

CHAGAS

CE



Western Blot IgG

Diagnóstico *in vitro* Ensaio Immunoblot
Técnica manual / semi-automática

#CHA-WB24G: 24 testes

#CHA-WB12G: 12 testes

#CHA-WB96G: 96 testes

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Encontre mais informações e instruções de uso no seu idioma no nosso site

www.ldbiodiagnostics.com

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

CHAGAS Western Blot (WB) IgG is a single use é um teste qualitativo de uso único de diagnóstico serológico de IgG por immunoblot para a trypanossomiase americana (*Trypanosoma cruzi*), concebido para ser um teste confirmatório de um resultado positivo ou equívoco obtido através dos testes clássicos de despiste.

PRINCÍPIO DO TESTE

Técnica de Western Blot

Os antígenos *T. cruzi*, uma vez separados por eletroforese, são ligados por electroblotting à superfície de uma membrana de nitrocelulose (a que se chama a transferência) cortada em 24 tiras numeradas de 1 a 24.

Condução do teste

Cada amostra de soro a testar é incubada separadamente com uma tira. Os anticorpos anti-*Trypanosoma* potencialmente presentes na amostra ligam-se seletivamente aos antígenos de *T. cruzi*. O conjugado fosfatase alcalina-anti IgG humana liga-se então aos anticorpos anti-*Trypanosoma*. Por fim, os imunocomplexos reagem com o substrato. Os antígenos reconhecidos pelos anticorpos anti-*Trypanosoma* do tipo IgG presentes nas amostras são revelados como bandas transversais de cor roxa.

REAGENTES FORNECIDOS COM O KIT

Padrão: embalagem de 24 testes (#CHA-WB24G)

italic: embalagem de 12 testes (#CHA-WB12G) - **bold**: Embalagem de 96 testes (#CHA-WB96G).

ID	Quant.	Descrição	Composição
R1	1	Pasta(s) de 24 (12, 4x24) TIRAS: padrões pré-cortados + coloridos. (Cada pasta e cada transferência é identificada por um número de série único)	Nitrocelulose sensibilizada. Peso molecular colorido (kDa): Azul: 250, Azul: 150, Azul: 100, Rosa: 75, Azul: 50, Verde: 37, Rosa: 25, Azul: 20, Azul: 15, Amarelo: 10.
R2	1	Frasco de 30 (30, 125) ml de TAMPÃO DA AMOSTRA (Pronto a utilizar - solução rosa).	Tampão + surfactante + Na ₃ N (<0,1%).
R3	1	Frasco(s) de 30 (30, 2x60) ml de CONJUGADO ANTI IgG (Pronto a utilizar - solução azul).	Tampão + conjugado de soro de cabra policlonal anti-IgG humana com fosfatase alcalina + Na ₃ N (<0,1%) + estabilizantes.
R5	1	Frasco de 30 (30, 125) ml de SUBSTRATO (Pronto a utilizar - frasco castanho opaco).	Tampão + NBT + BCIP + estabilizantes
R6	1	Frasco de 60 (60, 250) ml de TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADO 10x (A diluir 10 vezes em água destilada - solução incolor).	Tampão + surfactante.
R10	1	Tubo de 100 (100, 2x100) µl de SORO DE CONTROLO POSITIVO (Pronto a utilizar - tampa vermelha).	Tampão + conjunto de soros humanos positivos para <i>Trypanosoma</i> por serologia + Na ₃ N (<0,1%) + estabilizantes.

R1: A letra antes de cada número de tira é específica para o parâmetro.

R2, R3, R5 e R6 são comuns a todos os kits e possuem um número de lote único, dependendo apenas da sua data de produção. É recomendado efetuar séries multiparamétricas (ver gama de immunoblot LDBIO) a fim de limitar o número de frascos abertos e de assegurar um melhor controlo de qualidade.

R10 é calibrado em immunoblot de acordo com um lote de referência e é dedicado apenas a esta técnica.

R3, R10 (NaN3): EUH 032 - Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.

EUH 210 Ficha de segurança fornecida a pedido bem como no nosso site www.ldbiodiagnostics.com.

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO DISPONIBILIZADO

- Tabuleiros de incubação multicanal em polipropileno para mini-blots (#WBPP-08 ou equivalente).
- Plataforma oscilatória para immunoblots, sistema de vácuo para líquidos (os tubos #WBPP-08 que fornecemos podem ser esvaziados por simples inversão).
- Tubos e material para recolher as amostras, cilindros graduados, contentores adaptados.
- Pipetas automáticas, micropipetas e pontas descartáveis (volumes de 10 µl, 1,2 ml e 2 ml).
- Água destilada ou desionizada. Papel absorvente (por ex. papel de filtro Whatman), fita adesiva transparente.
- Luvas, pinça para manipular as tiras, cortador ou bisturi, régua plana transparente.

Nota: Os nossos reagentes podem ser utilizados num processador automático de immunoblots. **Devem tomar-se precauções relativamente a possíveis contaminações químicas dos nossos reagentes se o processador for partilhado com reagentes de outro fabricante** (exemplo conhecido: contaminação por TWEEN 20) e a possíveis contaminações bacterianas. Frascos de reserva para o processador. Depois do processamento, não voltar colocar os restos de reagentes utilizados nos frascos originais.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Conservar entre 2 e 8 °C. Os reagentes do kit são estáveis até à data de validade indicada na embalagem exterior e nos rótulos dos frascos. Não use reagente contaminado ou turvo. O tampão de lavagem diluído a 1:10 é estável durante 2 meses a +2 a +8 °C e uma semana à temperatura ambiente.

CUIDADOS NA UTILIZAÇÃO

Segurança

- Apenas para utilização *in vitro*. Apenas para uso profissional. Apenas para pessoal treinado tecnicamente. Manusear de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais e considerar todos os reagentes e todas as amostras como potencialmente tóxicos e/ou infecciosos.
- Usar bata, luvas e óculos: não beber, comer ou fumar no laboratório. Não pipetar com a boca.
- O controle positivo é um soro de origem humana que foi inativado para os vírus HIV 1 e 2, hepatite B e hepatite C. Contudo, deve ser manuseado como um produto potencialmente infeccioso.
- O substrato contém uma mistura de NBT e BCIP, tóxica por contacto (pele e mucosas) e por inalação.
- Os reagentes contêm azida de sódio, que pode formar sais metálicos explosivos com o chumbo e o cobre. Enxaguar qualquer derrame com água.
- Eliminar os resíduos (amostras, pontas, tubos, líquido de lavagem, reagentes usados, ...) de acordo com as boas práticas utilizadas na indústria e as regulamentações atuais do país.
- Qualquer incidente grave deve ser objeto de declaração ao fabricante e às autoridades competentes.

Cuidados

- Leia e interprete os resultados sob luz branca direta.
- É preferível utilizar todos os reagentes de um mesmo lote. Se forem utilizados lotes diferentes, assegurar a rastreabilidade.
- Utilizar as tiras por ordem numérica. Não misturar tiras com diferentes números de série; utilizar as transferências em sequência. Estabelecer um plano de distribuição específico antes de iniciar o teste.
- Não tocar nas tiras com os dedos; utilizar uma pinça.
- Os reagentes devem ser bem misturados antes da utilização, em especial o tampão de lavagem concentrado.
- Fechar os frascos após a utilização; não utilizar se tiver ocorrido introdução acidental de uma substância nos reagentes. Não utilizar reagente de um frasco que apresente sinais de vazamento. Não utilizar soluções turvas ou precipitadas.
- Utilizar apenas pontas de pipeta descartáveis. Evitar qualquer contaminação entre canais. Ter atenção à formação de espuma ou bolhas nas pontas de pipeta (contaminação bacteriana dos frascos de reagentes).
- Lavar os tabuleiros de incubação apenas com água limpa seguida de água destilada (nunca utilizar detergente ou lixívia).
- A omissão de uma amostra ou a distribuição de um volume inadequado pode tornar o teste negativo ou positivo, independentemente do seu verdadeiro estado.

RECOLHA DE AMOSTRAS

Colher as amostras em tubos secos, de forma assética. É necessário um mínimo de 10 µl de soro.

Manter as amostras a 2 a 8 °C até serem processadas. Se for necessário armazená-las por mais de uma semana, congelar as amostras a -20 ± 5 °C. Não utilizar uma amostra contaminada. Evitar congelar e descongelar as amostras repetidamente.

Embora não tenha sido observada nenhuma reação cruzada especial com soro hemolizado, icterico ou lipídico, é recomendado interpretar os resultados da utilização deste tipo de amostras com cuidado.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de lavagem: Para 4 testes, num frasco limpo, diluir 10 ml de concentrado de lavagem 10x (R6) em 90 ml de água destilada ou desionizada. Tenha o cuidado de misturar bem o tampão diluído.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Nota importante: É recomendado efetuar séries multiparamétricas (ver gama de immunoblot LDBIO) a fim de limitar o número de frascos abertos e de assegurar um melhor controlo de qualidade.

1. Preparar o plano de distribuição das amostras e do controlo positivo C+ (R10).

O teste só pode ser tecnicamente validado e a identificação feita, para um determinado número de série, ou reveladas as bandas específicas, através da utilização deste controlo. Uma tira C+ não pode ser usada para interpretar os resultados das tiras de um blot com um número de série diferente.

2. Cortar o número necessário de tiras (R1) utilizando um bisturi e uma régua plana transparente limpa e seca, mantendo a linha azul de posicionamento nas tiras: manter as tiras firmemente no seu lugar com a régua e cortá-las pelo lado da tensão (os números são visíveis através da régua).
3. Distribuir 1,2 ml de tampão da amostra (R2) em cada canal, de acordo com o plano estabelecido.
4. Deixe as tiras se reidratarem na superfície do tampão por aproximadamente 2 minutos, com o número visível no topo, ENTÃO, agite suavemente a bandeja para mergulhá-las totalmente no tampão.
5. Distribuir as amostras e controlo(s) positivo(s): de acordo com o plano de distribuição, a uma taxa de 10 µl por canal. Agitar suavemente o tabuleiro após cada dispensa. Colocar o tabuleiro numa plataforma oscilatória. **Incubar durante 90 min. ± 5 min. a 20-26 °C.**
6. Passo de lavagem: Esvaziar o conteúdo dos canais com uma pipeta de Pasteur ou voltando o tabuleiro de incubação ao contrário. Verter 2 a 3 ml de tampão de lavagem diluído em cada canal. Incubar na plataforma oscilatória durante 3 min. Repetir duas vezes e, em seguida, esvaziar o conteúdo dos canais. Assegurar que as tiras não se voltam durante estes passos.
7. Verter 1,2 ml de conjugado anti IgG (R3) em cada canal. Colocar o tabuleiro na plataforma oscilatória. **Incubar durante 60 min. ± 5 min. a 20 a 26 °C.**
8. Passo de lavagem: repetir o passo 6.
9. Deitar 1,2 ml de substrato NBT/BCIP (R5) em cada um dos canais. Colocar na plataforma oscilatória e proteger da luz direta. **Incubar durante 60 min. ± 5 min. a 20 a 26 °C.**

Independentemente do parâmetro, monitorizar a revelação da cor. A revelação pode ser interrompida se a cor de fundo da tira escurecer de tal modo que a leitura seja difícil (a qualidade dos passos de lavagens possui uma influência fundamental na cor de fundo). Ter em atenção que as tiras ficarão mais claras quando secas.

10. Interromper a reação, aspirando o substrato com uma pipeta de Pasteur ou voltando a tina de incubação ao contrário e deitando 2 ml de água destilada nos canais. Repetir este último passo de lavagem mais uma vez.
11. Secagem das tiras: Com os canais ainda cheios de água, pegar nas tiras pela extremidade numerada utilizando uma pinça e depositá-las, com o número visível, sobre um papel absorvente de Whatman. Deixar secar ao ar. A cor das tiras aclarará naturalmente enquanto secam. A interpretação só deve ser feita depois de concluída a secagem.
12. Conservação: Transferir as tiras para uma folha de papel, que será utilizada para as arquivar. Alinhar as linhas de posicionamento. Mantendo-as no lugar com a régua plana, colar a extremidade superior das tiras com a fita adesiva transparente.

Para uma boa interpretação, as tiras deve ser ordenadas por transferência e pela sua ordem numérica, espaçadas com um máximo de alguns milímetros entre si. Não é fiável comparar tiras que estejam muito afastadas (por ex. a nº 2 com a nº 15). **É perigoso** (resultados falsos) comparar tiras de diferentes kits (tiras com números de série diferentes).

CONTROLO DE QUALIDADE E INTERPRETAÇÃO

O controlo do soro (R10) disponibilizado com o kit deve ser sistematicamente incluído em qualquer série de immunoblot. Ele mostra o perfil típico e permite a validação técnica da boa execução do teste (as bandas devem aparecer muito distintamente na tira) e calibrar exatamente a posição e aspeto das bandas específicas de modo a permitir a interpretação dos resultados das tiras da mesma transferência (mesmo número de série).

Nota Bene: O perfil de controle positivo (R10) pode variar de acordo com o número de lote dos reagentes utilizados. As imagens correspondentes estão disponíveis no nosso website www.ldbiodiagnostics.com como exemplo.

Descrição das bandas

- Uma amostra positiva pode apresentar diversas bandas situadas entre 8 e 200 kilodaltons (kDa).
- A área de leitura está no fundo das tiras de teste, entre 15 e 47 kDa.
- 5 bandas estão mais frequentemente presentes: **P15-16**, **P21-22**, **P27-28**, **P42** e **P45-47** a pesos moleculares correspondentes (ver fotografia na **Fig. 1**).

O aspecto das bandas pode ser variável. O P15-16, P21-22, P27-28 pode assumir a forma de uma única banda grande, um duplete de 2 bandas mais estreitas ou de 1 das 2 bandas componentes do duplete. Os P45-47 podem aparecer como uma banda mais difusa.

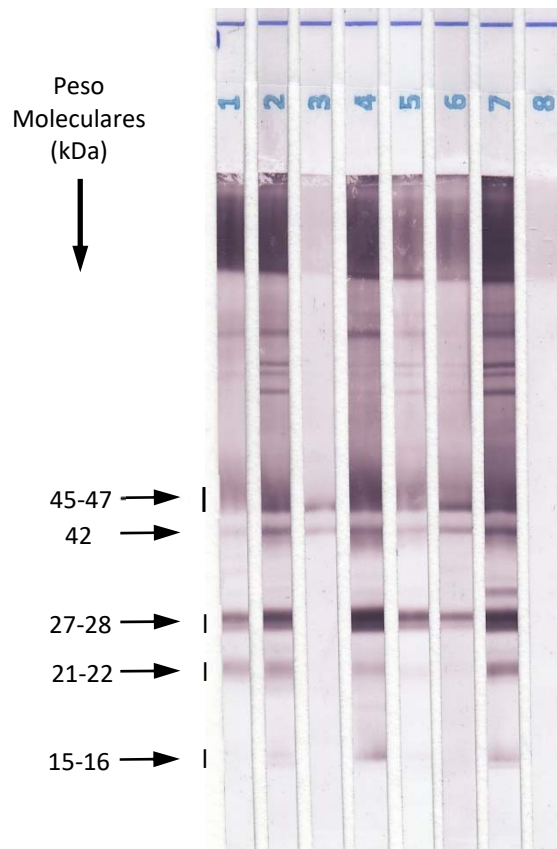


Fig. 1: Exemplos de resultados positivos e negativos

Os perfis são dados como exemplos. As tiras são marcadas com a letra "J" específica do parâmetro do lote "09003".

Interpretação

A presença **simultânea** de 2 bandas bem definidas entre **P15-16, P21-22, P27-28, P42 e P45-47** é indicativa da presença de anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi*.

Para validar os resultados, compare sempre o perfil do immunoblot de cada amostra com o do controlo positivo R10. O aspeto das bandas é importante para a interpretação do teste.

LIMITAÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- O diagnóstico de uma doença infecciosa não pode ser estabelecido com base em um único resultado de teste.
- Os resultados serológicos devem ser interpretados de acordo com as informações disponíveis (por exemplo, epidemiologia, clínica, imagem, biologia, etc.) de forma a estabelecer um diagnóstico. Não devem ser utilizados como base para o diagnóstico apenas com base na sua positividade.

DESEMPENHOS (VER REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS)

O teste **CHAGAS WB IgG** foi alvo de um estudo comparativo com as técnicas IFA e ELISA num laboratório independente. The sensitivity and specificity performances of the tests have been calculated, as well as their 95% confidence intervals according to Wilson's method with continuity correction.

Sensibilidade (Se)

Foram testados soros de 100 doentes infectados com doença de Chagas (incluindo 11 fases agudas) em WB, ELISA e IFA de acordo com as recomendações descritas nas instruções de cada kit. A doença de Chagas foi comprovada por dados clínicos.

	CHAGAS WB IgG	ELISA	IFA
POSITIVOS	100	99	96
NEGATIVOS	0	1	4
Se 95% (%)	100% [95.4 ; 100]	99% [93.8 ; 100]	96% [88.2 ; 98.1]

Tabela 1: Resultados comparados entre o teste CHAGAS WB IgG e dois testes comerciais de triagem, ELISA e IFA, em 100 amostras positivas de Chagas.

Especificidade (Sp)

178 soros correspondentes a 178 pacientes diferentes foram testados seguindo as indicações apresentadas nas instruções de cada teste. Esses soros pertenciam a pacientes saudáveis (79), malária (22), leishmaniose (44), amebíase (6) e toxoplasmose (27).

	CHAGAS WB IgG	ELISA	IFA
NEGATIVOS	178	160	148
POSITIVOS	0	18	30
Sp 95% (%)	100% [97.4 ; 100]	89.9% [85.9 ; 91.8]	83.1% [76.6 ; 88.2]

Tabela 2: Resultados comparados entre o teste CHAGAS WB IgG e dois testes comerciais de triagem, ELISA e IFA, em 178 amostras negativas de Chagas.

Nesta população, a especificidade de **CHAGAS WB IgG** foi **100%**.

O ELISA apresentou 10% de resultados falsos positivos (14% dos pacientes infectados com Leishmania).

O IFA apresentou 17% de resultados falsos positivos (30% dos pacientes infectados com Leishmania).

Conclusão

Na população estudada, o BM apresentou desempenhos de sensibilidade e especificidade superiores aos das técnicas ELISA e IFA utilizadas em comparação. Em particular, não foi observada qualquer reacção cruzada com os soros positivos de *Leishmania*. Estes desempenhos tornam o teste Chagas WB um excelente teste para a confirmação da infecção por *T. cruzi*.

REPRODUTIBILIDADE

Foi testada a reprodutibilidade inter-série e inter-lote. Em ambos os casos, a correlação soro a soro relativamente às bandas específicas é excelente.

Interferências

Embora não tenha sido observada nenhuma reacção cruzada especial com soro hemolizado, icterico ou lipídico, é recomendado interpretar os resultados da utilização deste tipo de amostras com cuidado.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

"As bandas estão pálidas, com pouco contraste": Certos soros com baixas concentrações de anticorpos podem dar este tipo de resultados.

"São visíveis áreas sombreadas, mais ou menos coloridas, ligeiramente difusas": A tira não foi totalmente mergulhada num dos reagentes e não incubou corretamente ao longo de todo o seu comprimento. Também podem ocorrer manchas nos locais onde a amostra foi depositada se o tabuleiro não tiver sido agitado após a distribuição.

"O ruído de fundo é significativo, tornando a leitura muito difícil": As lavagens foram insuficientes ou a última incubação foi demasiado longa. Assegurar boas técnicas de desempenho do teste, respeitar os tempos de lavagem e assegurar a boa qualidade da água. Reduzir o tempo da última incubação. Excepcionalmente, alguns soros poderão reagir de modo inespecífico. Neste caso, o resultado do immunoblot não pode ser utilizado.

Este ruído de fundo inespecífico pode envolver apenas parte da tira, invalidando a interpretação dos resultados apenas para aquela porção.

"Aparece um precipitado na solução durante o último passo da revelação": o substrato pode, efetivamente, precipitar parcialmente (flocos pretos) no tampão no final da revelação. Este fenómeno não altera a qualidade da revelação, que deve ser continuada normalmente. A última lavagem com água destilada elimina as eventuais partículas sólidas presentes.

BIBLIOGRAFIA

- Abras A *et al.* Towards a New Strategy for Diagnosis of Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. *Journal of Clinical Microbiology* **55**, 1396–1407 (2017).
- Abras A *et al.* Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a Change? *Journal of Clinical Microbiology* **54**, 1566–1572 (2016).
- Angehen A *et al.* Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfusion* (2015). doi:10.2450/2015.0040-15
- Capuani L *et al.* Mortality among blood donors seropositive and seronegative for Chagas disease (1996–2000) in São Paulo, Brazil: A death certificate linkage study. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **11**, e0005542 (2017).
- Carneiro CM, *et al.* Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **97**, 1289–1303 (2017).
- De Noya BA, & González ON. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Tropica* **151**, 94–102 (2015).
- Pinazo MJ, & Gascon J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Tropica* **151**, 16–20 (2015).
- Soriano-Arandes A, *et al.* Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. *Tropical Medicine & International Health* **21**, 590–596 (2016).

NOTIFICAÇÃO DE ACTUALIZAÇÃO - Por favor, leia atentamente

DATA DE LANÇAMENTO	VERSÃO	RESUMO DA MODIFICAÇÃO
09/08/2021	Vs 04	Remoção do aviso de segurança R5 - P45-47 banda mais difusa Endereço de e-mail de contacto – exemplos fotografia – NaN3 EUH32.
30/11/2022	Vs05	Novo endereço
05/07/2023	Vs06	R6 sem NaN3. Tira identificada pela letra. Possível utilização de reagentes de diferentes lotes.



NF EN ISO 13485

24 Av. Joannes MASSET – 69009 LYON – FRANCE
 Tel : +33(0)4 7883 3487 – Fax : +33(0)4 7883 3430
www.ldbiodiagnostics.com – info@ldbiodiag.com