

NovaLisa[®]

Dengue Virus NS1 Antigen

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

**Instructions for use / Gebrauchsanweisung / Notice d'utilisation / Istruzioni per l'uso /
Instrucciones de uso / Instruções de utilização**

| | |
|---|----|
| English | 2 |
| Deutsch | 6 |
| Français | 11 |
| Italiano | 16 |
| Español | 21 |
| Português | 26 |
| Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas | 34 |
| Packaging materials / Verpackungsmaterialien / Matériels d'emballage / Materiali d'imballaggio / Materiales de embalaje / Materiais de embalagem | 34 |
| Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos | 35 |
| Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste | 36 |

REF

NS1D4020 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTENDED USE

The Dengue Virus NS1 Antigen ELISA is intended for the qualitative determination of Dengue virus NS1 antigen in human serum or plasma (citrate, heparin).

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antigen is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with antibodies to bind the corresponding antigen of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material, horseradish peroxidase (HRP) labelled antibodies are added. This conjugate binds to the captured specific antigens. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complexes are visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of specific antigen in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

3. MATERIALS

3.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with anti-Dengue virus NS1 antibodies; in resealable aluminium foil.
- **DIL:** 1 bottle containing 50 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **WASH BUF 20x:** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap; 0.2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 12 mL of peroxidase labelled antibodies to Dengue virus NS1; coloured red; ready to use; black cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **SUB TMB:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:** 1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Negative Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 11.1

3.2. Materials supplied

- 2 Cover foils
- 1 Instructions for use (IFU)

3.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplate
- Pipettes to deliver volumes between 100 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

4. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

5. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards/controls to room temperature (20...25 °C) before starting the test run!

5.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with anti-Dengue virus NS1 antibodies. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

5.2. WASH BUF 20x

Dilute WASH BUF 20x 1 + 19; e. g. 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL distilled water. The diluted buffer (WASH BUF 1x) is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g., in a water bath. Mix well before dilution.

5.3. **SUB TMB**

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. **SUB TMB** should be colourless or could have a slight blue tinge. If **SUB TMB** turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise, they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

6.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+1 with **DIL**. Dispense e.g., 200 µL sample and 200 µL **DIL** into tubes to obtain a 1+1 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

7. ASSAY PROCEDURE

Please read the instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of **WASH BUF 1x** from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 11. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 60 min ± 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of **WASH BUF 1x**. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. Cover wells with the foil supplied in the kit.
7. **Incubate for 60 min ± 5 min at 37 ± 1 °C.** Do not expose to direct sunlight.
8. Repeat step 4.
9. Dispense 100 µL **SUB TMB** into all wells.
10. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
11. Dispense 100 µL **SOLN STOP** into all wells in the same order and at the same rate as for **SUB TMB**, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
12. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of **SOLN STOP**.

7.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

8. RESULTS

8.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these instructions for use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < **0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value < **Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

8.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43
Cut-off = 0.43

8.2.1. Results in Units [NTU]

Patient (mean) absorbance value x 10 = [NovaTec Units = NTU]
Cut-off

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37$ NTU

8.3. Interpretation of Results

| | | |
|--|------------|---|
| Cut-off | 10 NTU | - |
| Positive | > 11 NTU | Pathogen-specific antigen is present. There has been a contact with the pathogen. Further serological tests should be carried out to confirm the infection. |
| Equivocal | 9 – 11 NTU | Pathogen-specific antigen cannot be detected clearly; a secure evaluation is not possible. In the case of a clinical suspicion in combination with a borderline result, clarification by other diagnostic methods and/or the serological investigation of a follow-up sample is recommended. |
| Negative | < 9 NTU | Pathogen-specific antigen not detectable. In the case of a clinical suspicion in combination with a negative result clarification by other diagnostic methods and/or the serological investigation of a follow-up sample is recommended. |
| Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value. | | |

8.3.1. Antigen, Antibody Isotypes and State of Infection

| | |
|----------|---|
| Serology | Significance |
| Antigen | Characteristic of an acute infection |
| IgM | Characteristic of the primary antibody response High IgM titer with low IgG titer: → suggests a current or very recent infection Rare: → persisting IgM |
| IgG | Characteristic of the secondary antibody response May persist for several years High IgG titer with low IgM titer: → may indicate a past infection |

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

9.1. Precision

| Intraassay | n | Mean (OD) | CV (%) |
|------------|----|------------|--------|
| # 1 | 24 | 1.069 | 4.63 |
| # 2 | 24 | 0.104 | 7.03 |
| # 3 | 24 | 0.494 | 5.51 |
| Interassay | n | Mean (NTU) | CV (%) |
| # 1 | 12 | 30.99 | 5.99 |
| # 2 | 12 | 2.49 | 12.01 |
| # 3 | 12 | 14.81 | 6.38 |

9.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 98.63 % (95 % confidence interval: 92.60 % - 99.97 %).

9.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 97.44 % (95 % confidence interval: 91.04 % - 99.69 %).

9.4. Interferences

Interferences with lipemic or icteric samples or samples containing high levels of albumin are not observed up to a concentration of 5 mg/mL triglycerides, 0.5 mg/mL bilirubin and 60 mg/mL albumin.
Samples that are hemolyzed should be avoided for analysis with this assay.

9.5. Cross Reactivity

Investigation of a potentially cross-reacting sample panel (IgM antibody positive for West Nile virus, Zika virus, Chikungunya virus, Plasmodium, Leptospira, Epstein-Barr virus; or antinuclear antibody or rheumatoid factor positive) did not reveal evidence of false-positive results due to cross-reactions.

Nevertheless, false positive results should be considered in individuals with active flavivirus infection, including West Nile Virus (WNV) and Yellow Fever Virus (YFV).

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE


Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values.

11. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or Microtiterplates of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.


11.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 3.1).
Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

| | | | |
|---|----------------|-----------|---|
|  | Warning | H317 | May cause an allergic skin reaction. |
| | | P261 | Avoid breathing spray. |
| | | P280 | Wear protective gloves/ protective clothing. |
| | | P302+P352 | IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. |
| | | P333+P313 | If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention. |
| | | P362+P364 | Take off contaminated clothing and wash it before reuse. |

Reagents may contain 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (refer to 3.1).

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

| | | | |
|---|----------------|----------------|--|
|  | Warning | H315 | Causes skin irritation. |
| | | H319 | Causes serious eye irritation. |
| | | P280 | Wear protective gloves/ protective clothing. |
| | | P302+P352 | IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. |
| | | P305+P351+P338 | IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. |
| | | P337+P313 | If eye irritation persists: Get medical advice/attention. |

Further information can be found in the safety data sheet.

11.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

12. ORDERING INFORMATION

| | | | |
|------------|----------|--------------------------|---------------------|
| REF | NS1D4020 | Dengue Virus NS1 Antigen | (96 Determinations) |
|------------|----------|--------------------------|---------------------|

DEUTSCH

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Dengue Virus NS1 Antigen ELISA ist für den qualitativen Nachweis von Denguevirus NS1 Antigen in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

2. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischem Antigen beruht auf der ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Technik.

Mikrotiterplatten sind mit Antikörpern beschichtet, um entsprechendes Antigen aus der Probe zu binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch den folgenden Waschschrift entfernt. Anschließend werden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte Antikörper zugegeben, die an immobilisierte spezifische Antigene binden. In einem zweiten Waschschrift wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung nachgewiesen. Die Intensität dieses Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge des spezifischen Antigens in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

3. MATERIALIEN

3.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit anti-Denguevirus NS1 Antikörpern; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **DIL:** 1 Flasche mit 50 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **WASH BUF 20x:** 1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe; 0,2% (w/v) 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 12 mL Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen Denguevirus NS1; rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **SUB TMB:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Positivkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Cut-off Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Negativkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 11.1.

3.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- 1 Gebrauchsanweisung

3.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (100 - 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

4. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden.

5. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen!

5.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit anti-Denguevirus NS1-Antikörpern beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

5.2. **WASH|BUF|20x**

WASH|BUF|20x ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL **WASH|BUF|20x** + 190 mL destilliertes Wasser. Der verdünnte Puffer (**WASH|BUF|1x**) ist bei Raumtemperatur (20...25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

5.3. **SUB|TMB**

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. **SUB|TMB** ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte **SUB|TMB** blau sein, ist es kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

6. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

6.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+1 mit **DIL** verdünnen, z. B. 200 µL Probe und 200 µL **DIL** in die entsprechenden Rörchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+1 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Gebrauchsanweisung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsanweisung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf bis zu fünf und das **WASH|BUF|1x** -Volumen von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 11 beachten. Vor Testbeginn die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µL Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **60 min ± 5 min bei 37 ± 1 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL **WASH|BUF|1x** waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
7. **60 min ± 5 min bei 37 °C inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
8. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
9. 100 µL **SUB|TMB** in alle Vertiefungen pipettieren.
10. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
11. In alle Vertiefungen 100 µL **SOLN|STOP** in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der Zugabe von **SUB|TMB** pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
12. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe von **SOLN|STOP** messen.

7.1. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben notieren.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

8.1. Testgültigkeitskriterien

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < **0,100**
- **Negativkontrolle:** Extinktionswert < **Cut-off**
- **Cut-off Kontrolle:** Extinktionswert **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle:** Extinktionswert > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

8.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Cut-off Kontrolle.

Beispiel: 0,44 OD Cut-off Kontrolle + 0,42 OD Cut-off Kontrolle = 0,86 : 2 = 0,43

Cut-off = 0,43

8.2.1. Ergebnisse in Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-off}} =$ [NovaTec Einheiten = NTU]

Beispiel: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37$ NTU

8.3. Interpretation der Ergebnisse

| | | |
|-------------|------------|--|
| Cut-off | 10 NTU | - |
| Positiv | > 11 NTU | Erreger-spezifisches Antigen ist vorhanden. Ein Kontakt mit dem Erreger hat stattgefunden. Zur Bestätigung der Infektion sollten weitere serologische Tests durchgeführt werden. |
| Grenzwertig | 9 – 11 NTU | Erreger-spezifisches Antigen kann nicht eindeutig nachgewiesen werden; eine gesicherte Bewertung ist nicht möglich. Im Falle eines klinischen Verdachts in Kombination mit einem grenzwertigen Ergebnis, wird eine Abklärung durch andere diagnostische Methoden und/oder die serologische Untersuchung einer Folgeprobe empfohlen. |
| Negativ | < 9 NTU | Erreger-spezifisches Antigen ist nicht nachweisbar. Im Falle eines klinischen Verdachts in Kombination mit einem grenzwertigen Ergebnis, wird eine Abklärung durch andere diagnostische Methoden und/oder die serologische Untersuchung einer Folgeprobe empfohlen. |

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.

Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.

8.3.1. Antigen, Antikörper-Isotypen und Infektionsstatus

| Serologie | Bedeutung |
|-----------|--|
| Antigen | Typisch für eine akute Infektion |
| IgM | Typisch für Primärantwort Hoher IgM-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgG-Titer: → Hinweis auf relativ frische Infektion Selten: → persistierendes IgM |
| IgG | Typisch für Sekundärantwort Können auch noch nach Jahren nachweisbar sein Hoher IgG-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgM-Titer: → wahrscheinlich länger zurückliegende Infektion |

9. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

9.1. Präzision

| Intraassay | n | Mittelwert (OD) | Vk (%) |
|------------|----|------------------|--------|
| # 1 | 24 | 1,069 | 4,63 |
| # 2 | 24 | 0,104 | 7,03 |
| # 3 | 24 | 0,494 | 5,51 |
| Interassay | n | Mittelwert (NTU) | Vk (%) |
| # 1 | 12 | 30,99 | 5,99 |
| # 2 | 12 | 2,49 | 12,01 |
| # 3 | 12 | 14,81 | 6,38 |

9.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 98,63 % (95 % Konfidenzintervall: 92,60 % - 99,97 %).

9.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist 97,44 % (95 % Konfidenzintervall: 91,04 % - 99,69 %).

9.4. Interferenzen

Lipämische und ikterische Proben sowie Proben mit hohem Albumingehalt ergeben bis zu einer Konzentration von 5 mg/mL Triglyceriden, 0,5 mg/mL Bilirubin und 60 mg/mL Albumin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Hämolytierte Proben sollten für die Analyse mit diesem Assay vermieden werden.

9.5. Kreuzreaktivität

Die Untersuchung eines potenziell kreuzreagierenden Probenpanels (IgM-Antikörper positiv für das West-Nil-Virus, Zikavirus, Chikungunya-Virus, Plasmodium, Leptospira oder Epstein-Barr-Virus oder positiv für antinukleäre Antikörper oder Rheumafaktor) ergab keine Hinweise auf falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kreuzreaktionen.

Nichtsdestotrotz sollten falsch-positive Ergebnisse bei Personen mit aktiver Flavivirus-Infektion, einschließlich West-Nil-Virus (WNV) und Gelbfieber-Virus (YFV), in Betracht gezogen werden.

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

11.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 3.1).
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung



| | |
|-----------|--|
| H317 | Kann allergische Hautreaktionen verursachen. |
| P261 | Einatmen von Aerosol vermeiden. |
| P280 | Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen. |
| P302+P352 | BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen. |
| P333+P313 | Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P362+P364 | Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. |

Die Reagenzien können 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan enthalten (siehe 3.1).
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung



| | |
|----------------|--|
| H315 | Verursacht Hautreizungen. |
| H319 | Verursacht schwere Augenreizung. |
| P280 | Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen. |
| P302+P352 | BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen. |
| P305+P351+P338 | BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. |
| P337+P313 | Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. |

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden

11.2. Entsorgungshinweise

Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen werden im Allgemeinen als gefährliche Abfälle betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfällen wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt. Wenden Sie sich an Ihre örtlichen Behörden oder an Abfallentsorgungsunternehmen, die Sie über die Entsorgung von Sondermüll beraten.

Informationen zu den Verpackungsmaterialien finden Sie unter VERPACKUNGSMATERIALIEN.

12. BESTELLINFORMATIONEN

REF

NS1D4020

Dengue Virus NS1 Antigen

(96 Bestimmungen)

FRANÇAIS

1. INDICATION D'UTILISATION

La trousse Dengue Virus NS1 Antigen ELISA est prévue pour la détection qualitative des antigènes NS1 du virus de la dengue dans le sérum humain ou plasma (citrate, héparine).

2. PRINCIPE DU TEST

La détermination immunoenzymatique qualitative des antigènes spécifiques est basée sur la technique ELISA (du anglais, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Plaques de Microtitrage sont recouvertes d'anticorps spécifiques pour lier les antigènes correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon détaché, le conjugué peroxydase de raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux antigènes capturés. Dans une deuxième étape de lavage, le conjugué non lié est éliminé. Le complexe immun formé par le conjugué lié est visualisé par l'addition tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu.

L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'antigènes spécifiques dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit un changement du bleu au jaune. L'absorbance à 450/620 nm est lue en utilisant un photomètre de Plaque de Microtitrage ELISA.

3. MATERIEL

3.1. Réactifs fournis

- **Plaque de Microtitrage:** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'anticorps anti-Dengue virus NS1; en sachets d'aluminium refermables.
- **DIL:** 1 flacon contenant 50 mL de tampon phosphaté (10 mM) pour la dilution de l'échantillon; pH 7,2 ± 0,2; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon blanc; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0,2 mol/L; prêt à l'emploi; bouchon rouge.
- **WASH BUF 20x:** 1 flacon contenant 50 mL d'un tampon phosphaté (0,2 M) concentré 20 fois (pH 7,2 ± 0,2) pour laver les puits; bouchon blanc; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Conjugué:** 1 flacon contenant 12 mL de peroxydase conjuguées à anticorps contre dengue virus NS1; prêt à l'emploi; couleur rot, bouchon noir; ≤ 0,02% (v/v) MIT
- **SUB TMB:** 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), < 0,1 %; prêt à l'emploi; bouchon jaune.
- **Contrôle Positif:** 1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon rouge; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Contrôle Cut-off:** 1 flacon contenant 3 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon vert; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Contrôle Négatif:** 1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon bleu; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 11.1.

3.2. Matériel fourni

- 2 couvercles autocollante
- 1 notice d'utilisation

3.3. Matériel et équipement requis

- Photomètre de Plaque de Microtitrage ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620 nm
- Incubateur 37 °C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des Plaque de Microtitrage
- Pipettes pour utilisation entre 100 et 1000 µL
- Mélangeur Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables

4. STABILITE ET CONSERVATION

Conserver le kit à 2...8 °C. Les réactifs ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé à 2...8 °C.

5. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20...25 °C) et les mélanger avant de commencer le test!

5.1. Plaque de Microtitrage

Les barrettes sécables sont revêtues d'anticorps anti-Dengue virus NS1. Immédiatement après avoir prélevé les barrettes nécessaires, les barrettes restantes doivent être scellés le vide dans de feuille d'aluminium avec le sac de silicium (le déshydratant) fourni et emmagasiner à 2...8 °C.

5.2. WASH BUF 20x

Diluer WASH BUF 20x 1+19; par exemple 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL d'eau distillée. Le Tampon diluée (WASH BUF 1x) est stable pendant 5 jours à la température ambiante (20...25 °C). Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie mélangez bien avant dilution.

5.3. SUB TMB

La solution est prête à utiliser et doit être emmagasiné à 2...8 °C, à l'abri de la lumière. SUB TMB doit être incolore ou pourrait avoir une légère couleur bleu clair. Si SUB TMB devient bleu, il peut avoir été contaminé et ne peut pas être utilisé dans le test.

6. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons humains de sérum ou plasma (citrate, héparine) pour ce test. Si le test est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2...8 °C; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-70...-20 °C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le test. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation.

L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

6.1. Dilution de l'échantillon

Avant du test, tous les échantillons doivent être dilués 1+1 avec DIL. Diluer 200 µL d'échantillon avec 200 µL DIL dans des tubes pour obtenir une dilution 1+1 et mélanger soigneusement sur un Vortex.

7. PROCEDE DE TESTE

Lire attentivement la notice d'utilisation **avant de** réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. La technique de test suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le test doit être effectué sur un systèmes automatiques pour ELISA, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume du WASH BUF 1x de 300 à 350 µL. Faites attention au chapitre 11. Avant de commencer le test, le plan de distribution et d'identification de tous les échantillons et les étalons/contrôles (il est recommandé déterminer en double) doivent être soigneusement établi. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre donné et sans délai.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalon/contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37 ± 1 °C.

1. Pipeter 100 µL de étalons/contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle, fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 60 minutes ± 5 minutes à 37 ± 1 °C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µL WASH BUF 1x. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le cycle de lavage et l'aspiration doit être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape!
Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et de faux résultats.
5. Pipeter 100 µL du conjugué dans tous les puits sauf le puits Blanc A1.
6. Couvrez les puits de couvertures autocollantes.
7. **Incuber pendant 60 minutes ± 5 minutes à 37 ± 1 °C.** N'exposer pas à la lumière directe du soleil.
8. Répéter l'étape numéro 4.
9. Pipeter 100 µL de SUB TMB dans tous les puits.
10. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante (20...25°C) dans l'obscurité.** Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
11. Pipeter 100 µL SOLN STOP dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la SUB TMB, ainsi, il y a un changement du bleu au jaune.
12. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de SOLN STOP.

7.1. Mesure

Réglez le Photomètre de Plaque de Microtitrages ELISA à **zéro** en utilisant le **Blanc substrat**.

Si - pour des raisons techniques - le Photomètre de Plaque de Microtitrages ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le Blanc substrat, la valeur d'absorbance de cette doit être soustraire la valeur d'absorbance de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables!

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon.

Il est recommandé d'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620 nm comme longueur d'onde de référence.

Si doubles déterminations ont été effectuées, calculer **les valeurs moyennes d'absorbance**.

8. RESULTATS

8.1. Critères de validation

Pour qu'une série d'analyses soit considérée comme valide, ce notice d'utilisation doivent être strictement suivies, et les critères suivants doivent être respectés :

- **Blanc Substrat:** Valeur d'absorbance < **0,100**
- **Contrôle Négatif:** Valeur d'absorbance < **Cut-off**
- **Contrôle Cut-off:** Valeur d'absorbance **0,150 – 1,300**
- **Contrôle Positif:** Valeur d'absorbance > **Contrôle Cut-off**

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

8.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du Contrôle cut-off.

Exemple: $0,44 \text{ DO Contrôle Cut-off} + 0,42 \text{ DO Contrôle Cut-off} = 0,86 : 2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

8.2.1. Résultats en unités [NTU]

$\frac{\text{Valeur (moyenne) d'absorbance de l'échantillon} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unités NovaTec} = \text{NTU}]$

Exemple: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

8.3. Interprétation des résultats

| | | |
|------------|------------|---|
| Cut-off | 10 NTU | - |
| Positif | > 11 NTU | Un antigène spécifique d'agent infectieux est présent. Il y a eu un contact avec l'agent infectieux. D'autres tests sérologiques doivent être effectués pour confirmer l'infection. |
| Zone grise | 9 – 11 NTU | L'antigène spécifique d'agent infectieux ne peut pas être détecté clairement; une évaluation sécurisée n'est pas possible. En cas de suspicion clinique associée à un résultat limite, une clarification par d'autres méthodes de diagnostic et / ou une investigation sérologique d'un échantillon de suivi est recommandée. |
| Négatif | < 9 NTU | Antigène spécifique d'agent infectieux non détectable. En cas de suspicion clinique associée à un résultat négatif, une clarification par d'autres méthodes de diagnostic et / ou l'examen sérologique d'un échantillon de suivi est recommandée |

Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunodéprimés et des nouveaux-nés.

8.3.1. Antigène, isotypes d'anticorps et état de l'infection

| | |
|-----------|---|
| Sérologie | Signification |
| Antigène | Caractéristique d'une infection aiguë |
| IgM | Caractéristique de la réponse primaire du anticorps Titre élevé d'IgM avec une faible titre d'IgG: → suggère une infection très récente ou aiguë Rare: → persistante IgM |
| IgG | Caractéristique de la réponse secondaire du anticorps Peut persister pendant plusieurs années Des titres élevés d'IgG à faible titre d'IgM: → peuvent indiquer une infection ancienne |

9. PERFORMANCES DU TEST

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

9.1. Précision

| Intra-essai | n | moyenne (E) | CV (%) |
|-------------|----|---------------|--------|
| # 1 | 24 | 1,069 | 4,63 |
| # 2 | 24 | 0,104 | 7,03 |
| # 3 | 24 | 0,494 | 5,51 |
| Inter-essai | n | moyenne (NTU) | CV (%) |
| # 1 | 12 | 30,99 | 5,99 |
| # 2 | 12 | 2,49 | 12,01 |
| # 3 | 12 | 14,81 | 6,38 |

9.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est 98,63 % (95% Intervalle de confiance: 92,60 % - 99,97 %).

9.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est 97,44% (95% Intervalle de confiance: 91,04 % - 99,69 %).

9.4. Interférences

On n'observe pas d'interférences avec les échantillons lipidiques ou ictériques ou les échantillons contenant des taux élevés d'albumine jusqu'à une concentration de 5 mg/mL de triglycérides, 0,5 mg/mL de bilirubine et 60 mg/mL d'albumine. Les échantillons hémolysés doivent être évités pour l'analyse avec ce test.

9.5. Réaction croisée

L'examen d'un panel d'échantillons susceptibles de présenter des réactions croisées (anticorps IgM positifs pour le virus du Nil occidental, le virus Zika, le virus Chikungunya, le Plasmodium, Leptospira, le virus Epstein-Barr; ou anticorps antinucléaires ou facteur rhumatoïde positifs) n'a pas révélé de preuves de résultats faussement positifs dus à des réactions croisées.

Néanmoins, les résultats faussement positifs doivent être envisagés chez les personnes atteintes d'une infection active par des flavivirus, y compris le virus du Nil occidental et le virus de la fièvre jaune.

10. LIMITES DE LA TECHNIQUE


Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.

11. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS


- La procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'utilisation, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de test, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont pas autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les matériaux d'origine humaine ou animale doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC.
- Ne pas échanger les réactifs ou les Plaques de Microtitrage provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de étalon/contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et les réactifs exactement au fond des puits sans éclabousser.
- L'ELISA est uniquement conçu pour le personnel qualifié suivant les normes de bonnes pratiques de laboratoire (Good Laboratory Practice, GLP).
- Pour un contrôle de qualité interne plus poussé, chaque laboratoire doit en outre utiliser des échantillons connus.

11.1. Note de sécurité pour les réactifs contenant des substances dangereuses

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3:1) ou du MIT (voir chapitre 3.1).
Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

| | | |
|---|-----------|--|
| Attention | H317 | Peut provoquer une allergie cutanée. |
|  | P261 | Éviter de respirer les aérosols. |
| | P280 | Porter des gants de protection/ des vêtements de protection. |
| | P302+P352 | EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment savon à l'eau. |
| | P333+P313 | En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin. |
| | P362+P364 | Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. |

Les réactifs peuvent contenir du 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (voir chapitre 3.1).
Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

| | | |
|---|----------------|--|
| Attention | H315 | Provoque une irritation cutanée. |
|  | H319 | Provoque une sévère irritation des yeux |
| | P280 | Porter des gants de protection/ des vêtements de protection. |
| | P302+P352 | EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment savon à l'eau. |
| | P305+P351+P338 | EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. |
| | P337+P313 | Si l'irritation oculaire persiste: Consulter un médecin. |

De plus amples informations peuvent être trouvées dans la fiche de données de sécurité.

11.2. Elimination des déchets

Les résidus de produits chimiques et de préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est réglementée par des lois et règlements nationaux et régionaux. Contactez les autorités locales ou les entreprises de gestion des déchets qui vous donneront des conseils sur la manière d'éliminer les déchets dangereux.

Pour plus d'informations sur les matériaux d'emballage, reportez-vous à la section MATÉRIELS D'EMBALLAGE.

12. INFORMATION POUR LES COMMANDES

| | | | |
|------------|----------|--------------------------|---------------------|
| REF | NS1D4020 | Dengue Virus NS1 Antigen | (96 déterminations) |
|------------|----------|--------------------------|---------------------|

ITALIANO

1. USO PREVISTO

Il Dengue Virus NS1 Antigen ELISA è un kit per la determinazione qualitativa dell'antigene NS1 del virus della dengue per Dengue Virus nel siero o plasma (citrato, eparina) umano.

2. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione immunoenzimatico qualitativa degli antigeni specifici si basa sulla tecnica ELISA (d'inglese Enzyme-linked immunosorbent assay).

Piastre di Microtitolazione sono rivestite con anticorpi specifici che si legano agli antigeni presenti nel campione. Dopo aver lavato i pozzetti per rimuovere tutto il materiale campione non legato, il coniugato di perossidasi di rafano (HRP) è aggiunto. Questo coniugato si lega all'antigeni catturati. In una seconda fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu.

L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di antigeni specifici presenti nel campione. Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm viene letto utilizzando un Fotometro per Piastre di Microtitolazione ELISA.

3. MATERIALI

3.1. Reagenti forniti

- **Piastre di Microtitolazione:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, rivestite con anticorpo anti-NS1 della Dengue; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **DIL:** 1 flacone contenente 50 mL di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH 7,2 ± 0,2; colore giallo; pronto all'uso; tappo bianco; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, 0,2 mol/L, pronto all'uso; tappo rosso.
- **WASH BUF 20x:** 1 flacone contenente 50 mL di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH 7,2 ± 0,2; tappo bianco; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Coniugato:** 1 flacone contenente 12 mL di perossidasi coniugati con anticorpi anti-NS1 della Dengue colore rosso; pronto all'uso; tappo nero; ≤ 0,02% (v/v) MIT
- **SUB TMB:** 1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto all'uso; tappo giallo.
- **Controllo Positivo:** 1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo rosso; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controllo Cut-off:** 1 flacone da 3 mL controllo; colore giallo; tappo verde; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controllo Negativo:** 1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo blu; pronto all'uso; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 11.1.

3.2. Accessori forniti

- 2 pellicole adesivi
- 1 istruzioni per l'uso

3.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per Piastre di Microtitolazione con filtri da 450/620 nm
- Incubatrice 37 °C
- Lavatore, manuale o automatico, di Piastre di Microtitolazione
- Micropipette per l'uso tra 100-1000 µL
- Vortex-Mixer
- Acqua distillata
- Provette monouso

4. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2...8 °C. I reagenti aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando sono conservati a 2...8 °C.

5. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante, portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (20...25 °C) e mescolare prima di iniziare il test.

5.1. Piastre di Microtitolazione

Le strisce divisibili sono rivestite con anticorpo anti-NS1 della Dengue. Immediatamente dopo la rimozione delle strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere sigillare nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2...8 °C.

5.2. **WASH | BUF | 20x**

Diluire **WASH | BUF | 20x** 1+19; per esempio 10 mL **WASH | BUF | 20x** + 190 mL di acqua distillata. Il Tampone diluito (**WASH | BUF | 1x**) è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20...25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

5.3. **SUB | TMB**

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2...8 °C, al riparo dalla luce. **SUB | TMB** deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se **SUB | TMB** diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

6. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni di siero o plasma (citrato, eparina) umano. Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2...8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70...-20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

6.1. Diluizione dei campioni

Prima d'iniziare il test, tutti i campioni devono essere diluiti 1+1 con **DIL**. Dispensare ad es. 200 µL di campione e 200 µL **DIL** in provette per ottenere una diluizione 1+1 e miscelare bene (Vortex).

7. PROCEDIMENTO

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il teste. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi de 3 a 5 volte e il volume del **WASH | BUF | 1x** da 300 a 350 µL per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 11. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato). Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza ritardi.

Sul pipettaggio utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

Regolare l'incubatore a 37 ± 1 °C.

1. Pipettare 100 µL di standard/controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il Bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
3. **Incubare 60 min ± 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µL **WASH | BUF | 1x**. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere > 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo!
Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante. Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi.
5. Pipettare 100 µL di Coniugato in tutti i pozzetti, escludendo quello con il Bianco-substrato (Blank) A1.
6. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
7. **Incubare per 60 min ± 5 min a 37 ± 1 °C.** Non esporre a fonti di luce diretta.
8. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
9. Pipettare 100 µL **SUB | TMB** in tutti i pozzetti.
10. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20...25 °C) al buio.** Un colore blu verifica a causa della reazione enzimatica.
11. Pipettare 100 µL **SOLN | STOP** in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della **SUB | TMB**, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo si verifica.
12. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta **SOLN | STOP**.

7.1. Misurazione

Regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione ELISA a **zero** usando il substrato-Bianco (Blank).

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione a zero usando il Bianco-substrato, il valore de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e registra i valori di assorbanza per ogni standard/controllo e campione.

È raccomandato fare le misurazioni delle onde **bichrome** (due colori). Utilizzando la lunghezza d'onda de 620 nm come misura di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

8. RISULTATI

8.1. Validazione del test

Affinché un test possa essere considerato valido, le presenti istruzioni per l'uso devono essere rigorosamente seguite e devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- **Substrato Bianco (Blank):** Valore di assorbanza < **0,100**
- **Controllo Negativo:** Valore di assorbanza < **Cut-off**
- **Controllo Cut-off:** Valore di assorbanza **0,150 – 1,300**
- **Controllo Positivo:** Valore di assorbanza > **Cut-off**

Se non sono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

8.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-off è la media dei valori di assorbanza dei Controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,44 + valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,42 = 0,86/2 = 0,43
Cut-off = 0,43

8.2.1. Risultati in unità [NTU]

$$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unità NovaTec} = \text{NTU}]$$

Esempio:
$$\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$$

8.3. Interpretazione dei risultati

| Cut-off | 10 NTU | - |
|-------------|------------|---|
| Positivo | > 11 NTU | È presente antigene specifico patogeno. C'è stato un contatto con l'agente patogeno. Ulteriori test sierologici devono essere effettuati per confermare l'infezione. |
| Zone grigia | 9 – 11 NTU | L'antigene patogeno specifico non può essere chiaramente rilevato, una valutazione sicura non è possibile. Nel caso di un sospetto clinico combinato con un risultato limite, il chiarimento con altri metodi diagnostici e / o l'indagine sierologica di un campione di follow-up (accompagnamento) è raccomandato. |
| Negativo | < 9 NTU | Antigene patogeno specifico non rilevabile. Nel caso di un sospetto clinico in combinazione con un risultato negativo, si raccomanda di chiarire con altri metodi diagnostici e / o l'indagine sierologica di un campione di follow-up (accompagnamento). |

La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sul risultato di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi e i sintomi del paziente.

I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

8.3.1. Antigene, isotipi degli anticorpi e stato di infezione

| Sierologia | Significato |
|------------|--|
| Antigene | Caratteristica di un'infezione acuta |
| IgM | Caratteristica della risposta primaria dell'anticorpo Alto titolo IgM con basso titolo IgG: → suggerisce una infezione molto recente o acuta Raro: → IgM persistente |
| IgG | Caratteristica della risposta secondaria dell'anticorpo Può persistere per diversi anni Alto titolo IgG con basso titolo IgM: → può indicare un'infezione passata |

9. CARATTERISTICHE DEL TEST

I risultati si riferiscono al gruppo di campioni investigato; questi non sono specifiche garantite.

9.1. Precisione

| Intradossaggio | n | Media (E) | CV (%) |
|----------------|----|-------------|--------|
| # 1 | 24 | 1,069 | 4,63 |
| # 2 | 24 | 0,104 | 7,03 |
| # 3 | 24 | 0,494 | 5,51 |
| Interdossaggio | n | Media (NTU) | CV (%) |
| # 1 | 12 | 30,99 | 5,99 |
| # 2 | 12 | 2,49 | 12,01 |
| # 3 | 12 | 14,81 | 6,38 |

9.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analita specifici. La specificità diagnostica è 98,63% (95% Intervallo di confidenza: 92,60 % - 99,97 %).

9.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo alla presenza di analita specifici. La sensibilità diagnostica è 97,44% (95% Intervallo di confidenza: 91,04 % - 99,69 %).

9.4. Possibili interferenze

Non si osservano interferenze con campioni lipemici o itterici o con campioni contenenti alti livelli di albumina fino a una concentrazione di 5 mg/mL di trigliceridi, 0,5 mg/mL di bilirubina e 60 mg/mL di albumina.

I campioni emolizzati devono essere evitati per l'analisi con questo test.

9.5. Reattività incrociata

L'indagine di un pannello di campioni potenzialmente a reazione incrociata (anticorpo IgM positivo per il virus del Nilo occidentale, per il virus Zika, per il virus Chikungunya, per il Plasmodium, per la Leptospira, per il virus Epstein-Barr; o anticorpo antinucleare o fattore reumatoide positivo) non ha rivelato prove di risultati falsi positivi a causa di reazioni incrociate.

Tuttavia, i risultati falsi positivi devono essere considerati in individui con infezione da flavivirus attivo, tra cui il virus del Nilo occidentale (WNV) e il virus della febbre gialla (YFV).

10. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze.

11. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- La procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature simili deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti gli elementi di origine umana sono stati trovati **non reattivi** con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e Piastre di Microtitolazione di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti d'altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Per un ulteriore controllo di qualità interno ogni laboratorio dovrebbe inoltre utilizzare campioni noti.

11.1. Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose

I reagenti possono contenere CMIT/MIT (3:1) o MIT (vedi capitolo 3.1).

Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza.

Attenzione



| | |
|-----------|--|
| H317 | Può provocare una reazione allergica cutanea. |
| P261 | Evitare di respirare gli aerosol. |
| P280 | Indossare guanti/ indumenti protettivi. |
| P302+P352 | IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua. |
| P333+P313 | In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. |
| P362+P364 | Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. |

I reagenti possono contenere 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (vedi capitolo 3.1).

Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza

Attenzione



| | |
|----------------|--|
| H315 | Provoca irritazione cutanea. |
| H319 | Provoca grave irritazione oculare |
| P280 | Indossare guanti/ indumenti protettivi. |
| P302+P352 | IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua. |
| P305+P351+P338 | IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. |
| P337+P313 | Se l'irritazione degli occhi persiste: Consultare un medico. |

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

11.2. Smaltimento

I residui di prodotti chimici e preparati sono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolato da leggi e regolamenti nazionali e regionali. Contattare le autorità locali o le società di gestione dei rifiuti che daranno consigli su come smaltire i rifiuti pericolosi.

Per informazioni sui materiali d'imballaggio fare riferimento a MATERIALI D'IMBALLAGGIO.

12. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

| | | | |
|-----|----------|--------------------------|---------------------|
| REF | NS1D4020 | Dengue Virus NS1 Antigen | (96 determinazioni) |
|-----|----------|--------------------------|---------------------|

ESPAÑOL

1. USO PREVISTO

El enzoinmunoensayo Dengue Virus NS1 Antigen ELISA se utiliza para la determinación cualitativa del antígeno NS1 del virus del dengue en suero o plasma (citrato, heparina) humano.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de antígenos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con anticuerpos específicos unen a los antígenos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unido, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los antígenos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualiza añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de antígenos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de de Placa de Microtitulación ELISA.

3. MATERIALES

3.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con anticuerpos contra el virus del dengue NS1, en bolsa de aluminio.
- **DIL:** 1 botella de 50 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH 7,2 ± 0,2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN|STOP:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **WASH|BUF|20x:** 1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH 7,2 ± 0,2; tapa blanca; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
- **Conjugado:** 1 botella de 12 mL de peroxida conjugado con anticuerpos anti- dengue virus NS1; color rojo; tapa negra; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **SUB|TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control Positivo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Control Cut-off:** 1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Control Negativo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 11.1.

3.2. Accesorios suministrados

- 2 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

3.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37°C
- Dispositivo de lavado manual o automático de Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (100-1000 µL)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

4. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C.

5. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

5.1. Placa de Microtitulation

Las tiras rompibles están recubiertas con anticuerpos contra el virus del dengue NS1. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

5.2. WASH BUF 20x

Diluir WASH BUF 20x 1+19; por ejemplo 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL de agua destilada. El Tampón diluido (WASH BUF 1x) es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...25 °C). En caso de aparecer cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

5.3. SUB TMB

La solución está lista para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. SUB TMB debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si SUB TMB se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizado en el ensayo.

6. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas a 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicuotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

6.1. Dilución de las muestras

Antes de realizar el ensayo, todas las muestras deben diluirse 1 + 1 con DIL. Dispensar, p. e. 200 µL de la muestra y 200 µL DIL en tubos para obtener una dilución, 1+1 mezclar bien con la mezcladora Vortex.

7. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavados de tres hasta cinco veces y el volumen de WASH BUF 1x de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 11. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (se recomienda determinar en duplicado). Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a 37 ± 1 °C.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 60 min ± 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL WASH BUF 1x. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: ¡El lavado es muy importante! ¡Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetar 100 µL de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco substrato A1.
6. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
7. **Incubar 60 min ± 5 min a 37 ± 1 °C.** Evitar la luz solar directa.
8. Pipetar 100 µL SUB TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de SOLN STOP en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con SUB TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir SOLN STOP.

7.1. Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación Elisa **al cero** utilizando el **Blanco**.

¡Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de esto debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

8.1. Criterios de validez del ensayo

Para que un ensayo se considere válido, deben seguirse estrictamente las presentes instrucciones de uso y deben cumplirse los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción < 0,100
- **Control Negativo:** valor de la extinción < Cut-off
- **Control Cut-off:** valor de la extinción 0,150 – 1,300
- **Control Positivo:** valor de la extinción > Cut-off

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

8.2. Cálculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de los dos Controles cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Control Cut-off + 0,44 OD Control Cut-off = 0,86:2 = 0,43

Cut-off = 0,43

8.2.1. Resultados en unidades [NTU]

Promedio valor de la extinción de la muestra x 10 / Cut-off = [NovaTec-unidades = NTU]

Ejemplo: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37$ NTU

8.3. Interpretación de los resultados

| Cut-off | 10 NTU | - |
|-----------------|------------|---|
| Positivo | > 11 NTU | El antígeno específico del patógeno está presente. Ha habido un contacto con el patógeno. Se deben realizar más pruebas serológicas para confirmar la infección. |
| Zona intermedia | 9 – 11 NTU | El antígeno específico del patógeno no se puede detectar claramente; Una evaluación segura no es posible. En el caso de una sospecha clínica en combinación con un resultado límite, se recomienda la aclaración por otros métodos de diagnóstico y / o la investigación serológica de una muestra de seguimiento. |
| Negativo | < 9 NTU | Antígeno específico de patógeno no detectable. En el caso de una sospecha clínica en combinación con un resultado negativo, se recomienda la aclaración por otros métodos de diagnóstico y / o la investigación serológica de una muestra de seguimiento. |

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico.
Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.

8.3.1. Antígeno, isotipos de anticuerpos y estado de la infección

| Serología | Significado |
|-----------|---|
| Antígeno | Característica de una infección aguda |
| IgM | Característica de la respuesta primaria del anticuerpo Alto título de IgM con bajo título de IgG → sugieren una infección muy reciente o aguda Raras: → persistente IgM |
| IgG | Característica de la respuesta secundaria del anticuerpo Pueden persistir por varios años El alto título de IgG con bajo título de IgM: → pueden indicar una infección pasada |

9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

9.1. Precisión

| Intra ensayo | n | Promedio (E) | CV (%) |
|--------------|----|----------------|--------|
| # 1 | 24 | 1,069 | 4,63 |
| # 2 | 24 | 0,104 | 7,03 |
| # 3 | 24 | 0,494 | 5,51 |
| Inter ensayo | n | Promedio (NTU) | CV (%) |
| # 1 | 12 | 30,99 | 5,99 |
| # 2 | 12 | 2,49 | 12,01 |
| # 3 | 12 | 14,81 | 6,38 |

9.2. Especificidad diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico. Es 98,63% (95% Intervalo de confianza: 92,60 % - 99,97 %).

9.3. Sensibilidad de diagnóstico

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es 97,44% (95% Intervalo de confianza: 91,04 % - 99,69 %).

9.4. Interferencias

No se observan interferencias con muestras lipémicas o ictericas o con muestras que contengan altos niveles de albúmina hasta una concentración de 5 mg/mL de triglicéridos, 0,5 mg/mL de bilirrubina y 60 mg/mL de albúmina.

Las muestras hemolizadas deben evitarse para el análisis con este ensayo.

9.5. Reactividad cruzada

La investigación de un panel de muestras con reacción cruzada potencial (anticuerpos IgM positivos para el virus del Nilo Occidental, el virus Zika, el virus de la Chikungunya, el Plasmodium, la Leptospira, el virus de Epstein-Barr; o anticuerpos antinucleares o positivos para el factor reumatoide) no reveló pruebas de resultados falsos positivos debido a las reacciones cruzadas.

No obstante, se deben considerar los resultados positivos falsos en los individuos con infección activa por flavivirus, incluidos el virus de la fiebre amarilla (*abreviatura inglesa YFV*), el virus del Nilo Occidental (*abreviatura inglesa WNV*).

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO


Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

11. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS


- El procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y Placa de Microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

11.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 3.1).
Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

| | | |
|--|-----------|---|
| Atención  | H317 | Puede provocar una reacción alérgica en la piel. |
| | P261 | Evitar respirar el aerosol. |
| | P280 | Llevar guantes/ prendas de protección. |
| | P302+P352 | EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua. |
| | P333+P313 | En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. |
| | P362+P364 | Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. |

Los reactivos pueden contener 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano (consulte el cap. 3.1).
Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

| | | |
|--|----------------|--|
| Atención  | H315 | Provoca irritación cutánea. |
| | H319 | Provoca irritación ocular grave. |
| | P280 | Llevar guantes/ prendas de protección. |
| | P302+P352 | EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua. |
| | P305+P351+P338 | EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. |
| | P337+P313 | Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. |

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

11.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Los residuos de productos químicos y preparados se consideran generalmente como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada por leyes y reglamentos nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o con las empresas de gestión de residuos, que le asesorarán sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

12. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

| | | | |
|------------|----------|--------------------------|----------------------|
| REF | NS1D4020 | Dengue Virus NS1 Antigen | (96 determinaciones) |
|------------|----------|--------------------------|----------------------|

PORTUGUÊS

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O kit Dengue Virus NS1 Antigen ELISA destina-se à determinação qualitativa de antígeno NS1 do vírus da dengue no soro ou plasma (citrato, heparina) humanos.

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

A determinação imunoenzimática qualitativa de antígenos específicos é baseado na técnica de ELISA (do inglês Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

As Placas de Microtitulação são revestidas com anticorpos específicos que se ligam os antígenos correspondentes da amostra. Após lavagem dos poços, para remover todo o material de amostra não ligado, o conjugado de peroxidase de rábano (HRP) é adicionado. Este conjugado se liga aos antígenos capturados. Num segundo passo de lavagem o conjugado não ligado é removido. O complexo imune formado pelo conjugado ligado é visualizado por adição de substrato de tetrametilbenzidina (TMB), o que dá um produto de reação azul.

A intensidade deste produto é proporcional à quantidade de antígenos específicos da amostra. O ácido sulfúrico é adicionado para parar a reação. Isso produz uma mudança de cor de azul para amarelo. Absorvância a 450/620 nm é lida utilizando um fotômetro para Placa de Microtitulação ELISA.

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes fornecidos

- **Placa de Microtitulação:** 12 tiras de 8 poços, destacáveis e quebráveis, revestidas com anticorpo anti-dengue Virus NS1, em bolsas de folha de alumínio com fecho.
- **DIL:** 1 frasco contendo 50 mL de tampão fosfato (10 mM) para diluição da amostra, pH 7,2 ± 0,2; de cor amarela; pronto a usar; tampa branca; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 frasco contendo 15 mL ácido sulfúrico; 0,2 mol/L; pronto a usar; tampa vermelha.
- **WASH BUF 20x:** 1 frasco contendo 50 mL de um tampão fosfato (0,2 M); concentrado 20 vezes (pH 7,2 ± 0,2) para a lavagem dos poços; tampa branca; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
- **Conjugado:** 1 frasco contendo 12 mL de peroxidase conjugado com anticorpo anti-dengue virus NS1; de cor vermelho, pronto a usar; tampa preta; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **SUB TMB:** 1 frasco contendo 15 mL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto a usar; tampa amarela.
- **Controle Positivo:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa vermelha; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controle Cut-off:** 1 frasco contendo 3 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa verde; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controle Negativo:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa azul; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Para advertências de perigo e recomendações de prudência ver capítulo 11.1.

3.2. Materiais fornecidos

- 2 Películas de cobertura
- 1 Instruções de utilização

3.3. Materiais e Equipamento necessários

- Fotômetro para Placa de Microtitulação ELISA, equipado para a medição da absorvância a 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Equipamento manual ou automático para a lavagem de Placa de Microtitulação
- Pipetas para dispensar volumes entre 100 e 1000 µL
- Agitador de tubos tipo Vortex
- Água destilada
- Tubos descartáveis

4. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

Armazene o kit a 2...8 °C. Os reagentes abertos são estáveis até o prazo de validade impresso no rótulo quando armazenado a 2...8 °C

5. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

É muito importante deixar todos os reagentes e amostras estabilizar à temperatura ambiente (20...25 °C) misturá-los antes de iniciar o teste!

5.1. Placa de Microtitulação

As tiras quebráveis são revestidas com antígeno com anticorpo anti-dengue Virus NS1. Imediatamente após a remoção das tiras necessárias, as tiras restantes devem ser lacradas de novo na folha de alumínio juntamente com o saquinho de silício fornecido e armazenar a 2...8 °C.

5.2. WASH | BUF | 20x

Diluir WASH | BUF | 20x 1+19; por exemplo. 10 mL WASH | BUF | 20x + 190 mL de água destilada. O Tampão diluído (WASH | BUF | 1x) é estável durante 5 dias à temperatura ambiente (20...25 °C). Caso apareça cristais no concentrado, aquecer a solução a 37 °C por exemplo, em banho Maria. Misture bem antes da diluição.

5.3. SUB | TMB

A Solução está pronta para uso e tem de ser armazenada à 2...8 °C, protegida da luz. SUB | TMB deve ser incolor ou poderia ter uma ligeira coloração azul claro. Se SUB | TMB se transforma em azul, pode ter sido contaminado e não pode ser usado no teste.

6. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Usar com este ensaio amostras de soro ou plasma (citrato, heparina) humanos. Se o ensaio for realizado dentro de 5 dias após colheita da amostra, o espécime deve ser mantido a 2...8 °C; caso contrário devem ser alicotadas e armazenadas congeladas (-70...-20 °C). Se as amostras forem armazenadas congeladas, misturar bem as amostras descongeladas antes de testar. Evitar congelar e descongelar repetidamente.

Não é recomendada a inactivação por calor das amostras.

6.1. Diluição das amostras

Antes de testar todas as amostras devem ser diluídas 1 + 1 com DIL. Dispensar 200 µL de amostra e 200 µL DIL em tubos para obter uma diluição 1 + 1 e misturar meticulosamente com um vortex.

7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Por favor, ler atentamente as instruções de utilização **antes** de realizar o teste. A fiabilidade dos resultados depende da adesão estrita as instruções de utilização, conforme descritas. O procedimento de ensaio a seguir está validado apenas para o procedimento manual. Se o teste for realizado em sistemas automáticos para teste ELISA é recomendável aumentar os passos de lavagem de três até cinco e o volume WASH | BUF | 1x de 300 µL para 350 µL para evitar efeitos de lavagem. Preste atenção ao capítulo 11. Antes de iniciar o teste, o plano de distribuição e identificação de todas as amostras e calibradores/controles (é recomendado determinar em duplicidade) deve ser cuidadosamente estabelecido. Seleccionar o número necessário de tiras ou poços e inserir os mesmos no suporte.

Realizar todas as etapas do teste na ordem indicada e sem atrasos significativos.

Na pipetagem deve ser utilizada uma ponta limpa e descartável para dispensar cada controle e amostra.

Ajustar a incubadora para 37 ± 1 °C.

1. Dispensar 100 µL dos calibradores/controles e das amostras diluídas nos poços respectivos. Deixar o poço A1 vazio para o branco substrato.
2. Cobrir os poços com a película fornecida no kit.
3. **Incubar durante 60 min ± 5 min à 37 ± 1 °C.**
4. Quando terminar a incubação, remover a película, aspirar o conteúdo dos poços e lavar cada poço três vezes com 300 µL WASH | BUF | 1x. Evitar que os poços de reacção transbordem. O intervalo entre a lavagem e a aspiração deve ser > 5 seg. No final, retirar cuidadosamente o fluido restante batendo delicadamente as tiras sobre papel absorvente, antes da próxima etapa!
Nota: A lavagem é muito importante! Lavagem insuficiente resulta em baixa precisão e falsos resultados.
5. Dispensar 100 µL de Conjugado em todos os poços, excepto no poço do Branco substrato A1.
6. Cobrir os poços com a película fornecida no kit.
7. **Incubar durante 60 min ± 5 min à 37 ± 1 °C.** Não expor diretamente à luz solar.
8. Repetir a etapa 4.
9. Dispensar 100 µL SUB | TMB em todos os poços.
10. **Incubar durante exactamente 15 min à temperatura ambiente (20...25°C) e no escuro.** A cor azul devido a uma reacção enzimática.
11. Dispensar 100 µL SOLN | STOP em todos os poços, pela mesma ordem e com a mesma velocidade a que foi dispensada a SUB | TMB, desse modo uma mudança de cor de azul para amarelo ocorre.
12. Medir a absorvância a 450/620 nm dentro de 30 min após a adição SOLN | STOP.

7.1. Medição

Ajustar o fotômetro para Placa de Microtitulação ELISA a zero usando o Branco substrato.

Se - devido à razões técnicas – o fotômetro para Placa de Microtitulação ELISA não puder ser ajustado a zero usando o Branco substrato, valor da absorvância deste deve ser subtraído de todos os outros valores de absorvância medidos de forma a obter resultados fiáveis!

Medir a absorvância de todos os poços a **450 nm** e registar os valores da absorvância para cada calibrador/controle e amostra.

É recomendado fazer a medição **dicromática** usando como referência um comprimento de onda de 620 nm.

Se determinações duplas foram realizadas, calcular **os valores médios de absorvância**.

8. RESULTADOS

8.1. Critérios de validação do ensaio

Para que um ensaio seja considerado válido, estas instruções de utilização devem ser rigorosamente seguidas, e os seguintes critérios devem ser cumpridos:

- **Branco substrato:** Valor de Absorvância < **0,100**
- **Controle Negativo:** Valor de Absorvância < **Cut-off**
- **Controle Cut-off:** Valor de Absorvância **0,150 – 1,300**
- **Controle Positivo:** Valor de Absorvância > **Cut-off**

Se estes critérios não forem cumpridos, o teste não é válido e deve ser repetido.

8.2. Cálculo dos Resultados

O Cut-off é o valor médio da absorvância das determinações do Controle cut-off.

Exemplo: Valor da absorvância do Controle Cut-off 0,42 + valor da absorvância do Controle Cut-off 0,44 = 0,86 : 2 = 0,43
Cut-off = 0,43

8.2.1. Resultados em Unidades [NTU]

$$\frac{\text{Valor da absorvância (média) da amostra} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Unidades NovaTec} = \text{NTU}]$$

Exemplo:
$$\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$$

8.3. Interpretação dos Resultados

| Cut-off | 10 NTU | - |
|---------------|------------|---|
| Positivo | > 11 NTU | O antígeno específico do patógeno está presente. Houve um contato com o patógeno. Mais testes sorológicos devem ser realizados para confirmar a infecção |
| Zona cinzenta | 9 – 11 NTU | O antígeno específico do patógeno não pode ser detectado claramente; uma avaliação segura não é possível. No caso de uma suspeita clínica combinada com um resultado limítrofe, recomenda-se o esclarecimento por outros métodos de diagnóstico e / ou a investigação sorológica de uma amostra de acompanhamento. |
| Negativo | < 9 NTU | Antígeno específico do patógeno não detectável. No caso de uma suspeita clínica em combinação com um resultado negativo, é recomendável esclarecer os métodos de diagnóstico e / ou a investigação sorológica de uma amostra de acompanhamento. |

O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base num único resultado do teste. Um diagnóstico preciso deve ter em consideração a história clínica, a sintomatologia bem como dados serológicos.
Em pacientes imunossuprimidos e recém-nascidos os dados serológicos têm apenas valor restrito.

8.3.1. Antígeno, isotipos de anticorpos, e estado da infecção

| Sorologia | Significado |
|-----------|--|
| Antígeno | Característico de uma infecção aguda |
| IgM | Característica da resposta primária do anticorpo Alto título de IgM com baixo título de IgG: → sugere uma infecção muito recente ou aguda Raros: → persistente IgM |
| IgG | Característica da resposta secundária do anticorpo Podem persistir por vários anos Alto título de IgG com baixo título de IgM: → pode indicar uma infecção passada |

9. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

Os resultados referem-se aos grupos de amostras investigados; estas não são especificações garantidas.

9.1. Precisão

| Intra ensaio | n | Média (E) | CV (%) |
|--------------|----|-------------|--------|
| # 1 | 24 | 1,069 | 4,63 |
| # 2 | 24 | 0,104 | 7,03 |
| # 3 | 24 | 0,494 | 5,51 |
| Inter ensaio | n | Média (NTU) | CV (%) |
| # 1 | 12 | 30,99 | 5,99 |
| # 2 | 12 | 2,49 | 12,01 |
| # 3 | 12 | 14,81 | 6,38 |

9.2. Especificidade Diagnóstica

A especificidade diagnóstica é definida como a probabilidade do ensaio ser negativo na ausência do analito específico. É de 98,63% (95% Intervalo de confiança: 92,60 % - 99,97 %).

9.3. Sensibilidade Diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica é definida como a probabilidade do ensaio ser positivo na presença do analito específico. É de 97,44% (95% Intervalo de confiança: 91,04 % - 99,69 %).

9.4. Interferências

Não são observadas interferências com amostras, lipêmicas ou ictericas ou amostras contendo altos níveis de albumina até uma concentração de 5 mg/mL de triglicerídeos, 0,5 mg/mL de bilirrubina e 60 mg/mL de albumina.

As amostras hemolisadas devem ser evitadas para análise com este teste.

9.5. Reacção cruzada

A investigação de um painel de amostras potencialmente de reacção cruzada (anticorpo IgM positivo para o vírus do Nilo Ocidental, vírus Zika, vírus Chikungunya, Plasmodium, Leptospira, vírus Epstein-Barr; ou anticorpo antinuclear ou factor reumatóide positivo) não revelou evidências de resultados falso-positivos devido a reacções cruzadas.

No entanto, resultados falsos positivos devem ser considerados em indivíduos com infecção pelo flavivírus ativo, incluindo o vírus do Nilo Ocidental (WNV) e o vírus da febre amarela (YFV).

10. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Contaminação bacteriana ou a repetição de ciclos de congelação-descongelação do espécime podem afectar os valores da absorvância.

11. PRECAUÇÕES E AVISOS

- O procedimento do teste, as informações, as precauções e avisos nas instruções de utilização têm de ser rigorosamente seguidas. O uso de kits de teste com analisadores e equipamento similar tem de ser validado. Qualquer alteração no desenho, composição e procedimento do teste bem como qualquer utilização em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante não estão autorizados; o próprio utilizador é responsável por tais alterações. O fabricante não é legalmente responsável por resultados falsos e incidentes originados por estes motivos. O fabricante não é legalmente responsável por quaisquer resultados obtidos por análise visual das amostras dos pacientes.
- Apenas para uso no diagnóstico in-vitro.
- Todos os materiais de origem humana ou animal devem ser considerados e tratados como potencialmente infectantes.
- Todos os componentes de origem humana usados para a produção destes reagentes foram testados para anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV e HBsAg e foram considerados não-reactivos.
- Não trocar e/ou juntar reagentes ou Placa de Microtitulação de lotes de produção diferentes.
- nenhuns reagentes de outros fabricantes devem ser usados juntamente com reagentes deste kit de teste.
- Não usar reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Usar apenas pontas de pipeta, dispensadores e material de laboratório limpos.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes para evitar contaminação cruzada.
- Fechar firmemente os frascos dos reagentes imediatamente após a utilização para evitar evaporação e contaminação microbiana.
- Após a primeira abertura e armazenamento subsequente verificar se existe contaminação microbiana dos frascos do conjugado e dos calibradores/controles antes de utiliza-los novamente.
- Para evitar contaminação-cruzada e resultados falsamente elevados, pipetar as amostras dos pacientes e dispensar o reagentes precisamente nos poços sem salpicar.
- O ELISA é projetado apenas para pessoal qualificado seguindo os padrões de boas práticas de laboratório (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para um controle de qualidade interno adicional cada laboratório deve utilizar amostras conhecidas.

11.1. Nota de segurança para reagentes que contenham substâncias perigosas

Os reagentes podem conter CMIT/MIT (3:1) ou MIT (ver capítulo 3.1).
Portanto, as seguintes advertências de perigo e recomendações de prudência aplicam-se.

Atenção



| | |
|-----------|---|
| H317 | Pode provocar uma reacção alérgica cutânea. |
| P261 | Evitar respirar os aerossóis. |
| P280 | Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção. |
| P302+P352 | SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabão água |
| P333+P313 | Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. |
| P362+P364 | Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. |

Os reagentes podem conter 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano (ver capítulo 3.1).
Portanto, as seguintes advertências de perigo e recomendações de prudência aplicam-se.

Atenção



| | |
|----------------|---|
| H315 | Provoca irritação cutânea. |
| H319 | Provoca irritação ocular grave. |
| P280 | Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção. |
| P302+P352 | SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabão água. |
| P305+P351+P338 | SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. |
| P337+P313 | Caso a irritação ocular persista: Consulte um médico. |

Mais informações podem ser encontradas na ficha de dados de segurança.

11.2. Considerações de Eliminação

Os resíduos de produtos químicos e preparações são geralmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos é regulamentada através de leis e regulamentos nacionais e regionais. Contacte as suas autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos que darão conselhos sobre como eliminar os resíduos perigosos.

Para informações sobre os materiais de embalagem, consulte MATERIAIS DE EMBALAGEM.


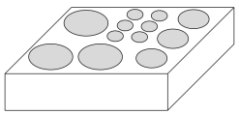




12. INFORMAÇÃO DE PEDIDO

| | | | |
|------------|----------|--------------------------|--------------------|
| REF | NS1D4020 | Dengue Virus NS1 Antigen | (96 Determinações) |
|------------|----------|--------------------------|--------------------|






ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

| | |
|------|--|
| CMIT | 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one |
| MIT | 2-methyl-2H-isothiazol-3-one |

PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN / MATÉRIELS D'EMBALLAGE / MATERIALI D'IMBALLAGGIO / MATERIALES DE EMBALAJE / MATERIAIS DE EMBALAGEM

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|---------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|---------|---|---------|---|-----|-----|--|---|-----|
|  PAP 21 |  PAP 21 |  PAP 22 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <tr> <td>SOLN</td> <td>STOP</td> <td>WASH</td> <td>BUF</td> <td>20x</td> <td>SUB</td> <td>TMB</td> <td>DIL</td> </tr> <tr> <td>CONJS</td> <td>CONTROL</td> <td>+</td> <td>CONTROL</td> <td>-</td> <td>CUT</td> <td>OFF</td> <td></td> </tr> </table> | | SOLN | STOP | WASH | BUF | 20x | SUB | TMB | DIL | CONJS | CONTROL | + | CONTROL | - | CUT | OFF | | <table border="1"> <tr> <td>MTP</td> </tr> </table> | MTP |
| SOLN | STOP | WASH | BUF | 20x | SUB | TMB | DIL | | | | | | | | | | | | |
| CONJS | CONTROL | + | CONTROL | - | CUT | OFF | | | | | | | | | | | | | |
| MTP | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|  HDPE 2 |  PP 5 |  PET / ALU / LDPE 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

| | |
|---|--|
|  | Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por |
| IVD | In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro |
| LOT | Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote |
|  | Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade |
|  | Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento |
| CE | CE marking / CE-Kennzeichnung / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE |
| UDI | Unique Device Identifier / Eindeutige Produktidentifizierung / identification unique des dispositifs / identificazione unica del dispositivo / identificación única del producto / identificação única dos dispositivos |
| REF | Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo |
|  | Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização |
| MTP | Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Plaque de Microtitrage / Piastre di Microtitolazione / Placa de Microtitulaciós / Placa de Microtitulação |
| CONJS | Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado |
| CONTROL - | Negative Control / Negativkontrolle / Contrôle Négatif / Controllo Negativo / Control Negativo / Controle Negativo |
| CONTROL + | Positive Control / Positivkontrolle / Contrôle Positif / Controllo Positivo / Control Positivo / Controle Positivo |
| CUT-OFF | Cut-off Control / Cut-off Kontrolle / Contrôle du Cut-off / Controllo Cut-off / Control Cut-off / Controle Cut-off |
| DIL | Sample Dilution Buffer / Probenverdünnungspuffer / Tampon de Dilution d'Échantillon / Tampone di Diluizione del Campione / Tampón de Dilución de Muestras / Tampão de Diluição de Amostra |
| SOLN STOP | Stop Solution / Stopplösung / Solution d'Arrêt / Soluzione Bloccante / Solución de Parada / Solução de Bloqueio |
| SUB TMB | TMB Substrate Solution / TMB-Substratlösung / Solution de Substrat TMB / Soluzione Substrato TMB / Solución Substrato TMB / Solução Substrato TMB |
| WASH BUF 20x | "Washing Buffer (20x concentrated)"; REF W0000 Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampon de Lavage concentré 20 x / Tampone di Lavaggio concentrazione x20 / Tampone di Lavaggio concentrado x20 / Tampão de Lavagem concentrada 20x |
| WASH BUF 1x | 20-fold dilution of WASH BUF 20x / 20-fach Verdünnung von WASH BUF 20x / Dilution 20 fois du WASH BUF 20x / Diluizione 20 volte del WASH BUF 20x / Dilución de 20 veces del WASH BUF 20x / Diluição de 20 dobras do WASH BUF 20x |
|  | Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes |

SUMMARY OF TEST PROCEDURE / KURZANLEITUNG TESTDURCHFÜHRUNG / RÉSUMÉ DE LA PROCEDURE DE TEST / SCHEMA DELLA PROCEDURA / RESUMEN DE LA TÉCNICA / RESUMO DO PROCEDIMENTO DE TESTE

SCHEME OF THE ASSAY

Dengue Virus NS1 Antigen

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

| | Substrate Blank | Negative Control | Cut-off Control | Positive Control | Sample (diluted 1+1) |
|--|-----------------|------------------|-----------------|------------------|----------------------|
| Negative Control | - | 100 µL | - | - | - |
| Cut-off Control | - | - | 100 µL | - | - |
| Positive Control | - | - | - | 100 µL | - |
| Sample (diluted 1+1) | - | - | - | - | 100 µL |
| Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 60 min at 37 ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of WASH BUF 1x | | | | | |
| Conjugate | - | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 60 min at 37 °C Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of WASH BUF 1x | | | | | |
| SUB TMB | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark | | | | | |
| SOLN STOP | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm) | | | | | |



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

NS1D4020_IFU_rev01_fromLot_015N