

BIOLISA DENGUE NS1

[REF] **K253**

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa do antígeno NS1 do vírus da Dengue, em amostras biológicas (soro ou plasma) através de teste enzimaimunoensaio. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou Imunoenzimático
O kit BIOLISA DENGUE NS1 é um ensaio imunoenzimático em fase sólida, baseado no princípio “sanduíche” para a detecção qualitativa do antígeno NS1 do Vírus da Dengue em amostras humanas de soro ou plasma. A microplaca é revestida com anticorpos monoclonais específicos anti-NS1 para os subtipos I, II, III e IV da Dengue. No primeiro momento, a amostra é incubada junto ao Conjugado, constituído de anticorpos anti-NS1 conjugados à peroxidase. Antígenos NS1 do Vírus da Dengue, presentes na amostra, se ligam aos anticorpos anti-Dengue específicos imobilizados na placa e nos anticorpos anti-Dengue específicos presentes no conjugado, formando imunocomplexos. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. Em seguida, o Substrato é adicionado e incubado, produzindo uma cor azul que indica a detecção de antígenos NS1 para Dengue na amostra. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação, havendo uma mudança de cor de azul para amarelo, medido em um leitor de microplaca.

REAGENTES

1- Placa Sensibilizada – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Placa sensibilizada com anticorpos monoclonais anti-NS1 da Dengue.
2- Conjugado – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão contendo anticorpos monoclonais anti-NS1 da Dengue ligado à peroxidase, surfactante, estabilizantes, corante e conservante.
3 - Lavagem Concentrada – Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Contém: Solução tampão (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloreto de Potássio < 100 mmol/L, Cloreto de Sódio < 5 mol/L), surfactante e conservante.
4 - Substrato – Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução tampão contendo peróxido de ureia, tetrametilbenzidina (TMB) e conservante.
5 - Solução de Parada – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de Ácido Clorídrico 1 M.
6 - Controle Negativo – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão, estabilizante, surfactante e conservante.
Potencialmente infectante.
7 - Controle Positivo – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão, antígeno NS1 para Dengue, corante, estabilizantes, surfactante e conservante. **Potencialmente infectante.**
8 - Seladores de Placa.

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3
1- Placa Sensibilizada	1 Unidade (96 cavidades)	2 Unidades (192 cavidades)	5 Unidades (480 cavidades)
2- Conjugado	1 Frasco x 6 mL	2 Frascos x 6 mL	5 Frascos x 6 mL
3- Lavagem Concentrada	1 Frasco x 50 mL	2 Frascos x 50 mL	5 Frascos x 50 mL
4 - Substrato	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
5- Solução de Parada	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
6 - Controle Negativo	1 Frasco x 1 mL	2 Frascos x 1 mL	5 Frascos x 1 mL
7- Controle Positivo	1 Frasco x 1 mL	2 Frascos x 1 mL	5 Frascos x 1 mL
8 – Seladores de Placa	3 Unidades	6 Unidades	15 Unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no item anterior
- Instruções de uso (manual)

Materiais necessários não contidos no kit:

1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 5 a 300 µL com coeficiente de variação menor que 1,5%.
2- Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 300 µL com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (opcional).
3- Lavadora de microplaca (opcional).
4- Leitora de ELISA com capacidade de absorbância em 450 e 630 nm de comprimento de onda.
5- Papel absorvente para secar as microcavidades.
6- Cronômetro ou relógio.
7- Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluída.
8- Água destilada ou deionizada.
9- Ferramentas de Controle de Qualidade.
10- Incubadora de 37 °C ± 2 °C.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8 °C. O transporte, em temperatura ambiente (até 30 °C), não deverá exceder 5 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade. Não congelar.

CUIDADOS ESPECIAIS

1- Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.
3- O sachê contendo a microplaca deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no sachê, vedar e estocar de 2 e 8 °C.
4- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes.
5- Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos, e agentes oxidantes e redutores que podem alterar de forma significativa os resultados.

6- A Solução de Parada contém Ácido Clorídrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.
7- Toda matéria-prima do produto é testada e deve ser não reagente para HBsAg e Anti-HIV 1&2. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação de todo produto que contém soro é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.
8- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
9- Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.
10- Deve-se assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco, e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.
11- Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de Hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.
12- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.
13- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.
14- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.
15- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Soro ou Plasma (EDTA ou Heparina)

Amostras hemolisadas e altamente lipêmicas não devem ser usadas. As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8 °C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20 °C. Amostras de plasma armazenadas por períodos superiores ao preconizado (30 dias) podem apresentar fibrina e precipitação de fibronectina que podem interferir no teste. Amostras coletadas com outros anticoagulantes, diferentes dos citados, não devem ser utilizadas.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Estabilidade Após Aberto

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit BIOLISA DENGUE NS1 é estável após aberto até 30 dias. Esta estabilidade pode variar de acordo com as condições do teste e do ambiente. Portanto, sugere-se acompanhar o desempenho do produto utilizando controles internos do kit e os critérios de validação da técnica

Preparo dos reagentes de trabalho

SOLUÇÃO DE LAVAGEM

Diluir o conteúdo do Reagente N° 3 (Lavagem Concentrada) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 e 30°C durante, pelo menos, 30 dias. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 °C até dissolução.

SUBSTRATO

O Substrato é pronto para o uso.

TÉCNICA

Para uso em equipamentos automáticos, consulte o SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente).

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30 °C) por no mínimo 40 minutos. Retornar as tiras não utilizadas damicroplaca para a embalagem original selada.
1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controles e Amostras (recomenda-se testar em duplicata). Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.
2- Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).
3- Pipetar 50 µL das Amostras, Controle Positivo e Controle Negativo nas cavidades previamente determinadas.
4- Pipetar 50 µL do Conjugado em todas as cavidades, exceto na cavidade do Branco.
5- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placas.
6- Incubar por 90 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
7- Retirar o selador das cavidades.
8- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora) ou por decantação (Manual). Usar 300 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, previamente preparada, e efetuar um total de cinco (5) ciclos de lavagem, com agitação (shake) de 5 segundos. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.
Nota: Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.
9- Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades, inclusive na cavidade do Branco.
10- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
11- Incubar por 10 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
12- Retirar o selador de placa das cavidades.
13- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todasas cavidades, **inclusive** na cavidade do Branco.
14- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.
15- Ler utilizando filtro duplo: 450 nm / 630 nm em até 15 minutos (no máximo).

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura do Branco e dos Controles estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Branco	< 0,100
Controle Negativo	< 0,100
Controle Positivo	> 1,000

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

CÁLCULOS Qualitativo
Calcular Cut Off de acordo com a seguinte fórmula:
Cut Off = (Absorbância Média Obtida com o Controle Positivo x 0,02) + 0,180.

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Controle Positivo	A1 = 2,101
	A2 = 2,104
Cut Off: (Absorbância Média Obtida com o Controle Positivo x 0,02) + 0,180	((2,101 + 2,104) / 2 x 0,02) + 0,180= 0,222

Calcular o Índice dividindo a absorbância da Amostra pelo valor de Cut Off.

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Amostra	2,675
Valor de Cut Off	0,222
Índice: Amostra / Valor de Cut Off	2,675 / 0,222 = 12,05

Nota: Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usados para cálculo dos resultados.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
Após o cálculo do índice das amostras, considerar os índices abaixo para determinação dos resultados.

RESULTADOS	QUALITATIVO PARA AMOSTRAS DE SORO E PLASMA
	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	Entre 0,9 - 1,1

Observação: No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra em até 9 dias após o início dos sintomas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO
A interpretação de um teste diagnóstico não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis, antes do diagnóstico descritivo da doença.

INTERFERENTES
Nenhuma interferência foi observada por Triglicérides 1500 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 2 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Reumatóide 980 UI/mL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL. Amostras de plasma armazenadas por períodos superiores ao preconizado (30 dias) podem apresentar fibrina e precipitação de fibronectina que podem interferir no teste. Essas amostras não devem ser utilizadas, assim como, amostras coletadas com outros anticoagulantes diferentes dos citados (EDTA e heparina).

REATIVIDADE CRUZADA
Um estudo de reatividade cruzada foi realizado, avaliando 147 amostras de soro e plasma negativas para Dengue NS1, mas positivas para outras infecções. Dentre elas 10 amostras positivas para HIV, 10 amostras positivas para HTLV, 10 amostras positivas para HBsAg, 10 amostras positivas para anti-HBs, 10 amostras positivas para Sífilis, 10 amostras positivas para Febre Amarela, 10 amostras positivas para Zika, 5 amostras positivas para Chikungunya, 10 amostras positivas para Doença de Chagas, 10 amostras positivas para CMV, 10 amostras positivas para Rubéola, 10 amostras positivas para Toxoplasmose, 7 amostras positivas para H1N1, 10 amostras positivas para Sars-CoV-2 e 15 amostras positivas para HCV. Não foi observado reatividade cruzada com amostras positivas para HIV, HTLV, HBsAg, anti-HBs, Sífilis, Febre Amarela, Zika, Chikungunya, Doença de Chagas, CMV, Rubéola, Toxoplasmose, H1N1, Sars-Cov-2 e HCV. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de reatividade cruzada. O diagnostico final deve considerar os dados clínicos do paciente juntamente com outros dados laboratoriais.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE
O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

DESEMPENHO DO PRODUTO

Precisão REPETIBILIDADE
A repetibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

REPETIBILIDADE	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	1,244	3,334	0,075
Desvio Padrão	0,028	0,135	0,005
Coefficiente de Variação (%)	2,29	4,04	6,45

REPRODUTIBILIDADE
A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

REPRODUTIBILIDADE	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	1,287	3,301	0,075
Desvio Padrão	0,066	0,077	0,007
Coefficiente de Variação (%)	5,12	2,33	9,53

Sensibilidade e Especificidade Clínica
O kit BIOLISA DENGUE NS1 foi utilizado para a análise de amostras clínicas previamente caracterizadas e confirmadas através de outro método de enzimaímunoenensaio de referência. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit BIOLISA DENGUE NS1 é de 96% e a especificidade clínica é de 96,3%.

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA	Resultado Esperado	BIOLISA DENGUE NS1
Amostra Positiva	50	48
Amostra Negativa	54	52
Total de Amostras Testadas	104	100

Sensibilidade Clínica: 96% (48/50) - IC 95%: 83,3% - 99,5%
Especificidade Clínica: 96,3% (52/54) - IC 95%: 87,3% - 99,5%

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO
O vírus da Dengue é um Flavivírus transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*. Está distribuído pelas áreas tropicais e subtropicais do mundo, causando mais de 100 milhões de infecções anualmente. A infecção clássica da Dengue é caracterizada pela febre alta (normalmente entre 38 e 40°C) de início abrupto, mal-estar, anorexia (pouco apetite), cefaléias, dores musculares e nos olhos. Casos de Dengue Hemorrágica pode provocar gengivorragias e epistáxis, hemorragias internas e coagulação intravascular disseminada, com danos em vários órgãos, o que pode causar a morte. O NS1 é uma glicoproteína altamente conservada que está presente em altas concentrações no soro de pacientes infectados por dengue. O antígeno NS1 é encontrado do 1° ao 9° dias após o início da febre nas amostras de pacientes com infecção primária e secundária pelo vírus da dengue. Entretanto, sua concentração reduz ao longo dos dias de infecção, diminuindo consideravelmente as chances de detecção do antígeno. Artigos relatam sensibilidade menor que 50% para detecção após o 4° dia de infecção por vários métodos de diagnóstico. A infecção primária da dengue causa um aumento de anticorpos IgM após 3 a 5 dias do início da febre. Anticorpos IgM normalmente permanecem na circulação por 30 a 90 dias. Pacientes de regiões endêmicas podem apresentar infecções secundárias, que resultam em níveis elevados de anticorpos IgG, isoladamente ou simultaneamente com uma resposta de IgM. Em caso de infecção secundária, o antígeno NS1 pode não ser detectado devido à possibilidade de menor viremia.

- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**
1. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR
 2. WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and sérum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
 3. Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the develop-ing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.
 4. Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
 - 5.Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detect-ed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese J. Trop. Med. Hygiene 1994; 22: 9-12.
 6. Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. Rev. Med. Micro. 1995; 6:39-48.
 7. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Ge-neva: World Health Organization.
 8. Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neu-tralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4): 725-8.
 9. Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephali-tis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
 10. Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. Micro-biol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.
 11. Dussart P, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. Clinical and vaccine immunology. 2006; p. 1185–1189.
 12. Dussart P., et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. Plos – Neglected Tropical Diseases. 2008; Volume 2; Issue 8; e280.
 13. QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento

GARANTIA DA QUALIDADE
Antes de serem liberados para o consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte/MG - Brasil
Tel.: +55 31 3439 5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR
Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 0315454
E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro do Kit BIOLISA DENGUE NS1 na ANVISA: 10269360348

Revisão: Janeiro/2023

REF

NÚMERO DE CATÁLOGO

LOT

NÚMERO DO LOTE

DATA DE FABRICAÇÃO

DATA DE VALIDADE
(último dia do mês)

LIMITE DE TEMPERATURA
(conservar a)

Σ

O CONTEÚDO É SUFICIENTE
PARA <N> TESTE

CONSULTAR INSTRUÇÕES
DE USO

IVD

PRODUTO PARA
DIAGNÓSTICO IN VITRO

PROTEGER DA
LUZ E CALOR

NÃO REUTILIZE

CUIDADO

FABRICADO POR

CONTROL

CONTROLE

CONTROL +

CONTROLE POSITIVO

CONTROL -

CONTROLE NEGATIVO

RISCO BIOLÓGICO

INFLÂMAVEL

CORROSIVO

TÓXICO

NÃO UTILIZAR SE A
EMBALAGEM ESTIVER
DANIFICADA

STERILE R

PRODUTO
ESTERELIZADO

PERIGO

Finalidad

Prueba para la determinación cualitativa del antígeno NS1 del virus del Dengue en muestras biológicas (suero o plasma) mediante inmunoensayoenzimático. Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

Principio de acción

Metodología: Inmunoensayo enzimático o Inmunoenzima
El kit BIOLISA DENGUE NS1 es un inmunoensayo enzimático en fase sólida basado en el principio “sándwich” para la detección cualitativa del antígeno NS1 del virus del dengue en muestras de suero o plasma humano. La microplaca está recubierta con anticuerpos monoclonales anti-NS1 específicos para los subtipos I, II, III y IV de Dengue. Al principio, la muestra se incuba con el conjugado, que consiste en anticuerpos anti-NS1 conjugados con peroxidasa. Los antígenos del virus del dengue NS1, presentes en la muestra, se unen a anticuerpos específicos anti-dengue inmovilizados en la placa y a anticuerpos específicos anti-dengue presentes en el conjugado, formando inmunocomplejos. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. Luego, se agrega e incuba el sustrato, produciendo un color azul que indica la detección de antígenos del Dengue NS1 en la muestra. Se agrega solución de parada para detener la reacción y hay un cambio de color de azul a amarillo medido en un lector de microplacas.

Reactivos

- 1- Placa Sensibilizada** - Almacenar entre 2 y 8 ° C. Contiene: Placa sensibilizada con anticuerpos monoclonales anti-NS1 del Dengue.
2- Conjugado - Conservar entre 2 y 8 ° C. Contiene: Solución tampón que contiene anticuerpos monoclonales contra Dengue NS1 ligados a peroxidasa, surfactante, estabilizadores, colorante y conservante.
3- Lavado Concentrado - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Contiene: Solución tampón (Fosfato <0,5 mol / L, Cloruro de potasio <100 mmol / L, Cloruro de sodio <5 mol / L), tensioactivo y conservante.
4- Sustrato - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución tampón que contiene peróxido de urea, tetrametilbencidina (TMB) y conservante.
5- Solución de Parada - Almacenar entre 2 y 8 ° C. Contiene: Solución de Ácido Clorhídrico 1 M.
6- Control Negativo - Almacenar entre 2 y 8 ° C. Contiene: Solución tampón, estabilizante, tensioactivo y conservante. **Potencialmente infeccioso.**
7- Control Positivo - Almacenar entre 2 y 8 ° C. Contiene: Solución tampón, antígeno NS1 para el Dengue, colorante, estabilizadores, tensioactivo y conservante. **Potencialmente infeccioso.**
8- Selladores de placas.

Presentación

REAGENTES	1	2	3
1- Placa Sensibilizada	1 Unidad (96 cavidades)	2 Unidades (192 cavidades)	5 Unidades (480 cavidades)
2- Conjugado	1 Vial x 6 mL	2 Viales x 6 mL	5 Viales x 6 mL
3- Lavado Concentrada	1 Vial x 50 mL	2 Viales x 50 mL	5 Viales x 50 mL
4 - Sustrato	1 Vial x 12 mL	2 Viales x 12 mL	5 Viales x 12 mL
5- Solución de Parada	1 Vial x 12 mL	2 Viales x 12 mL	5 Viales x 12 mL
6 - Control Negativo	1 Vial x 1 mL	2 Viales x 1 mL	5 Viales x 1 mL
7- Control Positivo	1 Vial x 1 mL	2 Viales x 1 mL	5 Viales x 1 mL
8 – Selladores de Placas	3 Unidades	6 Unidades	15 Unidades

Equipos e insumos operacionales

Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en el cuadro anterior.
- Instrucciones de uso (manual).

Materiales necesarios, no contenidos en los Kit:

- 1-** Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 5 a 300 µL con un coeficiente de variación inferior al 1,5%.
2- Repetidor para pipeteo repetitivo de volúmenes de 300 µL con coeficiente de variación inferior al 1,5% o pipeta multicanal (opcional).
3- Lavadora de microplacas (opcional).
4- Lector de ELISA con capacidad de absorbancia a 450 y 630 nm de longitud de onda.
5- Papel absorbente para secar las microcavidades.
6- Cronómetro o reloj.
7- Botella para almacenar la Solución de Lavado después de diluida.
8- Agua destilada o desionizada.
9- Herramientas de control de calidad.
10- Incubadora de 37 ° C ± 2 ° C.

Condiciones de almacenamiento y transporte

La temperatura de almacenamiento debe ser de 2 a 8°C. El transporte a temperaturas de hasta 30°C no debe exceder los 5 días. Mantener alejado de la luz y evitar la humedad.
No congelar.

Cuidados especiales

- 1- Solamente para el uso diagnóstico *in vitro***
2- Seguir con rigor la metodología propuesta para la obtención de resultados exactos.
3- El sobre de aluminio conteniendo la microplaca debe ser abierto solamente después de alcanzar la temperatura ambiente. Recolocar las tiras de microcavidades no utilizadas en el sobre de aluminio, sellar y almacenar de 2 a 8°C.
4- El agua utilizada en la limpieza del material debe ser reciente e exenta de contaminantes.
5- Columnas deionizadoras saturadas liberan agua alcalina, iones diversos y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar de forma significativa los resultados.

- 6-** La Solución de Parada contiene Ácido Clorídrico que es un ácido fuerte. Por lo tanto, manosearlo con el debido cuidado.
7- Toda matéria prima del producto es probada y debe ser no reactiva para HBsAg, Anti-HIV 1&2 y Anti-HCV. Sin embargo esos tests no ofrecen total seguridad de la ausencia de agentes infecciosos. La manipulación de todo producto que contiene suero es potencialmente capaz de transmitir dolencias. Por lo tanto, es necesario tomar los debidos cuidados de bioseguridad en la manipulación de esos productos.
8- Pipetear los reactivos siempre en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre las microcavidades.
9- Por medida de protección, debe cubrir la placa durante la reacción.
10- Asegurar que el fondo de la cavidad este limpio y seco y que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa. No permitir que las cavidades sequem durante el ensayo.
11- No exponga los reactivos, especialmente el Sustrato, a la luz fuerte o vapores de Hipoclorito durante almacenamiento o etapas de incubación.
12- Se recomienda la aplicación de la ley local, estatal y federal de protección ambiental para la eliminación de reactivos y material biológico se hace de acuerdo con la legislación vigente.
13- Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la FISPQ (Ficha de Informaciones de la Seguridad de Productos Químicos) disponibles en el site www.bioclin.com.br o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.
14- No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.
15- Es esencial que los instrumentos y equipos utilizados estén adecuadamente calibrados y sometidos a mantenimientos periódicos.

Muestras

Suero o plasma (EDTA o Heparina).
No se deben utilizar muestras hemolizadas y muy lipémicas. Las muestras pueden conservarse refrigeradas, entre 2 y 8°C, por un período máximo de 5 días. Si las muestras no se pueden analizar en 5 días, se pueden almacenar hasta 30 días a -20 ° C. Las muestras de plasma almacenadas por periodos superiores a los recomendados (30 días) pueden presentar fibrina y precipitación de fibronectina, lo que podría interferir con la prueba. Las muestras recolectadas con otros anticoagulantes, distintos de los mencionados, no deben usarse.

Descrição do processo

Estabilidad Después de Abierto

Los resultados de la prueba de estabilidad muestran que el kit BIOLISA DENGUE NS1 es estable después de abrir hasta por 30 días.Esta estabilidad puede variar según las condiciones de la prueba y el medio ambiente. Por lo tanto, se sugiere controlar el rendimiento del producto utilizando controles internos del kit y criterios de validación técnica.

Preparo de los Reactivos de Trabajo

SOLUCIÓN DE LAVADO
Diluir el contenido del Reactivo N° 3 (Lavado Concentrado) em 1000 mL de agua destilada o deionizada. Después de la preparación de la solución se puede almacenar a 2 a 30°C hasta la fecha de validez impresa en el frasco original. Caso ocurra cristalización, calentar a 37°C hasta su disolución.

Substrato

El Sustrato está listo para su uso.

Técnica

Para uso em equipamentos automáticos, consulte o SAC (Serviço de Assessoria do Cliente)

- Antes de iniciar el ensayo, deje que todos los reactivos, muestras y controles se estabilicen a temperatura ambiente (15 - 30 ° C) durante al menos 40 minutos. Regrese las tiras de microplacas sin usar al empaque original sellado.
1- Separe los pocillos a utilizar considerando: Controles y Muestras (se recomienda probar por duplicado). Regrese las tiras de microplacas sin usar al empaque original sellado.
2- Separar la primera cavidad para Blanco (OPCIONAL).
3- Pipetear 50 µL de las Muestras, Control Positivo y Control Negativo en los pocillos previamente determinados.
4- Pipetee 50 µL del conjugado en todos los pocillos, excepto en el pocillo del blanco.
5- Homogeneizar suavemente durante ± 10 segundos. Cubra los pocillos con sellador de placas.
6- Incubar durante 90 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
7- Retirar el sellador de las cavidades.
8- Desechar el contenido de las cavidades por aspiración (Lavador) o por decantación (Manual). Utilizar aproximadamente 300 µL de Solución de Lavado, previamente preparada, y realizar un total de cinco (5) ciclos de lavado, con agitación (agitar) durante 5 segundos. Para garantizar el secado de la placa, al final del lavado, golpee la placa durante unos segundos sobre papel absorbente.
Nota: Un lavado / secado deficiente puede causar resultados inapropiados.
9- Pipetee 100 µL de sustrato en todos los pocillos, incluido el pocillo del blanco.
10- Mezclar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra los pocillos con el sellador de placas.
11- Incubar durante 10 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 ° C ± 2 ° C.
12- Retire el sellador de placas de los pocillos.
13- Pipetee 100 µL de solución de parada en todos los pocillos, incluido el pocillo del blanco.
14- Mezclar suavemente durante ± 30 segundos.
15- Leer con doble filtro: 450 nm / 630 nm en 15 minutos (máximo).

Verificación de la técnica

Verifique si los resultados obtenidos para lectura do Blanco y dos Controles son compatibles con los valores presentados abajo:

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Blanco	< 0,100
Control Negativo	< 0,100
Control Positivo	> 1,000

Caso los valores se encuentren fuera de los valores esperados, se debe repetir la técnica.

CÁLCULOS Cualitativo
Calcule el corte según la siguiente fórmula:
Cut Off = (Absorbancia Control Positivo Promedio x 0,02)+ 0,180.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Control positivo	A1 = 2,101
	A2 = 2,104
Cut Off: (Absorbancia Promédio del Control Positivo x 0,02) + 0,180	((2,101 + 2,104) / 2 x 0,02) + 0,180=0,222

Calcular el Indice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de Cut Off.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Muestra	2,675
Valor de Cut Off	0,222
Indice = Muestra / Valor de Cut Off	2,675 / 0,222 = 12,05

Nota: Los datos presentados en los ejemplos son solo ilustrativos y no se pueden utilizar para calcular resultados.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Después de calcular el índice de la muestra, considere los índices siguientes para determinar los resultados.

RESULTADOS	CUALITATIVO PARA MUESTRAS DE SUERO Y PLASMA
	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	Entre 0,9 - 1,1

Nota: En caso de resultado indeterminado, la muestra debe volver a analizarse. Las muestras que obtienen repetidamente resultados indeterminados deben volver a analizarse utilizando un método alternativo. Si los resultados siguen siendo indeterminados, se debe recolectar una nueva muestra dentro de los 9 días posteriores al inicio de los síntomas. Debe prevalecer el resultado de la última muestra recogida. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable y no son el único criterio para determinar el diagnóstico y / o tratamiento del paciente.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La interpretación de una prueba de diagnóstico no debe basarse en un solo ensayo. Se deben incluir otras pruebas de confirmación antes de que una muestra se considere positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible, antes del diagnóstico descriptivo de la enfermedad.

INTERFERENTES

No se observaron interferencias con Triglicéridos 1500 mg / dL, Ácido acetilsalicílico 20 mg / dL, Ácido ascórbico 2 g / dL, Creatina 200 mg / dL, Bilirrubina 1 g / dL, Albúmina 2 g / dL, Hemoglobina 1000 mg / dL, Ácido Oxalic 60 mg / dL, Factor reumatoide 980 UI / mL, Proteína C reactiva 41,2 mg / dL y Anti-Estreptolisina O 1023 UI / mL. Las muestras de plasma almacenadas por periodos superiores a los recomendados (30 días) pueden presentar fibrina y precipitación de fibronectina, lo que podría interferir con la prueba. Estas muestras no deben utilizarse, así como las muestras recogidas con otros anticoagulantes distintos a los mencionados (EDTA y heparina).

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio de reactividad cruzada, evaluando 147 muestras de suero y plasma negativas para Dengue NS1 pero positivas para otras infecciones. Entre ellas, 10 muestras positivas para VIH, 10 muestras positivas para HTLV, 10 muestras positivas para HBsAg, 10 muestras positivas para anti-HBs, 10 muestras positivas para sífilis, 10 muestras positivas para fiebre amarilla, 10 muestras positivas para Zika, 5 muestras positivas para Chikungunya, 10 muestras positivas para Enfermedad de Chagas, 10 muestras positivas para CMV, 10 muestras positivas para Rubéola, 10 muestras positivas para Toxoplasmosis, 7 muestras positivas para H1N1, 10 muestras positivas para Sars-CoV-2 y 15 muestras positivas para VHC. No se observó reactividad cruzada con muestras positivas para VIH, HTLV, HBsAg, anti-HBs, Sífilis, Fiebre amarilla, Zika, Chikungunya, Enfermedad de Chagas, CMV, Rubéola, Toxoplasmosis, H1N1, Sars-Cov-2 y HCV. A pesar de los resultados encontrados, no se puede descartar por completo la posibilidad de reactividad cruzada. El diagnóstico final debe considerar los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El Laboratorio Clínico debe contar con un programa de control de calidad interno, donde se establezcan claramente los procedimientos, estándares, límites y tolerancia a variaciones. Es importante señalar que todos los sistemas de medición tienen una variabilidad analítica característica, que debe ser monitoreada por los propios laboratorios. Para eso, se recomienda utilizar controles, que permitan evaluar la precisión y exactitud de las dosificaciones.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

Precisión REPETIBILIDAD

La repetibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con diferentes valores, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia:

REPETIBILIDAD	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	1,244	3,334	0,075
Desvío Patrón	0,028	0,135	0,005
Coefficiente de Variación (%)	2,29	4,04	6,45

REPRODUTIBILIDAD

La reproducibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con diferentes valores, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia

REPRODUTIBILIDAD	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	1,287	3,301	0,075
Desvío Patrón	0,066	0,077	0,007
Coefficiente de Variación (%)	5,12	2,33	9,53

Sensibilidad y Especificidad Clínica

El kit BIOLISA DENGUE NS1 se utilizó para el análisis de muestras clínicas previamente caracterizadas y confirmadas por otro método de inmunoensayo enzimático de referencia. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit BIOLISA DENGUE NS1 es del 96% y la especificidad clínica es del 96,3%.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA	Resultado Esperado	BIOLISA DENGUE NS1
Muestra Positiva	50	48
Muestra Negativa	54	52
Total de Muestras Testadas	104	100

Sensibilidad Clínica: 96% (48/50) - IC 95%: 83,3% - 99,5%
Especificidad Clínica: 96,3% (52/54) - IC 95%: 87,3% - 99,5%

SIGNIFICADO CLÍNICO

El virus de la Dengue es un Flavivirus transmitido por el mosquito Aedes aegypti. Está distribuido por las regiones tropicales y subtropicales del mundo, causando más de 100 millones de infecciones anualmente. La infección clásica de la Dengue es caracterizada por la fiebre alta (normalmente entre 38 y 40°C) de inicio abrupto, malestar, anorexia (poco apetito), cefaleas, dolores musculares y de los ojos. Casos de Dengue Hemorrágica puede provocar gengivorragias y epistaxis, hemorragias internas y coagulación intravascular diseminada, con daños en varios órganos, lo que puede causar la muerte. El NS1 es una glicoproteína altamente conservada que está presente en altas concentraciones en el suero de pacientes infectados por dengue. El antígeno NS1 es encontrado del 1° al 9° día después del inicio de la fiebre en las muestras de pacientes con infección primaria y secundaria por el virus de la dengue. Sin embargo, su concentración disminuye a lo largo de los días de la infección, reduciendo significativamente las posibilidades de detección de antígeno. Artículos informan 50% menos de sensibilidad para la detección después del 4° día de la infección por varios métodos de diagnóstico. La infección primaria de la dengue causa un aumento de anticuerpos IgM después de 3 a 5 días del inicio de la fiebre. Anticuerpos IgM normalmente permanecen en la circulación de 30 a 90 días. Pacientes de regiones endémicas pueden presentar infecciones secundarias, que resulten en niveles elevados de anticuerpos IgG, isoladamente o simultaneamente con una respuesta de IgM. En el caso de infección secundaria, el antígeno NS1 no se puede detectar debido a la posibilidad de viremia menor.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR
- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the develop-ing 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 detect-ed 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. Ge-neva: World Health Organization.
- Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neu-tralization 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 encephali-tis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
- Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. Micro-biol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.
- Dussart P., et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. Clinical and vaccine immunology. 2006; p. 1185–1189.
- Dussart P., et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. Plos – Neglected Tropical Diseases. 2008; Volume 2; Issue 8; e280.
- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento

GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de su liberación para el consumo, todos los reactivos de Bioclin son analizados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos está asegurada hasta la fecha de caducidad mencionada en el paquete de presentación, siempre que se almacenen y transporten en las condiciones adecuadas.

GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de su liberación para el consumo, todos los reactivos de Bioclin son analizados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos está asegurada hasta la fecha de caducidad mencionada en el paquete de presentación, siempre que se almacenen y transporten en las condiciones adecuadas.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte/MG - Brasil
Tel.: +55 31 3439 5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AL CONSUMIDOR

Servicio de Asesoría al Cliente
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro del kit BIOLISA DENGUE NS1 en la ANVISA: 10269360348

Revisión: Enero/2023

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

	NUMERO DE CATALOGO		FABRICADO POR
	NUMERO DE LOTE		CONTROLAR
	FECHA DE FABRICACIÓN		CONTROL POSITIVO
	FECHA DE VALIDEZ (último día del mes)		CONTROL NEGATIVO
	LÍMITE DE TEMPERATURA (tienda)		RIESGO BIOLÓGICO
	EL CONTENIDO ES SUFICIENTE PARA <N> PRUEBA		INFLAMABLE
	VER INSTRUCCIONES DE USO		CORROSIVO
	PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DE LUZ Y CALOR		NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTA DAÑADA
	NO REUTILIZA		PRODUCTO ESTERILIZADO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO

FUNCTION

Test for qualitative determination of Dengue virus NS1 antigen in biological samples (serum or plasma) through enzyme-immunoassay. Only for *in vitro* diagnostic use.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or Immunoenzyme

The BIOLISA DENGUE NS1 kit is a solid-phase enzyme immunoassay based on the “sandwich” principle for the qualitative detection of Dengue Virus NS1 antigen in human serum or plasma samples. The microplate is coated with anti-NS1 monoclonal antibodies specific for Dengue subtypes I, II, III and IV. At first, the sample is incubated with the Conjugate, which consists of anti-NS1 antibodies conjugated to peroxidase. Dengue Virus NS1 antigens, present in the sample, bind to specific anti-Dengue antibodies immobilized on the plate and to specific anti-Dengue antibodies present in the conjugate, forming immune complexes. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. Then the Substrate is added and incubated, producing a blue color that indicates the detection of Dengue NS1 antigens in the specimen. Stopping Solution is added to stop the reaction and there is a color change from blue to yellow as measured on a microplate reader.

REAGENTS

- 1 - Sensitized Plate** - Store between 2 and 8°C. Contains: Plate sensitized with monoclonal antibodies anti-NS1 from Dengue.
- 2 - Conjugate** - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer solution containing monoclonal antibodies to Dengue's NS1 linked to peroxidase, surfactant, stabilizers, dye and preservative.
- 3 - Concentrated Wash** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Contains: Buffer solution (Phosphate < 0.5 mol/L, Potassium Chloride < 100 mmol/L, Sodium Chloride < 5 mol/L), surfactant and preservative.
- 4 - Substrate** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer solution containing urea peroxide, tetramethylbenzidine (TMB) and preservative.
- 5 - Stop Solution** – Store between 2 and 8°C. Contains: 1 M Hydrochloric Acid Solution.
- 6 - Negative Control** – Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer solution, stabilizer, surfactant and preservative. **Potentially infectious.**
- 7 - Positive Control** – Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer solution, NS1 antigen for Dengue, dye, stabilizers, surfactant and preservative. **Potentially infectious.**
- 8 - Plate Sealers.**

PRESENTATION

REAGENTES	1	2	3
1- Sensitized Plate	1 Unit (96 cavities)	2 Units (96 cavities)	5 Units (96 cavities)
2 - Conjugate	1 Vial x 6 mL	2 Vials x 6 mL	5 Vials x 6 mL
3 - Concentrated Washing Solution	1 Vial x 50 mL	2 Vials x 50 mL	5 Vials x 50 mL
4 - Substrate	1 Vial x 12 mL	2 Vials x 12 mL	5 Vials x 12 mL
5 - Stop Solution	1 Vial x 12 mL	2 Vials x 12 mL	5 Vials x 12 mL
6 - Negative Control	1 Vial x 1 mL	2 Vials x 1 mL	5 Vials x 1 mL
7 - Positive Control	1 Vial x 1 mL	2 Vials x 1 mL	5 Vials x 1 mL
8 - Plate Sealers	3 Units	6 Units	15 Units

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

Materials in the kit:

- Reactivos descritos en el cuadro anterior.
- Instrucciones de uso (manual).

Necessary materials not contained in the kit:

- 1- Pipettes capable of dispensing volumes from 5 to 300 µL with a coefficient of variation lower than 1.5%.
- 2- Repeater for repetitive pipetting of 300 µL volumes with a coefficient of variation less than 1.5% or multichannel pipette (optional).
- 3- Microplate washer (optional).
- 4- ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 630 nm wavelength.
- 5- Absorbent paper to dry the microcavities.
- 6- Stopwatch or clock.
- 7- Bottle to store the Wash Solution after diluted.
- 8- Distilled or deionized water.
- 9- Quality Control Tools.
- 10- Incubator at 37 °C ± 2 °C.

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

Storage temperature should be 2 to 8 °C. Transport, at room temperature (up to 30 °C), should not exceed 5 days. Keep away from light and avoid moisture. **Do not freeze.**

SPECIAL CARE

- 1- For *in vitro* diagnostic use only.
- 2- Strictly follow the proposed methodology to obtain accurate results.
- 3- The sachet containing the microplate must be opened only after reaching room temperature. Replace strips from unused microwells in the sachet, seal and store at 2 and 8 °C.
- 4- The water used to clean the material must be fresh and free from contaminants.
- 5- Saturated deionizer columns release alkaline water, different ions, and oxidizing and reducing agents that can significantly alter the results.

- 6- The Stop Solution contains Hydrochloric Acid which is a strong acid. So handle it with due care.
- 7- All raw material of the product is tested and must be non-reactive for HBsAg and Anti-HIV 1&2. However, these tests do not offer complete assurance of the absence of infectious agents. The handling of any product that contains serum is potentially capable of transmitting disease.
- Therefore, it is necessary to take proper biosafety precautions when handling these products.
- 8- Pipette the reagents always in the same order to minimize the difference in reaction time between the microwells.
- 9- As a protection measure, the plate must be covered during the reaction.
- 10- Ensure that the bottom of the cavity is clean and dry, and that there are no bubbles on the surface of the liquid before reading the plate. Do not allow wells to dry during the assay.
- 11- Do not expose reagents, especially Substrate, to strong light or Hypochlorite vapors during storage or incubation steps.
- 12- We recommend applying local, state and federal regulations for environmental protection so that the disposal of reagents and biological material is carried out in accordance with current legislation.
- 13- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Safety Information Sheet for Chemical Products) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Service of Customer Service) by Quibasa.
- 14- Do not use the product in case of damage to the packaging.
- 15- It is essential that the instruments and equipment used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

Serum or Plasma (EDTA or Heparin)

Hemolyzed and highly lipemic specimens should not be used. The samples can be stored under refrigeration, between 2 and 8 °C, for a maximum period of 5 days. If samples cannot be analyzed within 5 days, they can be stored for up to 30 days at -20°C. Plasma samples stored for periods longer than recommended (30 days) may present fibrin and fibronectin precipitation, which could interfere with the test. Samples collected with other anticoagulants, other than those mentioned, should not be used.

PROCESSS DESCRIPTION

Stability After Open

The results of the stability test prove that the BIOLISA DENGUE NS1 kit is stable after being opened for up to 30 days. This stability may vary depending on test conditions and environment. Therefore, it is suggested to monitor the product performance using the kit's internal controls and the technique's validation criteria.

Preparation of Work Reagents

WASHING SOLUTION

Dilute the contents of vial No3 (Concentrated Washing Solution) in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored at 2 to 30 °C for at least 30 days. It can be stored at room temperature. If crystallization occurs, heat to 37 °C until dissolved.

SUBSTRATE

The Substrate is ready for use.

TECHNIQUE

For use in automatic equipment, consult the (Customer Advisory Service) SAC

Before starting the assay, allow all reagents, samples and controls to stabilize at room temperature (15 – 30°C) for at least 40 minutes. Return unused microplate strips to the original sealed packaging.

- 1- Separate the wells to be used considering: Controls and Samples (it is recommended to test in duplicate). Return unused microplate strips to the original sealed packaging.
- 2- Separate the first cavity for White (OPTIONAL).
- 3- Pipette 50 µL of the Samples, Positive Control and Negative Control in the previously determined wells.
- 4- Pipette 50 µL of the Conjugate into all wells, except for the Blank well.
- 5- Homogenize gently for ± 10 seconds. Cover wells with plate sealer.
- 6- Incubate for 90 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
- 7- Remove the sealant from the cavities.
- 8- Discard the contents of the cavities by aspiration (Washer) or by decantation (Manual). Use approximately 300 µL of Wash Solution, previously prepared, and carry out a total of five (5) wash cycles, with shaking (shake) for 5 seconds. To guarantee the plate drying, at the end of washing, tap the plate for a few seconds on absorbent paper.
- Note:** Poor washing/drying may cause inappropriate results.
- 9- Pipette 100 µL of Substrate into all wells, including the Blank well.
- 10- Mix gently for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
- 11- Incubate for 10 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
- 12- Remove the plate sealer from the wells.
- 13- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells, including the Blank well.
- 14- Mix gently for ± 30 seconds.
- 15- Read using a double filter: 450 nm / 630 nm within 15 minutes (maximum).

TECHNIQUE VERIFICATION

Check if the results obtained for reading the Blank and the Controls are compatible with the values presented below:

ITEM	ABSORBANCE
Blank	< 0.100
Negative Control	< 0.100
Positive Control	> 1.000

If the values are outside the expected values, the technique should be repeated.

CALCULATIONS

Qualitative

Calculate Cut Off according to the following formula:
Cut Off = (Average Positive Control Absorbance x 0.02)
+ 0.180.

Example:

ITEM	ABSORBANCE
Positive Control	A1 = 2.101
	A2 = 2.104
Cut Off: (Average Positive Control Absorbance x 0.02 + 0.180	((2.101 + 2.104) / 2 x 0.02) + 0.180=0.222

Calculate the Index by dividing the Sample's absorbance by the Cut Off value.

Example:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Sample	2.675
Cut Off Value	0.222
Index = Samples / Cut Off Value	2.675 / 0.222 = 12.05

Note: The data presented in the examples are for illustration only and cannot be used to calculate the results.

INTERPRETATION OF RESULTS

After calculating the sample index, consider the indices below to determine the results.

RESULTS	QUALITATIVE FOR SERUM AND PLASMA SAMPLES
	INDEX
Negative	< 0.9
Positive	> 1.1
Undetermined	Entre 0.9 - 1.1

Note: In case of indeterminate result, the sample must be reanalyzed. Samples that repeatedly obtain indeterminate results should be retested using an alternative method. If results remain indeterminate, a new sample should be collected within 9 days of symptom onset. The result of the last sample collected must prevail. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional and are not the sole criterion for determining the patient's diagnosis and/or treatment.

PROCESS LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test should not be established on the basis of a single test. Other confirmatory tests must be included before a sample is considered positive. A negative result does not exclude the possibility of exposure. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information, before the descriptive diagnosis of the disease.

INTERFERENTS

No interference was observed by Triglycerides 1500 mg/dL, Acetylsalicylic Acid 20 mg/dL, Ascorbic Acid 2 g/dL, Creatine 200 mg/dL, Bilirubin 1 g/dL, Albumin 2 g/dL, Hemoglobin 1000 mg/dL, Acid Oxalic 60 mg/dL, Rheumatoid Factor 980 UI/mL, C-Reactive Protein 41.2 mg/dL and Anti-Streptolysin O 1023 UI/mL. Plasma samples stored for periods longer than recommended (30 days) may present fibrin and fibronectin precipitation, which could interfere with the test. These samples should not be used, as well as samples collected with other anticoagulants than those mentioned (EDTA and heparin).

CROSS REACTIVITY

A cross-reactivity study was performed, evaluating 147 serum and plasma samples negative for Dengue NS1 but positive for other infections. Among them 10 HIV positive samples, 10 HTLV positive samples, 10 HBsAg positive samples, 10 anti-HBs positive samples, 10 Syphilis positive samples, 10 Yellow Fever positive samples, 10 Zika positive samples, 5 positive samples for Chikungunya, 10 samples positive for Chagas Disease, 10 samples positive for CMV, 10 samples positive for Rubella, 10 samples positive for Toxoplasmosis, 7 samples positive for H1N1, 10 samples positive for Sars-CoV-2 and 15 samples positive for HCV . No cross-reactivity was observed with positive samples for HIV, HTLV, HBsAg, anti-HBs, Syphilis, Yellow Fever, Zika, Chikungunya, Chagas Disease, CMV, Rubella, Toxoplasmosis, H1N1, Sars-Cov-2 and HCV. Despite the results found, the possibility of cross-reactivity cannot be completely ruled out. The final diagnosis must consider the patient's clinical data along with other laboratory data.

INTERNAL QUALITY CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control program, where procedures, standards, limits and tolerance for variations are clearly established. It is important to note that all measurement systems have a characteristic analytical variability, which must be monitored by the laboratories themselves. For that, it is recommended to use controls, which allow to evaluate the precision and accuracy of the dosages.

PRODUCT PERFORMANCE

Accuracy

REPEATABILITY

Repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

REPEATABILITY	MUESTRA		
	1	2	3
Average	1.244	3.334	0.075
Standard Deviation	0.028	0.135	0.005
Coefficient of Variation (%)	2.29	4.04	6.45

REPRODUTIBILITY

Reproducibility was calculated from 10 successive determinations over 3 consecutive days, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

REPRODUTIBILITY	MUESTRA		
	1	2	3
Average	1.287	3.301	0.075
Standard Deviation	0.066	0.077	0.007
Coefficient of Variation (%)	5.12	2.33	9.53

Clinical Sensitivity and Specificity

The BIOLISA DENGUE NS1 kit was used for the analysis of clinical samples previously characterized and confirmed by another reference enzyme immunoassay method. The results show that the clinical sensitivity of the BIOLISA DENGUE NS1 kit is 96% and the clinical specificity is 96.3%.

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY	EXPECTED RESULT	BIOLISA DENGUE NS1
Positive Sample	50	48
Negative Sample	54	52
Total Tested Samples	104	100

Clinical Sensitivity: 96% (48/50) - IC 95%: 83.3% - 99.5%

Clinical Specificity: 96.3% (52/54) - IC 95%: 87.3% - 99.5%

CLINICAL SIGNIFICANCE

Dengue virus is a Flavivirus transmitted by the Aedes aegypti mosquito. It is distributed throughout the tropical and subtropical areas of the world, causing more than 100 million infections annually. The classic dengue infection is characterized by high fever (usually between 38 and 40°C) with an abrupt onset, malaise, anorexia (poor appetite), headache, muscle pain and eye pain. Cases of Hemorrhagic Dengue can cause gingivorrhages and epistaxis, internal hemorrhages and disseminated intravascular coagulation, with damage to several organs, which can cause death. NS1 is a highly conserved glycoprotein that is present in high concentrations in the serum of dengue-infected patients. The NS1 antigen is found from 1st to 9th days after the onset of fever in samples from patients with primary and secondary infection with the dengue virus. However, its concentration decreases over the days of infection, considerably reducing the chances of detecting the antigen. Articles report a sensitivity of less than 50% for detection after the 4th day of infection by various diagnostic methods. Primary dengue infection causes a rise in IgM antibodies 3 to 5 days after the onset of fever.

IgM antibodies normally remain in circulation for 30 to 90 days. Patients from endemic regions may present with secondary infections, which result in elevated levels of IgG antibodies, either alone or simultaneously with an IgM response. In case of secondary infection, the NS1 antigen may not be detected due to the possibility of lower viremia.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR
2. WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
3. Halstead SB, Selective primary health care: strategies for control of disease in the develop-ing world: XI, Dengue. Rev. Infect. Dis. 1984; 6:251-264.
4. Halstead SB, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988; 239:476-481.
- 5.Ruechusatsawat K, et al. Daily observation of antibody levels among dengue patients detect-ed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Japanese J. Trop. Med. Hygiene 1994; 22: 9-12.
6. Lam SK. Dengue haemorrhagic fever. Rev. Med. Micro. 1995; 6:39-48.
7. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Ge-neva: World Health Organization.
8. Yamada K, et al. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neu-tralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4): 725-8.
9. Dobler G, et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephali-tis. Wien Med Wochenschr (in German). 1997; 147(19-20): 463-4.
10. Makino Y, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. Micro-biol Immunol. 1994; 38(12): 951-5.
11. Dussart P., et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. Clinical and vaccine immunology. 2006; p. 1185–1189.
12. Dussart P., et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. Plos – Neglected Tropical Diseases. 2008; Volume 2; Issue 8; e280.
13. QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento

QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all Bioclin reagents are tested by the Department of Quality Control. The quality of reagents is assured until expiration date stated on the presentation packaging, when stored and transported under appropriate conditions.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Phone: +55 31 3439 5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Made in Brazil

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service
Phone.: 0800 0315454
E-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA registration for BIOLISA DENGUE NS1 kit:10269360348

Revision: January/2023

REF

CATALOG NUMBER

LOT

LOT NUMBER

MANUFACTURING DATE

VALIDITY DATE
(last day of the month)

TEMPERATURE LIMIT
(store)

CONTENT IS SUFFICIENT
FOR <N> TEST

SEE INSTRUCTIONS
FOR USE

IN VITRO DIAGNOSTIC
PRODUCT

KEEP AWAY
FROM SUNLIGHT

DO NOT REUSE

CAUTION

MADE BY

CONTROL

POSITIVE CONTROL

NEGATIVE CONTROL

BIOLOGICAL RISK

FLAMMABLE

CORROSIVE

TOXIC

DO NOT USE IF
PACKAGE IS
DAMAGED

PRODUCT
STERILIZED

DANGER