

TROD'DENGUE®

Test rapide COMBO
Antigène NS1 et Anticorps IgM/IgG de la Dengue
(sang total / sérum / plasma)
Réf : TR-DEN-002
 Notice d'utilisation

INDICATION D'UTILISATION

TROD'DENGUE® est un test rapide pour la détection qualitative de l'antigène NS1 du virus de la Dengue et des anticorps IgM/IgG dirigés contre le virus de la Dengue dans le sang total, le sérum ou le plasma.
 TROD'DENGUE® est un test à usage professionnel permettant de faciliter le diagnostic de l'infection virale par la Dengue.

INTRODUCTION

Les virus de la Dengue, transmis par les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*, sont largement répandus dans les zones tropicales et subtropicales du monde. Il existe quatre sérotypes distincts connus (virus de la Dengue 1, 2, 3 et 4). Chez les enfants, l'infection est souvent subclinique ou provoque une maladie fébrile autolimitée. Toutefois, si le patient est infecté plusieurs fois par un sérotype différent, une maladie plus grave, la Dengue, la Dengue hémorragique ou le syndrome de choc de la Dengue, est plus susceptible de se produire. La Dengue est considérée comme la plus importante maladie virale transmise par les arthropodes en raison de la morbidité et de la mortalité humaine qu'elle provoque. La NS1 est une glycoprotéine hautement conservée qui est présente à des concentrations élevées dans le sérum des patients infectés par la Dengue au cours de la phase clinique précoce de la maladie. L'antigène NS1 de la Dengue est présent dès le premier jour et jusqu'à 9 jours après l'apparition de la fièvre dans l'échantillon des patients infectés par la Dengue primaire ou secondaire. La réponse immunitaire comprend des anticorps IgM produits entre le 3e et le 5e jour des symptômes et persistant pendant 30 à 60 jours. Les anticorps IgG apparaissent vers le 14e jour et persistent à vie. Les infections secondaires entraînent souvent une forte fièvre et, dans de nombreux cas, des événements hémorragiques et une défaillance circulatoire. Les infections secondaires montrent que les niveaux d'IgG augmentent dans les 1 à 2 jours suivant l'apparition des symptômes et induisent une réponse IgM après 20 jours d'infection.

PRINCIPE DU TEST

TROD'DENGUE® est un test d'immunodosage qualitatif sur membrane en deux parties pour la détection simultanée des antigènes NS1 et des anticorps de classe IgG et IgM dirigés contre la Dengue dans le sang total, le sérum ou le plasma.

Test rapide de l'antigène NS1 de la Dengue :

Le test utilise des anticorps anti-Dengue NS1 fixés au niveau de la zone de test (T) et un anticorps IgG anti-souris fixé au niveau de la zone de contrôle (C). Lorsque l'échantillon puis le tampon sont ajoutés dans le puits échantillon (S), les antigènes NS1 interagissent avec les anticorps anti-Dengue NS1 conjugués aux particules de couleur pour former un complexe anticorps-antigènes coloré. Ce complexe migre par capillarité sur la membrane jusqu'à la ligne test (T) où il sera capturé par les anticorps anti-Dengue NS1 fixés sur la membrane. Le complexe est alors piégé et forme une bande colorée qui confirme la réactivité du test. L'absence de bande colorée dans la région test indique un résultat négatif.

Test rapide de différenciation des anticorps IgM et IgG dirigés contre la Dengue :

Le test utilise des anticorps anti IgM humaines (ligne test IgM), des anticorps anti IgG humaines (ligne test IgG) et des IgG de souris (ligne contrôle (C)) immobilisés sur la bandelette de nitrocellulose. Le Conjugué (antigènes recombinants de Dengue marqué à l'or colloïdal) est également intégré à la bandelette. Lorsque l'échantillon puis le tampon sont ajoutés dans le puits échantillon (S), les anticorps IgM et/ou IgG, s'ils sont présents, se lient aux conjugués Dengue, formant des complexes anticorps-antigènes. Ces complexes migrent à travers la membrane de nitrocellulose par capillarité. Lorsque les complexes rencontrent la ligne de l'anticorps immobilisé correspondant (anticorps anti IgM humaines et/ou anticorps anti IgG humaines), les complexes sont piégés et forment une bande de couleur bordeaux qui confirme la réactivité du test. L'absence de bande colorée dans la région test indique un résultat négatif.

MATERIEL FOURNI

- 20 sachets scellés contenant chacun une cassette de test et un absorbeur d'humidité
- 1 sachet de 20 pipettes de 10µl
- 1 sachet de 20 pipettes de 30µl
- 1 flacon de tampon de 4,0 ml
- 20 lancettes
- 20 tampons d'alcool
- 1 notice d'utilisation à usage professionnel

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Réceptifs de collecte des échantillons
- Pipettes de laboratoire (si utilisation de plasma/sérum)
- Centrifugeuse (pour l'obtention de plasma)
- Minuteur

STOCKAGE ET STABILITE

Le kit peut être conservé à température ambiante ou réfrigérée (2-30°C). Ne pas congeler le kit. Le kit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le kit. Le test doit rester dans le sachet scellé jusqu'à son utilisation. NE RETIRER LE KIT DU SACHET SCÉLÉ QUE JUSTE AVANT D'EFFECTUER LE TEST.

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

- Pour un usage professionnel de diagnostic in vitro. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'emballage.
- Ne pas manger, boire ou fumer dans la zone où les échantillons ou les kits sont manipulés.
- Ne pas utiliser si le sachet scellé est endommagé ou si le tube de tampon est cassé.
- La cassette test est à usage unique. Ne réutiliser en aucun cas.
- Manipuler tous les échantillons comme s'ils contenaient des agents infectieux. Respecter les consignes de sécurité en matière de risques microbiologiques et suivre les procédures en vigueur pour l'élimination appropriée des échantillons.
- Porter des vêtements de protection tels que des blouses de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection lorsque les échantillons sont testés.
- Le matériel utilisé doit être jeté conformément à la réglementation locale.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

TROD'DENGUE® peut être réalisée à partir de sang total, de sérum ou de plasma.

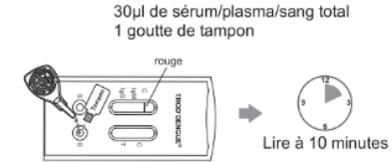
- Pour les échantillons de sang total : recueillir le sang total dans un tube de prélèvement (contenant des anticoagulants tels que l'héparine, l'EDTA et le citrate de sodium) par ponction veineuse.
- Pour les échantillons de sérum ou plasma : recueillir le sang par ponction veineuse puis séparer le sérum ou le plasma du sang dès que possible pour éviter l'hémolyse. N'utiliser que des échantillons clairs et non hémolysés.
- Pour les échantillons de sang total prélevés au bout du doigt (utilisation de la pipette fournie dans le kit) : recueillir le sang comme décrit dans la section « Procédure » ci-après.
- Les tests doivent être effectués immédiatement après le prélèvement de l'échantillon. Ne pas laisser les échantillons à température ambiante pendant de longues périodes. Les échantillons de sérum et de plasma peuvent être conservés à 2-8°C pendant 3 jours maximum. Pour un stockage à long terme, les échantillons doivent être conservés à une température inférieure à -20°C. Le sang total prélevé par ponction veineuse doit être conservé à 2-8°C si le test doit être effectué dans les 2 jours suivant le prélèvement. Ne pas congeler les échantillons de sang total. Le sang total prélevé au bout du doigt doit être testé immédiatement.
- Si les échantillons doivent être expédiés, ils doivent être emballés conformément aux réglementations locales relatives au transport des agents étiologiques.

PROCEDURE

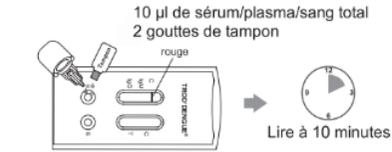
S'assurer que l'échantillon et les composants du test soient à température ambiante (15-30°C) avant de procéder au test. Retirer la cassette de la pochette scellée et juste avant d'effectuer le test.

1. Placer la cassette sur une surface propre et plane.
2. Réaliser le test comme suit, en fonction du type d'échantillon :
 - Pour les **échantillons de sang total prélevés au bout du doigt** (utilisation des pipettes de 10µl et 30µl fournies dans le kit) :
 - a) Désinfecter le bout du doigt avec le tampon d'alcool.
 - b) A l'aide de la lancette, piquer sur le côté du bout du doigt. Former une grosse goutte de sang suspendue.
 - c) Se munir de la pipette de 30µl, la tenir à l'horizontale et mettre l'extrémité de celle-ci en contact avec le sang. La pipette se remplit automatiquement. La remplir complètement.
 - d) Répéter l'opération avec la pipette de 10µl.
 - e) Prendre la pipette de 30µl contenant l'échantillon, la tenir verticalement pointée vers le bas et toucher délicatement le fond du puits échantillon (S) de droite (zone NS1) de la cassette pour la vider dans son intégralité. Ajouter immédiatement 1 goutte de tampon.
 - f) Prendre la pipette de 10µl et répéter l'opération décrite ci-dessus dans le puits échantillon (S) de gauche (zone IgG/IgM). Ajouter immédiatement 2 gouttes de tampon.
 - g) Démarrer le minuteur.
 - Pour les **échantillons de sang total veineux/sérum/plasma** :
 - a) Prélever 10µl d'échantillon de sang à l'aide d'une pipette de laboratoire puis les déposer dans le puits échantillon (S) gauche (zone IgG/IgM) de la cassette. Ajouter immédiatement 2 gouttes de tampon.
 - b) Prélever ensuite 30µl d'échantillon de sang à l'aide d'une pipette de laboratoire puis les déposer dans le puits échantillon (S) droite (zone NS1) de la cassette. Ajouter immédiatement 1 goutte de tampon.
 - c) Démarrer le minuteur.
3. Attendre que la ou les lignes colorées apparaissent.
4. Lire les résultats à 10 minutes. Ne pas interpréter le résultat après 20 minutes.

Test rapide de l'antigène NS1 de la Dengue



Test rapide de différenciation des anticorps IgM et IgG dirigés contre la Dengue



INTERPRETATION DES RESULTATS

IgM/IgG	Ag NS1	Résultat
Bleu C IgM IgG	Rouge C T	Ag NS1 positif Infection primaire aiguë probable
Bleu C Rouge IgM IgG	Rouge C T	IgM et Ag NS1 positifs Infection primaire probable
Bleu C Rouge IgM IgG	Rouge C T	IgM positif Infection primaire
Bleu C Rouge IgM IgG	Rouge C T	IgM et IgG positifs Phase de convalescence
Bleu C Rouge IgM IgG	Rouge C T	IgG positif Infection ancienne
Bleu C Rouge IgM IgG	Rouge C T	IgM, IgG et Ag NS1 positifs Infection secondaire probable
Bleu C Rouge IgM IgG	Rouge C T	IgG et Ag NS1 positifs Infection secondaire aiguë probable
Bleu C Rouge IgM IgG	Rouge C T	IgM, IgG et NS1 négatifs Pas d'infection ou phase d'incubation

INVALIDE

IgM/IgG : la ligne de contrôle (C) est toujours (même partiellement) rouge et ne passe pas complètement du rouge au bleu.
Ag NS1 : la ligne de contrôle (C) n'apparaît pas.

Un volume de tampon insuffisant ou une réalisation incorrecte sont les raisons les plus probables de l'échec de la ligne de contrôle. Revoir la procédure et la répéter avec un nouveau test. Si le problème persiste, cesser d'utiliser le kit et nous contacter.

VALEURS ATTENDUES

L'antigène NS1 de la Dengue devrait être détecté dès le premier jour après l'apparition de la fièvre et peut persister jusqu'à 9 jours dans les infections primaires et secondaires de la Dengue. Mais si des anticorps anti-NS1 sont produits, la détection de l'antigène NS1 est inhibée.

La Dengue primaire se caractérise par la présence d'anticorps IgM détectables 3 à 5 jours après le début de l'infection.

La Dengue secondaire se caractérise par l'élévation des taux d'IgG spécifiques 1 à 2 jours après le début de l'infection et, dans la majorité des cas, cette élévation s'accompagne généralement d'une élévation des taux d'IgM.

CONTROLE DE QUALITE

Contrôle qualité interne

Un contrôle qualité interne est inclus dans le test.

L'apparition d'une ligne rouge contrôle (C) pour le test Ag NS1 et le passage de la ligne contrôle (C) du rouge au bleu pour le test IgM/IgG confirme que la procédure de test a été correctement suivie.

LIMITES

- TROD'DENGUE® est destiné à un usage de diagnostic in vitro. Il doit être utilisé pour la détection de l'antigène NS1 du virus de la Dengue et des anticorps IgM/IgG dirigés contre le virus de la Dengue dans les échantillons de sang, de sérum ou de plasma uniquement. Ce test qualitatif ne permet pas de déterminer la valeur quantitative ni le taux d'augmentation de l'antigène NS1 du virus de la Dengue.
- Le non-respect de la procédure de test peut nuire à la performance du test et/ou invalider le résultat du test.
- La réactivité sérologique croisée entre les flavivirus (Dengue 1, 2, 3 et 4, encéphalite de Saint-Louis, virus du Nil occidental, encéphalite japonaise et virus de la fièvre jaune) est fréquente.
- Si le résultat du test est négatif et que les symptômes cliniques persistent, il est recommandé de procéder à des tests supplémentaires en utilisant d'autres méthodes cliniques. Un résultat négatif n'exclut à aucun moment la possibilité d'une infection par le virus de la Dengue.

PERFORMANCES

Performance clinique

Test rapide de l'antigène NS1 de la Dengue

Les échantillons obtenus à partir d'une population d'individus symptomatiques et asymptomatiques. Les résultats ont été confirmés par un test ELISA de référence.

Méthode	Test de référence			Total
	Résultats	Positif	Négatif	
TROD'DENGUE®	Positif	66	4	70
	Négatif	3	226	229
	Résultats totaux	69	230	299

Sensibilité relative : 95,7 %

Spécificité relative : 98,3 %

Précision : 97,7 %

Test rapide de différenciation des anticorps IgM et IgG dirigés contre la Dengue

Les échantillons proviennent d'une population d'individus symptomatiques et asymptomatiques. Les résultats ont été confirmés par un test ELISA de référence.

Infection par la Dengue	Résultat	IgM	IgG
Infection primaire	Positif	14	0
	Négatif	3	17
	Total	17	17
	Sensibilité relative	82,4 %	0 %
Infection secondaire	Positif	39	55
	Négatif	16	0
	Total	55	55
	Spécificité relative	70,9 %	>99,0 %
Infection autre que la Dengue	Positif	0	0
	Négatif	378	378
	Total	378	378
	Spécificité relative	>99,0 %	>99,0 %

Pour les infections primaire et secondaire, la sensibilité globale est de 95,8 %, la spécificité globale est >99,0 % et la précision globale est de 99,3 %.

Limite de détection (LOD)

La concentration minimale détectable d'antigène NS1 est 0,1ug/ml.

Les seuils de positivité pour la détection des anticorps IgG et IgM sont de :

- 1/32 pour les anticorps IgG
- 1/8 pour les anticorps IgM

Dilution IgG	Test rapide marqué CE	TROD'DENGUE®
	Positif /Total	Positif /Total
1/2	2/2	10/10
1/4	2/2	10/10
1/8	2/2	10/10
1/16	2/2	10/10
1/32	2/2	10/10
1/64	0/2	0/10
1/128	0/2	0/10

Dilution IgM	Test rapide marqué CE	TROD'DENGUE®
	Positif /Total	Positif /Total
1/2	2/2	10/10
1/4	2/2	10/10
1/8	2/2	10/10
1/16	0/2	0/10
1/32	0/2	0/10
1/64	0/2	0/10
1/128	0/2	0/10

Les résultats montrent que la sensibilité analytique du test est identique au test rapide marqué CE utilisé en comparaison.

Interférences

Les substances listées dans le tableau ci-dessous ont été testées :

Analyte	Concentration
4-Acetamidophenol	1mg/ml
Acide acétylsalicylique (Aspirine)	0.2mg/ml
Bilirubine	0.3mg/ml
Acide gentisique	0.2mg/ml
Phénothiazine	0.2mg/ml
Acide ascorbique	0.2mg/ml
EDTA	0.2 mg/ml
Hémoglobine	10 mg/ml
Acide oxalique	0.2mg/ml
Créatine	1mg/ml
Ethanol	1%
Méthanol	1%

Les résultats n'ont montré aucune interférence.

Précision

Intra-lot : 9 échantillons (un négatif IgG/IgM, un IgG positif faible, un IgG positif fort, un IgM positif faible, un IgM positif fort, un IgG/IgM positif d'un côté et un négatif NS1, un NS1 positif faible, un NS1 positif fort de l'autre) ont été testés 10 fois sur 3 lots différents. Les résultats ont tous été corrects.

Intra-lot : 9 échantillons (un négatif IgG/IgM, un IgG positif faible, un IgG positif fort, un IgM positif faible, un IgM positif fort, un IgG/IgM positif d'un côté et un négatif NS1, un NS1 positif faible, un NS1 positif fort de l'autre) ont été testés 5 fois sur 3 lots différents et pendant 4 jours. Les résultats ont tous été corrects.

Réactions croisées

Des échantillons contenant les substances listées ci-dessous ont été testés.

Echantillons
Sérum de femme enceinte
Ag HBs positif
HIV positif
RF positif
Syphilis positif
HCV positif
HAV positif
AFP positif
H. Pylori positif
PSA positif
Troponine I positif

Les résultats n'ont montré aucune réaction croisée.

BIBLIOGRAPHIE

- Pryor MJ., Wright PJ. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by Dengue virus. *Virology* 1993; 194:768-80
- Makino Y., et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. *Microbiol Immunol.* 1994; 38(12): 951-5.
- 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
- Alcon S., Talamin A., Debryne M., Falconar A., Deubel V., Falmand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 non structural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40.2:376-381.
- Shu, P., Huang, J. Current advances in Dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004 Jul; 11(4):642-50

LÉGENDE DES SYMBOLES

	Lire la notice d'utilisation		Date de péremption
	Pour usage de diagnostic <i>in vitro</i> uniquement		Numéro de Lot
	A conserver entre 2 et 30°C		Nombre de tests par kit
	Fabricant		Référence
	Ne pas réutiliser		Marquage CE

AAZ-LMB
43, rue de Bellevue
92100 Boulogne-Billancourt - France