

CHAGAS

CE



Western Blot IgG

Test de diagnóstico *in vitro* por inmunoblot
Técnica semiautomática / manual

#CHA-WB24G: 24 pruebas

#CHA-WB12G: 12 pruebas

#CHA-WB96G: 96 pruebas

INSTRUCCIONES DE USO

Encuentre más información e instrucciones de uso en su idioma en nuestra página web

www.ldbiodiagnostics.com

USO PREVISTO

CHAGAS Western Blot (WB) IgG es un test de diagnóstico serológico cualitativo para la determinación de las IgG anti *Trypanosoma cruzi* mediante una prueba por inmunoblot, previsto como prueba confirmatoria de resultados positivos por técnicas diagnósticas clásicas.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Técnica Western Blot

Los antígenos de *T. cruzi*, una vez separados mediante electroforesis, se unen mediante electrotransferencia a la superficie de una membrana de nitrocelulosa (llamada de transferencia), que se corta en 24 tiras numeradas del 1 al 24.

Desarrollo de la prueba

Cada muestra de suero a ensayar se incuba por separado con una tira. Los anticuerpos, potencialmente presentes en la muestra, se unen de forma selectiva a los antígenos. La anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina se une posteriormente a los anticuerpos unidos. Finalmente, los inmunocomplejos reaccionan al sustrato. Los antígenos reconocidos por los anticuerpos de tipo IgG presentes en las muestras aparecen como bandas transversales de color púrpura.

REACTIVOS SUMINISTRADOS

Por defecto: Caja con 24 pruebas (#CHA-WB24G)

Cursiva: caja con 12 pruebas (#CHA-WB12G) - **negrita**: Caja con 96 pruebas (#CHA-WB96G).

ID	Cantidad	Descripción	Composición
R1	1	Carpeta(s) con 24 (12, 4x24) TIRAS: precortadas + estándares de color. (Cada carpeta y cada tira se identifica mediante un número de serie único)	Nitrocelulosa sensibilizada. Peso molecular codificado por colores (kDa): Azul: 250, Azul: 150, Azul: 100, Rosa: 75, Azul: 50, Verde: 37, Rosa: 25, Azul: 20, Azul: 15, Amarillo: 10.
R2	1	Frasco de 30 (30, 125) mL de DILUYENTE DE MUESTRAS (Listo para su uso - solución rosada).	Tampón + tensioactivo + NaN3 (<0,1%).
R3	1	Frasco(s) de 30 (30, 2x60) mL de CONJUGADO ANTI IgG (Listo para su uso - solución azul).	Tampón + sueros policlonales de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina + NaN3 (<0,1%) + estabilizadores.
R5	1	Frasco de 30 (30, 125) mL de SUSTRATO (Listo para su uso - frasco marrón opaco).	Tampón + nitroazul de tetrazolio (NBT) + 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) + estabilizadores.
R6	1	Frasco de 60 (60, 250) mL de TAMPÓN DE LAVADO CONCENTRADO 10X (Para diluir 10 veces en agua destilada - solución incolora).	Tampón + tensioactivo.
R10	1	Vial de 100 (100, 2x100) µl de SUERO de CONTROL POSITIVO (Listo para su uso - tapón rojo).	Tampón + mezcla de suero humano positivo en serología para <i>Trypanosoma</i> + NaN3 (<0,1%) + estabilizadores.

R1: La letra que precede a cada número de banda es específica del parámetro.

R2, R3, R5 y R6 son los mismos para todos los kits y tienen un número de lote único dependiendo solo de su fecha de producción. **Se recomienda realizar series multiparamétricas (véase el rango de inmunoblot de LDBIO), para limitar el número de frascos abiertos y asegurar un mejor control de calidad.**

El **R10** está calibrado en inmunoblot de acuerdo con un lote de referencia y solo está dedicado a esta técnica.

R3, R10 (NaN3): EUH 032 - En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

EUH 210 Puede solicitar la ficha de datos de seguridad, consultarla en nuestra página web www.ldbiodiagnostics.com.

MATERIAL NECESARIO Y NO SUMINISTRADO

- Bandejas de incubación de polipropileno multicanal para mini-blot (#WBPP-08 o equivalente).
- Agitador ascilante para inmunoblot sistema de vacío para líquidos (los tubos #WBPP-08 que suministramos pueden vaciarse con un simple giro).
- Tubos y material para la extracción de muestras, provetas graduadas.
- Pipetas automáticas, micropipetas y puntas desechables (volúmenes de 10 µl, 1,2 ml y 2 ml).
- Agua destilada o desionizada. Papel absorbente (p. ej., papel de filtro Whatman), cinta adhesiva transparente.
- Guantes, pinzas para manipular las tiras, cuchilla o bisturí y regla plana transparente.

Nota: nuestros reactivos pueden utilizarse en un procesador automático de Inmunoblot. **Se debe prestar atención a los contaminantes químicos de nuestros reactivos en caso de que el procesador sea compartido con reactivos de otro fabricante** (un ejemplo conocido: contaminación por el TWEEN 20), y contaminaciones bacterianas. Frascos de reserva para el procesador. Después del procesamiento, no vuelva a colocar los reactivos usados restantes en los frascos originales.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Almacenar a una temperatura entre 2 y 8°C. Los reactivos del Kit permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja exterior y las etiquetas de los frascos. No use reactivo contaminado o turbio. El tampón de lavado diluido al 1/10 permanece estable durante 2 meses a una temperatura entre +2 y +8 C y una semana a temperatura ambiente.

PRECAUCIONES DE USO

Seguridad

- Solo para diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional. Solo para personal capacitado técnicamente. Manipule conforme a la buena práctica de laboratorio y considere cualquier reactivo y cualquier muestra como potencialmente tóxicos y/o infecciosos.
- Haga uso de una bata de laboratorio, guantes y gafas; no beba, coma ni fume en el laboratorio. No introduzca las pipetas en la boca.
- El control positivo es un suero de origen humano que ha sido inactivado para los virus VIH 1 y 2, hepatitis B y hepatitis C. No obstante, debe manipularse como si fuera un producto potencialmente infeccioso.
- El sustrato contiene una mezcla de NBT y BCIP, tóxica al contacto (con la piel y las membranas mucosas) y por inhalación.
- Los reactivos contienen azida sódica, que puede formar sales metálicas explosivas con el plomo y el cobre. Enjuague las salpicaduras con agua.
- Elimine los residuos (muestras, puntas, tubos, líquido de lavado, reactivo usado...) de acuerdo con las buenas prácticas empleadas en la industria y la normativa vigente del país.
- Cualquier incidente grave debe ser objeto de una declaración al fabricante y a la autoridad competente.

Precauciones

- Lea e interprete los resultados bajo luz blanca directa.
- Es preferible utilizar todos los reactivos del mismo lote. Si se utilizan lotes diferentes, hay que garantizar la trazabilidad.
- Utilice las tiras en orden numérico. No mezcle las tiras procedentes de cajas con números de serie diferentes; utilice las tiras consecutivamente. Establezca un plan de distribución específico antes de comenzar la prueba.
- No toque las tiras con los dedos; utilice pinzas.
- Los reactivos deben mezclarse bien antes de su uso, especialmente el tampón de lavado concentrado.
- Cierre los frascos después de cada uso; no se deben utilizar si se introdujera accidentalmente una sustancia en los reactivos. No utilice el reactivo de un frasco que presente indicios de fuga. No utilice soluciones turbias o precipitadas.
- Utilice solo puntas de pipetas desechables. Evite cualquier contaminación entre los canales. Vigile la formación de espuma o burbujas en las puntas de las pipetas (contaminación bacteriana de los frascos de reactivos).
- Limpie las bandejas de incubación solo con agua limpia y seguidamente con agua destilada (no utilice nunca detergente ni lejía).
- La omisión de una muestra o la distribución de un volumen inadecuado pueden dar lugar a un resultado negativo o positivo de la prueba, independientemente de su situación real.

RECOGIDA DE MUESTRAS

Recoja las muestras en tubos secos de forma aséptica. Se requiere una cantidad mínima de suero de 10 µL.

Mantenga las muestras a una temperatura entre 2 y 8 °C hasta su procesamiento. Congele las muestras a una temperatura de -20 ± 5 °C si precisan almacenamiento durante más de una semana. No utilice la muestra que esté contaminada. Evite la congelación y descongelación repetidamente de las muestras.

Aunque no se ha observado ninguna reacción cruzada con sueros hemolizados, ictericos o lipídicos, se recomienda interpretar los resultados de dichas muestras con cautela.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Tampón de lavado: para 4 pruebas, en un frasco limpio, diluya 10 mL de concentrado de lavado 10X (R6) en 90 mL de agua destilada o desionizada. Tenga cuidado de mezclar bien el tampón diluido.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Nota Bene: se recomienda realizar series multiparamétricas (véase el rango de inmunoblots de LDBIO), para limitar el número de frascos abiertos y asegurar un mejor control de calidad.

1. Prepare un plan de distribución para las muestras y un control positivo C+ (R10).

Solo mediante el uso de este control será posible validar la prueba técnicamente y llevar a cabo la identificación, para un número de serie determinado de las bandas específicas desarrolladas. No puede utilizarse una tira C+ para interpretar los resultados de los inmunoblots con un número de serie diferente.

2. Corte el número de tiras necesario (R1) con un bisturí y una regla plana transparente limpia, manteniendo la línea azul de posición en las tiras: sujete las tiras con firmeza de acuerdo con la posición de la regla y córtelas por el lado donde se está haciendo presión (los números son visibles a través de la regla).
3. Distribuya 1,2 mL de diluyente de muestras (R2) en cada canal de acuerdo con el plan establecido.
4. Deposite, por orden numérico, las tiras numeradas en los canales: deje que las tiras se rehidraten en la superficie del diluyente durante aproximadamente 2 minutos, con el número visible en la parte superior, LUEGO agitando suavemente la bandeja para sumergirlas completamente en el diluyente.
5. Distribuya las muestras y los controles positivos: de acuerdo con el plan de distribución, a razón de 10 µl por canal. Agite suavemente la bandeja después de cada dispensación. Coloque la bandeja en un agitador oscilante.
Incube durante 90 minutos ± 5 minutos a temperatura entre 20 y 26 °C.
6. Fase de lavado: vacíe el contenido de los canales con una pipeta Pasteur o girando la bandeja de incubación. Distribuya entre 2 y 3 mL de tampón de lavado diluido en cada canal. Incube en el agitador oscilante durante 3 minutos. Repita 2 veces la operación, después vacíe el contenido de los canales. Asegúrese de que las tiras no se giran durante estas fases.
7. Distribuya 1,2 mL de conjugado anti-IgG (R3) en cada canal. Coloque la bandeja en el agitador oscilante.
Incube durante 60 minutos ± 5 minutos a una temperatura entre 20 y 26 °C.
8. Fase de lavado: repita el paso 6.
9. Distribuya 1,2 mL de sustrato NBT/BCIP (R5) en cada uno de los canales. Coloque en el agitador oscilante y proteja de la luz directa. **Incube durante 60 minutos** ± 5 minutos a una temperatura entre 20 y 26 °C.

Independientemente de cuál sea el parámetro, supervise la variación del color. La variación se puede interrumpir si se oscurece el color de fondo de la tira hasta llegar a un punto en que la lectura sea difícil (la calidad de las fases de lavado influye directamente en la coloración de fondo). Es preciso tener en cuenta que las tiras tienden a aclararse a medida que se secan.

10. Interrumpa la reacción mediante la aspiración de sustrato con una pipeta Pasteur o girando el cubo de incubación y distribuyendo 2 mL de agua destilada en los canales. Repita una vez más esta última fase de lavado.
11. Secado de las tiras: con los canales todavía llenos de agua, sujete las tiras por el extremo numerado con las pinzas y deposítelas en el papel absorbente Whatman con el número visible. Deje secar al aire. El color de las tiras se aclarará de forma natural al secarse. La interpretación de la prueba solo debe realizarse una vez finalizado el secado.
12. Almacenamiento: transfiera las tiras a una hoja de papel, que se utilizará para archivarlas. Alinee las líneas de posición. Manténgalas de acuerdo con la posición de la regla plana, pegue la parte superior de las tiras con cinta adhesiva transparente.

Para una interpretación acertada, las tiras deben ordenarse por transferencia y por orden numérico y debe haber un espacio de separación máximo entre ellas de varios milímetros. No es fiable comparar las tiras que están muy separadas (p. ej., la n.º 2 con la n.º 15). **Es arriesgado** (resultados falsos) comparar las tiras de kits diferentes (tiras con números de serie diferentes).

CONTROL DE CALIDAD E INTERPRETACIÓN

El suero de control (R10) suministrado con el kit debe incluirse sistemáticamente en las series de inmunoblot. Muestra el perfil típico y permite la validación técnica del desarrollo satisfactorio de la prueba (las bandas deben ser claramente visibles en la tira) y calibrar con precisión la posición y el aspecto de las bandas específicas para permitir la interpretación de los resultados de las tiras de la misma transferencia (con el mismo número de serie).

Nota Bene: El perfil del control positivo (R10) puede variar según el número de lote de los reactivos utilizados. Las imágenes correspondientes están disponibles en nuestro sitio web www.ldbiodiagnostics.com como ejemplo.

Descripción de las bandas:

- Una muestra positiva puede presentar numerosas bandas con un peso molecular de entre 8 y 200 kDa.
- El área de lectura se encuentra en la parte inferior de la franja, entre 15 y 47 kDa.
- 5 bandas son las más frecuentes: **P15-16**, **P21-22**, **P27-28**, **P42** y **P45-47** con los correspondientes pesos moleculares (ver fotografía en la **Fig. 1**).

El aspecto de las bandas puede ser variable. El P15-16, P21-22, P27-28 puede tomar la forma de una sola banda grande, un doblete de 2 bandas más estrechas, o de 1 de las 2 bandas componentes del doblete. P45-47 puede aparecer como una banda más difusa.

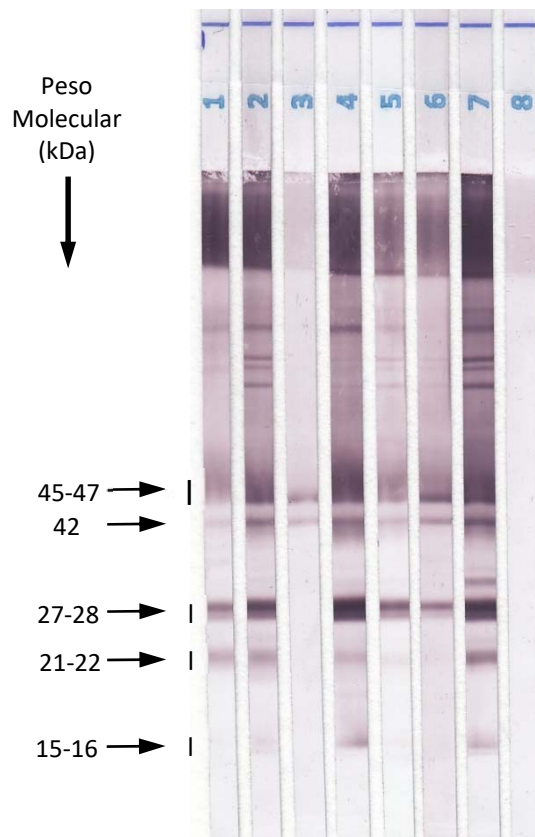


Fig. 1: ejemplos de resultados positivos y negativos

Los perfiles se dan como ejemplos. Las tiras están marcadas con la letra "J" específica del parámetro del lote "09003".

Interpretación

La presencia **simultánea** de dos bandas bien definidas entre **P15-16, P21-22, P27-28, P42 y P45-47** indica la presencia de anticuerpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi*.

Para validar los resultados, se debe comparar siempre el perfil de la inmunoblot de cada muestra con la del control positivo (R10). El aspecto de las bandas es importante a la hora de interpretar la prueba

LIMITACIONES DE USO

- El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no se puede establecer sobre la base de un solo resultado analítico.
- Estos resultados serológicos deben interpretarse de acuerdo con la información disponible (por ejemplo epidemiológica, clínica, imágenes, biológica, etc.) para poder establecer un diagnóstico. No deben utilizarse como base para el diagnóstico basándose únicamente en su positividad.

PRESTACIONES (VER REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS)

CHAGAS WB IgG fue objeto de un estudio comparativo con las técnicas IFA y ELISA en un laboratorio independiente. Se han calculado las prestaciones de sensibilidad y especificidad de las pruebas, así como sus intervalos de confianza del 95% según el método de Wilson con corrección de continuidad.

Sensibilidad (Se)

Se analizaron 100 sueros de pacientes infectados con la enfermedad de Chagas (incluidas 11 fases agudas) en WB, ELISA e IFA de acuerdo con las recomendaciones descritas en las instrucciones de cada kit. La enfermedad de Chagas fue probada por datos 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]

Tabla 1: Resultados comparados entre la prueba CHAGAS WB IgG y dos pruebas comerciales de cribado, ELISA e IFA, en 100 muestras positivas de Chagas.

Especificidad (Sp)

Se analizaron 178 sueros correspondientes a 178 pacientes diferentes siguiendo las indicaciones presentadas en las instrucciones de cada prueba. Estos sueros pertenecían a pacientes sanos (79), malaria (22), leishmaniasis (44), amebiasis (6) y toxoplasmosis (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]

Tabla 2 : Resultados comparados entre el kit CHAGAS WB IgG y dos ensayos comerciales de screening ELISA e IFA en 178 muestras negativas al Chagas

En esta población, la especificidad de **CHAGAS WB IgG fue del 100%**.

ELISA presentó 10% de resultados falsos positivos (14% de los pacientes infectados con Leishmania).

IFA presentó 17% de resultados falsos positivos (30% de pacientes infectados con Leishmania).

Conclusión

En la población estudiada, el WB presentó prestaciones de sensibilidad y especificidad superiores a los de las técnicas ELISA e IFA utilizadas en la comparación. En particular, no se observó ninguna reacción cruzada con los sueros positivos para la Leishmania. Estos resultados hacen que la prueba de Chagas WB sea una prueba excelente para la confirmación de la infección por *T. cruzi*.

Reproducibilidad

Se analizó la reproducibilidad entre series y entre lotes. En ambos casos, la correlación entre los sueros con respecto a las bandas específicas es excelente.

Interferencia

Aunque no se ha observado ninguna reacción cruzada con sueros hemolizados, ictericos o lipídicos, se recomienda interpretar los resultados de dichas muestras con cautela.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

"Las bandas son pálidas con poco contraste": Algunos sueros con concentraciones bajas de anticuerpos pueden aportar esos resultados.

"Pueden apreciarse áreas sombreadas, más o menos coloreadas y ligeramente difusas": La banda no se sumergió totalmente en uno de los reactivos y no incubó correctamente en toda su longitud. Puede asimismo haber presencia de manchas donde se depositó la muestra si no se sacudió la bandeja después de la dispensación.

"El ruido de fondo es considerable, lo que dificulta la lectura": Los lavados fueron insuficientes o la última incubación fue demasiado larga. Asegure unas buenas técnicas de ejecución de las pruebas, respete los tiempos de lavado y la calidad del agua. Reduzca el tiempo de la última incubación.

Excepcionalmente, algunos sueros pueden reaccionar de manera no específica. Entonces, no es posible utilizar el resultado del inmunoblot.

Este ruido de fondo no específico puede comprometer solo parte de la tira, arrojando resultados no interpretables para esa parte únicamente.

"Aparece un precipitado en la solución durante la última fase de desarrollo": Puede haberse precipitado el sustrato (escamas negras) en el tampón al final del desarrollo. Este fenómeno no altera la calidad del desarrollo, el cual debe continuarse normalmente. El último lavado con agua destilada elimina las posibles partículas sólidas presentes.

BIBLIOGRAFÍA

- 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).
- Angheben 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).

Notificación de actualización: lea atentamente

FECHA DE LANZAMIENTO	VERSION	RESUMEN DE MODIFICACIONES
09/08/2021	Vs 04	Eliminación de la advertencia de seguridad R5 - P45-47 banda más difusa. Dirección de correo electrónico de contacto – ejemplos fotografía– NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs05	Nueva dirección - Corrección de traducción
05/07/2023	Vs06	R6 sin NaN3. Tira identificada con la letra. Posible uso de reactivos 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