

# CHAGAS



## Western Blot IgG

*in vitro* Test imunoblot  
Tehnică semi-automată / manuală

#CHA-WB24G: 24 teste

#CHA-WB12G: 12 teste

#CHA-WB96G: 96 teste

## INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Găsiți mai multe informații și Instrucțiuni de utilizare în limba dvs. pe website-ul nostru  
[www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com)

## SCOPUL UTILIZĂRII

Testul **CHAGAS Western Blot (WB) IgG** este un test calitativ de o singură utilizare pentru diagnoza serologică IgG printr-un Test Immunoblot de tripanosomiază americană (*Trypanosoma cruzi*) utilizat pentru confirmarea testării în cazul unui rezultat pozitiv sau echivoc obținut prin intermediul testelor clasice de screening.

## PRINCIPIUL TESTULUI

### Tehnica Western Blot

Antigenii (extract larvic *T. cruzi*), odată separați prin electroforeză, sunt legați prin electroblotare pe suprafața unei membrane de nitroceluloză (numită transfer) tăiată în 24 de benzi numerotate de la 1 la 24.

### Desfășurarea testării

Fiecare specimen de testat este incubat separat cu o bandă. Anticorpii specifici potențial prezenți în probă se leagă în mod selectiv pe antigeni. Conjugatul anti-IgG uman marcat cu fosfatază alcalină se leagă apoi singur pe anticorpii legați. În final, imunocomplexurile reacționează cu substratul. Antigenii recunoscuți de anticorpii specifici de tip IgG prezenți în probe sunt evidențiați ca linii transversale mov.

## REACTIVII FURNIZAȚI ÎMPREUNĂ CU KIT-UL

Implicit: pachet de 24 de teste (#CHA-WB24G).

*Italic:* pachet de 12 teste (#CHA-WB12G) – **Bold:** pachet de 96 teste (#CHA-WB96G)

Cod	Cant	Descriere	Compoziție
R1	1	Pachet(e) de 24 (12, <b>4x24</b> ) BENZI: pretăiate+ Standarde culoare. (Fiecare pachet și fiecare transfer este identificat printr-un număr de serie unic)	Nitroceluloză sensibilizată. Greutate moleculară colorată (kDa): Albastru 250, Albastru: 150, Albastru: 100, Roz: 75, Albastru: 50, Verde: 37, Roz: 25, Albastru: 20, Albastru: 15, Galben: 10.
R2	1	Fiolă de 30 (30, <b>125</b> ) mL de SOLUȚIE-TAMPON PROBĂ (Gata de utilizare - soluție roz).	Soluție tampon + surfactant + NaN <sub>3</sub> (<0.1%).
R3	1	Fiolă(e) de 30 (30, <b>2x60</b> ) mL de CONJUGAT ANTI IgG (Gata de utilizare - soluție albastră).	Soluție tampon + seruri anticorpi policlonali de capra anti IgG uman conjugate cu Fosfatază Alcalină + NaN <sub>3</sub> (<0.1%) + stabilizatori.
R5	1	Fiolă de 30 (30, <b>125</b> ) mL de SUBSTRAT (Gata de utilizare - fiolă maro opacă).	Soluție tampon + NBT + BCIP + stabilizatori.
R6	1	Fiolă de 60 (60, <b>250</b> ) mL de CONCENTRAT DE SPĂLARE 10X SOLUȚIE TAMPON (A se dilua de 10 ori în apă distilată - soluție incoloră).	Soluție tampon + surfactant.
R10	1	Tub de 100 (100, <b>2x100</b> ) μL de SER DE CONTROL POZITIV (Gata de utilizare - capac roșu).	Soluție tampon + ser uman pozitiv în serologie <i>Trypanosoma</i> + NaN <sub>3</sub> (<0.1%) + stabilizatori.

**R1:** Litera de dinaintea fiecărui număr de bandă este specifică parametrului.

**R2, R3, R5 și R6** sunt comune pentru toate kiturile și au un număr unic de lot în funcție doar de data producției. **Se recomandă efectuarea testărilor multiparametru (vezi gama imunoblot LDBIO) pentru a limita numărul de fiole deschise și pentru a asigura un mai bun control al calității.**

**R10** este calibrat în imunoblot conform unui lot de referință și este dedicat doar acestei tehnici.

R3, R10 (NaN<sub>3</sub>): EUH 032 - În contact cu acizi, degajă un gaz foarte toxic.

EUH 210 Fișa cu date de securitate disponibilă la cerere și pe site-ul nostru web [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com).

#### ALTE MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE

- Tăvi multi-canal de incubație din polipropilenă pentru mini-bloturi (#WBPP- 08 sau echivalent)
- Platformă oscilantă pentru imunobloturi, sistem de vidare pentru lichide (tăvile #WBPP-08 pe care le furnizăm pot fi golite prin simpla lor răsturnare)
- Tuburi și materiale pentru extragerea eșantioanelor, cilindri gradați, containere adaptate. Pipete automate, micropipete și vârfuri de unică folosință (în volume de 10 μl, 1,2 ml și 2 ml)
- Apă distilată sau deionizată. Hârtie absorbantă (de ex: filtru de hârtie Whatman), bandă adezivă transparentă.
- Mănuși, pensete pentru manevrarea benzilor, cuttere sau scalpele, riglă transparentă plată.

**Notă:** Reactivii noștri pot fi folosiți într-un procesor automat de imunobloturi. **Atenție la posibilele contaminări chimice ale reactivilor noștri dacă procesorul este utilizat și pentru reactivi de la un alt fabricant** (exemple cunoscute: contaminare cu TWEEN 20) și la contaminările bacteriene. Rezervați fiole pentru procesor. După procesare, nu puneți la loc în fiolele originale reactivii folosiți care au rămas.

#### DEPOZITARE SI STABILITATE

Depozitați la o temperatură între 2 și 8°C. Reactivii din kit sunt stabili până la data de expirare indicată pe cutia exterioară și pe etichetele fiolelor. Nu utilizați reactiv contaminat sau tulbure. Soluția tampon concentrată 1/10 este stabilă timp de 2 luni la temperaturi între +2 și +8°C și o săptămână la temperatura camerei.

## MĂSURI DE SIGURANȚĂ LA UTILIZARE

### Siguranță

- Doar pentru utilizare *in vitro*. Numai pentru uz profesional. Numai pentru personalul instruit tehnic. Manipulați în conformitate cu Bunele Practici de Laborator și considerați orice reactiv și orice eșantion ca având potențial toxic și/sau infecțios.
- Folosiți un halat de laborator, mănuși și ochelari; nu beți, mâncați sau fumați în laborator. Nu folosiți gura pentru a absorbi prin pipetă.
- Martorul pozitiv este un ser de origine umană care a fost inactivat pentru virusurile HIV 1 și 2, hepatita B și hepatita C. Cu toate acestea, trebuie tratat ca un produs cu potențial infecțios.
- Substratul conține un amestec de NBT și BCIP, toxice la contact (piele și membrane mucoase) și la inhalare.
- Reactivii conțin azidă de sodiu care poate forma săruri metalice explozive la contactul cu plumbul și cuprul. Clătiți orice scurgere cu apă.
- Eliminați deșeurile (eșantioane, vârfuri, tuburi, lichid de spălare, reactiv folosit...) în conformitate cu bunele practici folosite în industrie și cu regulamentele existente în țară.
- Orice incident grav trebuie să facă obiectul unei declarații către producător și autoritatea competentă.

### Precauțiuni

- Citiți și interpretați rezultatele sub lumină albă directă.
- Este preferabil să se utilizeze toți reactivii din același lot. În cazul în care se utilizează loturi diferite, asigurați trasabilitatea.
- Folosiți benzile în ordinea numerelor. Nu amestecați benzile cu numere de serie diferite; folosiți transferurile prin succesiune. Stabiliți un plan specific de distribuție înainte de a începe testul.
- Nu atingeți benzile cu degetele; folosiți pensete.
- Reactivii trebuie amestecați bine înainte de utilizare, mai ales soluția tampon concentrată.
- Închideți fiolele după utilizare; nu folosiți dacă o substanță a fost introdusă accidental în reactivi. Nu folosiți reactivi dintr-o fiolă care prezintă urme de scurgere. Nu folosiți soluții tulburi sau precipitate.
- Folosiți doar vârfuri de pipetă de unică folosință. Evitați contaminarea inter-canale. Fiți atenți la formarea de spumă sau bule în vârfurile pipetei (contaminare bacteriană a fiolelor de reactivi).
- Curățați tăvile de incubare doar cu apă distilată (nu folosiți niciodată detergent sau înălbitor).
- Omiterea unui eșantion sau distribuția unui volum neadecvat poate duce la rezultate negative sau pozitiv, indiferent de statutul său real.

## COLECTAREA EȘANTIOANELOR

Colectați aseptice eșantioanele în tuburi uscate. Este necesar un minim de 10 μl de ser.

Păstrați eșantioanele la 2-8 °C până când sunt procesate. Dacă este necesar să le depozitați mai mult de o săptămână, congelați probele la -20 ± 5°C. Nu folosiți eșantioane contaminate. Evitați congelarea și decongelarea repetată a eșantioanelor.

Chiar dacă nu s-a observat o reacție încrucișată specială cu serurile hemolizate, icterice sau lipidice, se recomandă interpretarea cu grijă a rezultatelor obținute din utilizarea acestor probe.

## PREGĂTIREA REACTIVILOR

**Soluția tampon de spălare:** Pentru 4 teste, într-o sticlă curată, diluați 10 ml de Concentrat 10x (R6) în 90 ml de apă distilată sau deionizată. Aveți grijă să amestecați bine Soluție-tampon diluat

## PROCEDURA DE TEST

*Nota Bene:* Se recomandă efectuarea testelor multiparametru (vezi gama imunoblot LDBIO) pentru a limita numărul de fiole deschise și pentru a asigura un control mai bun al calității.

1. Pregătiți un plan de distribuție pentru eşantioane și pentru martor pozitiv C+ (**R10**).

Testul poate fi validat din punct de vedere tehnic și făcută identificarea, pentru un anumit număr de serie, a unei benzi specifice dezvoltate utilizând doar acest martor. O bandă C+ nu poate fi folosită pentru a interpreta rezultatele benzilor de la un blot cu un număr de serie diferit.

2. Tăiați numărul necesar de benzi (R1) folosind un scalpel sau o riglă transparentă plată curată și uscată, păstrând linia de poziționare albastră de pe benzi: țineți benzile ferm pe poziție cu rigla și tăiați-le pe partea de tragere (numerele sunt vizibile prin riglă).

3. Distribuți 1,2 ml de soluție-tampon pentru probe (R2) în fiecare canal conform planului stabilit.

4. Așezați, în ordinea numerelor, benzile numerotate în canale. Lasă benzile să se rehidrateze la suprafața soluției tampon pentru aproximativ 2 minute, cu numărul vizibil deasupra, APOI scuturați ușor tava pentru a le scufunda complet în soluția tampon.

5. Distribuți eşantioanele și soluția de control pozitiv: în conformitate cu planul de distribuție, la un volum de 10µl per canal. Scuturați ușor tava după fiecare distribuire. Așezați tava pe o platformă oscilantă. **Incubați timp de 90 min ± 5 min** la 20-26 °C.

6. Etapa de spălare: Goliți conținutul canalelor cu o pipetă Pasteur sau prin răsturnarea tăvii de incubare. Distribuți 2 sau 3 ml de soluție tampon de spălare în fiecare canal. Incubați pe platforma oscilantă timp de 3 min. Repetați de 2 ori, apoi goliți conținutul canalelor. Asigurați-vă că benzile nu s-au întors în timpul acestor pași.

7. Distribuți 1,2 ml de conjugat anti-IgG (R3) în fiecare canal. Amplasați tava pe platforma oscilantă. **Incubați timp de 60 min ± 5 min** la 20-26 °C.

8. Etapa de spălare: repetați pasul 6.

9. Distribuți 1.2 ml de substrat NBT/BCIP (R5) în fiecare canal. Amplasați pe platforma oscilantă și protejați de lumină directă. **Incubați timp de 60 min ± 5 min** la 20-26 °C.

Indiferent de parametri, monitorizați modificarea culorii. Modificarea poate fi oprită dacă culoarea de fundal a benzii se întunecă până la un punct unde citirea este dificilă (calitatea etapelor de spălare are o influență fundamentală asupra coloritului fundalului). Observați că benzile se deschid la culoare în timp ce se usucă.

10. Opriți reacția prin aspirarea substratului cu o pipetă Pasteur sau prin răsturnarea tăvii de incubare și distribuirea a 2 ml de apă distilată în canale. Repetați această ultimă etapă de spălare încă o dată.

11. Uscarea benzilor: Cu canalele încă pline de apă, luați benzile de capătul numerotat folosind penseta și așezați-le, cu numărul la vedere, pe o hârtie absorbantă Whatman. Lăsați să se usuce. Culoarea benzilor se va deschide natural în timp ce acestea se usucă. Interpretarea trebuie făcută doar după ce uscarea este completă.

12. Depozitarea. Transferați benzile pe o coală de hârtie, ce va fi folosită pentru arhivarea lor. Aliniați liniile de poziționare. Păstrându-le nemișcate cu rigla plată, lipiți vârful benzilor cu bandă adezivă transparentă.

Pentru o bună interpretare, benzile trebuie să fie ordonate prin transfer și în ordinea lor numerică, cu un spațiu între ele de maxim câțiva milimetri. Nu este de încredere compararea benzilor depărtate (de ex. nr 2 cu nr 15). **Este periculos** (rezultate false) să se compare benzile din diferite kituri (benzile cu diferite numere de serie).

## CONTROLUL CALITĂȚII ȘI INTERPRETARE

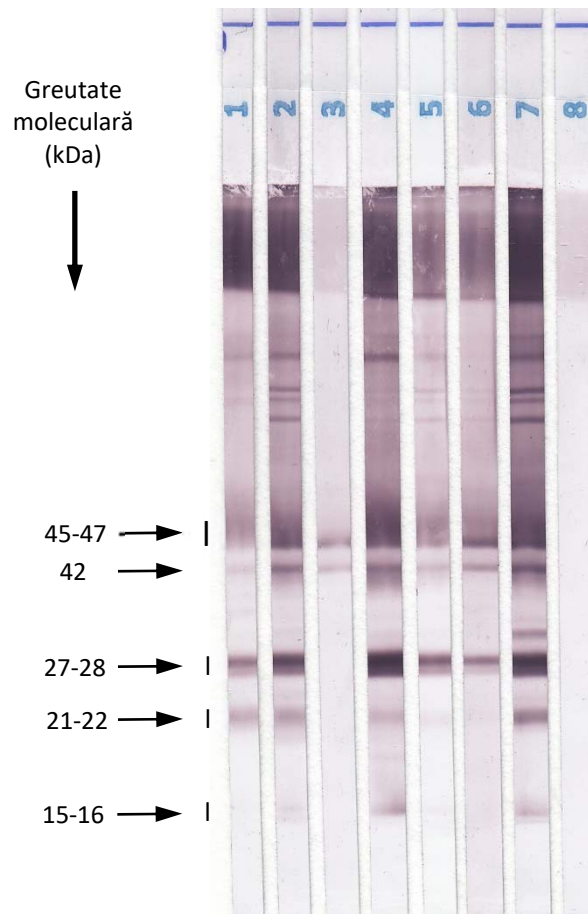
Serul de control (R10) furnizat împreună cu kitul trebuie să fie inclus în mod sistematic în orice serie de imunobloturi. Arată un profil tipic și permite (1) validarea tehnică a efectuării corecte a testului (liniile trebuie să apară foarte clar pe bandă) și (2) calibrarea precisă a poziției și aspectului liniilor specifice pentru a permite interpretarea rezultatelor de pe benzile din același transfer (același număr de serie).

*Nota Bene:* Profilul controlului pozitiv (R10) poate varia în funcție de numărul lotului reactivilor folosiți. Imaginile corespondente sunt disponibile pe website-ul nostru [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com) ca exemplu.

### Descrierea liniilor

- O probă pozitivă poate prezenta numeroase linii localizate între 8 și 200 kilodaltoni (kDa).
- Zona de citire este localizată pe partea inferioară a benzii, între 15 și 47 kDa.
- 5 linii sunt adesea mai prezente: **P15-16**, **P21-22**, **P27-28**, **P42** și **P45-47** la greutatețile moleculare corespondente (vezi fotografia din **Fig. 1**).

**Aspectul liniilor poate fi variabil. P15-16, P21-22, P27-28 pot lua forma unei singure linii groase, un dublet de 2 linii mai înguste, sau 1 dintre 2 linii componente din dublet. P45-47 pot apărea ca linie încheșoșată.**



**Fig. 1:** Exemple de rezultate pozitive și negative

Profilurile sunt prezentate ca exemple. Benzile sunt marcate cu litera "J" specifică parametrului din lotul "09003".

## Interpretare

Prezența simultană a **două linii bine definite** între **P15-16, P21-22, P27-28, P42 și P45-47** indică prezența anticorpilor anti-*T. cruzi* în probă.

Pentru validarea rezultatelor, întotdeauna comparați profilul testului imunoblot al fiecărei probe cu cel al controlului pozitiv R10. Aspectul liniilor este important la interpretarea testului.

## LIMITĂRI ALE UTILIZĂRII

- Diagnosticul unei boli infecțioase nu poate fi stabilit pe baza unui singur rezultat.
- Rezultatele serologice trebuie interpretate în conformitate cu informațiile disponibile (de ex. epidimiologice, clinice, de imagistică, biologice) pentru a stabili un diagnostic. Acestea nu ar trebui să fie folosite ca bază de diagnostic doar pe baza pozitivității lor.

## PERFORMANȚE (vezi referințele literaturii)

Un laborator de referință independent din Franța a evaluat performanțele kitului **CHAGAS WB IgG** în comparație cu 2 teste de screening comerciale actuale, ELISA și IFA. Performanțele privind sensibilitatea și specificitatea testelor au fost calculate, precum și intervalele lor de încredere de 95% conform metodei lui Wilson cu corecția continuității.

### Sensibilitate (Se)

100 de seruri de la pacienți infectați cu boala Chagas (inclusiv 11 faze acute) au fost testate cu WB, ELISA și IFA în conformitate cu recomandările descrise în instrucțiunile fiecărui chit. Boala Chagas a fost demonstrată cu ajutorul datelor clinice.

	CHAGAS WB IgG	ELISA	IFA
<b>POZITIV</b>	100	99	96
<b>NEGATIV</b>	0	1	4
<b>Se 95% (%)</b>	100% [95.4 ; 100]	99% [93.8 ; 100]	96% [88.2 ; 98,1]

**Tabel:** Rezultate comparate între testul CHAGAS WB IgG și două teste de screening comerciale, ELISA și IFA, pentru 100 de probe pozitive pentru Chagas.

### Specificitate (Sp)

178 de seruri de la 178 de pacienți diferiți au fost testate prin urmarea indicațiilor prezente în instrucțiunile fiecărui test. Aceste seruri aparțineau unor pacienți sănătoși (79), malarie (22), leishmaniază (44), amebiază (6) și toxoplasmoză (27).

	CHAGAS WB IgG	ELISA	IFA
<b>NEGATIV</b>	178	160	148
<b>POZITIV</b>	0	18	30
<b>Sp 95% (%)</b>	100% [97.4 ; 100]	89,9% [85.9 ; 91,8]	83.1% [76.6 ; 88.2]

**Tabelul 2:** Rezultate comparate între testul CHAGAS WB IgG și două teste de screening comerciale, ELISA și IFA, pentru 178 de probe negative pentru Chagas.

Pentru această populație, specificitatea **CHAGAS WB IgG** a fost de **100%**.

ELISA a prezentat 10% rezultate fals-pozitive (14% de pacienți infectați cu *Leishmania*).

IFA a prezentat 17% rezultate fals-pozitive (30% de pacienți infectați cu *Leishmania*).

## Concluzie

În cazul populației studiate, WB a prezentat performanțe privind sensibilitatea și specificitatea superioare celor obținute prin tehnicile ELISA și IFA utilizate în comparație. În special, nu au fost observate reacții încrucișate cu

serurile pozitive pentru *Leishmania*. Aceste performanțe fac testul Chagas WB un test excelent pentru confirmarea infecțiilor cu *T. cruzi*.

### Reproductibilitate

A fost testată reproductibilitatea inter-serie și inter-lot. În ambele cazuri, corelația ser la ser cu privire la liniile specifice este excelentă.

### Interferențe

Chiar dacă nu a fost observată o reacție încrucișată cu serurile hemolizate, icterice sau lipidice, se recomandă interpretarea cu grijă a rezultatelor de la utilizare cu asemenea probe.

## SOLUȚIONAREA PROBLEMELOR

**„Benzile sunt pale cu foarte puțin contrast”** Anumite seruri cu concentrații scăzute de anticorpi pot oferi asemenea rezultate.

**“Se pot observa zone umbrite, mai mult sau mai puțin colorate, ușor difuze”:** Banda nu a fost complet scufundată în unul dintre reactivi și nu s-a incubat corect pe întreaga sa lungime. De asemenea, pot fi prezente pete unde proba a fost depozitată, dacă tava nu a fost scuturată după dispensare.

**„Zgomotul de fundal este semnificativ, ceea ce face ca citirea să fie foarte dificilă”:** Spălările au fost insuficiente, sau ultima incubare a fost prea îndelungată. Asigurați bune tehnici de efectuare a testării, respectați timpii de spălare și asigurați calitatea apei. Reduceți timpul ultimei incubări. În mod excepțional, anumite seruri pot reacționa într-o manieră nespecifică. Atunci, rezultatul testului imunoblot nu poate fi utilizat.

Acest zgomot de fundal nespecific poate implica doar o parte a benzii, făcând ca rezultatele să fie neinterpretabile numai pentru partea respectivă.

**“Apare un precipitat în soluție în timpul ultimei etape a dezvoltării”:** substratul se poate precipita parțial (fulgi negri) în soluția tampon la finalul dezvoltării. Acest fenomen nu afectează calitatea dezvoltării, care trebuie continuată în mod normal. Ultima spălare cu apă distilată elimină posibilele particule solide prezente.



## BIBLIOGRAFIE

- 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).

### NOTIFICARE DE ACTUALIZARE - Vă rugăm să citiți cu atenție

DATA ELIBERĂRII	VERSIUNE	REZUMATUL MODIFICĂRIILOR
09/08/2021	Vs 04	Eliminarea avertismentului de securitate R5 - P45-47 bandă mai neclară - Adresa de e-mail de contact – Exemple de fotografie - EUH032 (NaN3)
30/11/2022	Vs05	Adresă nouă
05/07/2023	Vs06	R6 fără NaN3. Bandă identificată cu litera. Posibilă utilizare de reactivi din loturi diferite.



NF EN ISO 13485

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