



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A. N. M. A. T

DISPOSICIÓN Nº 5664

BUENOS AIRES 15 JUL 2015

VISTO, el expediente nº 1-47-3110-642/14-7 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones la firma CROMOION S.R.L solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in Vitro" denominado DENV DETECT™ NS1 ELISA/ SISTEMA DE ENSAYO ELISA, DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO NS1 DEL VIRUS DEL DENGUE EN SUERO HUMANO.

Que a fs. 194 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que el producto reúne las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que la Dirección Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establece la Ley 16.463, Resolución Ministerial Nº 145/98 y Disposición A N M A T Nº 2674/99.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Artículo 8º inciso 11) del Decreto Nº 1490/92 y 1886/14.



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A. N. M. A. T

DISPOSICIÓN N°

5 6 6 4

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACION NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MÉDICA

D I S P O N E:

ARTICULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in Vitro" denominado DENV DETECT™ NS1 ELISA/ SISTEMA DE ENSAYO ELISA, DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO NS1 DEL VIRUS DEL DENGUE EN SUERO HUMANO que será elaborado por INBIOS INTERNATIONAL, INC. 562 1st Avenue South, Suite 600. Seattle, WA 98104. (USA) e importado por CROMOION S.R.L a expendirse en ENVASES PARA 96 DETERMINACIONES CONTENIENDO: TIRAS DE MICROTITULACIÓN (12 x 8 pocillos), CONTROL NEGATIVO (1 vial x 300 µl), CONTROL POSITIVO (1 vial x 300 µl), CONTROL DE VALOR DE CORTE (1 vial x 300 µl), DILUYENTE DE MUESTRA (1 vial x 15 ml), CONJUGADO 100x (1 vial x 150 µl), DILUYENTE DE CONJUGADO (1 vial x 12 ml), BUFFER DE LAVADO 10x (1 x 120 ml), SUSTRATO TMB LÍQUIDO (1 vial x 12 ml) Y SOLUCIÓN DE CORTE (1 vial x 6 ml);cuya composición se detalla a fojas 30 a 31 con un período de vida útil de 12 (DOCE) meses desde la fecha de elaboración conservado entre 2 y 8°C.

ARTICULO 2º.- Acéptense los rótulos y manual de instrucciones obrantes a fojas 43 a 48, y 158 a 193, desglosándose las fojas 47 a 48 y 160 a 171 debiendo



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A. N. M. A. T.

DISPOSICIÓN N° 5 6 6 4

constar en los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTICULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA, se reserva el derecho de reexaminar los métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo determinen.

ARTICULO 5º.- Regístrese; gírese a Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por el Departamento de Mesa de Entradas notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con la copia de los proyectos de rótulos, manual de instrucciones y el Certificado correspondiente. Cumplido, archívese.-

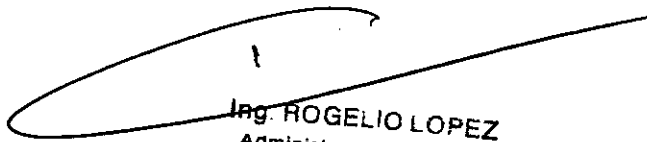
Expediente nº: 1-47-3110-642/14-7.

DISPOSICIÓN N°: 5 6 6 4

av.

A

f


Ing. ROGELIO LOPEZ
Administrador Nacional
A.N.M.A.T.



RÓTULOS INTERNOS

Tiras de microtitulación recubiertas
para DENV Detect NS1, 96 pocillos

Lote N°:

Fecha de expiración:

Parte N°:

Almacenar a 2-8°C

InBios

5664
15 JUL 2015

Buffer de dilución de muestra
Para DENV Detect NS1 ELISA, 15 ml

Lote N°:

Fecha de expiración:

Parte N°:

Almacenar a 2-8°C

InBios

Control Negativo
DENV Detect NS1 ELISA

300 ul

Lote N°:

Fecha de expiración:

Parte N°:

Almacenar a 2-8°C

InBios

Control Positivo
DENV Detect NS1 ELISA

300 ul

Lote N°:

Fecha de expiración:

Parte N°:

Almacenar a 2-8°C

InBios

Control Valor de corte
DENV Detect NS1 ELISA

300 ul

Lote N°:

Fecha de expiración:

Parte N°:

Almacenar a 2-8°C

InBios

Bloq. Hernán Sialino
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CERESION S.R.L.



5664

Conjugado 100 X
DENV Detect NS1 ELISA
150 ul
Lote N°:
Fecha de expiración:
Parte N°:
Almacenar a 2-8°C
InBios

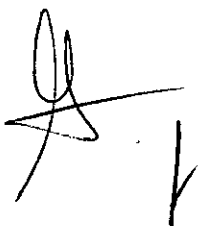
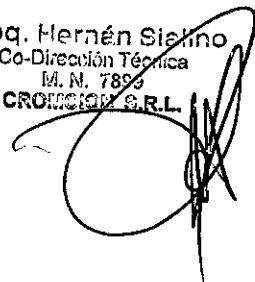
Diluyente de Conjugado para
DENV Detect NS1 ELISA
12 ml
Lote N°:
Fecha de expiración:
Parte N°:
Almacenar a 2-8°C
InBios

Buffer de lavado 10X, 120 ml
Lote N°:
Fecha de expiración:
Parte N°:
Almacenar a 2-8°C
InBios

Sustrato líquido TMB, 12 ml
Lote N°:
Fecha de expiración:
Parte N°:
Almacenar a 2-8°C
InBios

Solución de freno, 6 ml
Lote N°:
Fecha de expiración:
Parte N°:
Almacenar a 2-8°C
InBios

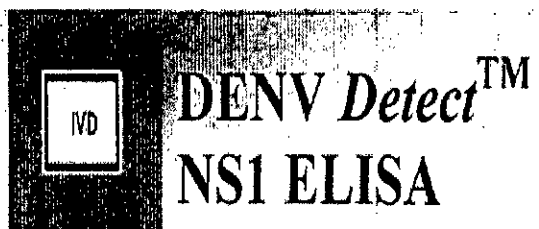
Bloq. Hernán Stelino
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CRONCION S.R.L.





ROTULOS EXTERNOS



5664




InBios
 International,
 Inc.
 562 1st Ave. S
 Suite 600
 Seattle, WA
 98104
 USA
 206-344-5821
 www.inbios.com

REF DNS1-1 LOT XX0000 0000 00'0000

 Store at 2-8°Celsius


CE   CE part no. 1, Esdaornlaan 15
 3951DB Maarn, The Netherlands



IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR: CROMOION S.R.L.
 Obispo 5125 (C1408CEA) C.A.B.A. - Argentina
 Tel./Fax (011) 4844-3205/06
 Legajo empresa: 939
 Directora Técnica: Dra. Cecilia Amaboldi
 Producto Médico - Venta exclusiva a Laboratorios de Análisis Clínicos
 Uso Diagnóstico In Vitro

Certif. / PM:

Autorizado por la ANMAT
 Ministerio de Salud - República Argentina
 VER INSTRUCCIONES DE USO


 Bloq. Hernán Stalino
 Co-Dirección Técnica
 M. N. 7899
 CROMOION S.R.L.



InBios

DENV DETECT™ NS1 ELISA
Para Uso Diagnóstico in vitro

5664

No apto para uso y distribución en USA

USO A QUE ESTA DESTINADO

El DENV Detect™ NS1 ELISA para la detección del virus del Dengue (DENV) es un sistema de ensayo ELISA, para la detección de antígeno NS1 en suero humano. Este ensayo ayudará en el diagnóstico precoz del virus del Dengue en suero humano, aún antes de la presencia de anticuerpos IgM o IgG. Este ensayo no está diseñado para el screening de la sangre o de los componentes de la sangre y es sólo para uso diagnóstico in vitro. No es apto para la venta o distribución en USA.

RESUMEN Y EXPLICACION DEL ENSAYO

El dengue es una enfermedad viral aguda del hombre, la cual se transmite por el mosquito *Aedes aegypti*. El dengue se caracteriza clínicamente por fiebre bifásica, erupción, depresión hematopoyética y por síntomas inespecíficos, como malestar, artralgia, mialgia y cefaleas (1). Con menor frecuencia, se ven cuadros más graves, que se manifiestan a través de una fiebre hemorrágica que puede ser mortal (2, 3). Es endémico en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, donde se calcula que anualmente se producen 100 millones de casos (4). Se estima que cerca de 50 a 100 millones de casos de Fiebre a Dengue (DF) ocurren cada año, con cerca de 250.000 a 500.000 casos de Fiebre hemorrágica a dengue (DHF). Durante el 2002, más de 30 países latinoamericanos reportaron más de 10.000.000 de casos de Fiebre a Dengue (DF), con una gran cantidad de casos de DHF. Esto siguió con extensas epidemias de DHF en varias partes de la India durante el año 2003 hasta el 2005. En las Américas, la incidencia reportada se triplicó desde el año 1996 al 2002. También en Hawai (5) y en Laredo, Texas, se constataron brotes epidémicos de dengue. El potencial del virus en cuanto a causar una enfermedad grave resultó también en la inclusión de este patógeno, en la lista de "categoría A" del CDC, para potenciales agentes de guerra biológica y para el bioterrorismo.

La proteína Dengue NS1 (no estructural) es una proteína hexamérica secretada. Esta juega un rol en la replicación del RNA viral. Es fuertemente inmunogénica, y produce anticuerpos con actividad de fijación de complemento. El antígeno NS1 puede detectarse en la sangre circulante durante una infección aguda de Dengue. El Dengue Detect NS1 ELISA detecta el antígeno NS1 en muestras de suero, casi inmediatamente después de la infección.

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El DENV Detect™ NS1 ELISA es un ensayo altamente sensible, rápido y confiable. Este utiliza un inmunoensayo de tipo sándwich "en dos etapas", amplificado enzimáticamente para detectar niveles bajos de NS1 en suero. En este ensayo, los controles y las muestras de suero desconocidas se diluyen en un buffer de dilución de muestras, que contiene anticuerpos secundarios, y se incuban en pocillos de microtitulación. Estos pocillos fueron recubiertos con un anticuerpo NS1 altamente efectivo. Posteriormente los antígenos NS1 presentes en la muestra forman un "sándwich", con los anticuerpos de captura y los secundarios. La presencia del antígeno NS1 se confirma mediante una respuesta colorimétrica utilizando un conjugado enzimático de peroxidasa de rábano y un sustrato de TMB líquido. Una vez que se detiene la reacción, usando una solución ácida, la transformación enzimática del sustrato se determina mediante la medición de absorbancia a 450 nanómetros. Los valores obtenidos para los sueros positivo y negativo sirven como guía para determinar si la muestra contiene antígeno NS1.

Nota: Se proporciona un juego de controles positivos, negativos y de valor de corte como controles internos, a fin de monitorear la integridad de los componentes del equipo.

MATERIALES PROVISTOS

El equipo DENV Detect™ NS1 ELISA contiene reactivos suficientes para una placa de 96 pocillos (12 x 8 tiras) cada uno.

Precaución: No use ningún reactivo si ocurrió daño en el envase.

El equipo contiene los siguientes reactivos:

Materiales provistos para el DENV Detect NS1™ ELISA:

1. Tiras de microtitulación recubiertas para NS1 del Dengue: soporte para tiras ELISA en envase ziplock, que contiene 96 pocillos de microtitulación de poliestireno. Almacene a 2-8°C hasta su vencimiento.

5664



2. Control Negativo de NS1 del dengue (1 x 300 ul): El control negativo ayudará en la verificación de la validez del kit. Almacene entre 2-8°C hasta la fecha de vencimiento. Centrifugue brevemente antes de usar, para que sedimente cualquier precipitado.
3. Control Positivo de NS1 del Dengue (1 x 300 ul): El control positivo ayudará en la verificación de la validez del kit. Almacene entre 2-8°C hasta la fecha de vencimiento. Centrifugue brevemente antes de su uso, para que sedimente cualquier precipitado.
4. Control de Valor de corte de NS1 del Dengue (1 x 300 ul): El control de valor de corte ayudará en la determinación del valor de corte del ELISA. Almacene entre 2-8°C hasta la fecha de vencimiento. Centrifugue brevemente antes de usar, para que sedimente cualquier precipitado.
5. Diluyente de muestra de NS1 del Dengue (1 x 15 ml): Esta solución contiene el anticuerpo secundario. Contiene Proclin (0.02 -0.03 %) como conservante. Almacene a 2-8°C hasta la fecha de vencimiento.
6. 100 x de Conjugado NS1 del Dengue (1 x 150 ul): Contiene anticuerpo policlonal marcado con peroxidasa de rábano. Mezcle bien antes de usar. Almacene entre 2-8°C hasta la fecha de vencimiento.
7. Diluyente de conjugado de NS1 del Dengue (1 x 12 ml): Contiene la solución diluyente para el Conjugado 100 x. El conjugado 100 x se diluye directamente dentro de esta solución. Después de diluir el Conjugado 100 x en esta solución, el conjugado listo para usar se puede almacenar durante 2 semanas, entre 2-8°C, antes de descartarse. Almacene hasta la fecha de vencimiento, entre 2-8°C.
8. Buffer de lavado 10 X: Una botella, 120 ml de buffer de lavado para utilizar según lo indicado en el procedimiento de ensayo. Almacene a 2-8°C hasta la fecha de vencimiento.
9. Sustrato TMB líquido (1 x 12 ml): Para utilizar según lo indicado en el procedimiento de ensayo. Almacene a temperatura ambiente hasta la fecha de vencimiento.
10. Solución de corte (1 x 6 ml): Se utiliza para terminar la reacción, como se indica en el procedimiento de ensayo. Almacene a temperatura ambiente hasta la fecha de vencimiento.
Precaución: Es un ácido fuerte. Utilice guantes de protección, mascarilla y gafas de seguridad. Descarte todos los materiales de acuerdo a las normas y regulaciones de seguridad.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROVISTOS

- Espectrofotómetro de ELISA capaz de la medición de absorbancia a 450 nm.
- Agua de alto grado de calidad o biológica.
- Bomba de vacío.
- Lavador de placas automático.
- Incubador de 37°C.
- Pipetas de canal único de 1-10 ul, pipetas de canal único y multicanal de 50-200 ul.
- Tubos de polipropileno o placas de dilución de 96 pocillos.
- Parafilm.
- Reloj Timer.
- Vórtex.

PRECAUCIONES

- Sólo para uso diagnóstico in vitro. No para la venta o distribución en USA.
- Todos los materiales de fuente humana utilizados en la preparación de los controles dieron resultado negativo para los anticuerpos contra el VIH 1 y 2, Hepatitis C y antígeno de superficie de hepatitis B. Sin embargo, ningún método asegura el 100 % de eficacia. Por lo tanto, todos los controles humanos y el antígeno deberían manipularse como materiales potencialmente infecciosos. El Centro de Control de Enfermedades y el Instituto Nacional de Salud recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos se manipulen en un nivel de bioseguridad 2.
- Se requiere una comprensión del inserto de este envase para un uso adecuado del producto.
- Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas y siguiendo el prospecto minuciosamente.

Bioq. Hernán Sialind
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.

5664



- No mezcle diversos lotes de los componentes del kit en un ensayo individual.
- No use componentes fuera de la fecha de vencimiento, indicada en el rótulo.
- Evite la exposición de los reactivos al calor excesivo o a la luz solar directa durante el almacenamiento e incubación.
- Algunos reactivos pueden generar pequeños sedimentos. Por lo tanto, mézclelos suavemente antes de su uso.
- Un lavado insuficiente afectará adversamente el resultado y la precisión del ensayo.
- Para minimizar un posible desvío del ensayo debido a la variación del tiempo de incubación del sustrato, tenga cuidado de adicionar la solución stop en los pocillos, en el mismo orden y a la misma velocidad utilizados para adicionar la solución de TMB.
- Para el ensayo del NS1, evite la contaminación de los reactivos, especialmente del Conjugado enzimático HRP listo para usar. Evite la contaminación de la solución de sustrato TMB con el conjugado enzimático HRP.
- Use ropa de protección, protectores oculares y guantes descartables mientras se realiza el ensayo. Lávese las minuciosamente cuando termine el ensayo.
- Utilice una punta de pipeta limpia descartable para cada reactivo, estándar, control o muestra.
- Cubra el área de trabajo con un papel absorbente descartable.

CUIDADO: Material potencialmente peligroso

Este equipo contiene reactivos realizados con suero humano o plasma. El suero o plasma utilizados fueron inactivados por calor, salvo indicación de lo contrario. Manipule los sueros y equipos usados como si contuvieran agentes infecciosos. Al realizar todos los procedimientos, siga las precauciones establecidas para los peligros biológicos y los procedimientos estándares para la eliminación adecuada de las muestras.

PELIGRO QUÍMICO

Las Hojas de Datos de Seguridad de Materiales (MSDS) están disponibles para todos los componentes de este equipo. Revise todas las MSDS pertinentes antes de realizar el ensayo. Evite el contacto entre las manos y los ojos ó las mucosas durante el ensayo. En caso de existir contacto, consulte la MSDS aplicable para el tratamiento correspondiente.

RECOLECCION Y PREPARACION DE MUESTRA

- En esta prueba se debe usar suero humano. Los reactivos no han sido optimizados o ensayados con sangre entera o plasma, de modo que no se pueden someter a pruebas directamente.
- Retire el suero del coágulo de eritrocitos, con la mayor brevedad posible, para evitar la hemólisis.
- El ensayo debe realizarse tan pronto como sea posible después de la recolección. No deje el suero a temperatura ambiente por períodos prolongados.
- Se debe usar suero y seguir las precauciones habituales para la punción venosa. Las muestras se deben almacenar a 2-8°C hasta 7 días, ó congelarse a -20°C ó menos por hasta 30 días. Para que la vida media del suero sea prolongada, almacene a -70°C. Evite el congelamiento y el descongelamiento reiterado de las muestras.
- Las muestras congeladas se deben descongelar a temperatura ambiente y mezclarse completamente por rotación suave o inversión antes de su uso. Siempre gírelas rápidamente antes de su uso.
- Si el suero debe transportarse, debería envasarse según las regulaciones federales para el transporte de agentes infecciosos.
- No use sueros si observa alguna indicación de contaminación.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Precaución: Este equipo no fue optimizado por InBios, para su uso con cualquier sistema de procesamiento ELISA automatizado. Para usarlo con un sistema de procesamiento ELISA automatizado requerirá una validación apropiada que asegure que los resultados son equivalentes a las tolerancias de aceptación

Bloq. Hernán Sialino
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.

descriptas en el inserto del envase. Pueden requerirse modificaciones al protocolo de estos sistemas y/o diferentes volúmenes de los reactivos.

5664



Permita que todos los reactivos y las muestras se lleven a temperatura ambiente (aprox. 25°C) antes de su uso. Mezcle bien los reactivos y las muestras antes de su uso, realizando una suave inversión.

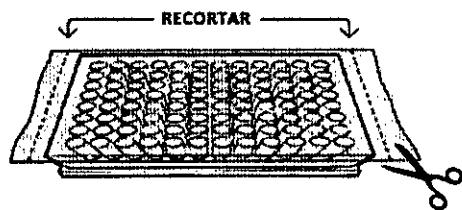
Preparación de los reactivos:

- **Preparación del Buffer de lavado 1 X**
Diluya el Buffer de lavado 10 X a 1 X, usando agua de alto grado de calidad o de calidad biológica. Para preparar una solución buffer de lavado 1 x, mezcle 120 ml de buffer de lavado 10 x con 1080 ml de agua destilada (o desionizada). Mezcle muy bien para asegurar que se disuelva cualquier precipitado y que la solución sea uniforme. Una vez diluida a 1 x, la solución puede almacenarse a temperatura ambiente hasta 6 meses. Antes de usar, verifique que no esté contaminada. Descarte si sospecha su contaminación.
- **Pocillos de microtitulación**
Seleccione el número de pocillos recubiertos requeridos para el ensayo. El resto de pocillos no utilizados deberían volverse a guardar inmediatamente con el desecante provisto y almacenarse a 2-8°C hasta que estén listos para usar o hasta su vencimiento.
- **Preparación de la Solución de conjugado**
Adicione 120 ul de Conjugado 100 x para Dengue NS1 ELISA directamente a la botella de 12 ml de Diluyente de Conjugado de NS1 (1 parte: 100 partes). Mezcle por inversión de la solución varias veces. Esta solución puede almacenarse hasta 2 semanas si se conserva entre 2 y 8°C. Después de 2 semanas, esta solución del conjugado debería descartarse y no utilizarse en este ensayo.

Procedimiento de ensayo:

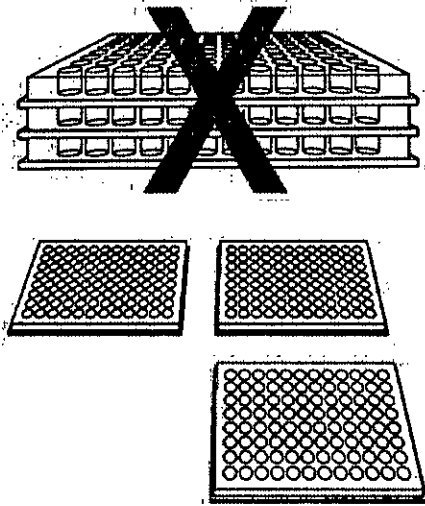
1. Los controles positivo, negativo y de valor de corte deberían ensayarse por duplicado (ejecútelos cada vez que el ensayo se lleve a cabo en cada placa). Las muestras de suero desconocidas se deben probar en un pocillo único (sin embargo se recomienda realizar las muestras por duplicado hasta que el operador se familiarice con el ensayo). En cada placa se pueden ensayar 90 muestras de prueba en un pocillo único.
2. Usando una pipeta de un canal único o multicanal, alicuote 50 ul de diluyente de muestra para Dengue NS1 ELISA, en cada uno de los pocillos necesarios.
3. Adicione 50 ul de cada suero sin diluir (muestras de prueba y muestras control) directamente en el centro de los pocillos que contienen el diluyente de muestra. Agite la placa suavemente de lado a lado, 5 veces.
4. Cubra la parte superior de la placa con parafilm y retire el exceso.

Nota: Este procedimiento se realiza para asegurarse de que la distribución de la temperatura es homogénea para todos los pocillos desde la parte inferior y laterales. Todo parafilm adicional puede retirarse una vez que la parte superior se encuentre sellada, a fin de evitar la evaporación.



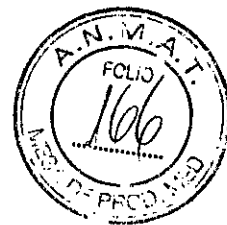
Nota: no apile las placas una encima de la otra. Se deben distribuir como una capa única. Esto es muy importante para lograr una distribución homogénea de la temperatura. No utilice CO2 u otros gases. No coloque las placas en contacto con ninguna sustancia húmeda, como toallas de papel húmedas, etc.

Bldg. Hernán Galino
Co-Dirección Técnica
M. N. 7898
CREMION S.R.L.



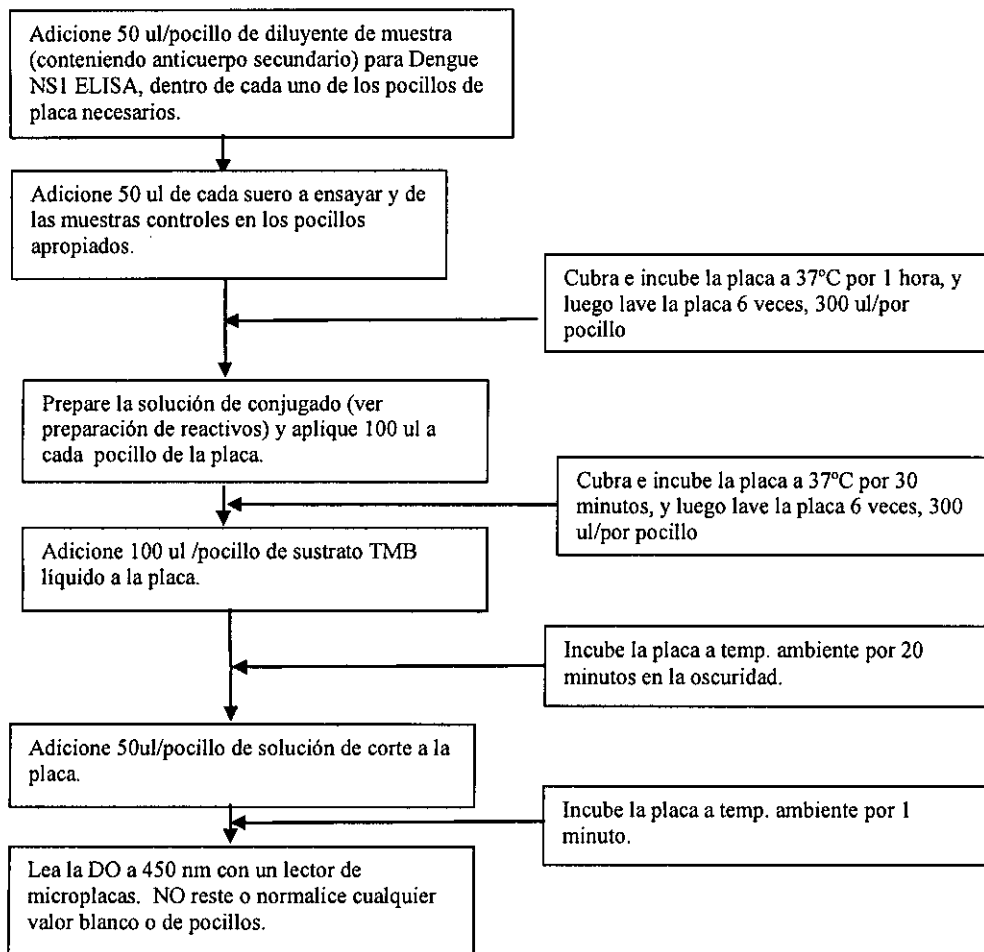
MÉTODO CORRECTO

5. Incube la placa a 37°C durante 1 hora en una incubadora.
6. Después de la incubación, lave la placa 6 veces con un lavador de placas automático usando un buffer de lavado 1 x. Use 300ul por pocillo en cada ciclo de lavado.
7. Prepare la solución del conjugado (120 ul de Conjugado 100 x: 12 ml de diluyente de conjugado) y adicione 100 ul por pocillo de esta solución del conjugado dentro de todos los pocillos, utilizando una pipeta multicanal. Descarte la solución de conjugado restante o almacénela hasta 2 semanas a 2-8°C.
8. Cubra la placa con parafilm, según se indica más arriba, e incube a 37°C durante 30 minutos en una incubadora.
9. Después de la incubación, lave la placa 6 veces con el lavador de placas automático utilizando el buffer de lavado 1 x.
10. Adicione 100 ul por pocillo de sustrato TMB líquido dentro de los pocillos usando la pipeta multicanal.
11. Incube la placa en la oscuridad y a temperatura ambiente por 20 minutos.
12. Adicione 50 ul por pocillo de la solución de corte dentro de todos los pocillos usando una pipeta multicanal y deje descansar la placa sin cubrirla a temperatura ambiente durante 1 minuto.
13. Lea la densidad óptica a 450 nm (DO₄₅₀) con un lector de microplacas. No sustraiga o normalice cualquier valor blanco o de pocillos. **NO RESTE NI NORMALICE LOS POCILLOS O VALORES BLANCO.**
14. Registre la DO₄₅₀ sin procesar y evalúe el estado de la muestra, según lo indicado en la sección de control de calidad.



5664

Flujograma de procedimiento del DENV Detect™ NS1 ELISA



CONTROL DE CALIDAD

Cada kit contiene muestras control positivas, negativas y de valor de corte. Se debe obtener una capacidad de discriminación aceptable ($R_{PC/NC}$) para asegurar la validez del ensayo. Los controles negativos y positivos están diseñados para monitorear cualquier falla sustancial de los reactivos. El control positivo no garantiza la precisión del valor de corte del ensayo. El ensayo es inválido y debe ser repetido si el valor ($R_{PC/NC}$) es demasiado bajo ó si las muestras controles no están dentro de las especificaciones. Si el ensayo es inválido, los resultados no pueden utilizarse. Se deben cumplir los requerimientos de control de calidad en conformidad con las regulaciones federales, estatales y locales o con los requisitos de acreditación y según los procedimientos de control de calidad estándares de su laboratorio. Se recomienda que el usuario consulte la norma NCCLS C24-A y 42 CFR 493.1256, como guía de las prácticas de control de calidad apropiadas. Los resultados a continuación se proporcionan estrictamente sólo a efectos informativos y son aplicables para lecturas espectrofotométricas únicamente.

En primer lugar calcule el ($R_{PC/NC}$) según se indica en el ejemplo.

Ejemplo

Calcule la Media del control negativo (NC):

Ejemplo: DO del Control Negativo

Nº1 0.108

Nº2 0.084

Total 0.192

Promedio del Control Negativo = $0.192 / 2 = 0.096$

Bloq. Hernán Sisto
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.



5664

Calcular la Media del control positivo (PC):

Ejemplo: DO del Control Positivo

Nº1 1.112

Nº2 1.089

Total 2.201

Promedio del Control Positivo = $2.201 / 2 = 1.101$

Cálculo del radio (R_{PC/NC}) entre el Control Positivo y Negativo:

Ejemplo: $(R_{PC/NC}) = 1.101 / 0.096 = 11.47$

A continuación, asegúrese de que se cumplan los requerimientos de control de calidad enumerados en la siguiente tabla.

Requerimientos de Control de Calidad

Control	Requerimiento
Muestra positiva	$DO \geq 0.5$
Muestra negativa	$DO < 0.2$
Muestra de valor de corte	$DO > \text{Muestra Negativa}$
$R_{PC/NC}$	≥ 8

Resumen:

Los resultados de la tabla anterior deben obtenerse para que el ensayo se considere válido. El incumplimiento de estos criterios es una indicación de deterioro de los reactivos o de un error en el procedimiento de la prueba; por lo tanto se debe repetir el ensayo.

CALCULOS DEL ENSAYO

El estado de la muestra desconocida se determina realizando, en primer lugar, el cálculo del valor de corte del ensayo, seguido del cálculo de la relación de la densidad óptica (D450) dividida por el valor de corte.

Cálculo del valor de corte: el valor de corte se calcula en base al promedio de los valores de DO obtenidos a partir de la muestra de control del valor de corte.

Ejemplo

Calcule la Media del Control de valor de corte:

Ejemplo: DO del Control Valor de Corte

Nº1 0.152

Nº2 0.189

Total 0.341

Promedio del Control de Valor de Corte = $0.341 / 2 = 0.171$

Ejemplo de valor de corte: 0.171

Nota: se recomienda verificar el valor de corte, usando sueros de poblaciones geográficamente relevantes.

Calcule la relación del Estado Inmune (ISR): La relación del estado inmune (ISR) se calcula de la relación de la densidad óptica (DO) obtenida con la muestra de ensayo dividida por el valor de corte calculado. Calcule el ISR para cada muestra a ensayar.

Ejemplo

Calcule el ISR para cada muestra:

Ejemplo: DO de la muestra

DO de la muestra: 0.431

ISR de la muestra: DO de la muestra / el valor de corte

ISR de la muestra = $0.431 / 0.171 = 2.52$

Blaq. Hernán Stalno
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.



5664

Tabla de interpretación de muestra

Estado de la muestra	ISR
Muestra Positiva	≥ 1
Muestra Negativa	< 1

Cálculo del valor de corte: Los sueros control endémicos no fueron usados para el cálculo del valor de corte. Se recomienda verificar el valor de corte, utilizando sueros de poblaciones geográficamente relevantes.

Interpretación de los resultados: Los valores de DO \geq al valor de corte (Valores ISR ≥ 1) se considerarán positivos para la presencia de antígeno NS1 circulante. Los sueros con valores de DO cercanos al valor de corte ($1.1 > \text{ISR} > 0.9$) deberían ser repetidos en duplicado para verificar el estado de la muestra.

LIMITACIONES

- Ya que este es un método de screening indirecto, se debe considerar la presencia de resultados falsos positivos y negativos.
- Todas las muestras reactivas deben evaluarse mediante un ensayo confirmatorio.
- Los reactivos provistos en este equipo están optimizados para medir los niveles de Dengue NS1 en muestras de suero.
- La reactividad serológica cruzada a través del grupo flavivirus es común. Algunos sueros de pacientes infectados con los virus de la Encefalitis Japonesa, del Oeste del Nilo y/o de San Luis pueden dar resultados falsos positivos. Por lo tanto cualquier suero positivo para Dengue debe ser confirmado con otros ensayos.
- Las características de performance del ensayo no han sido establecidas para la determinación visual de los resultados.
- Los resultados de pacientes inmunodeprimidos deben interpretarse con precaución.
- Los resultados del ensayo deberían ser interpretados solo en el contexto de otros hallazgos de laboratorio y del estado clínico general del paciente.
- Niveles altos de triglicéridos ($> 3000 \text{ mg/dl}$) parecen disminuir los valores observados de ISR.
- Niveles de hemoglobina ($> 1600 \text{ mg/dl}$) parecen afectar algunas muestras de pacientes mediante la disminución de los valores de ISR.

CARACTERISTICAS DE PERFORMANCE

Estudio de Sensibilidad:

Un panel de 50 sueros confirmados de Dengue se ensayó en un sitio clínico del sudeste de Asia. De las 50 muestras PCR positivas confirmadas, 44 fueron positivas con el INBios DENV Detect NS1 ELISA, arrojando una concordancia porcentual positiva (PPA) del 88 % (Intervalo de confianza del 95 %: 76.2 % - 94.4%). Los 4 serotipos de Dengue fueron representados en estas muestras clínicas y el equipo de DENV Detect NS1 ELISA fue capaz de detectar las muestras positivas entre todos los cuatro serotipos.

Tabla: PPA usando muestras PCR negativas confirmadas

DENV Detect™ NS1	Negativo PCR confirmado
≠ Positivo	44
≠ Negativo	6
PPA	88 % (76.2 % - 94.4 %) \cong
Media de los días post inicio de la enfermedad	4.1

\cong 95 % intervalo de confianza, Método Score Wilson.

Estudio de Especificidad

53 muestras negativas confirmadas por PCR se evaluaron en el mismo centro clínico en el sudeste asiático que también ensayó las muestras positivas confirmadas por PCR. Las 53 muestras negativas para PCR se confirmaron negativas por el equipo DENV Detect™ NS1 ELISA. Esto implica un porcentaje de concordancia negativo (NPA) del 100 % (95% intervalo de confianza: 76.2 % -100 %). Los resultados de este estudio se resumen a continuación.

Tabla: NPA usando muestras negativas confirmadas por PCR

Bloq. Hernán Sialino
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.

5664



DENV Detect NS1 ELISA	PCR Negativo Confirmado
≠ Positivo	0
≠ Negativo	53
NPA	100 % (93.2% - 100 %) ≅

≅ 95 Intervalo de confianza, Método Wilson Score.

Los estudios de especificidad internos fueron realizados con el equipo DENV Detect NS1 ELISA, usando un panel de 22 sueros humanos normales (NHS) y 10 muestras IgM positivas a Virus del Nilo Occidental. Todas las 32 muestras fueron confirmadas negativas en este estudio. Los resultados se resumen a continuación.

Muestras	≠ de Muestras	≠ de Muestras Positivas	≠ de Muestras Negativas
NHS	22	0	22
WNV	10	0	10
NPA 100 %			

Estudio de Reproducibilidad:

El estudio de reproducibilidad del equipo DENV Detect NS1 ELISA se realizó en 3 sitios diferentes, por 2 individuos diferentes (6 operadores en total) y en 5 días consecutivos. Se ensayaron idénticos paneles de muestras por triplicado, usando el mismo lote de DENV Detect NS1 ELISA. El estudio se llevó a cabo en InBios International, Inc., Estado de Florida Dept. de Salud Bureau de los Laboratorios de Virología en Jacksonville, Florida y Seattle based Washington Primate Center. Todos los ensayos fueron realizados de acuerdo al inserto del producto. Se usaron 4 muestras de suero (paneles de QC 1-4), utilizando muestras clínicas diluidas en una matriz analito – negativa, más 1 positivo, 1 negativo y un control de valor de corte. Las cuatro muestras de suero (no incluyeron los controles positivo, negativo y el control de valor de corte) incluyeron una muestra positiva, una muestra dentro del rango indeterminado, una muestra justo por debajo del rango indeterminado y una muestra negativa. Las diluciones de suero seleccionadas también aseguraron que la concentración de analito en las muestras representaba un rango clínicamente relevante. El CV % de la precisión total (de la desviación estándar de los resultados por triplicado) para la DO sin procesar y los valores de ISR se muestran en la tabla 1 a continuación. El CV % de la precisión total del DENV Detect NS1 ELISA para los valores de DO sin procesar varió entre 9-16.2 %, dependiendo de la muestra. El CV % de la precisión total ISR varió desde 3.7 – 11.9 %, dependiendo de la muestra. Esta medición de la variabilidad inherente incluyó el ruido debido a la variación de operador a operador y a la variación de laboratorio en laboratorio.

Tabla 1: % CV del DENV Detect NS1 ELISA, partir de los resultados por triplicado

	% CV _{Total} – DO450 sin procesar	% CV _{Total} – Valor ISR
Panel QC #1	9.81%	10.73%
Panel QC #2	9.75%	8.42%
Panel QC #3	12.29%	7.61%
Panel QC #4	15.17%	8.44%
(+) Control	12.88%	8.25%
(-) Control	16.18%	11.85%
Control del Valor de corte	13.53%	3.71%

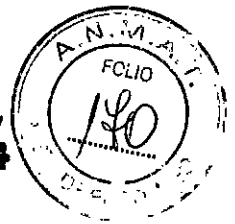
%CV = % Coeficiente de variación.

ISR = Relación estado inmune.

Estudio de Reactividad cruzada:

84 sueros (incluyendo 48 muestras positivas con carga viral o antígeno) que fueron ensayados para otros patógenos potencialmente reactivos- cruzados se evaluaron con el DEN Detect NS1 ELISA, para determinar la reactividad cruzada. Las muestras que fueron positivas para anticuerpos (IgM e IgG) fueron también seleccionadas y evaluadas con el DENV Detect NS1 ELISA. La Tabla 2 resume los resultados de este estudio. Sin embargo, esto no elimina la posibilidad de reactividad cruzada de este ELISA con otras muestras de enfermos que no se evaluaron por este panel. Los datos son presentados como % de especificidad con un 95 % de intervalos de confianza (Método Wilson Score).

5664



Enfermedad	Número de muestras	Número de positivos	Número de negativos	% de especificidad (95% de intervalo de confianza) *
PCR (+) para Virus del Nilo Occidental	18	0	18	100 % (82.4-100 %)
HBV (Ag +)	10	0	10	100 % (72.2-100 %)
HCV (Carga viral +)	10	0	10	100 % (72.2-100 %)
HIV (Carga viral +)	10	0	10	100 % (72.2-100 %)
Rubeóla IgG +	5	0	5	100 % (56.6-100 %)
Rubeóla IgM +	5	0	5	100 % (56.6-100 %)
Lupus eritematoso sistémico	5	0	5	100 % (56.6-100 %)
EBV IgM +	5	0	5	100 % (56.6-100 %)
CMV IgM +	6	0	6	100 % (61.0-100 %)
Sífilis TP IgG +	5	0	5	100 % (56.6-100 %)
HIV EIA Positivo	5	0	5	100 % (56.6-100 %)
Total	84	0	84	100 % (95.6-100 %)

*95% intervalo de confianza basado sobre el método Wilson Score.

Estudio de Interferencia:

5 sustancias potencialmente interferentes que comúnmente se encuentran en suero se ensayaron para determinar su efecto sobre el ensayo DENV Detect NS1 ELISA. Además de los controles de valor de corte, negativo y positivo del equipo, se ensayó un panel de cuatro muestras clínicas simuladas, que fueron desde un negativo hasta un positivo débil y una muestra fuertemente positiva. Las cinco sustancias potencialmente interferentes fueron la bilirrubina (0.01 & 0.02 mg/ml), el colesterol (3 & 5 mg/ml), el anticuerpo anti- ratón humano (HAMA) (12, 44, 46 ng/ml), los triglicéridos (5 & 30 mg/ml) y la hemoglobina (16 & 160 mg/ml). No hubo efectos evidentes de la bilirrubina o el colesterol, a las concentraciones ensayadas. HAMA no parece aumentar la incidencia de falsos positivos en el ensayo. HAMA puede reducir los valores de ISR para muestras positivas, aunque las muestras disponibles limitadas no mostraron un efecto consistente proporcional a los niveles de HAMA en las muestras.

Los resultados de este estudio indicaron que altos niveles de triglicéridos (30 mg/ml) pueden reducir los valores ISR de las muestras positivas. También altos niveles de hemoglobina (>16 mg/ml), muy por encima de los niveles normales encontrados en muestras de suero, causaron un efecto no deseado significativo, con reducción de los valores de ISR para las muestras positivas y causando que las muestras negativas a ensayar sean falso positivas. Así, las muestras conteniendo altos niveles de triglicéridos o muestras que estén hemolizadas deberían evitarse para el análisis con este ensayo.

Estudio de Congelación - Descongelación:

Con el fin de medir la sensibilidad del antígeno NS1 en muestras de suero con múltiples ciclos de congelación – descongelación, se expusieron 10 muestras de suero a 5 ciclos de congelamiento y descongelamiento y fueron ensayadas para NS1, usando el DENV Detect NS1 ELISA kit, después de cada ciclo. Las 10 muestras que fueron positivas en la versión no tratada del ensayo fueron positivas después de los 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento.

Se recomienda que las muestras de suero a usar en el DENV Detect NS1 ELISA no sean congeladas y descongeladas, por más de 5 veces.

Sin embargo, como no tenemos acceso a las muestras positivas de NS1 de Dengue que nunca fueron congeladas, no es posible comentar si es real o no que las muestras positivas para NS1 pueden tener una pérdida de algunas señales positivas por encima del primer congelamiento-descongelamiento respecto de una muestra que nunca fue congelada.

Referencias


1. Monath, Flaviviruses. In: Fields, B. N. et al. Fields Virology, 2nd ed. Vol 1, New York: Raven Press, 1990, p. 763-814.
2. Effler PV, Halstead SB. Immune enhancement of viral infection. Progress in Allergy 1982;31:301-64.
3. Halstead SB. Neutralisation and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. Advances in Virus Research 2003;60:421-67.
4. Gubler DJ, Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev 11, 480, 1998

5664



5. Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, Ayers T, Elm J, Tom T, Reiter P, Rigau-Perez JG, Hayes JM, Mills K, Napier M, Clark GG, Gubler DJ; Hawaii Dengue Outbreak Investigation Team. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(5):742-9
6. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(4):376-96.
7. Alcon-LePoder S, Sivard P, Drouet MT, Talarmin A, Rice C, Flamand M. Secretion of flaviviral non structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis.

 **InBios** International, Inc.
562 1st Ave. South, Suite 600,
Seattle, WA 98104 USA
206-344-5821

Inserto Parte N° 900180-00
 DNS1-1
Fecha efectiva: 04/15/2015



Representante autorizado
CEpartner4U
Esdoornlaan 13
3951 DB Maarn
The Netherlands





Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A. N. M. A. T

CERTIFICADO DE AUTORIZACION DE VENTA
DE PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº:1-47-3110-642/14-7

Se autoriza a la firma CROMOION S.R.L a importar y comercializar el Producto para Diagnóstico de uso "in vitro" denominado DENV DETECT™ NS1 ELISA/ SISTEMA DE ENSAYO ELISA, DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO NS1 DEL VIRUS DEL DENGUE EN SUERO HUMANO, en ENVASES PARA 96 DETERMINACIONES CONTENIENDO: TIRAS DE MICROTITULACIÓN (12 x 8 pocillos), CONTROL NEGATIVO (1 vial x 300 µl), CONTROL POSITIVO (1 vial x 300 µl), CONTROL DE VALOR DE CORTE (1 vial x 300 µl), DILUYENTE DE MUESTRA (1 vial x 15 ml), CONJUGADO 100x (1 vial x 150 µl), DILUYENTE DE CONJUGADO (1 vial x 12 ml), BUFFER DE LAVADO 10x (1 x 120 ml), SUSTRATO TMB LÍQUIDO (1 vial x 12 ml) Y SOLUCIÓN DE CORTE (1 vial x 6 ml). Se le asigna la categoría: Venta a laboratorios de Análisis clínicos por hallarse comprendido en las condiciones establecidas en la Ley 16.463, y Resolución M.S. y A.S. Nº 145/98. Lugar de elaboración: INBIOS INTERNATIONAL, INC. 562 1st Avenue South, Suite 600. Seattle, WA 98104. (USA). Periodo de vida útil: 12 (DOCE) meses desde la fecha de elaboración conservado entre 2 y 8 °C. En las etiquetas de los envases, anuncios y Manual de instrucciones deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO DE USO "IN VITRO" USO PROFESIONAL EXCLUSIVO AUTORIZADO

POR LA ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y
TECNOLOGIA MEDICA.

Certificado n°: **008289**

ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA
MÉDICA.

Buenos Aires, 15 JUL 2015



Firma y sello
Ing ROGELIO LOPEZ
Administrador Nacional
A.N.M.A.T.