

Bioclin

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
	96 CAVIDADES	192 CAVIDADES	480 CAVIDADES
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* profissional.

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, ions 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 durante, pelo menos, 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	$((2,101 + 2,104) / 2 \times 0,02) + 0,180 = 0,222$

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 diagnóstico 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 enzimaímmunoensaio 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 1º ao 9º 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 4º 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

- 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

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

ATENIMENTO 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: Março/2022

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITI
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGAT
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTE		INFLÂMAVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE / EMBALAGEM ESTI DANIFICADA
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERELIZADO
	CUIDADO		PERIGO