

BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS

REF **K272**

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste imunoenzimático indireto (ELISA) para determinação de Anticorpos IgG Anti-*Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da Doença de Chagas, em amostras de **sangue seco coletadas em papel filtro (DBS)**. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

**Metodologia:** Enzimaimunoensaio ou imunoenzimático. O kit BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio de detecção qualitativa de Anticorpos IgG contra *Trypanosoma cruzi* em amostras humanas de sangue seco coletadas em papel filtro. Anticorpos IgG específicos para *T. cruzi*, presentes na amostra de sangue seco são eluidas e se ligam aos Antígenos recombinantes de *T. cruzi* revestidos na microplaca formando imunocomplexos Antígeno-Anticorpos. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. Anticorpos Anti-IgG conjugado à Peroxidase são adicionados à microplaca, que é então incubada. Os Anticorpos Anti-IgG conjugados à Peroxidase se ligam aos complexos de Antígeno-Anticorpos ligados à placa. É realizada uma nova lavagem para remover os excedentes. Após esta etapa, o Substrato é adicionado e incubado produzindo uma cor azul, que indica a quantidade de Anticorpos IgG Anti-*T. cruzi* presentes nas amostras. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação havendo uma mudança de cor de azul para amarelo. A intensidade da cor é medida em 450/620 nm.

REAGENTES

**1- Placa Sensibilizada** – Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Placa sensibilizada com Antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi* e conservante.  
**2- Conjugado** – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão contendo Anti-IgG ligado à Peroxidase, surfactante, estabilizantes, corante e conservante.  
**3- Lavagem Concentrada** – Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloreto de Potássio < 100 mmol/L, Cloreto de Sódio < 5 mol/L), surfactante e conservante.  
**4- Substrato** – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão contendo Peróxido de Uréia, Tetrametilbenzidina (TMB) e conservante.  
**5- Solução de Parada** – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Ácido Clorídrico 1 M.  
**6- Tampão de Eluição** – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão, surfactante, estabilizante e conservante.  
**7- Controle Negativo DBS** – Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Amostra não reativa para Anticorpos IgG Anti *T. cruzi* impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**  
**8- Controle Positivo DBS** – Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Amostra reativa para Anticorpos IgG Anti-*T. cruzi*, impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**

APRESENTAÇÃO

| REAGENTES                       | 1                | 2                 | 3                 |
|---------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
|                                 | 96 Cavidades     | 192 Cavidades     | 480 Cavidades     |
| <b>1- Placa Sensibilizada</b>   | 1 Unidade        | 2 Unidades        | 5 Unidades        |
| <b>2- Conjugado</b>             | 1 Frasco x 12 mL | 1 Frasco x 24 mL  | 1 Frasco x 60 mL  |
| <b>3- Lavagem Concentrada</b>   | 1 Frasco x 50 mL | 1 Frasco x 100 mL | 1 Frasco x 250 mL |
| <b>4- Substrato</b>             | 1 Frasco x 12 mL | 1 Frasco x 24 mL  | 1 Frasco x 60 mL  |
| <b>5- Solução de Parada</b>     | 1 Frasco x 12 mL | 1 Frasco x 24 mL  | 1 Frasco x 60 mL  |
| <b>6-Tampão de Eluição</b>      | 1 Frasco x 20 mL | 1 Frasco x 40 mL  | 1 Frasco x 100 mL |
| <b>7- Controle Negativo DBS</b> | 1 Unidade        | 2 Unidades        | 3 Unidades        |
| <b>8- Controle Positivo DBS</b> | 1 Unidade        | 2 Unidades        | 3 Unidades        |

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior

Materiais necessários não contidos no kit:

**1-** Pipetas capazes de dispensar volumes de 100 a 500 µL com coeficiente de variação menor que 1,5%.  
**2-** Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 300 µL com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (opcional).  
**3-** Lavadora de microplaca para técnica em papel filtro.  
**4-** Leitora de ELISA com capacidade de absorbância em 450 e 620 nm de comprimento de onda.  
**5-** Papel absorvente para secar as microcavidades.  
**6-** Cronômetro ou relógio.  
**7-** Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluição.  
**8-** Água destilada ou deionizada.  
**9-** Ferramentas de Controle de Qualidade.  
**10-** Incubadora 37 °C ± 2 °C.  
**11-** Picotador de papel (diâmetro de 3 ± 0,2 mm).

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8 °C. O transporte em temperaturas até 30 °C não deverá exceder 5 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade. **Não congelar.**

CUIDADOS ESPECIAIS

1- Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

**2-** Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.  
**3-** O sachê contendo a microplaca deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no sachê, vedar e conservar entre 2 e 8 °C.  
**4-** A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes.  
**5-** Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos, e agentes oxidantes e redutores que podem alterar de forma significativa os resultados.  
**6-** A Solução de Parada contém Ácido Clorídrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.  
**7-** Toda matéria-prima do produto é testada sendo não reagente para HBsAg e Anti-HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação de todo produto que contém amostra biológica é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.  
**8-** Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.

**9-** Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.

**10-** Deve-se assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.

**11-** Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de Hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.

**12-** Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

**13-** Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

**14-** Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

**15-** É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Sangue Seco coletado em papel filtro (DBS) - EDTA ou Punção

O papel filtro utilizado dever ser específico para coleta de amostras de sangue seco, a exemplo dos modelos S&S 903 e Ahlstrom 226. O laboratório deve certificar da qualidade das amostras antes da sua utilização. As amostras de sangue seco em papel de filtro podem ser armazenadas à temperatura ambiente desde que fiquem protegidas de fonte de luz solar direta e em baixa umidade. Para armazenamento de até 2 anos, as amostras devem permanecer sob refrigeração, entre 2 e 8 °C. O armazenamento por tempo superior a 2 anos, deve ser realizado a temperatura de -20 °C.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Estabilidade Após Aberto

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS é estável após aberto até 30 dias. Esta estabilidade pode variar de acordo com as condições do teste e do ambiente. Portanto, sugere-se acompanhar o desempenho do produto utilizando controles internos do kit e os critérios de validação da técnica.

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

Solução de Lavagem

Diluir o conteúdo do frasco Nº 3 (Lavagem Concentrada) na proporção 1:20 de água destilada ou deionizada; por exemplo: 50 mL de solução de Lavagem Concentrada em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 e 30 °C por até 30 dias. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 °C até dissolução.

**Todos os demais reagentes são prontos para uso.**

TÉCNICA

**Para uso em equipamentos automáticos, consulte o SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente).**

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30 °C) por no mínimo 40 minutos.

**1-** Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS e amostras de sangue seco coletadas em papel de filtro (recomenda-se testar em duplicata). Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.

**2-** Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).

**3-** Adicionar um disco de 3mm de Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS e amostras de sangue seco coletadas em papel filtro, **previamente picotados**, nas cavidades determinadas.

**4-** Pipetar 100 µL do Tampão de Eluição, em todas as cavidades, **inclusive na cavidade para o Branco**.

**5-** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos, cobrir as cavidades com selador de placas.

**6-** Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.

**7-** Após incubação descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora para técnica de papel filtro). Usar 300 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, **previamente preparada**, e efetuar um total de cinco (5) ciclos de lavagem com agitação (*shake*) de 5 segundos. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.

**Nota:** Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.

**8-** Pipetar 100 µL de Conjugado em todas as cavidades, **inclusive na cavidade do Branco**.

**9-** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

**10-** Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.

**11-** Retirar o selador de placa das cavidades.

**12-** Repetir o item 7.

**13-** Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades. **Inclusive na cavidade do Branco**.

**14-** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

**15-** Incubar por 10 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.

**16-** Retirar o selador de placa das cavidades.

**17-** Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todas as cavidades.

**18-** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

**19-** Ler utilizando filtro duplo: 450 nm / 620 nm em até 15 minutos (no máximo).

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura do Branco e dos Controles estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

| ITEM                         | ABSORBÂNCIA |
|------------------------------|-------------|
| <b>Branco</b>                | < 0,150     |
| <b>Controle Negativo DBS</b> | < 0,150     |
| <b>Controle Positivo DBS</b> | > 0,500     |

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

CÁLCULOS

QUALITATIVO

Calcular Cut Off de acordo com a seguinte fórmula:

Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo DBS + 0,400.

Exemplo:

| ITEM                                                                  | ABSORBÂNCIA                           |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Controle Negativo DBS</b>                                          | 0,020                                 |
|                                                                       | 0,022                                 |
| <b>Cut Off = (Absorbância Média do Controle Negativo DBS) + 0,400</b> | ((0,020 + 0,022) / 2) + 0,400 = 0,421 |

Calcular o Índice dividindo a absorbância da amostra pelo valor de Cut Off.

Exemplo:

| ITEM                                | ABSORBÂNCIA          |
|-------------------------------------|----------------------|
| Amostra                             | 1,074                |
| Valor de Cut Off                    | 0,421                |
| Índice = Amostra / Valor de Cut Off | 1,074 / 0,421 = 2,55 |

**Nota:** Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usadas para cálculo dos resultados.

Cada laboratório deverá validar o cut-off conforme instrumentação utilizada e população pesquisada.

#### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Após o cálculo do Índice das amostras, considerar os índices abaixo para determinação dos resultados.

| RESULTADOS              | QUALITATIVO |
|-------------------------|-------------|
|                         | ÍNDICE      |
| Negativo (Não Reagente) | ≤ 0,8       |
| Indeterminado           | 0,8 e 1,2   |
| Positivo (Reagente)     | ≥ 1,2       |

Amostras com índice superior ou igual a 1,2 são consideradas como positivas, amostras com índice inferiores ou igual a 0,8 são consideradas como negativas e amostras que apresentam índice entre 0,8 e 1,2 são consideradas indeterminadas. Dessa forma, temos que a amostra citada no exemplo, cuja absorbância foi 1,074 e índice de 2,55, apresenta resultado positivo (índice ≥ 1,2).

**Observações:** No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada em duplicata. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecerem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada. A interpretação de um teste diagnóstico não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis, antes do diagnóstico descritivo da doença. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

#### LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnóstico, não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis antes do diagnóstico definitivo. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

#### INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi observada para as concentrações de Triglicérides 1200 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 10 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Reumatoide 980 UI/mL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL.

#### REATIVIDADE CRUZADA

Foi realizado um estudo com 72 amostras de sangue seco coletada em papel filtro negativas para anticorpos IgG Anti-*Trypanosoma cruzi*, mas positivas para outras infecções, a fim de se avaliar a possibilidade de reatividade cruzada destes interferentes no resultado do BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS. Dentre elas 10 amostras positivas para Sífilis, 10 amostras positivas para HCV, 9 amostras positivas para HBsAg, 8 amostras positivas para Zika, 10 amostras positivas para CMV, 10 amostras positivas para Rubéola, 5 amostras positivas para HIV e 10 amostras positivas para Toxoplasmose. Não foi observado reatividade cruzada com amostras positivas para Sífilis, HCV, HBsAg, Zika, CMV, Rubéola, HIV e Toxoplasmose. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de reatividade cruzada. O diagnóstico final deve considerar os dados clínicos do paciente juntamente com outros dados laboratoriais.

#### CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

#### DESEMPENHO DO PRODUTO

##### PRECISÃO Repetibilidade

A repetibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

| Repetibilidade               | Amostra |        |        |
|------------------------------|---------|--------|--------|
|                              | 1       | 2      | 3      |
| Média                        | 0,780   | 0,103  | 0,116  |
| Desvio Padrão                | 0,092   | 0,013  | 0,019  |
| Coefficiente de Variação (%) | 11,855  | 12,887 | 16,394 |

##### Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

| Reprodutibilidade            | Amostra |        |        |
|------------------------------|---------|--------|--------|
|                              | 1       | 2      | 3      |
| Média                        | 0,740   | 0,141  | 0,092  |
| Desvio Padrão                | 0,074   | 0,014  | 0,015  |
| Coefficiente de Variação (%) | 9,910   | 10,703 | 16,268 |

#### SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS foi utilizado para a análise de amostras clínicas previamente caracterizadas e confirmadas através de outro método de enzimaímunoensaio de referência. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS é > 99,9% e a especificidade clínica é 99,01%.

|                                 |          | Resultado Referência |          |       |
|---------------------------------|----------|----------------------|----------|-------|
|                                 |          | Positivo             | Negativo | Total |
| BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS | Positivo | 104                  | 0        | 104   |
|                                 | Negativo | 1                    | 100      | 101   |
|                                 | Total    | 105                  | 100      | 205   |

Sensibilidade Clínica: >99,9% (104/104) IC 95% = 96,50 a 100%  
Especificidade Clínica: 99,01% (104/105) IC 95% = 94,60 a 100%

#### SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

A doença de Chagas é uma doença crônica causada por infecção com o protozoário *Trypanossoma cruzi* endêmica na América Latina. O parasita é transmitido aos seres humanos por um grupo de insetos da família *Reduviidae*, sendo o barbeiro (*Triatoma infestans*), o principal vetor. A infecção também pode ser transmitida congenitamente, pela transfusão de sangue ou transplantes de órgãos. Esta infecção afeta vários órgãos em diferentes graus e sistemas, especialmente do coração e do trato gastrointestinal.

#### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1- Burns Jr. JM, ET al. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of Trypanosoma cruzi. Proc Natl Acad Sci USA 89: 1239-1243, 1992.
- 2- Gruber, A. anda Zingales, B. Trypanosoma cruzi: Characterization of two recombinant antigens with potencial application in the diagnosis of Chagas Disease. Exp. Parasitol. 76:1-12, 1993.
- 3- Ibañez, C.F., Affranchino, J.L., Medina, R.A., Reyes, M.B., Leguizamon, S., Camargo, M.E., Aslund, L., Petteron, U. and Frasch, A.C.C. Multiple Trypanossoma Cruzi antigens containing tabdemly repeated amino acid sequence motifs. Mol. Biochem. Parasitol 30:27-34, 1998.
- 4- Peralta JM, et al. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. J Clin Microbiology 32(4): 971-974, 1994.
- 5- Spencer, H.C., Allain, D.S., Sulzer, A.J., Collins, W.E. Evaluation of the Micro Enzyme Lynked Immunosorbent Assay for Antibodies to Trypanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29 (2): 179.182, 1980.
- 6- Umezawa ES, ET al. Evaluation of recombinant antigen for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America, J Clin Microbiol 37(5): 1554-1560, 1999.
- 7- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR
- 8- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- 9- TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
- 10- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

#### GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

#### QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca  
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Tel.: (31) 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

#### ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente  
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

**Número de Registro do kit BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS na ANVISA:** 10269360426

**Revisão:** Julho/2023

## SIMBOLOGIA UNIVERSAL

|  |                                        |  |                                                |
|--|----------------------------------------|--|------------------------------------------------|
|  | NÚMERO DE CATÁLOGO                     |  | FABRICADO POR                                  |
|  | NÚMERO DO LOTE                         |  | CONTROLE                                       |
|  | DATA DE FABRICAÇÃO                     |  | CONTROLE POSITIVO                              |
|  | DATA DE VALIDADE (último dia do mês)   |  | CONTROLE NEGATIVO                              |
|  | LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)    |  | RISCO BIOLÓGICO                                |
|  | O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTE |  | INFLÂMVEL                                      |
|  | CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO            |  | CORROSIVO                                      |
|  | PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO      |  | TÓXICO                                         |
|  | PROTEGER DA LUZ E CALOR                |  | NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA |
|  | NÃO REUTILIZE                          |  | PRODUTO ESTERELIZADO                           |
|  | CUIDADO                                |  | PERIGO                                         |

BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS

REF: K272

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Prueba inmunoenzimática indirecta (ELISA) para la determinación de Anticuerpos IgG contra *Trypanosoma cruzi*, el protozooario que causa la enfermedad de Chagas, en muestras de **sangre seca recolectadas en papel de filtro (DBS)**. Sólo para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

**Metodología:** Inmunoensayo enzimático o inmunoensayo enzimático. El kit BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida basado en el principio de detección cualitativa de Anticuerpos IgG contra *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre humana seca recolectadas en papel de filtro. Los Anticuerpos IgG específicos para *T. cruzi*, presentes en la muestra de sangre seca, se eluyen y se unen a los Antígenos recombinantes de *T. cruzi* recubiertos en la microplaca formando complejos inmunes Antígeno-Anticuerpo. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. Se añaden Anticuerpos Anti-IgG conjugados con Peroxidasa a la microplaca, que luego se incuban. Los Anticuerpos Anti-IgG conjugados con Peroxidasa se unen a los complejos Antígeno-Anticuerpo unidos a la placa. Se realiza un nuevo lavado para eliminar los excesos. Luego de este paso, se agrega el Sustrato y se incuban produciendo un color azul, que indica la cantidad de Anti-*T. cruzi* presente en las muestras. Se agrega Solución de Parada para detener la reacción con un cambio de color de azul a amarillo. La intensidad del color se mide a 450/620 nm.

REACTIVOS

- 1- Placa Sensibilizada** – Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Placa sensibilizada con Antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi* y conservante.
- 2- Conjugado** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución Tampón que contiene Anti-IgG ligada a Peroxidasa, surfactante, estabilizantes, colorante y conservante.
- 3- Lavado Concentrado** – Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tampón (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloruro de Potasio < 100 mmol/L, Cloruro de Sodio < 5 mol/L), tensioactivo y conservante.
- 4- Sustrato** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución Tampón que contiene Peróxido de Urea, Tetrametilbencidina (TMB) y conservante.
- 5- Solución de Parada** – Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Ácido Clorhídrico 1 M.
- 6- Tampón de Elución** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución Tampón, tensioactivo, estabilizante y conservante.
- 7- Control Negativo DBS** – Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Muestra no reactiva para Anticuerpos IgG Anti *T. cruzi* impregnadas en papel filtro. **Potencialmente infeccioso.**
- 8- Control Positivo DBS** – Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Muestra reactiva para Anticuerpos IgG Anti-*T. cruzi*, impregnadas en papel filtro. **Potencialmente infeccioso.**

PRESENTACIÓN

| REACTIVOS               | 1              | 2               | 3               |
|-------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                         | 96 Cavidades   | 192 Cavidades   | 480 Cavidades   |
| 1- Placa Sensibilizada  | 1 Unidad       | 2 Unidades      | 5 Unidades      |
| 2- Conjugado            | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 3- Lavado Concentrado   | 1 Vial x 50 mL | 1 Vial x 100 mL | 1 Vial x 250 mL |
| 4- Sustrato             | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 5- Solución de Parada   | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 6-Tampón de Elución     | 1 Vial x 20 mL | 1 Vial x 40 mL  | 1 Vial x 100 mL |
| 7- Control Negativo DBS | 1 Unidad       | 2 Unidades      | 3 Unidades      |
| 8- Control Positivo DBS | 1 Unidad       | 2 Unidades      | 3 Unidades      |

EQUIPOS E INSUMOS OPERACIONALES

**Materiales contenidos en el kit:**  
- Reactivos descritos en el cuadro anterior.

Materiales necesarios no contenidos en el kit:

- 1- Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 100 a 500 µL con un coeficiente de variación inferior al 1,5%.
- 2- Repetidor para pipeteo repetitivo de volúmenes de 300 µL con coeficiente de variación inferior al 1,5% o pipeta multicanal (opcional).
- 3- Lavador de microplacas para técnica sobre papel filtro.
- 4- Lector de ELISA con capacidad de absorbancia a 450 y 620 nm de longitud de onda.
- 5- Papel absorbente para secar las microcavidades.
- 6- Cronómetro o reloj.
- 7- Frasco para almacenar la Solución de Lavado después de la dilución.
- 8- Agua destilada o desionizada.
- 9- Herramientas de control de calidad.
- 10- Incubadora 37 ± 2 °C.
- 11- Trituradora de papel (diámetro 3 ± 0,2 mm).

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento debe estar entre 2 y 8°C. El transporte a temperaturas de hasta 30°C no debe exceder los 5 días. Mantener alejado de la luz y evitar la humedad. **No congelar.**

CUIDADOS ESPECIALES

- 1- Solo para uso diagnóstico *in vitro*.
- 2- Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados precisos.
- 3- El sobre que contiene la microplaca solo debe abrirse después de alcanzar la temperatura ambiente. Vuelva a colocar las tiras de micropocillos no utilizadas en el sobre, selle y almacene a una temperatura de 2 a 8 °C.
- 4- El agua utilizada para la limpieza del material debe ser reciente y libre de contaminantes.
- 5- Las columnas desionizantes saturadas liberan agua alcalina, varios iones y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar significativamente los resultados.
- 6- La solución de parada contiene ácido clorhídrico, que es un ácido fuerte. Por lo tanto, manéjelo con el debido cuidado.
- 7- Toda la materia prima del producto está testada y no reactiva para HBsAg y Anti-HCV. Sin embargo, estas pruebas no ofrecen una seguridad completa de la ausencia de agentes infecciosos. La manipulación de cualquier producto que contenga una muestra biológica es potencialmente capaz de transmitir enfermedades. Por lo tanto, es necesario tomar las debidas precauciones de bioseguridad al manipular estos productos.
- 8- Pipetee siempre los reactivos en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre los micropocillos.

- 9- Como medida de protección, la placa debe estar cubierta durante la reacción.
- 10- Se debe asegurar que el fondo del pozo esté limpio y seco y que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa. No permita que los pocillos se sequen durante el ensayo.
- 11- No exponer los reactivos, especialmente el Sustrato, a luz fuerte o vapores de hipoclorito durante las etapas de almacenamiento o incubación.
- 12- Recomendamos aplicar las normas locales, estatales y federales de protección ambiental para que la disposición de reactivos y material biológico se realice de acuerdo a la legislación vigente.
- 13- Para obtener información relacionada con la bioseguridad o en caso de accidentes con el producto, consulte la FISPQ (Ficha de Datos de Seguridad de Productos Químicos) disponible en el sitio web [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) o previa solicitud del SAC (Servicio de Assessoria al Cliente) de Quibasa.
- 14- No utilice el producto si el embalaje está dañado.
- 15- Es imperativo que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y sometidos a mantenimiento periódico.

MUESTRAS

Sangre Seca coletado en papel filtro (DBS) - EDTA o Punción

El papel filtro utilizado debe ser específico para la toma de muestras de sangre seca, como los modelos S&S 903 y Ahlstrom 226. El laboratorio debe certificar la calidad de las muestras antes de su uso. Las muestras de sangre secadas en papel de filtro se pueden almacenar a temperatura ambiente, siempre que estén protegidas de la luz solar directa y con poca humedad. Para almacenamiento de hasta 2 años, las muestras deben permanecer refrigeradas, entre 2 y 8 °C. El almacenamiento por un período superior a 2 años debe realizarse a una temperatura de -20 °C.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de Abierto

Los resultados de la prueba de estabilidad demuestran que el kit BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS es estable después de abierto hasta por 30 días. Esta estabilidad puede variar según la prueba y las condiciones ambientales. Por lo tanto, se sugiere monitorear el desempeño del producto utilizando los controles internos del kit y los criterios de validación de la técnica.

PREPARO DE LOS REACTIVOS DE TRABAJO

Solución de Lavado

Diluir el contenido de la ampolla Nº 3 (Lavado Concentrado) en proporción 1:20 de agua destilada o desionizada; por ejemplo: 50 mL de Solución de Lavado Concentrado en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Después de la preparación, la solución puede almacenarse entre 2 y 30 °C durante un máximo de 30 días. Si ocurre cristalización, calentar a 37 °C hasta disolución.

Todos los demás reactivos están listos para usar.

TÉCNICA

Para uso en equipos automáticos contactar con el SAC (Servicio de Assessoria al Cliente).

- Antes de comenzar el ensayo, coloque todos los reactivos, muestras y controles para que se establezcan a temperatura ambiente (15 – 30 °C) durante al menos 40 minutos.
- 1- Separar los pocillos a utilizar considerando: Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca colectadas en papel filtro (se recomienda realizar la prueba por duplicado). Devuelva las tiras de microplacas no utilizadas al paquete sellado original.
- 2- Separar la primera cavidad para el Blanco (OPCIONAL).
- 3- Agregar un disco de 3mm de Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca recolectadas en papel filtro, **previamente perforado**, en los pocillos determinados.
- 4- Pipetee 100 µL de Tampón de Elución en todos los pocillos, **incluido el pocillo en Blanco**.
- 5- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos, cubrir los pocillos con sellador de placas.
- 6- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 7- Después de la incubación, desechar el contenido de los pocillos por aspiración (Lavadora para técnica del papel filtro). Utilice aproximadamente 300 µL de Solución de Lavado **previamente preparada** y realice un total de cinco (5) ciclos de lavado con agitación (*shake*) de 5 segundos. Para garantizar el secado de la placa, al final del lavado, golpee la placa durante unos segundos sobre papel absorbente.
- Nota:** Un lavado/secado deficiente puede causar malos resultados.
- 8- Pipetee 100 µL de Conjugado en todos los pocillos, **incluido el pocillo en Blanco**.

- 9- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra los pocillos con el sellador de placas.
- 10- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 11- Retire el sellador de placas de los pocillos.
- 12- Repetir el punto 7.
- 13- Pipetear 100 µL de Sustrato en todos los pocillos. **Incluido el pocillo en Blanco**.
- 14- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra los pocillos con el sellador de placas.
- 15- Incubar durante 10 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 16- Retire el sellador de placas de los pocillos.
- 17- Pipetee 100 µL de Solución de Parada en todos los pocillos.
- 18- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos.
- 19- Lectura con doble filtro: 450 nm / 620 nm en hasta 15 minutos (máximo).

VERIFICACIÓN DE LA TÉCNICA

Verifique si los resultados obtenidos para la lectura del Blanco y los Controles son compatibles con los valores que se presentan a continuación:

| ITEM                 | ABSORBANCIA |
|----------------------|-------------|
| Blanco               | < 0,150     |
| Control Negativo DBS | < 0,150     |
| Control Positivo DBS | > 0,500     |

Si los valores están fuera de los valores esperados, se debe repetir la técnica.

CÁLCULOS

CUALITATIVO

Calcule Cut Off de acuerdo con la siguiente fórmula:

Cut Off = Absorbancia media del Control Negativo DBS + 0,400.

Ejemplo:

| ITEM                                                           | ABSORBANCIA                           |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Control Negativo DBS                                           | 0,020                                 |
|                                                                | 0,022                                 |
| Cut Off = (Absorbancia Media del Control Negativo DBS) + 0,400 | ((0,020 + 0,022) / 2) + 0,400 = 0,421 |



Calcule el índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de Cut Off.

Ejemplo:

| ITEM                                 | ABSORBANCIA          |
|--------------------------------------|----------------------|
| Muestra                              | 1,074                |
| Valor del Cut Off                    | 0,421                |
| Índice = Muestra / Valor del Cut Off | 1,074 / 0,421 = 2,55 |

**Nota:** Los datos que se muestran en los ejemplos son solo ilustrativos y no se pueden utilizar para el cálculo de resultados.

Cada laboratorio debe validar el Cut-Off de acuerdo con la instrumentación utilizada y la población investigada.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Después de calcular el índice de la muestra, considere los siguientes índices para determinar los resultados.

| RESULTADOS             | CUALITATIVO     |
|------------------------|-----------------|
|                        | ÍNDICE          |
| Negativo (No Reactivo) | ≤ 0,8           |
| Indeterminado          | Entre 0,8 y 1,2 |
| Positivo (Reactivo)    | ≥ 1,2           |

Las muestras con un índice mayor o igual a 1,2 se consideran positivas, las muestras con un índice menor o igual a 0,8 se consideran negativas y las muestras con un índice entre 0,8 y 1,2 se consideran indeterminadas. Así, tenemos que la muestra mencionada en el ejemplo, cuya absorbancia fue de 1,074 e índice de 2,55, presenta resultado positivo (índice ≥ 1,2).

**Notas:** En caso de resultados indeterminados, la muestra debe volver a analizarse por duplicado. Las muestras que arrojan resultados indeterminados repetidamente deben volver a analizarse con un método alternativo. Si los resultados siguen siendo indeterminados, se debe recolectar una nueva muestra en dos semanas. Prevalecerá el resultado de la última muestra recogida. La interpretación de una prueba diagnóstica no debe basarse en una sola prueba. Se deben incluir pruebas de confirmación adicionales antes de que una muestra se considere positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible, antes de realizar un diagnóstico descriptivo de la enfermedad. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

#### LIMITACIONES DEL PROCESO

La interpretación de una prueba diagnóstica no debe basarse en una sola prueba. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible antes del diagnóstico definitivo. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

#### INTERFERENTES

No se observó interferencia para las concentraciones de Triglicéridos 1200 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albúmina 10 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Factor Reumatoide 980 UI/mL, Proteína C Reactiva 41,2 mg/dL y Antiestreptolisina O 1023 UI/mL.

#### REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio con 72 muestras de sangre seca recolectadas en papel filtro negativas para anticuerpos IgG Anti-*Trypanosoma cruzi*, pero positivas para otras infecciones, con el fin de evaluar la posibilidad de reactividad cruzada de estos interferentes en el resultado de BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS. Entre ellos 10 muestras positivas para Sífilis, 10 muestras positivas para VHC, 9 muestras positivas para HBsAg, 8 muestras positivas para Zika, 10 muestras positivas para CMV, 10 muestras positivas para Rubéola, 5 muestras positivas para VIH y 10 muestras positivas para Toxoplasmosis. No se observó reactividad cruzada con muestras positivas para Sífilis, VHC, HBsAg, Zika, CMV, Rubéola, VIH y Toxoplasmosis. A pesar de los resultados encontrados, no se puede descartar por completo la posibilidad de reactividad cruzada. El diagnóstico final debe considerar los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

#### CONTROL DE CALIDAD INTERNO

El Laboratorio Clínico debe contar con un programa interno de control de calidad, donde se establezcan claramente los procedimientos, estándares, límites y tolerancia a las variaciones. Es importante señalar que todos los sistemas de medición tienen una variabilidad analítica característica, la cual debe ser monitoreada por los propios laboratorios. Para eso, se recomienda el uso de controles, que permitan evaluar la precisión y exactitud de las dosificaciones.

#### RENDIMIENTO DEL PRODUCTO

##### PRECISIÓN

##### Repetibilidad

La repetibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia:

| Repetibilidad                 | Muestra |        |        |
|-------------------------------|---------|--------|--------|
|                               | 1       | 2      | 3      |
| Promedio                      | 0,780   | 0,103  | 0,116  |
| Desvío Patrón                 | 0,092   | 0,013  | 0,019  |
| Coefficiente de Variación (%) | 11,855  | 12,887 | 16,394 |

##### Reproducibilidad

La reproducibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia:

| Reproducibilidad              | Muestra |        |        |
|-------------------------------|---------|--------|--------|
|                               | 1       | 2      | 3      |
| Promedio                      | 0,740   | 0,141  | 0,092  |
| Desvío Patrón                 | 0,074   | 0,014  | 0,015  |
| Coefficiente de Variación (%) | 9,910   | 10,703 | 16,268 |

#### SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICAS

El kit BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS se utilizó para el análisis de muestras clínicas previamente caracterizadas y confirmadas por otro método de inmunoensayo enzimático de referencia. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS es > 99,9% y la especificidad clínica es 99,01%.

|                                 |          | Resultado Referência |          |       |
|---------------------------------|----------|----------------------|----------|-------|
|                                 |          | Positivo             | Negativo | Total |
| BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS | Positivo | 104                  | 0        | 104   |
|                                 | Negativo | 1                    | 100      | 101   |
|                                 | Total    | 105                  | 100      | 205   |

Sensibilidad Clínica: >99,9% (104/104) IC 95% = 96,50 a 100%

Especificidad Clínica: 99,01% (104/105) IC 95% = 94,60 a 100%

#### SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

La enfermedad de Chagas es una enfermedad crónica causada por la infección con el protozoo *Trypanosoma cruzi*, endémico de América Latina. El parásito es transmitido a los humanos por un grupo de insectos de la familia *Reduviidae*, siendo la chinche besucona (*Triatoma infestans*) el principal vector. La infección también puede transmitirse de forma congénita, a través de transfusiones de sangre o trasplantes de órganos. Esta infección afecta a varios órganos en diferentes grados y sistemas, especialmente el corazón y el tracto gastrointestinal.

#### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1- Burns Jr. JM, ET al. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of Trypanosoma cruzi. Proc Natl Acad Sci USA 89: 1239-1243, 1992.
- 2- Gruber, A. anda Zingales, B. Trypanosoma cruzi: Characterization of two recombinant antigens with potencial application in the diagnosis of Chagas Disease. Exp. Parasitol. 76:1-12, 1993.
- 3- Ibañez, C.F., Affranchino, J.I., Medina, R.A., Reyes, M.B., Leguizamon, S., Camargo, M.E., Aslund, L., Petteron, U. and Frasch, A.C.C. Multiple Trypanossoma Cruzi antigens containing tabdemly repeated amino acid sequence motifs. Mol. Biochem. Parasitol 30:27-34, 1998.
- 4- Peralta JM, et al. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. J Clin Microbiology 32(4): 971-974, 1994.
- 5- Spencer, H.C., Allain, D.S., Sulzer, A.J., Collins, W.E. Evaluation of the Micro Enzyme Lynked Inmunosorbent Assay for Antibodies to Trypanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29 (2): 179.182, 1980.
- 6- Umezawa ES, ET al. Evaluation of recombinant antigen for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America, J Clin Microbiol 37(5): 1554-1560, 1999.
- 7- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337-44.2017 AACR
- 8- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- 9- TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
- 10- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

#### GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de ser liberado para el consumo, todos los reactivos **Bioclin** son testados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos es asegurada hasta la fecha de validez mencionada en el embalaje de presentación, desde que sean almacenados y transportados en las condiciones adecuadas.

#### QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca  
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Tel.: +55 31 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

#### ATENDIMIENTO AL CONSUMIDOR

Servicio de Asesoría al Cliente  
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

**Número de Registro del kit BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS en la ANVISA:** 10269360426

**Revisión:** Julio/2023

## SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

|  |                                               |  |                                             |
|--|-----------------------------------------------|--|---------------------------------------------|
|  | NUMERO DE CATALOGO                            |  | FABRICADO POR                               |
|  | NUMERO DE LOTE                                |  | CONTROLAR                                   |
|  | FECHA DE FABRICACIÓN                          |  | CONTROL POSITIVO                            |
|  | FECHA DE VALIDEZ<br>(último día del mes)      |  | CONTROL NEGATIVO                            |
|  | LÍMITE DE TEMPERATURA<br>(tienda)             |  | RIESGO BIOLÓGICO                            |
|  | EL CONTENIDO ES SUFICIENTE<br>PARA <N> PRUEBA |  | INFLAMABLE                                  |
|  | VER INSTRUCCIONES<br>DE USO                   |  | CORROSIVO                                   |
|  | PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO<br>IN VITRO           |  | TÓXICO                                      |
|  | PROTEGER DE<br>LUZ Y CALOR                    |  | NO UTILICE SI EL<br>EMBALAJE ESTA<br>DAÑADA |
|  | NO REUTILIZA                                  |  | PRODUCTO<br>ESTERILIZADO                    |
|  | PRECAUCIÓN                                    |  | PELIGRO                                     |

BIOLISA CHAGAS RECOMBINANT DBS

REF K272

INSTRUCTIONS FOR USE

FUNCTION

Indirect immunoenzymatic test (ELISA) for the determination of IgG Antibodies against *Trypanosoma cruzi*, the protozoan that causes Chagas disease, in **dried blood spot collected on filter paper (DBS)**. Only for *in vitro* diagnostic use.

PRINCIPLE OF ACTION

**Methodology:** Enzyme immunoassay or enzyme immunoassay.  
The BIOLISA CHAGAS RECOMBINANT DBS kit is a solid phase immunoenzymatic assay based on the principle of qualitative detection of IgG Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in dried human blood spot collected on filter paper. Specific IgG Antibodies for *T. cruzi*, present in the dried blood spot are eluted and bind to recombinant *T. cruzi* Antigens coated on the microplate forming Antigen-Antibody immune complexes. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. Peroxidase-conjugated Anti-IgG Antibodies are added to the microplate, which is then incubated. Peroxidase-conjugated Anti-IgG Antibodies bind to plate-bound Antigen-Antibody complexes. A new wash is carried out to remove the excesses. After this step, the Substrate is added and incubated producing a blue color, which indicates the amount of Anti-*T. cruzi* present in the samples. Stop Solution is added to stop the reaction with a color change from blue to yellow. Color intensity is measured at 450/620 nm.

REAGENTS

- 1- Sensitized Plate** – Store between 2 and 8 °C. Contains: Plate sensitized with *Trypanosoma cruzi* recombinant Antigens and preservative.
- 2- Conjugate** – Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer Solution containing Anti-IgG linked to Peroxidase, surfactant, stabilizers, dye and preservative.
- 3- Concentrated Washing** – Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer Solution (Phosphate < 0.5 mol/L, Potassium Chloride < 100 mmol/L, Sodium Chloride < 5 mol/L), surfactant and preservative.
- 4- Substrate** – Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer Solution containing Urea Peroxide, Tetramethylbenzidine (TMB) and preservative.
- 5- Stop Solution** – Store between 2 and 8°C. Contains: Hydrochloric Acid 1 M.
- 6- Elution Buffer** – Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer Solution, surfactant, stabilizer and preservative.
- 7- DBS Negative Control** – Store between 2 and 8 °C. Contains: Non-reactive sample for Anti *T. cruzi* IgG Antibodies impregnated on filter paper. **Potentially infectious.**
- 8- DBS Positive Control** – Store between 2 and 8 °C. Contains: Sample reactive for IgG Anti-*T. cruzi*, impregnated on filter paper. **Potentially infectious.**

PRESENTATION

| REAGENTS                | 1              | 2               | 3               |
|-------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                         | 96 Cavities    | 192 Cavities    | 480 Cavities    |
| 1- Sensitized Plate     | 1 Unit         | 2 Units         | 5 Units         |
| 2- Conjugate            | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 3- Concentrated Washing | 1 Vial x 50 mL | 1 Vial x 100 mL | 1 Vial x 250 mL |
| 4- Substrate            | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 5- Stop Solution        | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 6-Elution Buffer        | 1 Vial x 20 mL | 1 Vial x 40 mL  | 1 Vial x 100 mL |
| 7- DBS Negative Control | 1 Unit         | 2 Units         | 3 Units         |
| 8- DBS Positive Control | 1 Unit         | 2 Units         | 3 Units         |

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

Materials contained in the kit:

- Reagents described in the previous table

Required materials not contained in the kit:

- 1- Pipettes capable of dispensing volumes from 100 to 500 µL with a coefficient of variation less than 1.5%.
- 2- Repeater for repetitive pipetting of volumes of 300 µL with coefficient of variation less than 1.5% or multichannel pipette (optional).
- 3- Microplate washer for technique on filter paper.
- 4- ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 620 nm of wavelength.
- 5- Absorbent paper to dry the microcavities.
- 6- Stopwatch or clock.
- 7- Bottle to store the Washing Solution after dilution.
- 8- Distilled or deionized water.
- 9- Quality Control Tools.
- 10- Incubator 37 ± 2 °C.
- 11- Paper shredder (diameter 3 ± 0.2 mm).

STORAGE AND TRANSPORT CONDITIONS

The storage temperature should be between 2 and 8°C. Transport at temperatures up to 30°C should not exceed 5 days. Keep away from light and avoid moisture. **Do not freeze.**

SPECIAL CARES

- 1- For in vitro diagnostic use only.**
- 2- Strictly follow the proposed methodology to obtain accurate results.
- 3- The sachet containing the microplate should only be opened after reaching room temperature. Replace the unused microwell strips in the sachet, seal and store at 2 to 8 °C.
- 4- The water used to clean the material must be recent and free of contaminants.
- 5- Saturated deionizing columns release alkaline water, various ions, and oxidizing and reducing agents that can significantly alter the results.
- 6- The Stop Solution contains Hydrochloric Acid which is a strong acid. Therefore, handle it with due care.
- 7- All raw material of the product is tested and non-reactive for HBsAg and Anti-HCV. However, these tests do not offer complete assurance of the absence of infectious agents. Handling any product that contains a biological sample is potentially capable of transmitting diseases. Therefore, it is necessary to take the proper biosafety precautions when handling these products.
- 8- Always pipette the reagents in the same order to minimize the difference in reaction time between the microwells.

- 9- As a protection measure, the plate must be covered during the reaction.
- 10- It must be ensured that the bottom of the well is clean and dry and that there are no bubbles on the surface of the liquid before reading the plate. Do not allow the wells to dry out during the assay.
- 11- Do not expose the reagents, especially the Substrate, to strong light or hypochlorite vapors during storage or incubation steps.
- 12- We recommend applying the local, state and federal norms for environmental protection so that the disposal of reagents and biological material is carried out in accordance with current legislation.
- 13- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Material Safety Data Sheet) available on the website [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) or upon request by the SAC (Customer Advisory Service) by Quibasa.
- 14- Do not use the product if the packaging is damaged.
- 15- It is imperative that the instruments and equipment used are properly calibrated and submitted to periodic maintenance.

SAMPLES

**Dried Blood collected on filter paper (DBS) - EDTA or Puncture**  
The filter paper used must be specific for collecting dried blood samples, such as the S&S 903 and Ahlstrom 226 models. The laboratory must certify the quality of the samples before use.  
Blood samples dried on filter paper can be stored at room temperature as long as they are protected from direct sunlight and in low humidity. For storage of up to 2 years, the samples must remain refrigerated, between 2 and 8 °C. Storage for a period longer than 2 years must be carried out at a temperature of -20°C.

PROCESS DESCRIPTION

Stability After Opening

The results of the stability test show that the BIOLISA CHAGAS RECOMBINANTE DBS kit is stable after opening for up to 30 days. This stability may vary according to test and environmental conditions. Therefore, it is suggested to monitor the performance of the product using the kit's internal controls and the technique validation criteria.

PREPARATION OF WORKING REAGENTS

Washing Solution

Dilute the contents of vial N° 3 (Concentrated Washing) in a 1:20 ratio of distilled or deionized water; for example: 50 mL of Concentrated Washing solution in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored between 2 and 30°C for up to 30 days. If crystallization occurs, heat to 37 °C until dissolution.

All other reagents are ready to use.

TECHNIQUE

**For use in automatic equipment, consult the SAC (Customer Advisory Service).**

- Before starting the assay, place all reagents, samples and controls to stabilize at room temperature (15 – 30 °C) for at least 40 minutes.
- 1- Separate the wells to be used considering: DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood spot collected on filter paper (it is recommended to test in duplicate). Return unused microplate strips to the original sealed package.
- 2- Separate the first well for the Blank (OPTIONAL).
- 3- Add a 3mm disk of DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood spot collected on filter paper, **previously perforated**, in the determined wells.
- 4- Pipette 100 µL of Elution Buffer into all wells, **including the Blank well**.
- 5- Gently homogenize for ± 30 seconds, cover the wells with plate sealer.
- 6- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
- 7- After incubation, discard the contents of the wells by aspiration (Washer for filter paper technique). Use approximately 300 µL of **previously prepared** Washing Solution and perform a total of five (5) wash cycles with shake of 5 seconds. To guarantee the drying of the plate, at the end of the wash, tap the plate for a few seconds on absorbent paper.
- Note:** Poor washing/drying may cause poor results.
- 8- Pipette 100 µL of Conjugate into all wells, **including the Blank well**.

- 9- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
- 10- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
- 11- Remove the plate sealer from the wells.
- 12- Repeat item 7.
- 13- Pipette 100 µL of Substrate into all wells. **Including the Blank well**.
- 14- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
- 15- Incubate for 10 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
- 16- Remove the plate sealer from the wells.
- 17- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.
- 18- Gently homogenize for ± 30 seconds.
- 19- Read using a double filter: 450 nm / 620 nm in up to 15 minutes (maximum).

TECHNIQUE VERIFICATION

Check if the results obtained for reading the Blank and the Controls are compatible with the values presented below:

| ITEM                 | ABSORBANCE |
|----------------------|------------|
| Blank                | < 0.150    |
| DBS Negative Control | < 0.150    |
| DBS Positive Control | > 0.500    |

If the values are outside the expected values, the technique must be repeated.

CALCULATIONS

QUALITATIVE

Calculate Cut Off according to the following formula:

Cut Off = Mean Absorbance of DBS Negative Control + 0.400.

Example:

| ITEM                                                        | ABSORBANCE                            |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| DBS Negative Control                                        | 0.020                                 |
|                                                             | 0.022                                 |
| Cut Off = (Mean Absorbance of DBS Negative Control) + 0.400 | ((0.020 + 0.022) / 2) + 0.400 = 0.421 |

Calculate the Index by dividing the absorbance of the sample by the Cut Off value.

Example:

| ITEM                           | ABSORBANCE           |
|--------------------------------|----------------------|
| Sample                         | 1.074                |
| Cut Off Value                  | 0.421                |
| Index = Sample / Cut Off Value | 1.074 / 0.421 = 2.55 |

**Note:** Data shown in examples is for illustration only and cannot be used for calculation of results.

Each laboratory must validate the Cut-off according to the instrumentation used and the researched population.

INTERPRETATION OF RESULTS

After calculating the sample index, consider the indexes below to determine the results.

| RESULTS                | QUALITATIVE         |
|------------------------|---------------------|
|                        | INDEX               |
| Negative (Non-Reagent) | ≤ 0.8               |
| Undetermined           | Between 0.8 and 1.2 |
| Positive (Reagent)     | ≥ 1.2               |

Samples with an index greater than or equal to 1.2 are considered positive, samples with an index less than or equal to 0.8 are considered negative, and samples with an index between 0.8 and 1.2 are considered indeterminate. Thus, we have that the sample mentioned in the example, whose absorbance was 1.074 and index of 2.55, presents a positive result (index ≥ 1.2).

**Notes:** In case of indeterminate results, the sample must be reanalyzed in duplicate. Samples that give repeatedly indeterminate results should be retested using an alternate method. If results remain indeterminate, a new sample should be collected in two weeks. The result of the last sample collected shall prevail. The interpretation of a diagnostic test should not be based on a single test. Additional confirmatory tests must be included before a specimen is considered positive. A negative result does not exclude the possibility of exposure. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information, prior to making a descriptive diagnosis of the disease. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional, not being the only criterion for determining the diagnosis and/or treatment of the patient.

PROCEDURE LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test should not be based on a single test. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information prior to definitive diagnosis. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional, not being the only criterion for determining the diagnosis and/or treatment of the patient.

INTERFERENTS

No interference was observed for the concentrations of Triglycerides 1200 mg/dL, Acetylsalicylic Acid 20 mg/dL, Ascorbic Acid 2 g/dL, Creatine 200 mg/dL, Bilirubin 1 g/dL, Albumin 10 g/dL, Hemoglobin 1000 mg/dL, Oxalic Acid 60 mg/dL, Rheumatoid Factor 980 IU/mL, C-Reactive Protein 41.2 mg/dL and Anti-Streptolysin O 1023 IU/mL.

CROSS REACTIVITY

A study was carried out with 72 dried blood samples collected on filter paper negative for Anti-Trypanosoma cruzi IgG antibodies, but positive for other infections, in order to evaluate the possibility of cross-reactivity of these interferents in the result of BIOLISA CHAGAS RECOMBINANT DBS. Among them 10 positive samples for Syphilis, 10 positive samples for HCV, 9 positive samples for HBsAg, 8 positive samples for Zika, 10 positive samples for CMV, 10 positive samples for Rubella, 5 positive samples for HIV and 10 positive samples for Toxoplasmosis. No cross-reactivity was observed with positive samples for Syphilis, HCV, HBsAg, Zika, CMV, Rubella, HIV and Toxoplasmosis. Despite the results found, the possibility of cross-reactivity cannot be completely ruled out. The final diagnosis must consider the patient's clinical data along with other laboratory data.

INTERNAL QUALITY CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control program, where procedures, standards, limits and tolerance for variations are clearly established. It is important to point out that all measurement systems have a characteristic analytical variability, which must be monitored by the laboratories themselves. For that, it is recommended the use of controls, which allow evaluating the precision and accuracy of the dosages.

PRODUCT PERFORMANCE

PRECISION

Repeatability

Repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

| Repeatability                | Sample |        |        |
|------------------------------|--------|--------|--------|
|                              | 1      | 2      | 3      |
| Average                      | 0.780  | 0.103  | 0.116  |
| Standard Deviation           | 0.092  | 0.013  | 0.019  |
| Coefficient of Variation (%) | 11.855 | 12.887 | 16.394 |

Reproducibility

The reproducibility was calculated from 10 successive determinations during 3 consecutive days, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

| Reproducibility              | Sample |        |        |
|------------------------------|--------|--------|--------|
|                              | 1      | 2      | 3      |
| Average                      | 0.740  | 0.141  | 0.092  |
| Standard Deviation           | 0.074  | 0.014  | 0.015  |
| Coefficient of Variation (%) | 9.910  | 10.703 | 16.268 |

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The BIOLISA CHAGAS RECOMBINANT DBS kit was used for the analysis of clinical samples previously characterized and confirmed by another reference enzyme-immunoassay method. The results show that the clinical sensitivity of the BIOLISA CHAGAS RECOMBINANT DBS kit is > 99.9% and the clinical specificity is 99.01%.

|                                |          | Result Reference |          |       |
|--------------------------------|----------|------------------|----------|-------|
|                                |          | Positive         | Negative | Total |
| BIOLISA CHAGAS RECOMBINANT DBS | Positive | 104              | 0        | 104   |
|                                | Negative | 1                | 100      | 101   |
|                                | Total    | 105              | 100      | 205   |

Clinical Sensitivity: >99.9% (104/104) CI 95% = 96.50 to 100%  
Clinical Specificity: 99.01% (104/105) CI 95% = 94.60 to 100%

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Chagas disease is a chronic disease caused by infection with the protozoan *Trypanosoma cruzi* endemic to Latin America. The parasite is transmitted to humans by a group of insects of the *Reduviidae* family, with the kissing bug (*Triatoma infestans*) being the main vector. The infection can also be transmitted congenitally, through blood transfusion or organ transplants. This infection affects various organs to different degrees and systems, especially the heart and the gastrointestinal tract.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCE

- 1- Burns Jr. JM, ET al. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of Trypanosoma cruzi. Proc Natl Acad Sci USA 89: 1239-1243, 1992.
- 2- Gruber, A. anda Zingales, B. Trypanosoma cruzi: Characterization of two recombinant antigens with potencial application in the diagnosis of Chagas Disease. Exp. Parasitol. 76:1-12, 1993.
- 3- Ibañez, C.F., Affranchino, J.I., Medina, R.A., Reyes, M.B., Leguizamon, S., Camargo, M.E., Aslund, L., Petteron, U. and Frasch, A.C.C. Multiple Trypanossoma Cruzi antigens containing tabdemyly repeated amino acid sequence motifs. Mol. Biochem. Parasitol 30:27-34, 1998.
- 4- Peralta JM, et al. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. J Clin Microbiology 32(4): 971-974, 1994.
- 5- Spencer, H.C., Allain, D.S., Sulzer, A.J., Collins, W.E. Evaluation of the Micro Enzyme Lynked Immunosorbent Assay for Antibodies to Trypanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29 (2): 179.182, 1980.
- 6- Urmezawa ES, ET al. Evaluation of recombinant antigen for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America, J Clin Microbiol 37(5): 1554-1560, 1999.
- 7- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8): 1337-44.2017 AACR
- 8- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- 9- TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
- 10- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all **Bioclin** reagents are tested by the Quality Control Department. The quality of the reagents is guaranteed until the expiry date mentioned on the presentation packaging, provided they are stored and transported under appropriate conditions.

 QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca  
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Phone.: (31) 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Made in Brazil

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service  
Phone: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Registration number of the BIOLISA CHAGAS RECOMBINANT DBS kit at ANVISA: 10269360426

Review: July/2023

UNIVERSAL SYMBOLOGY

|                                                                                       |                                          |                                                                                       |                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
|    | CATALOG NUMBER                           |    | MADE BY                                |
|    | LOT NUMBER                               |    | CONTROL                                |
|    | MANUFACTURING DATE                       |    | POSITIVE CONTROL                       |
|    | VALIDITY DATE<br>(last day of the month) |    | NEGATIVE CONTROL                       |
|   | TEMPERATURE LIMIT<br>(store)             |   | BIOLOGICAL RISK                        |
|  | CONTENT IS SUFFICIENT<br>FOR <N> TEST    |  | FLAMMABLE                              |
|  | SEE INSTRUCTIONS<br>FOR USE              |  | CORROSIVE                              |
|  | IN VITRO DIAGNOSTIC<br>PRODUCT           |  | TOXIC                                  |
|  | KEEP AWAY<br>FROM SUNLIGHT               |  | DO NOT USE IF<br>PACKAGE IS<br>DAMAGED |
|  | DO NOT REUSE                             |  | PRODUCT<br>STERILIZED                  |
|  | CAUTION                                  |  | DANGER                                 |