat positif. L'absence d'une ligne colorée dans la zone de test « T » et/ou « IgM » et/ou « IgG » indique un résultat négatif.

La ligne colorée apparaissant dans la zone de contrôle « C » (côté gauche de la cassette : test dengue NS1 Ag) et le changement de couleur de la ligne, passant du bleu au rouge, dans la zone de contrôle « C » (côté droit de la cassette : test dengue IgG/IgM) sont des procédures de contrôle et indiquent que le volume d'échantillon est suffisant et que la membrane a été suffisamment imbibée.

4. Réactifs et matériels fournis

- 10 cassettes NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM, avec pipettes à usage unique (25 µL) pour Dengue NS1 Ag
- 10 pipettes à usage unique (5 µL) pour Dengue IgG/IgM
- 1 solution tampon « Buffer » (3 mL)**
- 1 notice d'utilisation

*Contient de l'azide de sodium comme conservateur : <0,1 %

**Le tampon phosphate contient le conservateur suivant : azide de sodium : <0,1 %

Selon le règlement européen n° 1272/2008, le CLP, aucun étiquetage de danger n'est requis, les concentrations étant inférieures au seuil fixé.

5. Matériel supplémentaire nécessaire

- Récipient collecteur (adapté à l'échantillon à tester)
- Centrifugeuse (pour les échantillons de sérum ou de plasma uniquement)
- Tampons imprégnés d'alcool
- Lancettes (pour les prélèvements de sang total par ponction du doigt uniquement)
- Chronomètre

6. Recueil et conservation des réactifs

Les kits doivent être conservés entre 2 et 30°C jusqu'à la date de péremption indiquée. Les cassettes sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage d'origine. La cassette doit rester dans son emballage d'origine jusqu'à son utilisation. Ne pas congeler les tests. Ne pas utiliser les tests après la date de péremption figurant sur l'emballage. Protéger les composants du kit de toute contamination. Ne pas utiliser les composants du test s'ils présentent des signes de contamination microbienne ou de précipitation. La contamination biologique des pipettes, récipients et réactifs peut entraîner des résultats erronés.

7. Avertissement et précautions

- Test réservé au diagnostic *in-vitro* professionnel.
- Lire la notice d'utilisation attentivement avant de réaliser le test.
- Ne pas utiliser le test après la date de péremption figurant sur l'emballage.
- Ne pas utiliser les composants des tests si l'emballage primaire est endommagé.
- Tests à usage unique.
- Les échantillons ne doivent pas entrer en contact avec la zone réactive (fenêtre de lecture des résultats).
- Ne pas toucher la zone réactive du test (champ de lecture des résultats) afin d'éviter toute contamination.
- Pour éviter toute contamination croisée, un collecteur d'échantillons dédié doit être utilisé pour chaque échantillon.
- Ne pas interchanger les composants de différents lots.
- Ne pas manger, boire ou fumer dans la zone de manipulation des échantillons.
- Lors de la manipulation des tests, porter des vêtements de protection : blouse, gants à usage unique et lunettes de protection.
- Manipuler tous les échantillons comme de potentiels composants infectieux. Respecter les précautions relatives aux risques microbiologiques pendant les manipulations ainsi que les directives locales en vigueur concernant l'élimination des déchets.
- Ce test contient des produits d'origine animale. La certification concernant l'origine et l'état sanitaire des animaux ne certifie pas l'absence totale d'agents pathogènes transmissibles. Tous les prélèvements et produits utilisés pour ce test doivent être considérés comme des matières infectieuses. Il est recommandé d'appliquer les mesures de précaution nécessaire (ne pas avaler ou inhaler).
- La température peut influencer les résultats du test.
- Le matériel utilisé pour la réalisation des tests doit être éliminé selon les directives locales en vigueur.

8. Recueil, préparation et conservation des prélèvements

Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM s'effectue sur des échantillons de sang total (par ponction veineuse ou du doigt), de sérum ou de plasma.

Échantillons de sang total par ponction du doigt

- Laver la main du patient au savon et à l'eau tiède ou la désinfecter avec un tampon imprégné d'alcool. La laisser sécher.

- Masser la main sans toucher le point de ponction en frottant la main vers le haut du majeur ou de l'annulaire.
- Piquer la peau avec une lancette stérile. Essuyer la première goutte de sang.
- Frotter doucement la main du poignet vers la paume jusqu'au doigt, de sorte qu'une goutte de sang se forme sur le point de ponction.

Les échantillons de sang total par ponction du doigt doivent être analysés immédiatement.

Échantillons de sang total par ponction veineuse

Afin de prélever des échantillons de sang total ou de plasma par ponction veineuse, il faut utiliser les récipients collecteurs contenant des anticoagulants, tels que EDTA de sodium, citrate de sodium ou héparine de sodium.

Réaliser le test immédiatement après le prélèvement. Ne pas conserver les échantillons à température ambiante pendant une période prolongée.

Si le test est effectué dans les 3 jours suivant le prélèvement, le sang total prélevé par ponction veineuse doit être conservé entre 2 et 8°C.

Ne pas congeler les échantillons de sang total.

Échantillons de sérum et de plasma

Séparer le sérum ou le plasma du sang dès que possible pour éviter l'hémolyse. Utiliser exclusivement des échantillons purs et non hémolysés.

Réaliser le test immédiatement après le prélèvement. Ne pas conserver les échantillons à température ambiante pendant une période prolongée. Les échantillons de sérum et de plasma peuvent être conservés jusqu'à sept jours entre 2 et 8°C. Pour une conservation plus longue, ils doivent être conservés à une température de -20°C.

Avant de commencer le test, amener les échantillons à température ambiante. Les échantillons congelés doivent être complètement décongelés et bien mélangés avant la réalisation du test. Ne pas répéter les cycles de congélation-décongélation.

Si des échantillons doivent être expédiés, veiller à les emballer conformément aux réglementations en vigueur concernant le transport des agents pathogènes étiologiques.

Des échantillons ictériques, lipémiques, hémolytiques, traités thermiquement ou contaminés peuvent fausser les résultats du test.

9. Procédure du test

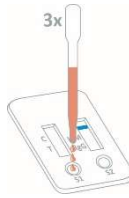
Amener tous les tests, échantillons, tampons et/ou contrôles à température ambiante (entre 15 et 30°C) avant la réalisation du test.

1. Retirer la cassette de son emballage et réaliser le test rapidement. Les meilleurs résultats sont obtenus si le test est exécuté immédiatement après ouverture de l'emballage. Inscrive sur la cassette le numéro d'identification du patient ou du contrôle.
2. Placer la cassette de test sur une surface propre et plane.

3. a) Échantillons de sérum ou de plasma :

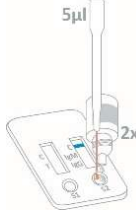
Pour dengue NS1 Ag

Tenir la pipette de 25 µL à la verticale, aspirer ainsi l'échantillon de sérum ou de plasma et déposer 3 gouttes (env. 75 µL) dans le puits de dépôt (S1) de la cassette. **Éviter la formation de bulles d'air.**



Pour IgG/IgM anti-dengue

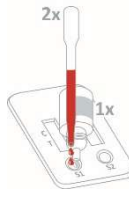
- Tenir la pipette de 5 µL à la verticale, aspirer ainsi l'échantillon de sérum ou de plasma jusqu'au premier élargissement (env. 5 µL) et le déposer dans le puits de dépôt (S2) de la cassette.
- Tenir le flacon de solution tampon à la verticale et déposer 2 gouttes dans le puits de dépôt (S2) de la cassette. **Éviter la formation de bulles d'air.**



b) Échantillons de sang total par ponction veineuse/par ponction du doigt :

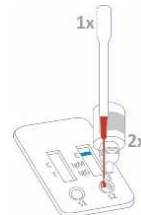
Pour dengue NS1 Ag

- Tenir la pipette de 25 µL à la verticale, aspirer ainsi l'échantillon de sang total et déposer 2 gouttes (env. 50 µL) dans le puits de dépôt (S1) de la cassette.
- Tenir le flacon de solution tampon à la verticale et ajouter 1 goutte de tampon dans le puits de dépôt (S1) de la cassette. **Éviter la formation de bulles d'air.**



Pour IgG/IgM anti-dengue

- Tenir la pipette de 5 µL à la verticale, aspirer ainsi l'échantillon de sang total jusqu'au premier élargissement et déposer 1 goutte (env. 10 µL) dans le puits de dépôt (S2) de la cassette.
- Tenir le flacon de solution tampon à la verticale et déposer 2 gouttes dans le puits de dépôt (S2) de la cassette. **Éviter la formation de bulles d'air.**



Une micropipette peut également être utilisée.

4. Démarrer le chronomètre.
5. Attendre que la/les ligne(s) rouge(s) apparaisse(nt). Interpréter le résultat du test après exactement 15 minutes. Ne plus interpréter le résultat du test après 30 minutes.



10. Interprétation des résultats

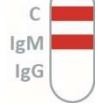
Résultat positif au test dengue NS1 Ag

Une ligne colorée apparaît dans la zone de contrôle « C » et une autre ligne colorée dans la zone de test « T ».



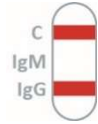
Résultat positif au test d'IgM anti-dengue

La ligne bleue dans la zone de contrôle « C » devient rouge. Une autre ligne rouge apparaît dans la zone de test « IgM ».



Résultat positif au test d'IgG anti-dengue

La ligne bleue dans la zone de contrôle « C » devient rouge. Une autre ligne rouge apparaît dans la zone de test « IgG ».



Résultat positif au test d'IgG et IgM anti-dengue

La ligne bleue dans la zone de contrôle « C » devient rouge. Une ligne rouge apparaît dans la zone de test « IgM » et une autre dans la zone de test « IgG ».



Remarque :

L'intensité de la couleur des lignes de test « T », « IgG » ou « IgM » peut varier en fonction de la concentration d'antigènes NS1 de la dengue ou d'anticorps anti-dengue. Par conséquent, toute apparition de lignes dans les zones de test « T », « IgG » ou « IgM » doit être considérée comme un résultat positif. Ce test est uniquement un test qualitatif et ne peut déterminer la concentration en analytes dans l'échantillon.

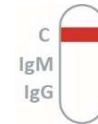
Résultat négatif au test dengue NS1 Ag

Une seule ligne colorée apparaît dans la zone de contrôle « C ». Aucune ligne n'apparaît dans la zone de test « T ».



Résultat négatif au test d'IgG et IgM anti-dengue

La ligne bleue dans la zone de contrôle « C » devient rouge. Aucune ligne n'apparaît dans la zone de test « IgM » et « IgG ».



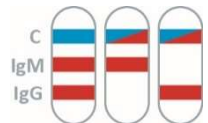
Résultat non-valide au test dengue NS1 Ag

Les tests sur lesquels aucune ligne de contrôle n'est apparue dans le temps d'évaluation imparti doivent être éliminés.



Non-valide au test d'IgG et IgM anti-dengue

Les tests sur lesquels la ligne bleue dans la zone de contrôle « C » reste entièrement ou partiellement bleue dans le temps d'évaluation imparti doivent être éliminés.



Contrôler la procédure d'exécution du test et renouveler le test avec une nouvelle cassette. Si le problème persiste, cesser immédiatement d'utiliser le kit du test et contacter le distributeur.

Un volume d'échantillon insuffisant, une mauvaise manipulation ou des tests périmés sont les principales causes d'absence de ligne de contrôle.

11. Contrôle qualité

La cassette de test contient un contrôle de procédure interne :

La ligne colorée apparaissant au niveau de la zone de contrôle « C » (côté gauche de la cassette : test dengue NS1 Ag) ainsi que la ligne colorée passant du bleu au rouge (côté droit de la cassette : test dengue IgG/IgM) sont considérées comme un contrôle interne. Ces lignes confirment que le volume de prélèvement est suffisant, que la manipulation a été correctement effectuée et que la membrane a été suffisamment imbibée.

Les *Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL)* recommandent l'utilisation de matériel de contrôle externe afin de vérifier la performance du kit de test.

12. Limites du test

- Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM est réservé au diagnostic *in-vitro* professionnel et à la détection qualitative des anticorps anti-dengue dans des échantillons de sang total, de sérum ou plasma humain. Ce test qualitatif ne permet ni de déterminer la valeur quantitative ni le taux de concentration d'antigènes NS1 de la dengue ou d'anticorps anti-dengue.
- Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM indique exclusivement la présence d'antigènes NS1 de la dengue et d'anticorps anti-dengue dans l'échantillon et ne peut être employé comme seul critère de diagnostic de la dengue.
- Dans le cas d'une apparition précoce de la fièvre, la concentration en IgM anti-dengue peut se situer en-deçà du seuil de détection du test. Lors d'une infection primaire, la méthode de dosage immunoenzymatique des IgM spécifiques (MAC-ELISA) a montré que 80 % des patients testés à la dengue ont démontré des concentrations en IgM détectables au bout du cinquième jour après l'apparition de l'infection et que 99 % des patients ont été testés positifs aux IgM au bout du dixième jour. Il est donc conseillé de tester les patients dans cet intervalle de temps. Lors d'une infection secondaire, une faible fraction molaire d'IgM anti-dengue et une forte fraction molaire d'IgG anti-dengue réagissant contre de nombreux flavivirus caractérisent les anticorps. Il est possible que la ligne de test « IgM » soit de faible intensité et une réaction croisée est envisageable à hauteur de la zone de test « IgG ».
- Des réactions croisées sérologiques engendrées par le groupe Flavivirus (encéphalite de Saint-Louis, virus du Nil occidental, encéphalite japonaise et les virus de la fièvre jaune) sont possibles. Les résultats positifs doivent toujours être confirmés à l'aide de méthodes de test alternatives.
- La présence ou l'absence continue d'anticorps ne permettent pas de prouver le succès ou l'échec d'un traitement.
- Les résultats des patients immunodéprimés sont à interpréter avec prudence.
- Un diagnostic clinique définitif ne devrait jamais s'appuyer sur les résultats d'un seul test. Le diagnostic devrait être établi par un médecin après évaluation de toutes les données de laboratoire et cliniques.
- Si les résultats du test sont négatifs mais que les symptômes cliniques persistent, il est recommandé de réitérer le test avec d'autres méthodes cliniques de

diagnostic. Un résultat négatif n'exclut à aucun moment la possibilité d'une infection récente au virus de la dengue.

- Un test dengue NS1 Ag peut s'avérer négatif si la quantité des antigènes de la dengue contenue dans l'échantillon se situe en deçà du seuil de détection du test ou si les antigènes NS1 de la dengue détectés n'étaient pas présents au stade de la maladie auquel le test a été réalisé.
- La présence des antigènes NS1 de la dengue détectables peut signifier un résultat positif pour une infection précoce à la dengue.
- L'antigène NS1 de la dengue peut être détecté un jour après l'apparition de la fièvre et peut persister jusqu'à neuf jours dans les infections primaires et secondaires de la dengue. Cependant, lorsque des anticorps anti-dengue NS1 sont produits, la détection des antigènes NS1 de la dengue est inhibée.

13. Performance du test

Performance clinique

Sensibilité et spécificité diagnostiques

Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM a été évalué avec des échantillons cliniques dont le statut a été confirmé par ELISA pour le côté droit de la cassette (test dengue IgG/IgM) et par culture virale pour le côté gauche de la cassette (test dengue NS1 Ag).

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants :

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgM) vs. ELISA

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgM)	Dengue IgM ELISA		
	Positif	Négatif	Total
Positif	59	0	59
Négatif	1	140	141
Total	60	140	200

Sensibilité diagnostique : 98,3 % (91,1 % - 99,7 %)*
 Spécificité diagnostique : >99,9 % (97,3 % - 100,0 %)*
 Concordance totale : 99,5 % (97,2 % - 99,9 %)*
 *95 % Intervalle de confiance

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG) vs. ELISA

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG)	Dengue IgG ELISA		
	Positif	Négatif	Total
Positif	89	0	89
Négatif	1	150	151
Total	90	150	240

Sensibilité diagnostique : 98,9 % (94,0 % - 99,8 %)*
 Spécificité diagnostique : >99,9 % (97,5 % - 100,0 %)*
 Concordance totale : 99,6 % (97,7 % - 99,9 %)*
 *95 % Intervalle de confiance

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (NS1 Ag) vs. culture virale

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (NS1 Ag)	Culture virale		
	Positif	Négatif	Total
Positif	104	3	107
Négatif	8	186	194
Total	112	189	301

Sensibilité diagnostique : 92,9 % (86,5 % - 96,3 %)*

Spécificité diagnostique : 98,4 % (95,4 % - 99,5 %)*
 Concordance totale : 96,3 % (93,6 % - 97,9 %)*

*95 % Intervalle de confiance

Substances interférentes

Des échantillons de plasma négatifs et faiblement positifs en IgG et IgM anti dengue, ainsi que les échantillons de plasma faiblement positifs en NS1 Ag ont été mélangés avec les substances interférentes suivantes et n'ont montré aucune interférence avec le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM.

Acide acétylsalicylique	4,34 mmol/L
Acide ascorbique	0,2 mg/mL
Albumine	60 g/mL
Bilirubine	342 µmol/L
Quinine	148 µmol/L
Éthanol	86,8 mmol/L
HAMA	780,73 UI/mL
Hémoglobine	2 g/L
Ibuprofène	2425 µmol/L
Caféine	308 µmol/L
Métronidazole	701 µmol/L
Paracétamol	199 µmol/L
Facteurs rhumatoïdes	1035 UI/mL
Rifampicine	78,1 mol/L
Triglycérides	37 mmol/L
Gammaglobuline	60 g/L

Réaction croisée

Des échantillons positifs à anti-VIH, HBsAg, anti-HCV, IgM anti-HAV, IgM anti-*Rubella*, IgM anti-CMV, IgM anti-HSV-1, IgM anti-HSV2, typhus, fièvre jaune, virus Zika, virus Chikungunya, IgM anti-*Toxoplasma gondii*, syphilis et tuberculose ont été testés avec le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM. Aucune réactivité croisée avec les échantillons n'a été observée lors des tests effectués avec le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM.

Précision

Répétabilité et reproductibilité

La précision a été déterminée en testant 10 reproductions de 7 échantillons : un échantillon négatif, un faiblement et un fortement positif en NS1 Ag, ainsi que des échantillons faiblement et fortement positifs en IgG et IgM anti-dengue.

La reproductibilité a été déterminée en testant 7 échantillons dans 3 tests : un échantillon négatif, un faiblement et un fortement positif en NS1 Ag, ainsi que des échantillons faiblement et fortement positifs en IgG et IgM anti-dengue. Les tests ont été réalisés sur 3 jours distincts, par 3 opérateurs, avec 3 lots de tests NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM indépendants, sur 3 sites différents.

Le test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM a indiqué une répétabilité et une reproductibilité admissibles. Les valeurs négatives et positives ont été correctement déterminées dans plus de 99 % des cas.

14. Bibliographie

- Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. *Rev. Infect. Dis.* 1984; 6:251-264.
- Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239:476-481.
- Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Japanese J. Trop. Med. Hygiene* 1994; 22: 9-12.
- Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. *Rev. Med. Micro.* 1995; 6:39-48.

- Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
- Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jul; 10(4): 725-8.
- Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr (in German).* 1997; 147(19-20): 463-4.
- Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus. *Microbiol Immunol.* 1994; 38(12): 951-5.

1. Uso previsto

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa del antígeno NS1 del virus del dengue, así como de IgG e IgM anti-dengue en muestras de sangre completa, suero o plasma humanos (véase la sección 12 "Limitaciones"). Este test sirve de ayuda en el diagnóstico de infecciones primarias y secundarias por dengue. El procedimiento de test no está automatizado y no requiere una especial formación o cualificación. El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM ha sido diseñado solo para uso profesional.

2. Introducción y significado clínico

El virus del dengue es un flavivirus, transmitido principalmente por mosquitos tigre *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Está ampliamente distribuido en las zonas tropicales y subtropicales del mundo y causa hasta 100 millones de infecciones anuales. La infección clásica por dengue se caracteriza por la aparición repentina de fiebre, dolor de cabeza intenso, mialgia, artralgia y sarpullidos.

La infección primaria por dengue hace que la IgM aumente hasta un nivel detectable aproximadamente 5 días después de la aparición de la fiebre. La IgM suele persistir entre 30 y 90 días. La mayoría de los pacientes con dengue en regiones endémicas tienen infecciones secundarias, lo que da lugar a niveles elevados de IgG específica antes o simultáneamente a la respuesta de IgM. Por lo tanto, la detección de IgM e IgG específicas anti-dengue también puede ayudar a distinguir entre infecciones primarias y secundarias.

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

3. Principio del test

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa de antígenos NS1 del virus del dengue, así como de IgG e IgM anti-dengue en muestras de sangre completa, suero o plasma humanos.

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

Los anticuerpos anti-dengue NS1, están inmovilizados en la región de la línea de test "T" de la membrana. En las regiones de la línea de test "IgM" e "IgG" de la membrana se inmovilizan, respectivamente, anti-IgM y anti-IgG humanas.

Durante el test, los antígenos NS1 del virus del dengue, si están presentes en la muestra, se unen a los anticuerpos NS1 anti-dengue (principio activo de la reacción de detección: 0,6 - 0,8 µg/test), que se conjugan con partículas coloreadas y se encuentran recubriendo la almohadilla para la muestra del casete de test. Si en la muestra hay IgM o IgG anti-dengue específicas, se unen a los antígenos del virus del dengue (principio activo de la reacción de detección: 0,2 - 0,4 µg/test) conjugados con partículas coloreadas y que recubren la almohadilla para la muestra del casete de test. A continuación, la mezcla migra a lo largo de la membrana por acción capilar e interactúa con los reactivos. Posteriormente, los complejos son captados por anticuerpos NS1 anti-dengue (principio activo de la reacción de detección: 1,0 - 2,5 µg/test) así como por anti-IgM humana (principio activo de la reacción de detección: 0,5 - 1,0 µg/test) y anti-IgG humana (principio activo de la reacción de detección: 1,5 - 3,0 µg/test) en las regiones de la línea de test "T", así como "IgM" e "IgG", respectivamente. El exceso de partículas coloreadas es capturado en cada región de la línea de control "C". La presencia de una línea coloreada en la región de la línea de test "T" y/o "IgM" y/o "IgG" indica un resultado positivo. La ausencia de una línea coloreada en la región de la línea de test "T" y/o "IgM" y/o "IgG" indica un resultado negativo.

La formación de una línea coloreada en la región de la línea de control "C" (lado izquierdo del casete: test de Dengue NS1 Ag) y el cambio de color de una línea azul a una roja en la región de la línea de control "C" (lado derecho del casete: test de Dengue IgG/IgM) sirven como control del procedimiento, indicando que el volumen de muestra añadido ha sido adecuado y que la membrana se ha empapado suficientemente.

4. Reactivos y materiales provistos

- 10 casetes de test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM*, con pipetas desechables (25 µL) para Dengue NS1 Ag
- 10 pipetas desechables (5 µL) para Dengue IgG/IgM
- 1 búfer, "Buffer" (3 mL)**
- 1 manual de instrucciones

*contiene el conservante azida sódica: <0,1%

**Búfer fosfato que contiene los siguientes conservantes: azida sódica: <0,1%

No se requiere un etiquetado de riesgos según el Reglamento (CE) Nº 1272/2008 CLP. Las concentraciones están por debajo del umbral de exención.

5. Materiales adicionales

- Recipientes de recolección de muestras (apropiados para el material de la muestra que se va a analizar)
- Centrifugadora (solo para muestras de suero o plasma)
- Almohadillas con alcohol
- Lancetas (solo para muestras de sangre completa obtenida por punción digital)
- Cronómetro

6. Almacenamiento y estabilidad

Almacene los kits a 2-30°C hasta su fecha de caducidad. Los casetes de test se mantienen estables hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. Los casetes deben permanecer en los envases de aluminio hasta su uso. No

congele el kit. No utilice los test después de la fecha de caducidad indicada en el envase. Proteja los componentes del kit de test de cualquier contaminación. No utilice los componentes del kit si hay evidencia de contaminación microbiana o precipitación. La contaminación biológica del dispositivo suministrado, recipientes o reactivos puede producir resultados incorrectos.

7. Advertencias y precauciones

- Solo apto para el uso profesional de diagnóstico *in-vitro*.
- Lea atentamente todo el procedimiento antes de comenzar el test.
- No utilice el test después de la fecha de caducidad indicada en el envase.
- No utilice los componentes del kit de test si el envase original está dañado.
- Los test son de un solo uso.
- No añada muestras en la zona de reacción (región de resultados).
- No toque la zona de reacción (región de resultados) para evitar posibles contaminaciones.
- Evite la contaminación cruzada de las muestras utilizando un nuevo recipiente recolector para cada una.
- No intercambie ni mezcle componentes de diferentes kits.
- No coma, beba o fume en la zona donde se manipulen las muestras y los kits de test.
- Utilice ropa protectora como bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección, mientras manipule las muestras.
- Manipule las muestras como si contuviesen agentes infecciosos. Siga durante todo el procedimiento las precauciones establecidas para riesgos microbiológicos y las directrices estándar para la correcta eliminación de las muestras.
- El kit de test contiene productos de origen animal. El conocimiento certificado del origen y/o estado sanitario de los animales no garantiza completamente la ausencia de agentes patogénicos transmisibles. Por ello, se recomienda tratar estos productos como potencialmente infecciosos y seguir las medidas de seguridad habituales durante su manipulación (p.ej. no ingerir ni inhalar).
- La temperatura puede afectar negativamente a los resultados del test.
- La eliminación de los materiales utilizados se debe realizar de acuerdo con las regulaciones locales.

8. Recolección de muestras y preparación

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM se puede realizar utilizando sangre completa (de punción venosa o digital), suero o plasma.

Para recolectar muestras de sangre completa obtenidas por punción digital:

- Lave la mano del paciente con jabón y agua templada o límpiela con una almohadilla con alcohol. Déjela secar.
- Realice un masaje en la mano sin tocar el lugar de la punción, frotándola en dirección a la punta del dedo medio o anular.
- Pinche la piel con una lanceta estéril. Limpie la primera gota de sangre.

- Frote suavemente desde la muñeca hasta la palma de la mano, y después continúe hasta el dedo para producir una gota redonda de sangre en la zona de punción.

Si la sangre completa se obtiene por punción digital se debe realizar el test inmediatamente.

Muestras de sangre completa obtenida por punción venosa

Deben utilizarse recipientes que contengan anticoagulantes, como el EDTA de sodio, el citrato de sodio o la heparina de sodio para la preparación de muestras de sangre completa venosa o plasma.

El test se debe realizar inmediatamente después de la recolección de la muestra. No deje las muestras a temperatura ambiente durante periodos de tiempo prolongados.

Si el test se va a realizar en los 3 días posteriores a la recolección de las muestras, almacene a 2-8°C la sangre completa recolectada por punción venosa.

No congele las muestras de sangre completa.

Muestras de suero y plasma

Separe el suero o plasma de la sangre lo antes posible para evitar la hemólisis. Use solo muestras claras no hemolizadas.

El test se debe realizar inmediatamente después de la recolección de las muestras. No deje las muestras a temperatura ambiente durante periodos de tiempo prolongados. Las muestras de suero y plasma se pueden almacenar a 2-8°C hasta un máximo de 7 días. Si desea almacenarlas durante más tiempo, debe mantenerlas a -20°C.

Lleve las muestras a temperatura ambiente antes de realizar el test. Las muestras congeladas deben descongelarse completamente y mezclarse bien antes de realizar el test. Evite los ciclos repetidos de congelado y descongelado de muestras.

Si las muestras se van a transportar, se deben empaquetar de acuerdo con las regulaciones aplicables para el transporte de agentes etiológicos.

Las muestras ictericas, lipemicas, hemolizadas, tratadas térmicamente y contaminadas pueden dar lugar a resultados inexactos en los test.

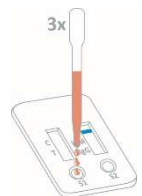
9. Procedimiento del test

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

1. Retire el casete de test de su envase de aluminio y utilícelo lo antes posible. Los mejores resultados se obtendrán si el test se realiza inmediatamente después de abrir el envase. Etiquete el casete de test con la identificación del paciente o de control.
2. Coloque el casete de test sobre una superficie limpia y plana.
3. **a) Para muestras de suero o plasma:**

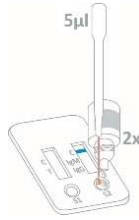
Antígeno NS1 del virus del dengue

Sosteniendo la pipeta de 25 µL en posición vertical, recolecte una muestra de suero o plasma y añada 3 gotas (aproximadamente 75 µL) de la muestra al pocillo (S1) del casete de test. **Evite la formación de burbujas de aire.**



IgG e IgM anti-dengue

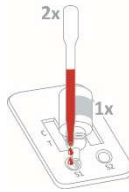
- Sosteniendo verticalmente la pipeta de 5 µL, recolecte una muestra de suero o plasma hasta el primer ensanchamiento (aproximadamente 5 µL) y añádala al pocillo de muestras (S2) del casete de test.
- Sosteniendo verticalmente el bote del búfer, añada 2 gotas del búfer al pocillo de muestras (S2). **Evite la formación de burbujas de aire.**



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

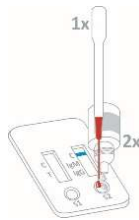
Antígeno NS1 del virus del dengue

- Sosteniendo verticalmente la pipeta de 25 µL, recolecte una muestra de sangre completa y añada 2 gotas (aproximadamente 50 µL) de la muestra al pocillo (S1) del casete de test.
- Sosteniendo verticalmente el bote del búfer, añada 1 gota del búfer al pocillo de muestras (S1). **Evite la formación de burbujas de aire.**



IgG e IgM anti-dengue

- Sosteniendo verticalmente la pipeta de 5 µL, recolecte una muestra de sangre completa hasta por encima del primer ensanchamiento y añada 1 gota (aproximadamente 10 µL) de la muestra al pocillo (S2) del casete de test.
- Sosteniendo verticalmente el bote del búfer, añada 2 gotas del búfer al pocillo de muestras (S2). **Evite la formación de burbujas de aire.**



Como alternativa, se puede utilizar una micropipeta.

4. Active el cronómetro.
5. Espere a que aparezca(n) la(s) línea(s) roja(s). Lea el resultado del test después de 15 minutos exactamente. No interprete los resultados después de más de 30 minutos.



10. Interpretación del resultado

Positivo para Ag NS1 del virus del dengue

Aparece una línea coloreada en la región de control "C" y otra línea coloreada en la región de test "T".



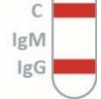
Positivo para IgM anti-dengue

La línea azul en la región de la línea de control "C" se vuelve roja. Otra línea roja se desarrolla en la región de la línea de test "IgM".



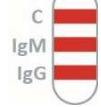
Positivo para IgG anti-dengue

La línea azul en la región de la línea de control "C" se vuelve roja. Se desarrolla otra línea roja en la región de la línea de test "IgG".



Positivo para IgG e IgM anti-dengue

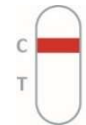
La línea azul en la región de la línea de control "C" se vuelve roja. Se desarrolla una línea roja en la región de la línea de test "IgM" y otra en la región de la línea de test "IgG".



Nota: la intensidad del color en las regiones de la línea de test "T", "IgG" o "IgM" puede variar en función de la concentración de antígenos NS1 del virus del dengue o de anticuerpos anti-dengue en la muestra. Por eso, cualquier sombra coloreada en la región de test "T", "IgG" o "IgM" se debe considerar positiva. Recuerde que este test solo es cualitativo y no puede determinar la concentración del analito presente en la muestra.

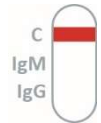
Negativo para Ag NS1 del virus del dengue

Aparece una línea coloreada en la región de control "C". No aparece ninguna línea en la región de la línea de test "T".



Negativo para IgG e IgM anti-dengue

La línea azul en la región de la línea de control "C" se vuelve roja. No se desarrollan líneas en la región de la línea de test "IgM" e "IgG".



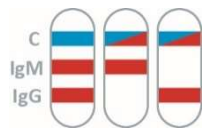
No válido para Ag NS1 del virus del dengue

No aparece la línea de control "C". Si no aparece la línea de control dentro del tiempo de lectura especificado, los resultados del test no son válidos y se deben descartar.



No válido para IgG e IgM anti-dengue

Los resultados de cualquier test donde la línea azul en la región de la línea de control "C" permanezca total o parcialmente azul en el tiempo de lectura especificado deben ser descartados.



Si esto sucede, revise el procedimiento y repita el test con un nuevo casete. Si el problema persiste, deje de usar el kit inmediatamente y contacte con su distribuidor.

Las causas más frecuentes de que no aparezca la línea de control son un volumen de muestra insuficiente, un procedimiento incorrecto o que el dispositivo esté caducado.

11. Control de calidad

El casete de test contiene un control interno del procedimiento:

Una línea coloreada que aparece en la región de la línea de control "C" (lado izquierdo del casete: test de Dengue NS1 Ag) así como una línea azul que se vuelve roja (lado derecho del casete: test de Dengue IgG/IgM) se consideran un control interno del procedimiento. Esta línea confirma que el volumen de muestra ha sido adecuado, que la membrana se ha empapado suficientemente y que la técnica del procedimiento ha sido correcta.

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

12. Limitaciones

- El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM solo es apto para el uso profesional de diagnóstico *in-vitro*. Debe utilizarse para la detección cualitativa de los antígenos NS1 del virus del dengue, así como de las IgG e IgM anti-dengue en muestras de sangre completa, suero o plasma únicamente. Con este test cualitativo no se puede determinar ni el valor cuantitativo ni el aumento en la concentración de antígenos NS1 del virus del dengue o de anticuerpos anti-dengue.
- El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM solo detecta la presencia de antígenos NS1 del virus del dengue y anticuerpos anti-dengue en las muestras y no debe utilizarse como único criterio para un diagnóstico de dengue.
- Poco después de la aparición de la fiebre, las concentraciones de IgM anti-dengue pueden estar por debajo de los niveles detectables. Para una infección primaria, un ensayo por inmunoabsorción ligado a una enzima de captura de anticuerpos IgM (MAC-ELISA) mostró que el 80% de los pacientes de dengue examinados mostraron niveles detectables de IgM al quinto día de la infección y el 99% de los pacientes examinados mostraron IgM positivo el décimo día. Por esta razón, se recomienda realizar el test a los pacientes dentro de este periodo de tiempo. Como para la infección secundaria, una fracción molar baja de IgM anti-dengue y una fracción molar alta de IgG anti-dengue, que son ampliamente reactivas con los flavivirus, caracteriza a los anticuerpos. La línea de test 'IgM' puede ser débil, y puede producirse una reacción cruzada en la región de la línea de test "IgG".
- Es posible la reacción cruzada serológica con el grupo de flavivirus (encefalitis de San Luis, virus del Nilo Occidental, encefalitis japonesa y virus de la fiebre amarilla). Los resultados positivos deben ser confirmados utilizando otros métodos.
- La presencia o ausencia continuada de anticuerpos no se puede utilizar para determinar el éxito o fracaso de la terapia.
- Los resultados de pacientes inmunodeprimidos se deben interpretar con cautela.
- Al igual que con todos los test de diagnóstico, los resultados obtenidos se deben interpretar conjuntamente con otra información clínica de la que disponga el médico.
- Si el test muestra un resultado negativo y los síntomas clínicos persisten, se recomienda realizar test adicionales utilizando otros métodos clínicos. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección reciente por dengue.

- Puede producirse un resultado negativo de NS1 Ag de dengue si la cantidad de dichos antígenos presente en la muestra está por debajo del límite de detección del test o si los antígenos NS1 del dengue detectados no estaban presentes durante la etapa de la enfermedad en la que se recolectó la muestra.
- La presencia de antígenos NS1 del virus del dengue detectables puede significar un resultado positivo de infección temprana por dengue.
- Es de esperar que el antígeno NS1 del virus del dengue sea detectable 1 día después de la aparición de la fiebre y puede persistir hasta 9 días en las infecciones primarias y secundarias de dengue. Pero si se producen anticuerpos NS1 anti-dengue, la detección de antígenos NS1 del virus del dengue se inhibe.

13. Características del rendimiento

Rendimiento clínico

Sensibilidad y especificidad de diagnóstico

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM se evaluó con muestras clínicas cuyo estado se confirmó mediante ELISA para el lado derecho del casete (test de Dengue IgG/IgM) y mediante cultivo viral para el lado izquierdo del casete (test de Dengue NS1 Ag).

Los resultados se muestran en las siguientes tablas:

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgM) vs. ELISA

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgM)	ELISA Dengue IgM			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	59	0	59
	Negativo	1	140	141
Total	60	140	200	

Sensibilidad diagnóstica: 98,3% (91,1% - 99,7%)*

Especificidad diagnóstica: >99,9% (97,3% - 100,0%)*

Concordancia general: 99,5% (97,2% - 99,9%)*

*95% de intervalo de confianza

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG) vs. ELISA

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG)	ELISA Dengue IgG			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	89	0	89
	Negativo	1	150	151
Total	90	150	240	

Sensibilidad diagnóstica: 98,9% (94,0% - 99,8%)*

Especificidad diagnóstica: >99,9% (97,5% - 100,0%)*

Concordancia general: 99,6% (97,7% - 99,9%)*

*95% de intervalo de confianza

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (NS1 Ag) vs. cultivo vírico

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (NS1 Ag)	Cultivo vírico			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	104	3	107
	Negativo	8	186	194
Total	112	189	301	

Sensibilidad diagnóstica: 92,9% (86,5% - 96,3%)*

Especificidad diagnóstica: 98,4% (95,4% - 99,5%)*

Concordancia general: 96,3% (93,6% - 97,9%)*

*95% de intervalo de confianza

Sustancias interferentes

Las muestras de plasma negativas y débilmente positivas para IgG e IgM anti-dengue, así como las muestras de plasma débilmente positivas para antígenos NS1 del virus del dengue enriquecidas con las siguientes sustancias interferentes no mostraron ninguna interferencia con el test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM.

Ácido acetilsalicílico	4,34 mmol/L
Ácido ascórbico	0,2 mg/mL
Albúmina	60 g/L
Bilirrubina	342 µmol/L
Cafeína	308 µmol/L
Etanol	86,8 mmol/L
Hemoglobina	2 g/L
HAMA	780,73 IU/mL
Ibuprofeno	2425 µmol/L
Metronidazol	701 µmol/L
Paracetamol	199 µmol/L
Quinina	148 µmol/L
Factores reumatoides	1035 UI/mL
Rifampicina	78,1 µmol/L
Triglicéridos	37 mmol/L
Gammaglobulina	60 g/L

Reacciones cruzadas

Se analizaron muestras positivas de anti-VIH, HBsAg, anti-VHC, IgM anti-VHA, IgM anti-rubeola, IgM anti-CMV, IgM anti-VHS-1, IgM anti-VHS-2, fiebre tifoidea, fiebre amarilla, virus del Zika, virus chikungunya, IgM anti-*Toxoplasma gondii*, sífilis y tuberculosis utilizando el test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM. No se observaron reacciones cruzadas con las muestras cuando se analizaron con el test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM.

Precisión

Repetibilidad y reproducibilidad

La precisión se estableció analizando 10 réplicas de 7 muestras: una muestra negativa, una débilmente positiva y una altamente positiva de antígenos NS1, así como muestras débil y altamente positivas de IgG e IgM anti-dengue.

La repetibilidad se estableció analizando 7 muestras en 3 test: una muestra negativa, una débilmente positiva y una altamente positiva de antígenos NS1, así como muestras débil y altamente positivas de IgG e IgM anti-dengue. Los test fueron realizados por 3 operadores utilizando 3 lotes independientes del test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM en 3 diferentes lugares en 3 días distintos.

El test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM demostró una repetibilidad y reproducibilidad aceptables. Los valores negativos y positivos se identificaron correctamente en más del 99% de los casos.

14. Referencias

1. Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. *Rev. Infect. Dis.* 1984; 6:251-264.
2. Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239:476-481.
3. Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Japanese J. Trop. Med. Hygiene* 1994; 22: 9-12.
4. Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. *Rev. Med. Micro.* 1995; 6:39-48.
5. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.

6. Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jul; 10(4): 725-8.
7. Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr (in German).* 1997; 147(19-20): 463-4.
8. Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus. *Microbiol Immunol.* 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2020-10-19 GP

1. Uso previsto

Il test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è un immunodosaggio cromatografico a flusso laterale per l'individuazione qualitativa degli antigeni NS1 del virus della dengue e degli IgG ed IgM anti-dengue in campioni di sangue intero, siero oppure plasma umani (vedi sezione 12 'Limiti del Test'). Questo test è concepito come supporto nella diagnosi di infezioni primarie e secondarie da dengue. La procedura di test non è automatizzata e non richiede una formazione o una qualifica speciali. Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è concepito esclusivamente per uso professionale.

2. Introduzione e Significato Clinico

Il virus della dengue è un flavivirus, trasmesso dalle zanzare tigre *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. È ampiamente distribuita nelle aree tropicali e subtropicali del mondo e causa fino a 100 milioni di infezioni ogni anno. L'infezione classica della dengue è caratterizzata da un inizio improvviso di febbre, mal di testa intenso, mialgia, artralgia e un'eruzione cutanea.

L'infezione primaria da dengue causa l'aumento delle IgM a un livello rilevabile circa 5 giorni dopo l'inizio della febbre. Le IgM generalmente persistono per 30-90 giorni. La maggior parte dei pazienti con dengue nelle regioni endemiche hanno infezioni secondarie, con conseguenti alti livelli di IgG specifiche prima o contemporaneamente alla risposta IgM. Pertanto, il rilevamento di IgM e IgG specifiche anti-dengue può anche aiutare a distinguere tra infezioni primarie e secondarie.

L'NS1 è una delle 7 proteine non strutturali del virus della dengue che si pensa siano coinvolte nella replicazione virale. L'NS1 esiste come monomero nella sua forma immatura ma viene rapidamente elaborato nel reticolo endoplasmatico per formare un dimero stabile. Una piccola quantità di NS1 rimane associata agli organelli intracellulari dove si pensa sia coinvolta nella ripetizione virale. Il resto di NS1 si trova associato alla membrana plasmatica o secreto come esadimero solubile. L'NS1 è essenziale per la vitalità virale ma la sua precisa funzione biologica è sconosciuta. Gli anticorpi prodotti in risposta all'NS1 nelle infezioni virali possono reagire in modo incrociato con gli antigeni di superficie delle cellule epiteliali e delle piastrine. Questo può avere implicazioni nello sviluppo della febbre emorragica della dengue.

3. Principio del Test

Il test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è un test immunologico cromatografico a flusso laterale per la rilevazione qualitativa degli antigeni NS1 del virus dengue e delle IgG e IgM anti virus della dengue in campioni di sangue intero, siero o plasma umano.

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

Gli anticorpi NS1 anti virus della dengue sono immobilizzati nella regione 'T' della membrana. Le IgM anti-umane e le IgG anti-umane sono immobilizzate nelle regioni della linea del test 'IgM' e 'IgG', rispettivamente, della membrana.

Durante il test, gli antigeni NS1 del virus della dengue, se presenti nel campione, si legano agli anticorpi NS1 anti virus

della dengue (principio attivo della reazione di rilevamento: 0,6–0,8 µg/test), che sono coniugati a particelle colorate e pre-rivestiti sul tamponi del campione del test a cassetta. Se nel campione sono presenti IgM o IgG specifiche anti virus della dengue, queste si legano agli antigeni del virus della dengue (principio attivo della reazione di rilevamento: 0,2–0,4 µg/test) coniugati a particelle colorate e priverestiti sul tamponi del test a cassetta. Il composto migra poi lungo la membrana per azione capillare e va ad interagire con i reagenti presenti sulla membrana. I complessi vengono poi catturati dagli anticorpi NS1 anti virus della dengue (ingrediente attivo della reazione di rilevazione: 1,0–2,5 µg/test) così come le IgM anti-umane (ingrediente attivo della reazione di rilevazione: 0,5–1,0 µg/test) e IgG anti-umane (ingrediente attivo della reazione di rilevazione: 1,5–3,0 µg/test) rispettivamente nella regione della linea del test 'T', 'IgM' e 'IgG'. Le particelle colorate in eccesso sono catturate nella regione della linea di controllo 'C'. La presenza di una linea colorata nella regione della linea del test 'T' e/o 'IgM' e/o 'IgG' indica un risultato positivo. L'assenza di una linea colorata nella regione della linea del test 'T' e/o 'IgM' e/o 'IgG' indica un risultato negativo.

La formazione di una linea colorata nella regione della linea di controllo 'C' (lato sinistro del test a cassetta: Test Dengue NS1 Ag) ed il cambiamento di colore da blu a rosso della linea nella regione della linea di controllo 'C' (lato destro del test a cassetta: Test Dengue IgG/IgM) serve da controllo procedurale indicando che è stato aggiunto il giusto volume di campione e che la migrazione lungo la membrana è avvenuta correttamente.

4. Reagenti e Materiali Forniti

- 10 test a cassetta NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM*, incl. pipette monouso (25 µL) per dengue Ag NS1
- 10 pipette monouso (5 µL) per dengue IgG/IgM
- 1 soluzione 'Buffer' (3 mL)**
- 1 istruzioni per l'uso

*contenenti il conservante azoturo di sodio: <0,1%

**Tamponi fosfato contenente i seguenti conservanti: azoturo di sodio: <0,1%

Non è richiesta un'etichettatura per materiali pericolosi secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 CLP. Le concentrazioni sono al di sotto della soglia di esenzione.

5. Altri materiali richiesti

- Contenitore di raccolta del campione (appropriato per il materiale campione da testare)
- Centrifuga (solo per i campioni di siero oppure plasma)
- Dischetti imbevuti di alcol
- Bisturi (solo per il prelievo di sangue intero mediante puntura del polpastrello)
- Timer

6. Conservazione e Stabilità

I kit devono essere conservati a 2-30°C fino alla data di scadenza indicata. I test a cassetta rimangono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. I test a cassetta vanno conservati nella loro confezione fino al loro utilizzo. Non congelare i kit di test. Non utilizzare i test oltre la data di scadenza. Si raccomanda di fare attenzione a proteggere i

componenti del kit di test dalla contaminazione. Non utilizzare in caso di evidente contaminazione microbica o deterioramento. Contaminazione biologica di apparecchiature, contenitori o reagenti può portare all'ottenimento di falsi risultati.

7. Avvertenze e Precauzioni

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

8. Preparazione e Raccolta del Campione

Il test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM può essere eseguito su campioni di sangue intero (ottenuti tramite prelievo venoso o puntura del polpastrello), siero o plasma.

Prelievo del campione di sangue intero tramite puntura del polpastrello:

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

I campioni raccolti tramite puntura del polpastrello andrebbero testati immediatamente.

Campioni di sangue intero, prelievo venoso

I contenitori con anticoagulanti, come sodio EDTA, citrato di sodio, eparina di sodio o eparina di litio devono essere utilizzati per la preparazione di campioni di sangue intero venoso o di plasma.

Eeguire il test immediatamente dopo la raccolta del campione. Non lasciare i campioni a temperatura ambiente per lunghi periodi di tempo.

Se il test viene eseguito entro 3 giorni dalla raccolta del campione, il sangue intero raccolto tramite prelievo venoso va conservato a 2-8°C.

Non congelare i campioni di sangue intero.

Campioni di siero e plasma

Separare siero e plasma immediatamente al fine di evitare emolisi. Utilizzare solo campioni chiari non emolizzati.

Eeguire il test immediatamente dopo la raccolta del campione. Non lasciare i campioni a temperatura ambiente per lunghi periodi di tempo. Campioni di siero e plasma possono essere conservati tra 2-8°C per un massimo di 7 giorni. Per conservazioni prolungate, i campioni vanno conservati a -20°C.

Portare i campioni a temperatura ambiente prima di eseguire il test. I campioni congelati vanno fatti scongelare completamente e mescolati adeguatamente prima di eseguire il test. Evitare episodi ripetuti di congelamento e scongelamento dei campioni.

Nel caso in cui si intenda spedire i campioni, questi andrebbero imballati seguendo le regolamentazioni locali in materia di trasporto di agenti eziologici.

I campioni itterici, lipemici, emolizzati, trattati termicamente e contaminati possono portare a risultati imprecisi del test.

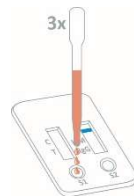
9. Procedura del Test

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

1. Rimuovere la cassetta dalla busta di alluminio e usarla il prima possibile. Si otterranno i risultati migliori se il test viene eseguito immediatamente dopo l'apertura della confezione. Etichettare il test a cassetta con l'identificativo del paziente o controllo.
2. Posizionare il test a cassetta su una superficie piana e pulita.
3. **a) Per campioni di siero oppure plasma:**

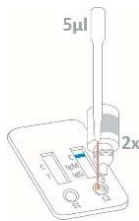
Virus dengue NS1 Ag

Tenendo la pipetta da 25 µL in verticale, prelevare un campione di siero o plasma e aggiungere 3 gocce (circa 75 µL) del campione al pozzetto del campione (S1) della cassetta del test. **Evitare la formazione di bolle d'aria.**



IgG/IgM anti virus dengue

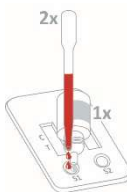
- Mantenendo verticalmente la pipetta da 5 µL fornita, aspirare il campione di siero oppure plasma fino al primo allargamento (circa 5 µL) e aggiungerli nel pozzetto di raccolta del campione (S2) del test a cassetta.
- Mantenendo il flacone di soluzione, aggiungere 2 gocce di soluzione al pozzetto di raccolta del campione (S2). **Evitare la formazione di bolle d'aria.**



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

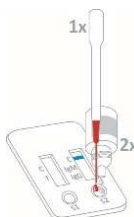
Virus dengue NS1 Ag

- Tenendo la pipetta da 25 µL in verticale, prelevare un campione di sangue intero e aggiungere 2 gocce (circa 50 µL) del campione al pozzetto del campione (S1) del test a cassetta.
- Mantenendo verticalmente il flacone di soluzione, aggiungere 1 goccia di soluzione al pozzetto di raccolta del campione (S1). **Evitare la formazione di bolle d'aria.**



IgG/IgM anti virus Dengue

- Tenendo la pipetta da 5 µL in verticale, prelevare un campione di sangue intero fino al primo allargamento e aggiungere 1 goccia (circa 10 µL) del campione al pozzetto del campione (S2) del test a cassetta.
- Tenendo la provetta in verticale, aggiungere 2 gocce di soluzione al pozzetto del campione (S2). **Evitare la formazione di bolle d'aria.**



In alternativa, utilizzare una micropipette.

4. Avviare il timer.
5. Attendere la comparsa delle linee colorate. Leggere il risultato del test entro 15 minuti. Non interpretare i risultati dopo più di 30 minuti.



10. Interpretazione dei risultati

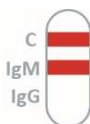
Positivo agli Ag NS1 del virus della dengue

Si sviluppa una linea colorata nella regione della linea di controllo 'C' e una linea colorata nella regione della linea del test 'T'.



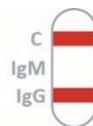
Positivo a IgM anti virus della dengue

La linea blu nella regione della linea di controllo 'C' diventa rossa. Si sviluppa un'altra linea nella regione della linea del test 'IgM'.



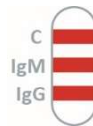
Positivo a IgG anti virus della dengue

La linea blu nella regione della linea di controllo 'C' diventa rossa. Si sviluppa un'altra linea nella regione della linea del test 'IgG'.



Positivo a IgG e IgM anti virus della dengue

La linea blu nella regione della linea di controllo 'C' diventa rossa. Si sviluppa una linea rossa nella regione della linea del test 'IgM' ed un'altra linea si sviluppa nella regione della linea del test 'IgG'.



Nota Bene: L'intensità del colore nella regione della linea del test 'T', 'IgG' o 'IgM' può variare a seconda della concentrazione di antigeni NS1 del virus della dengue o di anticorpi anti virus della dengue nel campione. Pertanto, qualsiasi sfumatura di colore nell'area della linea 'T', 'IgG' o 'IgM' va considerata come indicativa di un risultato positivo. Questo test qualitativo non è in grado di determinare la concentrazione dell'analita nel campione.

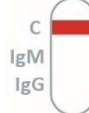
Negativo al virus della dengue NS1 Ag

Si sviluppa una linea verde nella regione della linea di controllo 'C'. Non si sviluppa alcuna linea nella regione della linea del test 'T'.



Negativo a IgG e IgM anti virus della dengue

La linea blu nella regione della linea di controllo 'C' diventa rossa. Non compare alcuna linea nella regione della linea del test 'IgM' ed 'IgG'.



Non valido per virus della dengue NS1 Ag

La linea di controllo (C) non compare. I risultati di qualsiasi test che non abbia prodotto alcuna linea di controllo entro i tempi di lettura indicati, non vanno presi in considerazione.



Non valido per IgG e IgM anti virus della dengue

I risultati di qualsiasi test in cui la linea blu nella regione della linea di controllo 'C' rimane completamente o parzialmente blu al tempo di lettura specificato non vanno presi in considerazione.



Rivedere la procedura e ripetere il test con una nuova cassetta. Se il problema persiste, interrompere immediatamente l'uso del kit di test e contattare il proprio distributore.

Un volume di campione insufficiente, una procedura operativa errata o test scaduti sono le ragioni più probabili che potrebbero impedire la comparsa della linea di controllo.

11. Controllo Qualità

Un controllo procedurale interno è inserito nel test a cassetta:

Una linea colorata che appare nella regione della linea di controllo 'C' (lato sinistro della cassetta del test: Dengue NS1 Ag Test) così come una linea blu che diventa rossa (lato destro della cassetta del test: Dengue IgG/IgM Test) sono considerati un controllo procedurale interno. Ciò conferma che è stato aggiunto il giusto volume di campione, che la migrazione lungo la membrana è avvenuta correttamente e che sono state applicate le corrette tecniche procedurali.

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

12. Limiti del Test

- Il Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è concepito esclusivamente per uso diagnostico professionale *in-vitro*. Andrebbe utilizzato per l'individuazione qualitativa degli antigeni NS1 del virus della dengue così come gli IgG e IgM anti virus della dengue in sangue intero, siero oppure plasma. Con questo test qualitativo, non è possibile determinare né il valore quantitativo né la velocità di aumento della concentrazione degli antigeni NS1 del virus della dengue o degli anticorpi del virus anti dengue.
- Il test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM rileva solo la presenza di antigeni NS1 del virus della dengue e di anticorpi contro il virus della dengue nei campioni e non deve essere utilizzato come unico criterio per una diagnosi di dengue.
- In seguito alla comparsa di febbre, la concentrazione di IgM potrebbe essere al di sotto dei livelli rilevabili. Per le infezioni primarie, il saggio immunoadsorbente anticorpo di cattura legato ad un enzima (MAC-ELISA) hanno mostrato che l'80% dei pazienti testati per la dengue hanno riportato livelli rilevabili di IgM dal quinto giorno dopo l'infezione e il 99% dei pazienti testati era positivo agli IgM a partire dal giorno 99. Pertanto, è raccomandabile che i pazienti vengano testati in questo periodo di tempo. Come per l'infezione secondaria, una bassa frazione molare di IgM anti virus della dengue e un'alta frazione molare di IgG anti virus della dengue che sono ampiamente reattivi ai flavivirus caratterizzano gli anticorpi. La linea del test 'IgM' può essere debole e può verificarsi una reazione incrociata nella regione della linea del test 'IgG'.
- La reattività crociata sierologica nel gruppo dei flavivirus (encefalite di St. Louis, virus del Nilo occidentale, encefalite giapponese e virus della febbre gialla) è possibile. I risultati positivi devono essere confermati con altri metodi.
- La continua presenza o assenza di anticorpi non può essere usata per determinare il successo o il fallimento della terapia.
- I risultati provenienti da pazienti immunodepressi vanno interpretati con cura.
- Come per tutti i test diagnostici, tutti i risultati ottenuti andrebbero interpretati in congiunzione con altre informazioni cliniche reperibili dal medico.
- Se il risultato del test è negativo ma i sintomi clinici persistono, si consiglia di eseguire altri test utilizzando altri

metodi clinici di analisi. Un risultato negativo non preclude la possibilità di infezioni da virus della dengue.

- Un risultato negativo del test per gli antigeni NS1 del virus della dengue può verificarsi se la quantità di antigeni NS1 del virus della dengue presenti nel campione è inferiore al limite di rilevamento del test o se gli antigeni NS1 del virus della dengue rilevati non erano presenti durante lo stadio della malattia in cui è stato raccolto il campione.
- La presenza di Ag NS1 del virus della dengue può essere indicativa di un risultato positivo per l'infezione precoce da dengue.
- L'antigene NS1 del virus della dengue dovrebbe essere rilevabile 1 giorno dopo l'inizio della febbre e può persistere fino a 9 giorni sia nelle infezioni primarie che in quelle secondarie di dengue. Ma se vengono prodotti anticorpi NS1 contro il virus della dengue, la rilevazione degli antigeni NS1 del virus della dengue viene inibita.

13. Caratteristiche Tecniche

Performance clinica

Sensibilità e Specificità diagnostica:

Il test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM è stato valutato con campioni clinici il cui status è stato confermato utilizzando un ELISA per il lato destro del test a cassetta (Test Dengue IgG/IgM) e la coltura virale per il lato sinistro del test a cassetta (Test Dengue NS1 Ag).

I risultati sono riassunti rispettivamente nelle seguenti tabelle:

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgM) vs. ELISA

		Dengue IgM ELISA		
		Positivo	Negativo	Totale
Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgM)	Positivo	59	0	59
	Negativo	1	140	141
	Totale	60	140	200

Sensibilità diagnostica: 98,3% (91,1% - 99,7%)*

Specificità diagnostica: >99,9% (97,3% - 100,0%)*

Andamento complessivo: 99,5% (97,2% - 99,9%)*

*95% Accuratezza

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG) vs. ELISA

		Dengue IgG ELISA		
		Positivo	Negativo	Totale
Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG)	Positivo	89	0	89
	Negativo	1	150	151
	Totale	90	150	240

Sensibilità diagnostica: 98,9% (94,0% - 99,8%)*

Specificità diagnostica: >99,9% (97,5% - 100,0%)*

Andamento complessivo: 99,6% (97,7% - 99,9%)*

*95% Accuratezza

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (NS1 Ag) vs. coltura virale

		Coltura virale		
		Positivo	Negativo	Totale
Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (NS1 Ag)	Positivo	104	3	107
	Negativo	8	186	194
	Totale	112	189	301

Sensibilità diagnostica: 92,9% (86,5% - 96,3%)*

Specificità diagnostica: 98,4% (95,4% - 99,5%)*

Andamento complessivo: 96,3% (93,6% - 97,9%)*

*95% Accuratezza

Sostanze interferenti

I campioni di plasma IgG e IgM anti virus della dengue negativi e debolmente positivi, nonché i campioni di plasma NS1 Ag del virus della dengue debolmente positivi, addizionati delle seguenti sostanze interferenti, non hanno mostrato alcuna interferenza con il test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM.

Acido Acetilsalicilico	4,34 mmol/L
Acido Ascorbico	0,2 mg/mL
Albumina	60 g/L
Bilirubina	342 µmol/L
Caffeina	308 µmol/L
Etanolo	86,8 mmol/L
Emoglobina	2 g/L
HAMA	780,73 IU/mL
Ibuprofene	2425 µmol/L
Metronidazolo	701 µmol/L
Paracetamolo	199 µmol/L
Quinina	148 µmol/L
Fattori Reumatoidi	1035 IU/mL
Rifampicina	78,1 µmol/L
Trigliceridi	37 mmol/L
globulina y	60 g/L

Reattività incrociata

I campioni positivi all'anti-HIV, HBsAg, anti-HCV, anti-HAV IgM, anti-rubella virus IgM, anti-CMV IgM, anti-HSV-1 IgM, anti-HSV-2 IgM, febbre tifoide, febbre gialla, virus Zika, virus chikungunya, anti-Toxoplasma gondii IgM, sifilide e tubercolosi sono stati testati utilizzando il test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM. Non è stata osservata alcuna reattività crociata con i campioni quando sono stati testati con il test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM.

Precisione

Ripetibilità e riproducibilità

La precisione è stata stabilita testando 10 repliche di 7 campioni: un campione NS1 Ag negativo, uno basso e uno alto positivo, nonché campioni IgG e IgM anti virus della dengue bassi e altamente positivi.

La ripetibilità è stata stabilita testando 7 repliche di 3 saggi: un campione NS1 Ag negativo, uno basso e uno alto positivo e campioni IgG e IgM anti virus della dengue bassi e altamente positivi. I test sono stati eseguiti da 3 operatori utilizzando 3 lotti di test indipendenti NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM in 3 siti diversi in 3 giorni separati.

Il test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM ha dimostrato una ripetibilità e riproducibilità accettabili. I valori negativi e positivi sono stati identificati correttamente in più del 99% dei casi (>99%).

14. Bibliografia

1. Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI, Dengue. *Rev. Infect. Dis.* 1984; 6:251-264.
2. Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239:476-481.
3. Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Japanese J. Trop. Med. Hygiene* 1994; 22: 9-12.
4. Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. *Rev. Med. Micro.* 1995; 6:39-48.
5. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.

6. Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jul; 10(4): 725-8.
7. Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr (in German).* 1997; 147(19-20): 463-4.
8. Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus. *Microbiol Immunol.* 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2020-10-19 BN

1. Zastosowanie

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM to chromatograficzny test immunologiczny w formacie przepływu bocznego służący do jakościowego wykrywania antygenów NS1 wirusa dengi, a także IgG i IgM przeciwko wirusowi dengi w próbkach ludzkiej krwi pełnej, surowicy lub osocza (patrz punkt 12. „Ograniczenia testu”). Test ten służy jako środek pomocniczy przy diagnozowaniu pierwotnych i wtórnych zakażeń dengą. Test nie jest automatyzowany i nie wymaga specjalnego szkolenia ani kwalifikacji. Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego.

2. Wprowadzenie i znaczenie diagnostyczne

Denga jest flawiwirusem, przenoszonym przez komary tygrysie *Aedes aegypti* i *Aedes albopictus*. Jest szeroko rozpowszechniona w tropikalnych i subtropikalnych obszarach świata i powoduje do 100 milionów zakażeń rocznie. Klasyczne infekcje dengą charakteryzują się nagłym pojawieniem się gorączki, silnym bólem głowy, bólami mięśni, bólami stawów i wysypką.

Pierwotne zakażenia dengą powodują wzrost IgM do wykrywalnego poziomu około 5 dni po wystąpieniu gorączki. IgM zwykle utrzymuje się przez 30 do 90 dni. Większość pacjentów z dengą z obszarów endemicznych ma wtórne zakażenia, które mogą prowadzić do wysokich stężeń swoistych IgG przed lub w tym samym czasie z reakcją IgM. Stąd wykrywanie swoistych przeciwciał dengi IgM i - IgG również przyczynia się do rozróżniania między pierwotną, a wtórnymi infekcjami.

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

3. Zasada działania testu

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM to chromatograficzny test immunologiczny w formacie przepływu bocznego służący do jakościowego wykrywania antygenów NS1 wirusa dengi, a także IgG i IgM przeciwko wirusowi dengi w próbkach ludzkiej krwi pełnej, surowicy lub osocza.

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

Przeciwciała anti-Dengue-Virus-NS-1 są immobilizowane w obszarze linii testowej „T” membrany. Przeciw ludzkie IgM i przeciw ludzkie IgG są unieruchamiane w odpowiednich obszarach linii testowej „IgM” i „IgG” membrany.

Podczas testu antygeny NS1 wirusa dengi, jeśli są obecne w próbce, wiążą się z przeciwciałami NS1 przeciwko wirusowi dengi (aktywny składnik reakcji wykrywania: 0,6-0,8 µg/test), które zawierają kolorowe cząsteczki sprężone i pokryte wstępnie na płytce kasety testowej. Jeśli w próbce obecne są specyficzne IgM przeciw wirusowi dengi lub IgG przeciw wirusowi dengi, wiążą się one z antygenami wirusa dengi (aktywny składnik reakcji wykrywania: 0,2-0,4 µg/test), które są sprężone z kolorowymi cząstkami i są wstępnie powlekane na płytce próbnej kasety testowej. Mieszanina wędruje następnie przy pomocy sił kapilarnych wzdłuż membrany i zachodzi w interakcję z odczynnikami znajdującymi się na membranie. Kompleksy zostają przechwycone w obszarach linii testowej „T” oraz „IgM” i „IgG”, przez przeciwciała przeciw wirusowi dengi NS1 (aktywny składnik reakcji wykrywania: 1,0-2,5 µg/test) oraz przeciw ludzkie IgM (aktywny składnik reakcji wykrywania: 0,5-1,0 µg/test) oraz przeciw ludzkie IgG (aktywny składnik reakcji wykrywania: 1,5-3,0 µg/test). Nadmiar cząsteczek zostaje wyląpany w obszarze linii kontrolnej (C). Obecność kolorowej linii w obszarze linii testowej „T” i/lub „IgM” i/lub „IgG” wskazuje na wynik pozytywny. Brak kolorowej linii w obszarze linii testowej „T” i/lub „IgM” i/lub „IgG” wskazuje na wynik ujemny.

Pojawienie się kolorowej linii w obszarze linii kontrolnej „C” (lewa strona kasety testowej: test Dengue NS1 Ag) i zmiana koloru z niebieskiej na czerwoną w obszarze linii kontrolnej „C” (prawa strona kasety testowej: test Dengue IgG/IgM) służy jako kontrola proceduralna i wskazuje, że dodano wystarczającą objętość próbki i że membrana jest dostatecznie nasączona.

4. Materiały zawarte w zestawie

- 10 kaset testowych NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM*, w tym pipety jednorazowe (25 µL) do Dengue NS1 Ag
- 10 jednorazowych pipet (5 µL) do IgG/IgM wirusa dengi
- 1 bufor „Buffer” (3 mL)**
- 1 instrukcja obsługi

* zawiera konserwant azodyku sodu: <0,1%

** Bufor fosforanowy zawiera następujące środki konserwujące: azodyk sodu: <0,1%

Zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008 CLP nie jest wymagane oznakowanie zagrożeń. Stężenia są poniżej limitów zwolnienia.

5. Dodatkowo potrzebne materiały

- Pojemnik do pobierania próbek (odpowiedni do badanego materiału próbki)
- Centryfuga (tylko dla próbek surowicy i osocza)
- Płytki alkoholowe
- Lancety (tylko dla próbek z krwi pełnej z nakłucia palca)
- Stoper

6. Data ważności i przechowywanie odczynników

Zestawy testowe powinny być przechowywane w temperaturze 2-30°C, do daty podanej na opakowaniu. Testy kasetowe są stabilne do daty użyteczności podanej na opakowaniu foliowym. Kasetka testowa musi zostać w zamkniętym opakowaniu foliowym aż do momentu jej użycia. Nie zamrażać zestawów testowych. Nie stosować kontroli pozytywnej po

upływie daty użyteczności podanej na opakowaniu. Test i komponenty testu należy chronić przed kontaminacją. Testu nie należy używać przy oznakach mikrobiologicznej kontaminacji lub wytrąceniu. Biologiczne zanieczyszczenie urządzeń dozujących, zbiorników lub próbek, może prowadzić do błędnych wyników.

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Tylko do profesjonalnej diagnostyki *in-vitro*.
- Przed przeprowadzeniem testu należy dokładnie przeczytać całą instrukcję obsługi.
- Nie używać testu po upływie daty użyteczności podanej na opakowaniu.
- Nie należy używać żadnych części zestawu testowego, jeśli opakowanie jest uszkodzone.
- Testy są przeznaczone do jednorazowego użytku.
- Nie pipetować próbek na pole reakcyjne (pole wyniku).
- Aby uniknąć zanieczyszczenia, nie należy dotykać pola reakcyjnego (pola wyniku).
- W celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego należy używać każdorazowo nowej probówki dla każdej próbki.
- Nie wymieniać lub mieszać elementów składowych z różnych zestawów testowych.
- Nie jeść, nie pić ani nie palić w obszarze pracy z próbkami lub zestawem testowym.
- Podczas kontaktu z próbkami, stosować odzież ochronną, taką jak fartuch, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne.
- Traktować wszystkie próbki tak, jakby zawierały zakaźne odczynniki. Należy zwrócić uwagę na zaistniałe środki ostrożności dla mikrobiologicznego ryzyka, podczas wszystkich procesów jak również standardowych dyrektyw dla odpowiedniej utylizacji próbek.
- Test ten zawiera produkty pochodzenia zwierzęcego. Certyfikowana wiedza o pochodzeniu i/lub o stanie sanitarnym zwierząt nie gwarantują braku przenoszonych patogenów. Dlatego zaleca się, aby te produkty były traktowane jako potencjalnie zakaźne. Posługując się nimi, należy przestrzegać standardowych środków ostrożności, np. unikać połknięcia lub wdychania.
- Temperatura może wpływać na wyniki testu.
- Zużyte materiały testowe powinny być zutylizowane zgodnie z lokalnymi zaleceniami.

8. Pobieranie, przygotowywanie i przechowywanie próbek

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM można wykonać z pełnej krwi (pobranej z żyły lub nakłucia palca), surowicy lub osocza.

Pobieranie krwi pełnej z nakłucia palca.

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

Próbki krwi pełnej z palca powinny być przebadane bezpośrednio.

Próbki krwi pełnej z nakłucia żyły.

Do przygotowania próbek krwi żyłnej lub osocza należy używać pojemników do pobierania próbek z antykoagulantami, takimi jak EDTA sodu, cytrynian sodu lub heparyna sodowa.

Przeprowadzenie testu powinno nastąpić bezpośrednio po pobraniu próbki. Nie przechowywać próbek w temperaturze pokojowej przez dłuższy okres czasu.

Krew pełna z żyły powinna być przechowywana przy temperaturze 2-8°C, jeżeli test zostanie przeprowadzony w ciągu 3 dni po pobraniu próbki.

Nie zamrażać próbek z krwi pełnej.

Próbki surowicy i osocza

Jak najszybciej rozdzielić surowicę lub osocze z krwi, w celu uniknięcia hemolizy. Używać wyłącznie przejrzystych i niehemolitycznych próbek.

Przeprowadzenie testu powinno nastąpić bezpośrednio po pobraniu próbki. Nie przechowywać próbek w temperaturze pokojowej przez dłuższy okres czasu. Probki surowicy/osocza mogą być przechowywane przy temperaturze 2-8°C do 7 dni. W przypadku dłuższego przechowywania próbki należy przechowywać w temperaturze -20°C.

Doprowadzić próbki do temperatury pokojowej przed badaniem. Zamrożone próbki powinny zostać całkowicie rozmrożone i dobrze wymieszane, przed rozpoczęciem testu. Probki nie mogą być ponownie zamrożone i rozmrożone.

Jeśli próbki mają zostać wysłane, te powinny być pakowane zgodnie z obowiązującymi przepisami dotyczącymi transportu patogenów etiologicznych.

Ikteryczne, lipemiczne, hemolityczne, obrabiane ciepłem i zanieczyszczone próbki, mogą prowadzić do fałszywych wyników testu.

9. Przeprowadzanie testu

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

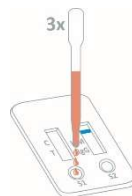
1. Wyciągnąć kasetę testową z opakowania foliowego i użyć ją tak szybko, jak to możliwe. Najlepsze wyniki zostają osiągnięte, gdy test przeprowadzony zostaje bezpośrednio po jego otwarciu. Oznaczyć kasetę testową z danymi pacjenta oraz identyfikacją kontrolną.
2. Kasetę testową położyć na czystą i równą powierzchnię.
3. **a) dla próbek surowicy lub osocza:**

Wirus Denga-Ag NS1

Trzymać pipetę 25 µL pionowo, użyć jej do zassania próbki surowicy lub osocza i dodać 3 krople (ok. 75 µL) do zagłębienia próbki (S1) kasety testowej. **Unikać powstawania pęcherzyków powietrza.**

anty-Denga-IgG/IgM

- Trzymać pipetę 5 µL pionowo, użyć jej do zassania próbki surowicy lub osocza do pierwszego rozszerzenia (ok. 5 µL)



i umieść ją w zagłębieniu próbki (S2) kasety testowej.

- Trzymać pipetę pionowo i dodać 2 krople roztworu do zagłębienia próbki (S) testu kasety. **Unikać powstawania pęcherzyków powietrza.**

b) dla próbek krwi pełnej z naktucia żyły/z naktucia palca:

Wirus Denga-Ag NS1

- Trzymać pipetę 25 µL pionowo, użyć jej do zassania próbki krwi pełnej i dodać 2 krople (ok. 50 µL) próbki do zagłębienia próbki (S1) kasety testowej.
- Trzymać pipetę pionowo i dodać 1 krople roztworu do zagłębienia próbki (S1) kasety testowej. **Unikać powstawania pęcherzyków powietrza.**

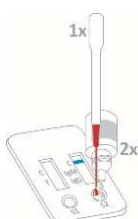
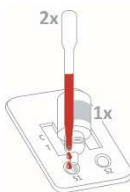
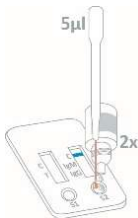
anty-Denga-IgG/IgM

- Trzymać pipetę 5 µL pionowo, użyć jej do zassania próbki krwi pełnej poza pierwsze poszerzenie i dodać 1 kroplę (ok. 10 µL) do zagłębienia próbki (S2) kasety testowej.
- Trzymać fiolkę z buforem pionowo i dodać 2 krople buforu do zagłębienia próbki (S2) kasety testowej. **Unikać tworzenia się pęcherzyków powietrza.**

Alternatywnie można zastosować mikro-pipetę.

4. Włączyć stoper.

5. Zaczekać, aż pojawią się czerwone linie. Wynik interpretować dokładnie po 15 minutach. Nie interpretować wyników po upływie więcej jak 30 minut.



testowej „IgM”, a druga w obszarze linii testowej „IgG”.

Wskazówka:

Intensywność koloru w obszarze linii testowej „T”, „IgG” lub „IgM” może się różnić w zależności od stężenia antygenów NS1 wirusa dengi lub przeciwciał przeciw wirusowi dengi w próbce. Dlatego każdy odcień w obszarze linii testowej „T”, „IgG” lub „IgM” należy uznać za wynik pozytywny. Za pomocą testu otrzymuje się wynik jakościowy i na jego podstawie nie można określać stężenia analitów w próbce.

Negatywny dla Dengue-NS1-Ag

Tylko w obszarze linii kontrolnej (C) pojawia się kolorowa linia”. W obszarze linii testowej (T) linia nie pojawia się.

Negatywny dla anty-Dengue IgG i IgM

Niebieska linia w obszarze linii kontrolnej „C” zmienia kolor na czerwony. W obszarze linii testowej „IgM” i „IgG” nie pojawiają się linie.

Nieważny dla Dengue-NS1-Ag

Linia kontrolna „C” nie pojawia się. Wyniki testów, które po ustalonym czasie odczytu nie wytworzyły linii kontrolnej, muszą zostać odrzucone.

Nieważny dla anty-Dengue IgG i IgM

Wyniki testów, w których niebieska linia w obszarze linii kontrolnej „C” pozostaje całkowicie lub częściowo niebieska po określonym czasie oceny, należy odrzucić.

Sprawdzić przebieg procesu i powtórzyć badanie przy pomocy nowej kasety testowej. Jeżeli problem będzie występował nadal, nie używać już tego zestawu testowego i skontaktować się z dystrybutorem.

Niewystarczająca objętość próbki, przeterminowane testy lub niewłaściwy sposób użytkowania testu, są najprawdopodobniejszymi przyczynami niepojawienia się linii kontrolnej.

11. Kontrola jakości

Test kasetyowy zawiera wewnętrzną kontrolę procesową:

kolorowa linia pojawiająca się w obszarze linii kontrolnej (lewa strona kasety testowej: test Dengue NS1 Ag), a także linia, która zmienia się z niebieskiego na czerwony (po prawej stronie kasety testowej: test Dengue IgG/IgM) są uważane za wewnętrzną kontrolę procesową. Potwierdza ona dodanie wystarczającej ilości próbki, prawidłowe przeprowadzenie testu oraz wystarczające nasycenie membrany.

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

12. Ograniczenia testu

- Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM jest przeznaczony wyłącznie do profesjonalnej diagnostyki *in-vitro* i powinien być używany wyłącznie do jakościowego wykrywania przeciwciał przeciw dengi w ludzkich próbkach krwi pełnej,



10. Interpretacja wyników

Pozytywny dla Dengue-NS1-Ag

Jedna kolorowa linia pojawia się w obszarze linii kontrolnej „C”, a druga kolorowa linia pojawia się w obszarze linii testowej „T”.

Pozytywny dla anty-Dengue IgM

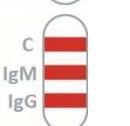
Niebieska linia w obszarze linii kontrolnej „C” zmienia kolor na czerwony. Kolejna czerwona linia pojawi się w obszarze linii testowej „IgM”.

Pozytywny dla anty-Dengue IgG

Niebieska linia w obszarze linii kontrolnej „C” zmienia kolor na czerwony. Kolejna czerwona linia pojawia się w obszarze linii testowej „IgG”.

Pozytywny dla anty-Dengue IgG i IgM

Niebieska linia w obszarze linii kontrolnej „C” zmienia kolor na czerwony. Jedna czerwona linia pojawia się w obszarze linii



surowicy lub osocza. Za pomocą tego testu jakościowego nie można określić wartości ilościowej ani tempa wzrostu stężenia antygenów NS1 wirusa dengi lub przeciwciał przeciwko dengi.

- Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM wykazuje jedynie obecność antygenów Dengue-NS1 oraz przeciwciał przeciw Dengue w próbce i nie powinien być wykorzystywany jako jedyne kryterium do diagnozowania dengi.
- Po wczesnym wystąpieniu gorączki, stężenia IgM przeciw Dengue mogą leżeć poniżej wykrywalnych stężeń. Dla infekcji pierwotnych test MAC-ELISA (Antibody-Capture-IgM-Enzyme-linked Immunosorbent Assay) wykazał, że 80% wszystkich przebadanych pacjentów, wykazało wykrywalne stężenia IgM w piątym dniu po infekcji i 5% wszystkich pacjentów zostało przebadanych pozytywnie pod kątem IgM dziesiątego dnia. Dlatego zaleca się, aby pacjenci byli badani w ciągu tego okresu. Biorąc pod uwagę o infekcje wtórne, to przeciwciała charakteryzują się niską frakcją molową IgM przeciw Dengue i wysoką frakcją IgG przeciw Dengue, które są w dużej mierze reaktywne na flawiwirusy. Linia testowa „IgM” może być słaba, a w obszarze linii testowej „IgG” może wystąpić reakcja krzyżowa.
- Możliwe są serologiczne reaktywności krzyżowe grupy flawiwirusów (zapalenie mózgu z St. Louis, wirus Zachodniego Nilu, japońskie zapalenie mózgu i wirusy żółtej febry). Pozytywne wyniki należy potwierdzić innymi metodami.
- Ciągłości obecności przeciwciał lub jej braku, nie można wykorzystać do określenia sukcesu lub niepowodzenia terapii.
- Wyniki od pacjentów z obniżoną odpornością powinny być interpretowane z ostrożnością.
- Jak przy wszystkich testach diagnostycznych, wszystkie wyniki muszą być interpretowane, w połączeniu w kolejnymi klinicznymi informacjami, które udostępnione są lekarzowi.
- Jeżeli wynik testu jest negatywny, a objawy kliniczne dalej będą się utrzymywać, zaleca się przeprowadzenie dodatkowych badań, przy zastosowaniu innych metod klinicznych. Ujemny wynik nigdy nie wyklucza niedawnej infekcji dengą.
- Negatywny wynik testu dla Dengue NS1 Ag może wystąpić również wtedy, gdy ilość antygenów wirusa Dengue w próbce znajduje się poniżej granicy wykrywalności testu albo gdy wykryte antygeny Dengue-Virus-NS1 nie istniały, podczas stadium choroby, w którym próbka została pobrana.
- Obecność wykrywalnego wirusa dengi NS1-Ag może wskazywać na pozytywny wynik wczesnego zakażenia dengą.
- Oczekuje się, że antygen NS1 wirusa dengi zostanie wykryty 1 dzień po wystąpieniu gorączki i może utrzymywać się do 9 dni zarówno w przypadku pierwotnych, jak i wtórnych zakażeń dengą. Jednak gdy wytwarzane są przeciwciała NS1 przeciwko wirusowi dengi, wykrywanie antygenów NS1 wirusa dengi jest hamowane.

13. Charakterystyka testu

Właściwości kliniczne

Czułość i swoistość diagnostyczna

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG /IgM oceniano na próbkach klinicznych, których status został potwierdzony dla prawej strony kasety testowej (test Dengue IgG/IgM) metodą ELISA oraz dla lewej strony kasety testowej (Dengue NS1 Ag test) przy użyciu kultury wirusa.

Wyniki przedstawiono w poniższych tabelach.

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgM) vs. ELISA

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgM)	Dengue IgM ELISA			
	Pozytywny	Negatywny	Suma	
	Pozytywny	59	0	59
	Negatywny	1	140	141
Suma	60	140	200	

Czułość diagnostyczna: 98,3% (91,1% - 99,7%)*

Swoistość diagnostyczna: >99,9% (97,3% - 100,0%)*

Ogólna zgodność: 99,5% (97,2% - 99,9%)*

*95% przedział ufności

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG) vs. ELISA

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG)	Dengue IgG ELISA			
	Pozytywny	Negatywny	Suma	
	Pozytywny	89	0	89
	Negatywny	1	150	151
Suma	90	150	240	

Czułość diagnostyczna: 98,9% (94,0% - 99,8%)*

Swoistość diagnostyczna: >99,9% (97,5% - 100,0%)*

Ogólna zgodność: 99,6% (97,7% - 99,9%)*

*95% przedział ufności

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (NS1 Ag) vs. kultura wirusa

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (NS1 Ag)	Kultura wirusa			
	Pozytywny	Negatywny	Suma	
	Pozytywny	104	3	107
	Negatywny	8	186	194
Suma	112	189	301	

Czułość diagnostyczna: 92,9% (86,5% - 96,3%)*

Swoistość diagnostyczna: 98,4% (95,4% - 99,5%)*

Ogólna zgodność: 96,3% (93,6% - 97,9%)*

*95% przedział ufności

Substancje interferujące

Ujemne, słabo dodatnie próbki osocza IgG i IgM przeciwko wirusowi dengi, a także słabo dodatnie próbki osocza NS1-Ag wirusa dengi zmieszane z następującymi substancjami interferującymi i nie wykazały one interferencji z testem NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM.

Kwas acetylosalicylowy	4,34 mmol/L
Kwas askorbinowy	0,2 mg/mL
Albumina	60 g/L
Bilirubina	342 µmol/L
Chinina	148 µmol/L
Etanol	86,8 mmol/L
HAMA	780,73 IU/mL
Hemoglobina	2 g/L
Ibuprofen	2425 µmol/L
Kofeina	308 µmol/L
Metronidazol	701 µmol/L
Paracetamol	199 µmol/L
Czynniki reumatoidalne	1035 IU/mL
Ryfampicyna	78,1 µmol/L
Triglicerydy	37 mmol/L
Globulina γ	60 g/L

Reakcje krzyżowe

Anty-HIV, HBsAg, anty-HCV, anty-HAV IgM, anty-wirus różyczki IgM, anty-CMV IgM, anty-HSV-1 IgM, anty-HSV-2 IgM, dur brzuszny, żółta febra, wirus Zika, wirus Chikungunya, anty-Toxoplasma gondii IgM, kiła i gruźlica były badane testem NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM. Podczas testowania testem NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM nie zaobserwowano reaktywności krzyżowej z próbkami.

Precyzyjność

Powtarzalność i odtwarzalność

Precyzyjność została określona przez przetestowanie 10 powtórzeń 7 próbek: jedną negatywną, jedną słabo dodatnią i jedną silnie dodatnią próbkę NS1 Ag, a także słabo i silnie dodatnią próbkę IgG i IgM przeciw wirusowi dengi.

Powtarzalność została określona przez przebadanie 7 próbek w 3 testach: jedną negatywną, jedną słabo dodatnią i jedną silnie dodatnią próbkę NS1 Ag, a także słabo i silnie dodatnią próbkę IgG i IgM przeciw wirusowi dengi. Testy zostały przeprowadzone w 3 różnych dniach przez 3 użytkowników z 3 niezależnymi seriami testu NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM w 3 różnych lokalizacjach.

Test NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM wykazał akceptowalną powtarzalność i odtwarzalność. Wartości ujemne i dodatnie zostały poprawnie zidentyfikowane w > 99% przypadków.

14. Bibliografia

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

Rev. 0, 2020-10-19 AM

1. Uso Previsto

O Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM é um imunoensaio cromatográfico de fluxo lateral para a detecção qualitativa do antígeno NS1 do vírus da dengue, bem como IgG e IgM anti-vírus da dengue em amostras de sangue total, soro ou plasma humanos (consulte a secção 12 'Limitações'). Este teste deve ser usado como um auxílio no diagnóstico de infecções primárias e secundárias por dengue. O procedimento de teste não é automatizado e não requer treino ou alguma qualificação especial. O Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM foi desenvolvido apenas para uso profissional.

2. Introdução e Significado Clínico

O vírus da dengue é um flavivírus transmitido principalmente pelos mosquitos tigre *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. É amplamente distribuído nas áreas tropicais e subtropicais do mundo e causa até 100 milhões de infecções anualmente. A infecção clássica por dengue é caracterizada por um início súbito de febre, dor de cabeça intensa, mialgia, artralgia e erupção cutânea.

A infecção primária por dengue faz com que os IgM aumentem para um nível detectável aproximadamente 5 dias após o início da febre. Os IgM geralmente persistem por 30 a 90 dias. A maioria dos pacientes com dengue em regiões endémicas tem infecções secundárias, resultando em altos níveis de IgG específicos antes ou simultaneamente com a resposta de IgM. Portanto, a detecção de IgM e IgG anti-dengue específicos também pode ajudar a distinguir entre infecções primárias e secundárias.

A NS1 é uma das 7 proteínas não estruturais do vírus da dengue que se acredita estarem envolvidas na replicação viral. A NS1 existe como monómero na sua forma imatura, mas é rapidamente processada no retículo endoplasmático para formar um dímero estável. Uma pequena quantidade de NS1 permanece associada a organelos intracelulares, onde se acredita que esteja envolvida na replicação viral. O restante da NS1 está associado à membrana plasmática ou é secretado como um hexámero solúvel. A NS1 é essencial para a viabilidade viral, mas a sua função biológica precisa é desconhecida. Os anticorpos produzidos em resposta à NS1 em infecções virais podem apresentar reacção cruzada com antígenos de superfície celular em células epiteliais e plaquetas. Isso pode ter implicações no desenvolvimento da febre hemorrágica da dengue.

3. Princípio do Teste

O Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM é um imunoensaio cromatográfico de fluxo lateral para a detecção qualitativa de antígenos NS1 do vírus da dengue, bem como IgG e IgM anti-vírus da dengue em amostras de sangue total, soro ou plasma humano.

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

Os anticorpos NS1 anti-vírus da dengue são imobilizados na região da linha de teste 'T' da membrana. Os IgM anti-humanos e IgG anti-humanos são imobilizados nas regiões da linha de teste 'IgM' e 'IgG', respectivamente, da membrana.

Durante o teste, os antígenos NS1 do vírus da dengue, se presentes na amostra, ligam-se aos anticorpos NS1 anti-vírus da dengue (ingrediente activo da reacção de detecção: 0,6 - 0,8 µg/teste), que são conjugados a partículas coloridas e pré-revestidos na almofada da amostra do teste cassete. Se IgM anti-vírus da dengue ou IgG anti-vírus da dengue específicos estiverem presentes na amostra, estes ligam-se aos antígenos do vírus da dengue (ingrediente activo da reacção de detecção: 0,2 - 0,4 µg/teste) conjugados a partículas coloridas e pré-revestidos na almofada da amostra do teste cassete. A mistura então migra ao longo da membrana por acção capilar e interage com os reagentes na membrana. Os complexos são então capturados por anticorpos NS1 anti-vírus da dengue (ingrediente activo da reacção de detecção: 1,0 - 2,5 µg/teste), bem como IgM anti-humanos (ingrediente activo da reacção de detecção: 0,5 - 1,0 µg/teste) e IgG anti-humanos (ingrediente activo da reacção de detecção: 1,5 - 3,0 µg/teste) nas regiões da linha de teste 'T', bem como 'IgM' e 'IgG', respectivamente. O excesso de partículas coloridas é capturado em cada região da linha de controlo 'C'. A presença de uma linha colorida na região da linha de teste 'T' e/ou 'IgM' e/ou 'IgG' indica um resultado positivo. A ausência de uma linha colorida na região da linha de teste 'T' e/ou 'IgM' e/ou 'IgG' indica um resultado negativo.

A formação de uma linha colorida na região da linha de controlo 'C' (lado esquerdo do teste cassete: Teste Dengue NS1 Ag) e a mudança de cor de uma linha azul para uma vermelha na região da linha de controlo 'C' (lado direito do teste cassete: Teste Dengue IgG/IgM) servem como um controlo do procedimento, indicando que um volume adequado de amostra foi adicionado e ocorreu a absorção da membrana.

4. Reagentes e Materiais Fornecidos

- 10 testes cassetes NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM*, incluindo pipetas descartáveis (25 µL) para Dengue NS1 Ag
- 10 pipetas descartáveis (5 µL) para Dengue IgG/IgM
- 1 tampão (3 mL)**
- 1 folheto informativo

*contendo o conservante azida de sódio: <0,1%

**Tampão fosfato contendo os seguintes conservantes: azida de sódio: <0,1%

Nenhuma rotulagem de perigo é exigida de acordo com o Regulamento (CE) nº 1272/2008 CLP. As concentrações estão abaixo do limite de isenção.

5. Materiais Adicionais Requeridos

- Recipientes de recolha de amostras (apropriados para o material da amostra a ser testado)
- Centrifugadora (apenas para amostras de soro ou plasma)
- Compressas de álcool
- Lancetas (apenas para amostras de sangue total por picada no dedo)
- Temporizador

6. Armazenamento e Estabilidade

Os kits de teste devem ser armazenados de 2 a 30°C até à data de validade indicada. Os testes cassete são estáveis até a data de validade impressa nas embalagens. Os testes cassete devem permanecer nas embalagens de alumínio seladas até

ao seu uso. Não congele o kit de teste. Não use testes depois da data de validade indicada na embalagem. Deve-se ter cuidado para proteger os componentes do kit de teste de contaminação. Não use os componentes do kit de teste se houver evidência de contaminação microbiana ou precipitação. A contaminação biológica do equipamento de distribuição, recipientes ou reagentes pode levar a resultados imprecisos.

7. Avisos e Precauções

- Apenas para diagnóstico *in-vitro* profissional.
- Leia cuidadosamente o procedimento de teste antes de iniciar o teste.
- Não use o teste após a data de validade indicada na embalagem.
- Não use os componentes do kit de teste se a embalagem primária estiver danificada.
- Os testes são para uso único.
- Não adicione amostras à área de reacção (área de resultados).
- Para evitar contaminação, não toque na área de reacção (área de resultados).
- Evite a contaminação cruzada de amostras usando um novo recipiente de recolha de amostras para cada amostra obtida.
- Não substitua ou misture componentes de kits de teste diferentes.
- Não coma, beba ou fume na área onde as amostras e kits de teste são manuseados.
- Use roupas de protecção como batas de laboratório, luvas descartáveis e protecção para os olhos quando as amostras estiverem a ser analisadas.
- Manuseie todas as amostras como se contivessem agentes infecciosos. Observe as precauções estabelecidas para riscos microbiológicos em todos os procedimentos e directrizes padrão para o descarte adequado de amostras.
- O kit de teste contém produtos de origem animal. O conhecimento certificado da origem e/ou estado sanitário dos animais não garante totalmente a ausência de agentes patogénicos transmissíveis. Portanto, é recomendado que esses produtos sejam tratados como potencialmente infecciosos e manuseados de acordo com as precauções de segurança usuais (por exemplo, não ingerir ou inalar).
- A temperatura pode afectar adversamente os resultados do teste.
- Os materiais de teste usados devem ser descartados de acordo com os regulamentos locais.

8. Recolha e Preparação de Amostras

O Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM pode ser realizado usando sangue total (por punção venosa ou picada no dedo), soro ou plasma.

Para recolher amostras de sangue total por picada no dedo:

- Lave a mão do paciente com sabão e água morna ou limpa com uma compressa embebida em álcool. Deixe secar.
- Massage a mão, sem tocar no local da punção, esfregando ao longo da mão em direcção à ponta do dedo do meio ou anelar.
- Perfure a pele com uma lanceta estéril. Limpe a primeira gota de sangue.

- Esfregue suavemente a mão do pulso para a palma e, em seguida, para o dedo para formar uma gota arredondada de sangue sobre o local da punção.

Sangue total por picada no dedo deve ser testado imediatamente.

Amostras de sangue total por punção venosa

Recipientes contendo anticoagulantes, como EDTA de sódio, citrato de sódio ou heparina sódica, devem ser usados para a preparação de amostras de sangue total venoso ou plasma.

O teste deve ser realizado imediatamente após a recolha da amostra. Não deixe as amostras à temperatura ambiente por períodos prolongados.

Se o teste for realizado dentro de 3 dias após a recolha da amostra, o sangue total recolhido por punção venosa deve ser armazenado a 2-8°C.

Não congele amostras de sangue total.

Amostras de Soro ou Plasma

Separe o soro ou plasma do sangue o mais rápido possível para evitar hemólise. Use apenas amostras límpidas e não hemolisadas.

O teste deve ser realizado imediatamente após a recolha da amostra. Não deixe as amostras à temperatura ambiente por períodos prolongados. As amostras de soro e plasma podem ser armazenadas de 2 a 8°C por até 7 dias. Para armazenamento de longo prazo, as amostras devem ser mantidas a -20°C.

Coloque as amostras à temperatura ambiente antes do teste. Amostras congeladas devem ser completamente descongeladas e bem misturadas antes do teste. As amostras não devem ser congeladas e descongeladas repetidamente.

Se as amostras forem enviadas, estas devem ser embaladas de acordo com todas as regulamentações aplicáveis para o transporte de agentes etiológicos.

Amostras ictericas, lipémicas, hemolisadas, tratadas termicamente e contaminadas podem levar a resultados de teste imprecisos.

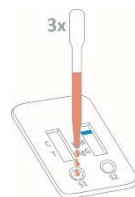
9. Procedimento de teste

Coloque os testes, amostras, tampão e/ou controlos à temperatura ambiente (15-30°C) antes do teste.

1. Remova o teste cassete da embalagem e use-o o mais rápido possível. Os melhores resultados serão obtidos se o teste for realizado imediatamente após a abertura da embalagem. Rotule o teste cassete com a identificação do paciente ou controlo.
2. Coloque o teste cassete numa superfície limpa e nivelada.
3. **a) Para amostras de soro ou plasma:**

NS1 Ag vírus da dengue

Segurando a pipeta de 25 µL verticalmente, retire uma amostra de soro ou plasma e adicione 3 gotas (aproximadamente 75 µL) da amostra ao poço da amostra (S1) do teste cassete. **Evite a formação de bolhas de ar.**



IgG/IgM anti-vírus da dengue

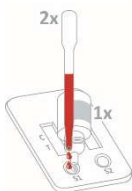
- Segurando a pipeta de 5 µL verticalmente, retire uma amostra de soro ou plasma até ao primeiro alargamento (aproximadamente 5 µL) e adicione-a ao poço da amostra (S2) do teste cassette.
- Segurando o frasco de tampão verticalmente, adicione 2 gotas de tampão ao poço da amostra (S2). **Evite a formação de bolhas de ar.**



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

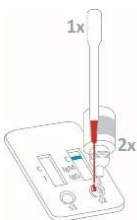
NS1 Ag vírus da dengue

- Segurando a pipeta de 25 µL verticalmente, retire uma amostra de sangue total e adicione 2 gotas (aproximadamente 50 µL) da amostra ao poço da amostra (S1) do teste cassette.
- Segurando o frasco de tampão verticalmente, adicione 1 gota de tampão ao poço da amostra (S1). **Evite a formação de bolhas de ar.**



IgG/IgM anti-vírus da dengue

- Segurando a pipeta de 25 µL verticalmente, retire uma amostra de sangue total até acima do primeiro alargamento e adicione 1 gota (aproximadamente 10 µL) da amostra ao poço da amostra (S2) do teste cassette.
- Segurando o frasco de tampão verticalmente, adicione 2 gotas de tampão ao poço da amostra (S2). **Evite a formação de bolhas de ar.**



Alternativamente, pode usar uma micropipeta.

4. Inicie o temporizador.
5. Espere até ao aparecimento da(s) linha(s) vermelha(s). Leia o resultado do teste após exactamente 15 minutos. Não interprete o resultado após mais de 30 minutos.



10. Interpretação de Resultados

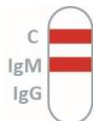
Positivo para NS1 Ag vírus da dengue

Uma linha colorida desenvolve-se na região da linha de controlo 'C' e outra linha colorida desenvolve-se na região da linha de teste 'T'.



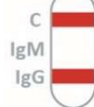
Positivo para IgM anti-vírus da dengue

A linha azul na região da linha de controlo 'C' fica vermelha. Outra linha vermelha desenvolve-se na região da linha de teste 'IgM'.



Positivo para IgG anti-vírus da dengue

A linha azul na região da linha de controlo 'C' fica vermelha. Outra linha vermelha desenvolve-se na região da linha de teste 'IgG'.



Positivo para IgG e IgM anti-vírus da dengue

A linha azul na região da linha de controlo 'C' fica vermelha. Uma linha vermelha desenvolve-se na região da linha de teste 'IgM' e outra desenvolve-se na região da linha de teste 'IgG'.



Note: A intensidade da cor nas regiões da linha de teste 'T', 'IgG' ou 'IgM' pode variar dependendo da concentração de antígenos NS1 do vírus da dengue ou de anticorpos anti-vírus da dengue na amostra. Portanto, qualquer tom de cor na região da linha de teste 'T', 'IgG' ou 'IgM' deve ser considerado positivo. Observe que este é apenas um teste qualitativo e não pode determinar a concentração de analito na amostra.

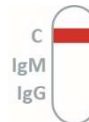
Negativo para NS1 Ag vírus da dengue

Uma linha colorida desenvolve-se na região da linha de controlo 'C'. Nenhuma linha se desenvolve na região da linha de teste 'T'.



Negativo para IgG e IgM anti-vírus da dengue

A linha azul na região da linha de controlo 'C' fica vermelha. Nenhuma linha se desenvolve na região da linha de teste 'IgM' e 'IgG'.



Inválido para NS1 Ag vírus da dengue

A linha de controlo 'C' não aparece. Os resultados de qualquer teste que não produziu uma linha de controlo no tempo de leitura especificado devem ser descartados.



Inválido para IgG and IgM anti-vírus da dengue

Os resultados de qualquer teste em que a linha azul na região da linha de controlo 'C' permanece completa ou parcialmente azul no tempo de leitura especificado devem ser descartados.



Por favor, reveja o procedimento e repita o teste com um novo teste cassette. Se o problema persistir, pare de usar o kit de teste imediatamente e entre em contacto com seu distribuidor. Os motivos mais prováveis para a falha da linha de controlo são um volume de amostra insuficiente, procedimento operacional incorrecto ou testes expirados.

11. Controlo de Qualidade

Um controlo de procedimento interno está incluído no teste cassette:

Uma linha colorida que aparece na região da linha de controlo 'C' (lado esquerdo do teste cassette: Teste Dengue NS1 Ag), bem como uma linha azul que fica vermelha (lado direito do teste cassette: Teste Dengue IgG/IgM) são considerados um controlo de procedimento interno. Confirma um volume de amostra suficiente, uma absorção da membrana adequada e uma técnica de procedimento correcta.

Boas práticas de laboratório (BPL) recomendam o uso de materiais de controlo externo para garantir o desempenho adequado do kit de teste.

12. Limitações

- O teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM é apenas para diagnóstico *in-vitro* profissional. Deve ser usado para a detecção qualitativa de antígenos NS1 do vírus da dengue, bem como IgG e IgM anti-vírus da dengue em amostras de sangue total, soro ou plasma humanas. Nem o valor quantitativo, nem a taxa de aumento na concentração de antígenos NS1 do vírus da dengue ou anticorpos anti-vírus da dengue podem ser determinados com este teste qualitativo.
- O teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM detecta apenas a presença de antígenos NS1 do vírus da dengue e anticorpos anti-vírus da dengue em amostras e não deve ser usado como o único critério para o diagnóstico de dengue.
- Logo após o início da febre, as concentrações de IgM anti-vírus da dengue podem estar abaixo dos níveis detectáveis. Para a infecção primária, um ensaio de imunoadsorção enzimática de captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) mostrou que 80% dos pacientes com dengue testados exibiram níveis detectáveis de IgM ao 5º dia após a infecção e 99% dos pacientes testaram positivo para IgM no décimo dia. Portanto, é recomendado que os pacientes sejam testados dentro deste período de tempo. Quanto à infecção secundária, uma fracção molar baixa de IgM anti-vírus da dengue e uma fracção molar alta de IgG anti-vírus da dengue que são amplamente reactivos a flavivírus caracterizam os anticorpos. A linha de teste 'IgM' pode ser fraca e uma reacção cruzada na região da linha de teste 'IgG' pode ocorrer.
- A reactividade sorológica cruzada no grupo dos flavivírus (encefalite de St. Louis, vírus do Nilo Ocidental, encefalite japonesa e vírus da febre amarela) é possível. Os resultados positivos devem ser confirmados por outros métodos.
- A presença ou ausência contínua de anticorpos não pode ser usada para determinar o sucesso ou o fracasso da terapia.
- Os resultados de pacientes imunossuprimidos devem ser interpretados com cuidado.
- Como acontece com todos os testes de diagnóstico, todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis para o médico.
- Se o resultado do teste for negativo e os sintomas clínicos persistirem, testes adicionais usando outros métodos clínicos são recomendados. Um resultado negativo não exclui em nenhum momento a possibilidade de uma infecção recente de dengue.
- Um resultado de teste negativo para antígenos NS1 do vírus dengue pode ocorrer se a quantidade de antígenos NS1 do vírus dengue presente na amostra estiver abaixo do

limite de detecção do teste ou se os antígenos NS1 do vírus da dengue detectados não estiverem presentes durante o estágio da doença em que o espécime foi recolhido.

- A presença de NS1 Ag do vírus da dengue detectável pode significar um resultado positivo para uma infecção inicial por dengue.
- Prevê-se que o antígeno NS1 do vírus da dengue seja detectável 1 dia após o início da febre e que pode persistir por até 9 dias nas infecções primárias e secundárias por dengue. Mas se anticorpos NS1 anti-vírus da dengue são produzidos, a detecção de antígenos NS1 do vírus da dengue é inibida.

13. Características de Desempenho

Desempenho Clínico

Sensibilidade e especificidade de diagnóstico

O teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM foi avaliado com amostras clínicas cujo status foi confirmado ao usar ELISA para o lado direito do teste cassette (Teste Dengue IgG/IgM) e ao usar uma cultura viral para o lado esquerdo do teste cassette (Teste Dengue NS1 Ag).

Os resultados são apresentados nas seguintes tabelas:

Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgM) vs. ELISA

Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgM)	ELISA Dengue IgM		
	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	59	0
Negativo	1	140	141
Total	60	140	200

Sensibilidade de diagnóstico: 98,3% (91,1% - 99,7%)*

Especificidade de diagnóstico: >99,9% (97,3% - 100,0%)*

Concordância Geral: 99,5% (97,2% - 99,9%)*

*Intervalo de confiança de 95%

Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG) vs. ELISA

Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (IgG)	ELISA Dengue IgG		
	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	89	0
Negativo	1	150	151
Total	90	150	240

Sensibilidade de diagnóstico: 98,9% (94,0% - 99,8%)*

Especificidade de diagnóstico: >99,9% (97,5% - 100,0%)*

Concordância Geral: 99,6% (97,7% - 99,9%)*

*Intervalo de confiança de 95%

Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (NS1 Ag) vs. cultura viral

Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM (NS1 Ag)	Cultura viral		
	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	104	3
Negativo	8	186	194
Total	112	189	301

Sensibilidade de diagnóstico: 92,9% (86,5% - 96,3%)*

Especificidade de diagnóstico: 98,4% (95,4% - 99,5%)*

Concordância Geral: 96,3% (93,6% - 97,9%)*

*Intervalo de confiança de 95%

Substâncias interferentes

Amostras de plasma IgG e IgM anti-vírus da dengue negativas, positivas baixas, bem como amostras de plasma NS1 Ag do vírus da dengue positivas baixas foram testadas com as seguintes substâncias interferentes e não apresentaram interferência com o Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM.

Ácido acetilsalicílico	4,34 mmol/L
Ácido ascórbico	0,2 mg/mL
Albumina	60 g/L
Bilirrubina	342 µmol/L
Cafeína	308 µmol/L
Etanol	86,8 mmol/L
Hemoglobina	2 g/L
HAMA	780,73 IU/mL
Ibuprofeno	2425 µmol/L
Metronidazol	701 µmol/L
Paracetamol	199 µmol/L
Quinina	148 µmol/L
Fatores reumatóides	1035 IU/mL
Rifampicina	78,1 µmol/L
Triglicéridos	37 mmol/L
Globulina γ	60 g/L

Reactividade cruzada

Amostras positivas para anti-HIV, HBsAg, anti-HCV, IgM anti-HAV, IgM anti-vírus da *rubella*, IgM anti-CMV, IgM anti-HSV-1, IgM anti-HSV-2, febre tifóide, febre amarela, vírus Zika, vírus chicungunha, IgM anti-*Toxoplasma gondii*, sífilis e tuberculose foram testadas com o Teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM. Nenhuma reactividade cruzada com as amostras foi observada ao testar, usando o teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM.

Precisão

Repetibilidade e reprodutibilidade

A precisão foi estabelecida ao testar 10 replicados de 7 amostras: uma amostra NS1 Ag negativa, positiva baixa e positiva alta, bem como amostras de IgG e IgM anti-vírus da dengue positivas baixas e altas.

A repetibilidade foi estabelecida ao testar 7 amostras em 3 ensaios: uma amostra NS1 Ag negativa, positiva baixa e positiva alta, bem como amostras de IgG e IgM anti-vírus da dengue positivas baixas e altas. O teste foi realizado por 3 operadores usando 3 lotes do teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM independentes em 3 locais diferentes em 3 dias separados.

O teste NADAL® Dengue NS1 Ag + IgG/IgM demonstrou repetibilidade e reprodutibilidade aceitáveis. Os valores negativos e positivos foram identificados correctamente > 99% do tempo.











14. Referências

- Halstead SB. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI. Dengue. *Rev. Infect. Dis.* 1984; 6:251-264.
- Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239:476-481.
- Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Japanese J. Trop. Med. Hygiene* 1994; 22: 9-12.
- Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. *Rev. Med. Micro.* 1995; 6:39-48.
- Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
- Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jul; 10(4): 725-8.

- Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr (in German).* 1997; 147(19-20): 463-4.
- Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus. *Microbiol Immunol.* 1994; 38(12): 951-5.

Rev. 0, 2020-10-19 JC

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

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

Our Teams

Germany:

Regensburg

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

Moers

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

Austria:

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

UK & Ireland:

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

France:

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

Switzerland

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

Belgium

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

Luxembourg

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

Spain:

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

Italy:

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

Poland:

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

Portugal:

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

Netherlands:

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

Nordic countries:

Denmark

Tel: +31 703075 605
Free Tel: 808 887 53

Finland

Tel: +31 703075 606
Free Tel: 0800 918 263
Free Fax: 0800 918 262

Norway

Tel: +31 703075 605
Free Tel: 800 16 731

Sweden

Tel: +31 703075 605
Free Tel: 020 79 09 06

