

# CHAGAS CE



## Western Blot IgG

*In vitro* dijagnostički imunoblot test  
Poluautomatska / ručna tehnika

#CHA-WB24G: 24 testova

#CHA-WB12G: 12 testova

#CHA-WB96G: 96 testova

## UPUTSTVO ZA UPOTREBU

Pronađite više informacija i uputstva prevedena na vaš jezik na našem  
sajtu [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com)



# CHAGAS Western Blot IgG



## NAMENA

**CHAGAS Western Blot (WB) IgG** je kvalitativni test za jednokratnu upotrebu serološke IgG dijagnoze imunoblot testom američke tripanosomijaze (*Trypanosoma cruzi*) namenjen za potvrdno testiranje pozitivnog ili dvosmislenog rezultata dobijenog klasičnim skrining testovima.

## PRINCIP TESTA

### Western Blot tehnika

Antigeni (*ekstrakt larve T. cruzi*), jednom odvojeni elektroforezom, vezani su elektroblokiranjem na površinu nitrocelulozne membrane (nazvane transfer) isečene na 24 trake numerisane od 1 do 24.

### Sprovođenje testa

Svaki uzorak koji se testira je odvojeno inkubiran sa trakom. Specifična antitela potencijalno prisutna u uzorku selektivno se vezuju za antigene. Alkalna fosfataza-anti humani IgG konjugat se zatim vezuje za vezana antitela. Konačno, imunokompleksi reaguju sa supstratom. Antigeni prepoznati specifičnim antitelima tipa IgG prisutnim u uzorcima otkrivaju se kao ljubičaste poprečne trake.

## ISPORUČENI REAGENSI

Podrazumevano: paket od 24 testa (#CHA-WB24G).

*Italic:* paket od 12 testova (#CHA-WB12G) – **Podebljano:** paket od 96 testova (#CHA-WB96G)

Kodovi	Količina	Opis	Sastav
R1	1	Fascikla (e) od 24 (12, <b>4x24</b> ) trake: precut + obojeni standardi. (Svaka fascikla i svaki prenos je identifikovan jedinstvenim serijskim brojem)	Senzibilizovana nitroceluloza. Obojena molekulska težina (kDa): Plava: 250, Plava: 150, Plava: 100, Roze: 75, Plava: 50, Zelena: 37, roze: 25, plava: 20, plava: 15, žuta: 10.
R2	1	Bočica od 30 (30, <b>125</b> ) mL SAMPLE BUFFER (Spreman za upotrebu - ružičasti rastvor).	Pufer + surfaktant + NaN <sub>3</sub> (<0,1%).
R3	1	Bočica (e) od 30 (30, <b>2x60</b> ) mL ANTI IgG CONJUGATE (Spreman za upotrebu – plav rastvor).	Pufer + anti-humani IgG poliklonski kozji serumi konjugovani sa alkalnom fosfatazom + NaN <sub>3</sub> (<0.1%) + stabilizatori.
R5	1	Bočica od 30 (30, <b>125</b> ) mL SUPSTRATA (Spreman za upotrebu - neprozirna smeđa bočica).	Buffer + NBT + BCIP + stabilizatori.
R6	1	Bočica od 60 (60, <b>250</b> ) mL koncentrata za ispiranje 10X BUFFER (Da se razblaži 10 puta u destilovanoj vodi - bezbojan rastvor).	Pufer + površinski aktivna supstanca.
R10	1	Tuba od 100 (100, <b>2x100</b> ) µL POZITIVNOG KONTROLNOG SERUMA (Spreman za upotrebu - crvena kapa).	Pufer + grupa ljudskih seruma pozitivnih na <i>Trypanosoma</i> serologija + NaN <sub>3</sub> (<0,1%) + stabilizatori.

**R1:** Slovo pre svakog broja trake je specifično za parametar.

**R2, R3, R5 i R6** su zajednički za sve komplete i imaju jedinstven broj partije u zavisnosti samo od datuma njihove proizvodnje. **Preporučuje se da se izvrši multiparametarsko testiranje (vidi LDBIO imunoblot opseg) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i osigurala bolja kontrola kvaliteta.**

**R10** je kalibrisan u imunoblotu prema referentnom lotu i posvećen je samo ovoj tehnici.

R3, R10 (NaN<sub>3</sub>): EUH 032 - Kontakt sa kiselinama oslobađa veoma toksični gas.

EUH 210 - Sigurnosno-tehnički list dostupan na zahtev kao i na našoj veb stranici [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com)

#### DODATNI MATERIJAL POTREBAN, ALI NIJE OBEZBEĐEN

- Jedna višekanalna polipropilenska inkubaciona posuda za mini-blots (# WBPP-08 ili ekvivalent).
- Jedna platforma za mešanje imunoblota, jedan vakuumski sistem za tečnosti (kade #WBPP-08 koje isporučujemo mogu se isprazniti jednostavnim okretanjem).
- Epruvete i materijal za izvlačenje uzoraka, građirani cilindri, prilagođeni kontejneri. Automatske pipete, mikropipete i nastavci za jednokratnu upotrebu (zapremine 10 µL, 1,2 mL i 2 mL).
- Destilovana ili dejonizovana voda. Upijajući papir (npr. Whatman filter papir), prozirna lepljiva traka.
- Rukavice, pinceta za rukovanje trakom, sekač ili skalpel, ravan transparentan lenjir.

Napomena: Naši reagensi se mogu koristiti u automatizovanom imunoblot procesoru. Treba voditi računa o mogućim hemijskim kontaminacijama naših reagenasa ako se procesor deli sa reagensima drugog proizvođača (poznati primer: kontaminacija od strane TWEEN 20) i bakterijske kontaminacije. Rezervne bočice za procesor. Nakon obrade, ne stavljajte preostale korišćene reagense nazad u originalne bočice.

#### SKLADIŠTENJE I STABILNOST

Čuvati između 2 i 8 ° C. Reagensi iz kompleta su stabilni do isteka roka trajanja navedenog na spoljnoj kutiji i etiketama bočica. Nemojte koristiti kontaminirane ili zamućene reagense. Pufer za pranje razblažen na 1/10 je stabilan 2 meseca na +2 do +8 °C i nedelju dana na sobnoj temperaturi.

## MERE PREDOSTROŽNOSTI ZA UPOTREBU

### Bezbednost

- Samo za *in vitro* upotrebu. Samo za profesionalnu upotrebu. Samo za tehnički obučeno osoblje. Rukovati u skladu sa dobrim laboratorijskim praksama i razmotriti bilo koji reagens i bilo koji uzorak kao potencijalno toksičan i / ili infektivni.
- Nosite laboratorijski mantil, rukavice i naočare; Nemojte piti, jesti ili pušiti u laboratoriji. Ne usta pipete.
- Pozitivna kontrola je serum ljudskog porekla koji je inaktiviran za HIV 1 i 2, viruse hepatitisa B i hepatitisa C. Međutim, mora se rukovati kao potencijalno infektivnim proizvodom.
- Supstrat sadrži mešavinu NBT i BCIP, toksičan u kontaktu (koža i sluzokože) i udisanjem.
- Reagensi sadrže natrijum azid koji može da formira eksplozivne metalne soli sa olovom i bakrom. Isperite svako izlivanje vodom.
- Odložite otpad (uzorci, nastavci, epruvete, tečnost za pranje, korišćeni reagens ...) u skladu sa dobrim praksama koje se koriste u industriji i važećim propisima u zemlji.
- Svaki ozbiljan incident mora biti prijavljen proizvođaču i nadležnom organu.

### Predostrožnosti

- Pročitajte i interpretirajte rezultate pod direktnim belim svetlom.
- Poželjno je koristiti sve reagense iz iste serije. Ako se koriste različite serije, obezbedite sledljivost.
- Koristite trake u numeričkom redosledu. Ne mešajte trake iz različitih serijskih brojeva; Koristite transfere uzastopno. Uspostavite poseban plan distribucije pre početka testa.
- Ne dodirujte trake prstima; koristite pincetu.
- Reagensi se moraju dobro izmešati pre upotrebe, posebno koncentrisani pufer za ispiranje.
- Zatvorite bočice nakon upotrebe; Nemojte koristiti ako je supstanca slučajno uvedena u reagense. Nemojte koristiti reagens iz bočice koja predstavlja znake curenja. Nemojte koristiti zamučeno ili taloženo rešenje.
- Koristite samo nastavke za pipete za jednokratnu upotrebu. Izbegavajte bilo kakvu međukanalnu kontaminaciju. Pazite na formiranje pene ili mehurića u nastavcima pipeta (bakterijska kontaminacija bočica reagensa).
- Posude za inkubaciju čistite samo destilovanom vodom (nikada ne koristite deterdžent ili izbeljivač).
- Izostavljanje uzorka ili distribucija neadekvatnog volumena može učiniti rezultat testa negativnim ili pozitivnim, bez obzira na njegov stvarni status.

## KOLEKCIJA PRIMERAKA

Aseptički prikupiti uzorke u suvim epruvetama. Potrebno je najmanje 10 µL seruma.

Držite uzorke na 2-8 °C dok se ne obrade. Ako je potrebno da ih čuvate duže od nedelju dana, zamrznite uzorke na -20 ± 5 °C. Nemojte koristiti kontaminirani uzorak. Izbegavajte zamrzavanje i odmrzavanje uzoraka više puta.

Iako nije primećena posebna unakrsna reakcija sa hemolizovanim, ikteričnim ili lipidnim serumima, preporučuje se pažljivo tumačenje rezultata upotrebe takvih uzoraka.

## PRIPREMA REAGENSA

**Pufer za ispiranje:** Za 4 testa, u čistoj boci, razblažite 10 ml koncentrata za ispiranje 10X (**R6**) u 90 ml destilovane ili dejonizovane vode. Pazite da dobro izmešate razblaženi pufer.

## POSTUPAK TESTIRANJA

*Nota Bene:* Preporučuje se da se izvrši multiparametarsko testiranje (vidi LDBIO imunoblot opseg) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i osigurala bolja kontrola kvaliteta.

1. Pripremite plan distribucije za uzorke i C + pozitivnu kontrolu (**R10**).

Samo korišćenjem ove kontrole test može biti tehnički potvrđen i identifikacija napravljena, za dati serijski broj, specifičnih razvijenih traka. C + traka se ne može koristiti za tumačenje rezultata traka iz blota drugog serijskog broja.

2. Odrežite potreban broj traka (R1) pomoću skalpela i čistog i suvog ravnog prozirnog lenjira, zadržavajući plavu liniju pozicioniranja na trakama: držite trake čvrsto na mestu sa lenjirom i izrežite ih sa strane napreznja (brojevi su vidljivi kroz lenjir).
3. Distribuirati 1.2 ml uzorka pufera (R2) u svakom kanalu u skladu sa utvrđenim planom.
4. Depozit, u svom numeričkom redosledu, numerisane trake u kanalima: Neke trake se rehidriraju na površini pufera za oko 2 minuta, sa brojem vidljivim na vrhu, onda lagano protresite ležište da ih potpuno uronite u pufer.
5. Distribuirajte uzorke i pozitivne kontrole: prema planu distribucije, po stopi od 10 µl po kanalu. Lagano protresite poslužavnik nakon svakog doziranja. Postavite poslužavnik na platformu za mešanje. **Inkubirati 90 minuta** ± 5 minuta na 20-26 °C.
6. Korak ispiranja: Ispraznite sadržaj kanala Pasterovom pipetom ili okretanjem posude za inkubaciju. Raspršite 2 do 3 ml razblaženog pufera za ispiranje u svakom kanalu. Inkubirajte na platformi za mešanje 3 minuta. Ponovite 2 puta, a zatim ispraznite sadržaj kanala. Uverite se da se trake ne okreću tokom ovih koraka.
7. Mameti 1.2 mL anti IgG konjugata (R3) u svaki kanal. Postavite poslužavnik na platformu za mešanje. **Inkubirati 60 minuta** ± 5 minuta na 20-26 °C.
8. Korak ispiranja: ponovite korak 6.
9. Distribuirajte 1.2 ml NBT / BCIP supstrata (R5) u svaki od kanala. Postavite na platformu za mešanje i zaštitite od direktne svetlosti. **Inkubirati 60 minuta** ± 5 minuta na 20-26 °C.

Bez obzira na parametar, pratite razvoj boje. Razvoj se može zaustaviti ako boja pozadine trake potamni do tačke u kojoj je teško čitati (kvalitet koraka ispiranja ima fundamentalni uticaj na obojenost pozadine). Imajte na umu da će trake olakšati dok se suše.

10. Zaustavite reakciju aspiracijom supstrata sa Pasterovom pipetom ili okretanjem kade za inkubaciju i doziranjem 2 ml destilovane ili dejonizovane vode u kanalima. Ponovite ovaj poslednji korak ispiranja još jednom.
11. Sušenje traka: Sa kanalima i dalje ispunjenim vodom, uzmite trake po numerisanom kraju pomoću pincete i deponujte ih, sa vidljivim brojem, na upijajući papir Whatman. Ostavite da se osuši na vazduhu. Boja traka će prirodno osvetliti tokom sušenja. Tumačenje se mora izvršiti tek nakon završetka sušenja.
12. Skladištenje: Prenesite trake na list papira, koji će se koristiti za njihovo arhiviranje. Poravnajte linije pozicioniranja. Držeći ih na mestu ravnim lenjirom, vrh traka zalepите prozirnog lepljivom trakom.

Za dobro tumačenje, trake moraju biti postavljene u skladu sa njihovim numeričkim redosledom, razmaknute na maksimalno nekoliko milimetara. Nepouzdan je upoređivati trake koje su razmaknute daleko (npr. br.2 sa br.15). **Opasno je** (lažni rezultati) upoređivati trake iz različitih kompleta (trake sa različitim serijskim brojevima).

## KONTROLA KVALITETA I TUMAČENJE

Kontrola seruma (R10) koja se isporučuje sa kompletom mora biti sistematski uključena u bilo koju seriju imunoblota. Prikazuje tipičan profil i omogućava tehničku validaciju dobrog sprovođenja testa (trake moraju da se

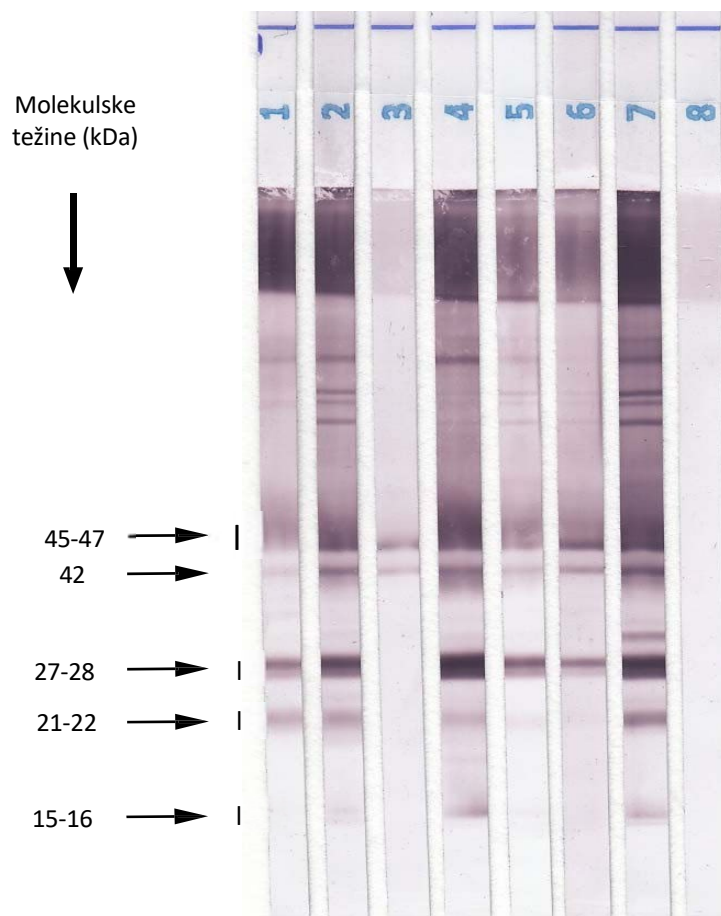
pojavljaju vrlo jasno na traci) i da precizno kalibriraju položaj i aspekt specifičnih traka kako bi se omogućilo tumačenje rezultata traka iz istog lota (isti serijski broj).

*Nota Bene:* Pozitivna kontrola (R10) profil može da varira u zavisnosti od broja serije reagensa koji se koriste. Odgovarajuće slike su dostupne na našem sajtu [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com) kao primer.

### Opis traka

- Pozitivan uzorak može predstaviti brojne trake koje se nalaze između 8 i 200k kilodaltona (kDa).
- Prostor za čitanje nalazi se na dnu trake, između 15 i 47 kDa.
- Najčešće je prisutno 5 traka: **P15-16, P21-22, P27-28, P42 i P45-47** na odgovarajućim molekulskim težinama (vidi fotografiju na *slici 1*).

Aspekt traka može biti promenljiv. P15-16, P21-22, P27-28 može imati oblik jedne velike trake, dublet od 2 uže trake, ili 1 od 2 komponentnih traka dubleta. P45-47 može izgledati kao više nejasna traka.



### Sl. 1: Primeri pozitivnih i negativnih rezultata

Profili su dati kao primeri. Trake su označene slovom "J" specifičnim za parametar iz serije "09003".

### Tumačenje

Istovremeno prisustvo **dva dobro definisana opsega** među **P15-16, P21-22, P27-28, P42 i P45-47** ukazuje na prisustvo anti-*T. cruzi* antitela u uzorku.

Da biste potvrdili rezultate, uvek uporedite profil imunoblota svakog uzorka sa profilom pozitivne kontrole R10. Aspekt traka je važan prilikom tumačenja testa.

## OGRANIČENJE UPOTREBE

- Dijagnoza zarazne bolesti ne može se utvrditi na osnovu jednog rezultata testa.
- Serološki rezultati moraju se tumačiti u skladu sa dostupnim informacijama (npr. epidemiologija, klinička, snimanje, biologija ...) kako bi se postavila dijagnoza. Ne treba ih koristiti za postavljanje dijagnoze samo na osnovu njihove pozitivnosti.

## UČINAK (vidi literaturu reference str. 9)

Nezavisna francuska referentna laboratorija procenila je učinak **CHAGAS WB IgG** kompleta u poređenju sa 2 trenutna komercijalna skrining testa, ELISA i IFA. Izračunat je učinak osetljivosti i specifičnosti testova, kao i njihovi intervali pouzdanosti od 95% prema Wilsonovoj metodi sa korekcijom kontinuiteta.

### Osetljivost (Se)

100 seruma pacijenata zaraženih Chagasovom bolešću (uključujući 11 akutnih faza) testirano je u WB, ELISA i IFA prema preporukama opisanim u uputstvima svakog kompleta. Čagasova bolest je dokazana kliničkim podacima.

	CHAGAS WB IgG	ELISA	IFA
<b>POZITIVAN</b>	100	99	96
<b>NEGATIVNO</b>	0	1	4
<b>Se 95% (%)</b>	100% [95.4 ; 100]	99% [93.8 ; 100]	96% [88.2 ; 98.1]

**Tabela 1:** Rezultati u poređenju između CHAGAS WB IgG testa i dva komercijalna skrining-testova, ELISA i IFA, na 100 Chagas pozitivnih uzoraka.

### Specifičnost (Sp)

Testirano je 178 seruma koji odgovaraju 178 različitih pacijenata prateći indikacije predstavljene u uputstvima svakog testa. Ovi serumski pripadali su zdravim pacijentima (79), malarije (22), lišmanioze (44), amebijaze (6) i toksoplazmoza (27).

	CHAGAS WB IgG	ELISA	IFA
<b>NEGATIVNO</b>	178	160	148
<b>POZITIVAN</b>	0	18	30
<b>Sp 95% (%)</b>	100% [97.4 ; 100]	89.9% [85.9 ; 91.8]	83.1% [76.6 ; 88.2]

**Tabela 2:** Rezultati u poređenju između CHAGAS WB IgG testa i dva komercijalna skrining testova, ELISA i IFA na 178 Chagas negativnih uzoraka.

Na ovoj populaciji, specifičnost CHAGAS WB IgG bila je **100%**.

ELISA je predstavila 10% lažno pozitivnih rezultata (14% pacijenata zaraženih *Leishmaniom*). IFA je predstavila 17% lažno pozitivnih rezultata (30% pacijenata zaraženih *Leishmaniom*).

## Zaključak

U ispitivanoj populaciji, WB je predstavio performanse osetljivosti i specifičnosti superiornije od onih ELISA i IFA tehnika koje se koriste u poređenju. Konkretno, nije primećena unakrsna reakcija sa *Leishmania* pozitivnim serumima. Ovi rezultati čine Chagas WB test odličan test za potvrdu *T. cruzi* infekcije.

## Ponovljivost

Testirana je ponovljivost između serija i između lotova. U oba slučaja, korelacija između seruma u odnosu na određene trake je odlična.

## Smetnje

Iako nije primećena posebna unakrsna reakcija sa hemolizovanim, ikteričnim ili lipidnim serumima, preporučuje se pažljivo tumačenje rezultata upotrebe takvih uzoraka.

## REŠAVANJE PROBLEMA

**"Trake su blede sa malim kontrastom"**: Određeni serumi sa niskim koncentracijama antitela mogu dati takve rezultate.

**"Osenčena područja mogu se videti, više ili manje obojena, blago difuzna"**: Traka nije bila potpuno potopljena u jedan od reagensa i nije se pravilno inkubirala duž cele dužine. Trake boje mogu biti prisutne i tamo gde je uzorak deponovan ako poslužavnik nije uzdrman nakon doziranja.

**"Pozadinski šum je značajan, što čitanje veoma otežava"**: Ispiranje je bilo nedovoljno ili je poslednja inkubacija bila preduga. Obezbedite dobre tehnike izvođenja testa, poštujujte vreme ispiranja i obezbedite kvalitet vode. Smanjite vreme poslednje inkubacije. Izuzetno, određeni serumi mogu reagovati na nespecifičan način. Zatim, rezultat imunoblota se ne može koristiti.

Ovaj nespecifičan pozadinski šum može uključivati samo deo trake, čineći rezultate neinterpretabilnim samo za taj deo.

**"Talog se pojavljuje u rastvoru tokom poslednjeg koraka razvoja"**: supstrat može u stvari delimično taložiti (crne pahuljice) u puferu na kraju razvoja. Ovaj fenomen ne menja kvalitet razvoja koji se mora normalno nastaviti. Poslednje ispiranje destilovanom vodom eliminiše moguće prisutne čvrste čestice.

## BIBLIOGRAFIJA

- 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).

## OBAVEŠTENJE AŽURIRANJA – Molimo vas da pažljivo pročitate

DATUM IZLASKA	VERZIJA	REZIME MODIFIKACIJE
09/08/2021	Vs 04	Uklanjanje sigurnosnog upozorenja R5 - P45-47 više nejasnog opsega. Kontakt adresa e-pošte – Primeri fotografija – NaN <sub>3</sub> EUH 032.
30/11/2022	Vs 05	Nova adresa
05/07/2023	Vs 06	R6 bez NaN <sub>3</sub> . Strip identifikovan slovom. Moguća upotreba reagensa iz različitih serija.



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](http://www.ldbiodiagnostics.com) – info@ldbiodiag.com