

Test rapido per la rilevazione qualitativa dell'antigene NS1 e degli anticorpi IgG e IgM del virus Dengue nel sangue intero, siero o plasma. Per il solo uso professionale diagnostico in vitro.

**[USO PREVISTO]**

Il test a cassetta Dengue Combo (sangue intero / siero / plasma) è un test immunologico cromatografico rapido per il rilevamento qualitativo dell'antigene NS1 e degli anticorpi IgG e IgM del virus Dengue nel sangue intero umano, nel siero o nel plasma, come ausilio nella diagnosi di infezioni da Dengue.

**[SOMMARIO]**

Dengue è un flavivirus, trasmesso dalle zanzare Aedes aegypti e Aedes albopictus, ampiamente distribuito nelle aree tropicali e subtropicali del mondo, 1 il quale causa fino a 100 milioni di infezioni all'anno.<sup>2</sup> L'infezione classica da Dengue è caratterizzata da un'improvvisa comparsa di febbre, intenso mal di testa, mialgia, artralgia ed eruzione cutanea. L'infezione primaria da Dengue causa un aumento degli anticorpi IgM ad un livello rilevabile in 3-5 giorni dopo l'inizio della febbre. Gli anticorpi IgM generalmente persistono da 30 a 90 giorni.<sup>3</sup> La maggior parte dei pazienti affetti da Dengue nelle regioni endemiche presenta infezioni secondarie.<sup>4</sup> con conseguenti livelli elevati di anticorpi IgG specifici che precedono o compaiono simultaneamente alla risposta IgM.<sup>5</sup> Pertanto, il rilevamento di IgM anti-Dengue specifici e degli anticorpi IgG può anche aiutare a distinguere tra infezioni primarie e secondarie. NS1 è una delle 7 proteine non strutturali del Dengue Virus che si ritiene siano coinvolte nella replicazione virale. NS1 esiste come monomero nella sua forma immatura ma viene rapidamente elaborato nel reticolo endoplasmatico per formare un dimero stabile. Una piccola quantità di NS1 rimane associata agli organelli intracellulari dove si ritiene sia coinvolta nella replicazione virale. Il resto di NS1 viene trovato associato alla membrana plasmatica o secreto come esadimero solubile. L'NS1 è essenziale per la vitalità virale ma la sua precisa funzione biologica non è nota. Gli anticorpi sollevati in risposta a NS1 nell'infezione virale possono avere una reazione crociata con gli antigeni della superficie cellulare su cellule epiteliali e piastrine, implicando lo sviluppo della febbre emorragica Dengue. Il test rapido a cassetta IgG / IgM Dengue (sangue intero / siero / plasma) utilizza una combinazione di particelle colorate rivestite con antigene Dengue per la rilevazione di anticorpi IgG e IgM Dengue nel sangue intero, siero o plasma. Il test rapido Dengue NS1 (sangue intero / siero / plasma) utilizza una combinazione di particelle colorate rivestite di anticorpi Dengue per la rilevazione dell'antigene Dengue NS1 nel sangue intero, siero o plasma.

**[PRINCIPIO]**

Il test rapido a cassetta Dengue IgG/IgM (Sangue Intero/Siero/Plasma) è un test immunologico qualitativo basato su membrana per la rilevazione di anticorpi Dengue nel sangue intero, siero o plasma. Questo test è costituito da una componente IgG e da una componente IgM. Nella miscela componente IgG, le IgG sono rivestite sull'area della linea di test IgG. Durante il test, il campione reagisce con particelle rivestite di antigene Dengue nella cassetta del test. La miscela migra verso l'alto sulla membrana cromatograficamente per azione capillare e reagisce con gli IgG nella regione della linea di test IgG. Se il campione contiene anticorpi IgG anti-Dengue, apparirà una linea colorata nella zona della linea di test IgG. Nella componente IgM, le IgM sono rivestite nella zona della linea di test IgM. Durante il test, il campione reagisce con gli IgM. Gli anticorpi IgM Dengue, se presenti nel campione, reagiscono con gli IgM le particelle rivestite di antigene Dengue nella cassetta del test, il complesso viene poi catturato dagli IgM, formando una linea colorata nella zona della linea di test IgM. Se il campione contiene anticorpi IgG Dengue, compare una linea colorata nella zona della linea di test IgG. Se il campione contiene anticorpi IgM Dengue, compare una linea colorata nella zona della linea di test IgM.

Se il campione non contiene anticorpi Dengue, non compare alcuna linea colorata in nessuna delle zone della linea di test T, indicando un risultato negativo. Con la funzione di controllo procedurale, una linea colorata deve sempre comparire nella zona della linea di controllo, indicando che è stato aggiunto un volume di campione adeguato e che si è verificata la traspirazione della membrana.

Il test rapido a cassetta Dengue NS1 (Sangue Intero/Siero/Plasma) è un test immunologico qualitativo basato su membrana per la rilevazione dell'antigene Dengue NS1 nel sangue intero, siero o plasma. Durante il test, il campione reagisce con l'anticorpo coniugato Dengue presente sulla cassetta del test. L'anticorpo coniugato con oro si legherà all'antigene Dengue del campione che a sua volta si legherà con Anti-Dengue NS1 rivestito sulla membrana. Mentre il reagente si sposta attraversando la membrana, l'anticorpo Dengue NS1 sulla membrana lega il complesso anticorpo-antigene causando la formazione di una linea rosa pallida o rosa scuro nella zona della linea del test sulla membrana. L'intensità delle linee varierà a seconda della quantità di antigene presente nel campione. L'aspetto della linea rosa nella zona di test deve essere considerato come risultato positivo.

**[REAGENTI]**

Il test rapido a cassetta Dengue IgG/IgM contiene particelle d'oro colloidale coniugate con antigene dengue, IgM e IgG rivestite sulla membrana.

Il test rapido a cassetta Dengue NS1 contiene particelle colloidali coniugate con anti-Dengue Ag, rivestite con membrana anti-Dengue Ag.

**[PRECAUZIONI]**

- Solo per uso professionale diagnostico in vitro. Non utilizzare dopo la data di scadenza.
- Non mangiare, bere o fumare nell'area in cui vengono manipolati i campioni o i kit.
- Manipolare tutti i campioni come se contenenti agenti infettivi. Osservare le precauzioni stabilite contro i rischi microbiologici durante tutta la procedura e seguire le procedure standard per il corretto smaltimento dei campioni.
- Indossare indumenti protettivi come camici da laboratorio, guanti monouso e occhiali

protettivi quando si analizzano i campioni.

- L'umidità e la temperatura possono influire negativamente sui risultati.

**[STOCCAGGIO E STABILITÀ]**

Conservare nella confezione a temperatura ambiente o refrigerato (2-30 ° C). Il test è stabile fino alla data di scadenza stampata sulla confezione sigillata. Il test deve rimanere nella confezione sigillata fino al momento dell'uso. **NON CONGELARE.** Non utilizzare oltre la data di scadenza.

**[RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI]**

- Il test a cassetta Dengue Combo (sangue intero / siero / plasma) può essere eseguito utilizzando sangue intero, siero o plasma.
- **Raccolta di campioni di sangue intero con lancetta pungidito:**  
Lavare la mano del paziente con acqua calda e sapone o pulire con un bastoncino imbevuto di alcol. Lasciare asciugare  
Massaggiare la mano senza toccare il luogo della puntura facendo scorrere la mano verso il dito medio o l'anulare.  
Pungere la pelle con una lancetta sterile. Pulire la prima traccia di sangue.  
Far scorrere delicatamente la mano dal polso al palmo fino al polpastrello per formare una goccia intera di sangue dove si è effettuato la puntura.
- Versare il campione di sangue intero del polpastrello sulla cassetta del test usando un contagocce da 5ul o una micropipetta da 5 µl e un contagocce da 25 µl o una micropipetta da 25µl. I contagocce da 5µl o 25µl forniti con il test erogano circa 5µl o 25µl con una goccia anche se si aspira una quantità maggiore di sangue nel contagocce.
- Separare il siero o il plasma dal sangue il prima possibile per evitare l'emolisi. Utilizzare solo campioni limpidi non emolizzati.
- Eseguire il test immediatamente dopo la raccolta dei campioni. Non lasciare i campioni a temperatura ambiente per periodi prolungati. I campioni di siero e plasma possono essere conservati a 2-8 ° C per un massimo di 3 giorni, per una conservazione a lungo termine, i campioni devono essere conservati a una temperatura inferiore a -20 ° C. Il sangue intero raccolto mediante prelievo venoso può essere conservato a 2-8 ° C se il test deve essere eseguito entro 2 giorni dalla raccolta. Non congelare i campioni di sangue intero. Il sangue intero raccolto dal polpastrello andrebbe testato immediatamente.
- Portare i campioni a temperatura ambiente prima del test. I campioni congelati devono essere completamente scongelati e mescolati bene prima del test. I campioni non vanno congelati e scongelati ripetutamente.
- Se i campioni devono essere spediti, devono essere imballati in conformità con le normative locali in materia di trasporto di agenti eziologici.

**[MATERIALI ]**

**Materiali Inclusi**

- Test a cassetta
- Buffer
- Contagocce
- Foglietto Illustrativo

**Materiali Richiesti non Inclusi**

- Contenitori per la raccolta del campione
- Micropipetta
- Centrifuga (solo per plasma)
- Timer
- Lancette Pungidito (Solo per sangue intero dal polpastrello)

**[ISTRUZIONI PER L'USO]**

Consentire al test, al campione, al buffer e / o ai controlli di raggiungere la temperatura ambiente (15-30 ° C) prima di eseguire il test.

1. Portare la confezione di alluminio a temperatura ambiente prima di aprirla. Rimuovere la cassetta test dalla bustina sigillata ed utilizzarla entro 1 ora.
2. Posizionare la cassetta su una superficie pulita e piana.

**> Per campioni di Siero o Plasma:**

**Per NS1:**

- Con il contagocce in posizione verticale trasferire **3 gocce di siero o plasma (circa 75 µl)** nell'area del campione e avviare il timer. Come mostrato nell'illustrazione in basso.

**Per IgG/IgM:**

**Per utilizzare il contagocce:** Con il contagocce in posizione verticale, estrarre il campione fino alla **linea di riempimento** (circa 5 µl) e trasferire il campione nel pozzetto del campione presente sulla cassetta del test, quindi aggiungere 1 goccia di buffer (circa 40 µl) e avviare il timer. Evitare la formazione di bolle d'aria nel pozzetto del campione.

**Per utilizzare la micropipetta:** raccogliere e versare **5 µl di siero o plasma nel pozzetto del campione (S)** presente sulla cassetta di test, quindi aggiungere **1 goccia di buffer (circa 40 µl)** e avviare il timer.

**> Per Sangue intero (Venoso o dal Polpastrello):**

**Per NS1:**

- **Per utilizzare il contagocce:** Con il contagocce in posizione verticale, trasferire **3 gocce di sangue intero (approssimativamente 75 µl)** nel pozzetto per la raccolta del campione (s), aggiungere **1 goccia del buffer** (approssimativamente 40 µl) e avviare il timer. Come mostrato nell'illustrazione in basso.
- Per utilizzare una **provetta capillare:** riempire la provetta capillare e trasferire approssimativamente 75 µL di sangue intero del polpastrello nel pozzetto per la raccolta del campione (s) sulla cassetta del test, aggiungere **1 goccia di buffer** (circa 40 µL), come mostrato nell'illustrazione in basso.
- Per trasferire il sangue **direttamente dal polpastrello:** Lasciare cadere **3 gocce di campione di sangue intero direttamente dal polpastrello** (approssimativamente 75 µL) sul pozzetto del campione (S) della cassetta di test, aggiungere **1 goccia di buffer**

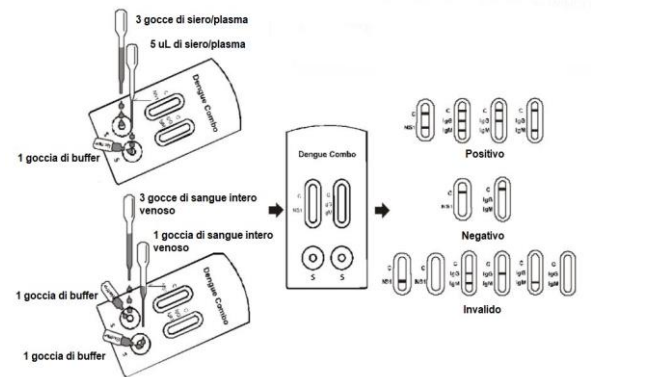
(approssimativamente 40 µL) e avviare il timer, come mostrato nell'illustrazione in basso.

**Per IgG/IgM:**

- **Per utilizzare il contagocce:** Con il contagocce in posizione verticale, aspirare il campione 1 cm sopra la linea di riempimento e trasferire 1 goccia di sangue intero (circa 10 µl) nel pozzetto (S) del campione sul test a cassetta, quindi aggiungere 1 goccia di buffer (circa 40 ul) e avviare il timer, come mostrato nell'illustrazione in basso.

- **Per utilizzare la micropipetta:** raccogliere e versare **10 µl di sangue intero nel pozzetto del campione (S)** del test a cassetta, quindi aggiungere **1 goccia di buffer (circa 40 µl)** e avviare il timer, come mostrato nell'illustrazione in basso.

3. **Leggere i risultati a 10 minuti**, non interpretare i risultati dopo 20 minuti.



**[INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI]**

(Si prega di fare riferimento all'illustrazione in alto)

**NS1 POSITIVO:** \* **Compaiono due linee colorate.** Una linea colorata dovrebbe comparire sulla zona di controllo (C) mentre un'altra linea colorata dovrebbe trovarsi nella zona di test (T). **IgG e IgM POSITIVO:**\* **Compaiono tre righe colorate.** Una linea colorata dovrebbe comparire sulla zona della linea di controllo (C) e due linee colorate dovrebbero trovarsi nelle rispettive zone della linea di test IgG e IgM. Non è necessario che l'intensità di colore delle linee corrisponda. Il risultato è positivo per gli anticorpi IgG e IgM presenti nella fase finale dell'infezione primaria da Dengue e nella fase iniziale dell'infezione secondaria da Dengue.

**IgG POSITIVO:**\* **Compaiono due linee colorate.** Una linea colorata deve trovarsi nella zona della linea di controllo (C) e una linea colorata compare nella zona della linea di test IgG. Il risultato è positivo per IgG specifiche per il virus Dengue ed è probabilmente indicativo di infezione da Dengue secondaria.

**IgM POSITIVO:**\* **Compaiono due linee colorate.** Una linea colorata dovrebbe trovarsi nella zona di controllo (C), mentre una linea rossa dovrebbe comparire nella zona della linea di test IgM. Il risultato è positivo agli anticorpi specifici IgM del virus Dengue e indica una infezione primaria da Dengue.

\***NOTA:** L'intensità del colore nella zona della linea di test (NS1 e/o IgG e/o IgM) può variare a seconda della concentrazione dell'antigene Dengue NS1 e/o IgG e/o IgM presente nel campione. Per questa ragione qualsiasi tonalità di rosso nella zona di test andrebbe considerata come positiva.

**NEGATIVO:** **Compare una linea di colore nell'area di controllo (C).** Non compare alcuna linea rossa o rosa nell'area di test (T).

**INVALIDO:** **La linea di controllo non compare.** Le cause più comuni sono l'aggiunta di una quantità insufficiente di campione o tecniche procedurali scorrette. Rivedere la procedura e ripetere il test con un nuovo test a cassetta. Se il problema persiste, interrompere immediatamente l'utilizzo del kit di test ed informare il rivenditore.

**[CONTROLLO DI QUALITÀ]**

Un controllo procedurale interno è incluso nel test. Una linea colorata che compare nella regione di controllo (C) è un controllo procedurale interno efficace. Conferma che il volume di campione è sufficiente e che la tecnica procedurale è corretta. Gli standard di controllo non sono inclusi in questo kit; tuttavia, si raccomanda di testare con controllo positivo e negativo come buona pratica di laboratorio per confermare la procedura del test e verificarne le prestazioni.

**[LIMITAZIONI]**

1. Il test rapido a cassetta Dengue Combo (Sangue Intero/Siero/Plasma) indicherà la sola presenza dell'antigene Dengue NS1 e degli anticorpi del virus Dengue presenti nel campione e non deve essere utilizzato come unico criterio per la diagnosi di Dengue.
2. La procedura di analisi e l'interpretazione dei risultati del test devono essere eseguite attentamente quando si verifica la presenza di dengue Ab nel siero o nel plasma di singoli soggetti. La mancata osservanza della procedura può fornire risultati inesatti.
3. Un risultato di test negativo per Dengue NS1 non preclude la possibilità di esposizione o infezione da virus Dengue.
4. Un risultato negativo a Dengue NS1 potrebbe verificarsi se la quantità di Dengue Ag presente nel campione è inferiore ai limiti rilevabili dai test o se la Dengue Ag rilevata non è presente durante lo stadio della malattia in cui viene raccolto il campione.

- Alcuni campioni contenenti un titolo insolitamente elevato di anticorpi eterofili o fattore reumatoide possono influenzare l'esito del test.
- Se i sintomi persistono, nonostante il risultato del test rapido Dengue NS1 sia negativo o non reattivo, si raccomanda di prelevare un nuovo campione dal paziente dopo qualche giorno o di effettuare il test con un metodo alternativo quale PCR o ELISA.
- I risultati ottenuti con questo test devono essere interpretati solo insieme ad altre procedure diagnostiche e risultati clinici.
- Durante la fase iniziale della febbre, le concentrazioni di IgM anti-Dengue possono essere inferiori ai livelli rilevabili. Per l'infezione primaria, durante un test di sorbente immunoenzimatico legato alla cattura di anticorpi IgM (MAC ELISA) si è rilevato che l'80% dei pazienti Dengue testati mostrava livelli rilevabili di anticorpo IgM entro il quinto giorno dopo l'infezione e che il 99% dei pazienti era risultato positivo alle IgM al giorno 10. Si raccomanda di testare i pazienti entro questo termine. Per l'infezione secondaria, gli anticorpi sono caratterizzati da una bassa frazione molare di IgM anti-Dengue e un'alta frazione molare di IgG ampiamente reattiva ai flavivirus.5 La linea IgM può risultare debole e può apparire una reazione crociata nella zona della linea IgG.
- La reattività crociata sierologica in tutto il gruppo flavivirus (Dengue 1, 2, 3 & 4, encefalite di St. Louis, virus del Nilo occidentale, encefalite giapponese e virus della febbre gialla) è comune. 6,7,8 Tutti i risultati positivi devono essere confermati con altri mezzi.

**[VALORI ATTESI]**

Il test rapido a cassetta Dengue NS1 (sangue intero / siero / plasma) è stato confrontato con un test commerciale EIA Dengue Ag leader nel settore. La correlazione tra questi due sistemi è del 96%.

L'infezione primaria da Dengue è caratterizzata dalla presenza di anticorpi IgM rilevabili 3-5 giorni dopo l'inizio dell'infezione. L'infezione secondaria da Dengue è caratterizzata dall'aumento di IgG specifiche per Dengue. Nella maggior parte dei casi, questo è accompagnato da elevati livelli di IgM. Il test rapido a cassetta Dengue (sangue intero / siero / plasma) è stato confrontato con un test commerciale ELISA Dengue leader nel settore, dimostrando una sensibilità dell'83,3% per IgM nelle infezioni primarie e del 98,4% per IgG nelle infezioni secondarie.

**[CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE]**

**Sensibilità e specificità**

Il test rapido Dengue Combo (sangue intero / siero / plasma) ha superato un pannello di sierconversione ed è stato confrontato con un test EIA Dengue Ag commerciale leader nel settore, utilizzando campioni clinici per Dengue NS1 ed è stato valutato con campioni ottenuti da una popolazione di individui sintomatici e asintomatici. I risultati sono stati confermati da un importante test commerciale ELISA Dengue per IgG e IgM. I risultati mostrano che la sensibilità relativa del test rapido a cassetta Dengue NS1 (sangue intero / siero / plasma) è del 95,8% e la specificità relativa è del 96,1%. La sensibilità relativa complessiva per l'infezione primaria e secondaria del test rapido a cassetta Dengue (sangue intero / siero / plasma) è del 94,3% e la specificità relativa è del 99,1% mentre la precisione relativa è del 98,3%.

**Dengue IgG/IgM**

**Risultati del test per infezione primaria dengue su IgM / IgG**

Metodo	ELISA			
	Risultati		Positivo	Negativo
Test Rapido a cassetta Dengue (sangue intero / siero / plasma)			IgM	IgG
	Positivo	IgM	20	0
		IgG	4	0
	Negativo		0	0
Sensibilità Relativa		83.3%		✓

**Risultati del test per infezione secondaria dengue su IgM / IgG**

Metodo	ELISA			
	Risultati		Positivo	Negativo
Test Rapido a cassetta Dengue (sangue intero / siero / plasma)			IgM	IgG
	Positivo	IgM	46	1
		IgG	18	63
	Negativo		0	0
Sensibilità Relativa		71.9%		✓

**Risultati infezione non-dengue per IgM / IgG**

Method	ELISA			
	Risultati		Positivo	Negativo
Test Rapido a cassetta Dengue (sangue intero / siero / plasma)			IgM	IgG
	Positivo	IgM	0	0
		IgG	0	0
	Negativo		0	0
Sensibilità Relativa		✓		99.1%

Sensibilità Relativa: (20+63)/(24+64) =94.3% (95%CI\*: 87.2%-98.1%);  
 Specificità Relativa: 429/433=99.1% (95%CI\*: 97.7%-99.7%);  
 Accuratezza: (20+63+429)/(24+64+433) =98.3% (95%CI\*: 96.7%-99.2%).  
 \*Intervalli di Sicurezza

**Dengue NS1**

Metodo	Test Dengue Ag EIA			Risultati
	Risultati		Positivo	Negativo
Test Rapido a cassetta Dengue NS1 (sangue intero / siero / plasma)	Positivo		137	8
	Negativo		6	200
Risultati Totali		143		208

Sensibilità Relativa: 137/143\*100%=95.8% (95%CI\*: 91.1%-98.4%);  
 Specificità Relativa: 200/208\*100%=96.1% (95%CI\*: 92.6%-98.4%);  
 Accuratezza: (137+200)/(137+6+8+200)\*100%=96.0%(95%CI\*:93.4%-97.8%)  
 \*Intervalli di Sicurezza

**Precisione**

**Intra-Assay**

La precisione del test è stata determinata utilizzando 15 replicati di quattro campioni: un negativo, un positivo basso, un positivo medio e un positivo alto. I campioni sono stati identificati correttamente > 99% delle volte.

**Inter-Assay**

La precisione tra i lotti è stata determinata da 15 test indipendenti sugli stessi quattro campioni: un negativo, un positivo basso, un positivo medio e un positivo alto. Tre diversi lotti di test rapido Dengue Combo (sangue intero / siero / plasma) sono stati testati usando questi campioni. I campioni sono stati identificati correttamente > 99% delle volte.

**Reattività Crociata**

Il test rapido combinato Dengue (sangue intero / siero / plasma) è stato testato su campioni positivi HAMA, RF, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Syphilis, HIV, HCV, H. Pylori, MONO, CMV, Rosolia e TOXO. I risultati non hanno mostrato reattività crociata.

**Sostanze Alteranti**

Le seguenti sostanze potenzialmente alteranti sono state aggiunte ai campioni positivi Acetaminofene: 20 mg / dL Acido acetilsalicilico: 20 mg / dL Acido ascorbico: 2g / dL Bilirubina: 1g / dL Creatina: 200 mg / dL Caffaina: 20 mg / dL Acido gentisico: 20 mg / dL di emoglobina 1000 mg / dL di albumina: 2 g / dL Acido ossalico: 60 mg / dL  
 Nessuna delle sostanze alla concentrazione testata ha interferito sul risultato.

**[BIBLIOGRAFIA]**

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

 **SCREEN ITALIA Srl**  
 Via dell'Artigianato, 16  
 06089 - Torgiano - Perugia - Italia  
 www.screenitalia.it info@screenitalia.it



Numero: 14503920  
 Data Effettiva: 2019-04-30