

Bioclin

BIOLISA RUBÉOLA IgG DBS

REF **K276**

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE
Teste imunoenzimático indireto (ELISA) para determinação quantitativa e qualitativa de Anticorpos IgG para o vírus da Rubéola 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 RUBÉOLA IgG DBS é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio de detecção qualitativa e quantitativa indireta de Anticorpos IgG para Rubéola em amostras humanas de sangue seco coletadas em papel filtro. Anticorpos IgG Rubéola, presentes na amostra de sangue seco são eluídos e se ligam aos Antígenos revestidos na microplaca formando imunocomplexos. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. Anticorpos Anti-IgG humano conjugados à Peroxidase são adicionados à microplaca, que é então incubada. Os Anticorpos Anti-IgG humano conjugados a enzima ligam-se aos Anticorpos IgG presentes, ligados à placa revestida com Antígenos. Nova lavagem é realizada 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-Rubéola presentes na amostra. 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- Padrões Referência (A - E) - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Cinco (5) frascos (A - E) de Padrões Referência contendo Anticorpos IgG para Anti-Rubéola em diferentes concentrações em Solução Tampão contendo surfactante, estabilizantes, corante e conservante. **Potencialmente infectante.**
As concentrações dos Padrões Referência (A-E) variam a cada lote. Vide rótulos dos frascos.
2- Conjugado - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão, Anticorpo Anti-IgG humano ligado à Peroxidase, surfactante, estabilizantes, corante e conservante.
3- Placa Sensibilizada - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Placa sensibilizada com Antígenos de Rubéola purificados.
4- 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.
5- Substrato - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão contendo Peróxido de Ureia, Tetrametilbenzidina (TMB) e conservante.
6- Solução de Parada – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Ácido Clorídrico 1 M.
7- Tampão de Eluição – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão, surfactante, estabilizante e conservante.
8- Controle Negativo DBS – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Amostra não reativa para Anticorpos IgG Anti-Rubéola impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**
9- Controle Positivo DBS – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Amostra reativa para Anticorpos IgG Anti-Rubéola impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**

APRESENTAÇÃO

Reagentes	1	2	3
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Padrões Referência (A – E)	1 Frasco x 1 mL	1 Frascos x 1 mL	1 Frasco x 2 mL
2- Conjugado	1 Frasco x 12 mL	1 Frascos x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
3- Placa Sensibilizada	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades
4- Lavagem Concentrada	1 Frasco x 50 mL	1 Frasco x 100 mL	1 Frasco x 250 mL
5- Substrato	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
6- Solução de Parada	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
7-Tampão de Eluição	1 Frasco x 20 mL	1 Frasco x 40 mL	1 Frasco x 100 mL
8- Controle Negativo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades
9- Controle Positivo DBS	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 amostra-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 deve 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 devem ser armazenadas 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.⁹

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Estabilidade Após Aberto
Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit BIOLISA RUBÉOLA IgG DBS é estável após aberto por 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 ao 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: Padrões Referência (A - E), 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 picotadas, nas cavidades determinadas.
4- Pipetar 100 µL e Padrões Referência (A - E) nas cavidades previamente determinadas.
5- Pipetar 100 µL do Tampão de Eluição, inclusive na cavidade para o Branco. Não pipetar nas cavidades dos Padrões Referência (A - E).
6- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos, cobrir as cavidades com selador de placas.
7- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
8- Retirar o selador das cavidades.
9- Após incubação descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavar 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.
10- Pipetar 100 µL de Conjugado em todas as cavidades, **inclusive na cavidade do Branco.**
11- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
12- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
13- Retirar o selador de placa das cavidades.
14- Repetir o item 9.
15- Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades, **inclusive na cavidade do Branco.**
16- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
17- Incubar por 10 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
18- Retirar o selador de placa das cavidades.
19- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todas as cavidades.
20- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.
21- 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 Padrões Referência estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	ABSORVÂNCIAS
Branco	< 0,100
Padrão Referência A	< 0,100
Padrão Referência B	> 0,200 e < 0,600
Padrão Referência C	> B e < D
Padrão Referência D	> C e < E
Padrão Referência E	> 1,200
Controle Negativo DBS	< 0,150
Controle Positivo DBS	> 0,500

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

CÁLCULOS

QUALITATIVO

Considerar como Cut Off a absorbância média obtida com o Padrão Referência B.

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Padrão Referência B	0,417
	0,419
Cut Off = Absorbância Média do Padrão Referência B	Cut Off = (0,417 + 0,419) / 2 Cut Off = 0,418

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

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Amostra	1,346
Valor do Cut off	0,418
Índice = Amostra / Valor de Cut Off	1,346 / 0,418 = 3,22

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.

QUANTITATIVO

Uma curva de calibração é usada para determinar a concentração de anticorpos IgG para Rubéola em amostras desconhecidas.

Preparo da Curva de Calibração

Registrar as absorbâncias obtidas na leitora de microplaca, como apresentado no exemplo 1. Calcular as médias das duplicatas (caso sejam realizadas duplicatas). Plotar as absorbâncias médias de cada Padrão Referência versus a Concentração correspondente em UI/mL (descrita no rótulo) em papel milimetrado (antes de plotá-las no gráfico) traçar a curva.

Exemplo 1:

Padrão	Concentração em UI/mL, vide rótulo	Absorbância	Média das duplicatas
A	0	0,029	0,030
		0,031	
B	15	0,417	0,418
		0,419	
C	30	0,822	0,823
		0,824	
D	60	1,420	1,414
		1,408	
E	120	2,142	2,143
		2,144	

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

RESULTADOS	QUALITATIVO	QUANTITATIVO
	ÍNDICE	CONCENTRAÇÃO
Negativo (Não Reagente)	≤ 0,8	≤ 12
Indeterminado	0,8 e 1,2	12,0 – 18,0
Positivo (Reagente)	≥ 1,2	≥ 18,0

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 1,346 e índice de 3,22, apresenta resultado positivo (índice ≥ 1,2).

O cálculo da concentração das amostras testadas também pode ser realizado utilizando programas adequados de computador, através de regressão linear.

Amostra	Absorbância	Concentração calculada (UI/mL)	Resultado Quantitativo
1	0,054	0,0	< 1,7 UI/mL
2	2,562	Acima do limite superior de detecção	> 120,0 UI/mL
3	0,242	7,4	74,0 UI/mL

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 diagnostico, 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 O produto não é indicado para triagem neonatal, já que a detecção de anticorpos IgG em neonatos não tem significado clínico. O produto é indicado para análise amostras de sangue total em papel de filtro, e a dosagem de anticorpos IgG anti-rubéola é usualmente indicada para análise de amostras de mulheres em período pré-natal.

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 52 amostras de sangue seco coletada em papel de filtro negativas para Rubéola IgG, mas positivas para outras infecções, a fim de se avaliar a possibilidade de reatividade cruzada destes interferentes no resultado do BIOLISA RUBÉOLA IgG DBS. Dentre elas 5 amostras positivas para HTLV, 10 amostras positivas para Sífilis, 6 amostras positivas para HBsAg, 5 amostras positivas para HCV, 7 amostras positivas para Doença de Chagas, 6 amostras positivas para Zika, 4 amostras positivas para CMV, 4 amostras positivas para Toxoplasmose e 5 amostras positivas para HIV. Não foi observado reatividade cruzada com amostras positivas para HTLV, Sífilis, HBsAg, HCV, Doença de Chagas, Zika, CMV, Toxoplasmose e HIV. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de reatividade cruzada. O diagnostico 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	1,7699	0,8366	0,0225
Desvio Padrão	0,0244	0,0169	0,0027
Coefficiente de Variação (%)	1,3810	2,0193	11,898

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 absorbancia:

Reprodutibilidade	Amostra		
	1	2	3
Média	1,7696	0,8404	0,0300
Desvio Padrão	0,0271	0,0235	0,0029
Coefficiente de Variação (%)	1,5349	2,7983	10,502

SENSIBILIDADE ANALÍTICA

A sensibilidade analítica do kit BIOLISA RUBÉOLA IgG DBS é 1,7 UI/mL.

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

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

		Resultado Referência		
		Positivo	Negativo	Total
BIOLISA RUBÉOLA IgG DBS	Positivo	151	0	151
	Negativo	0	41	41
	Total	151	41	192

Sensibilidade Clínica: >99,9% (151/151) IC 95% = 97,59 a 100%

Especificidade Clínica: >99,9% (41/41) IC 95% = 91,40 a 100%

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

A Rubéola é um vírus de RNA, esférico, envelope pequeno, pertencente à família Togaviridae. É vulgarmente conhecido como alemão ou sarampo de 3 dias. A infecção pelo vírus de Rubéola é transmitida através de gotículas de saliva, resultando em erupção contagiosa leve em crianças ou jovens adultos. Na infância, a infecção é uma doença auto-limitante, benigna, caracterizada por febre baixa, dor de cabeça, linfadenopatia, artralgia e conjuntivite. No entanto, a infecção durante a gravidez, especialmente no primeiro trimestre, pode levar ao aborto espontâneo, infecção intra-uterina causando a morte fetal ou anomalias congêntas.

A Rubéola Congênita depende do período em que a infecção ocorre e pode resultar em complicações graves, incluindo a surdez, problemas oculares, incluindo cataratas e glaucoma, cardiopatia congênita e retardo mental. Os anticorpos IgM contra a Rubéola são produzidos inicialmente, podendo atingir níveis detectáveis dentro de 2 - 3 dias e pico de 14 - 21 dias após o início dos sintomas que permanecem detectáveis durante as próximas 4 - 8 semanas. O diagnóstico de infecção ativa ou recente pode ser obtido pela presença de anticorpos IgM em amostra inicial. Depois de vários dias, os anticorpos IgG aparecem depois da IgM, com pico de 14 - 21 dias, persistindo níveis variados para toda a vida. A presença de anticorpos IgG anti-Rubéola é indicativo de infecção prévia e/ou imunidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Herrmann, KL. Rubella Virus. In: Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology 4th Edition (1985) 779-784.
- Turgeon, ML. Rubella Infection. In: Immunology and Serology in Laboratory Medicine. 2nd Edition (1996). 275-286.
- Chernesky, MA, Mahony JB. Rubella Virus. In: Manual of Clinical Microbiology. 6th Edition (1995) 968-973.
- Voller, A, Bidwell, DE, A simple Method for Detecting Antibodies to Rubella. Brit. J. Exp. Pathol. (1975) 56:338-339.
- Rawls WE, Chernesky MA. Rubella Virus. Manual Clinical Immunology (1976) 452-455.
- Millian, SJ, Wegman D. Rubella Serology: Applications, Limitations, and Interpretations. Amer. J. Pub. Health (1972) 170-176.
- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR
- 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.
- Coleta de sangue: Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais: Brasília, Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2010, 98 p. (Série TELELAB)
- 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 RUBÉOLA IgG DBS na ANVISA: 10269360434

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		INFLÂMABEL
	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 ESTERILIZADO
	CUIDADO		PERIGO

Bioclin

BIOLISA RUBÉOLA IgG DBS

[REF]
 K276

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA) para la determinación cuantitativa y cualitativa de Anticuerpos IgG contra virus de la Rubéola 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 RUBÉOLA IgG DBS es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida basado en el principio de detección cualitativa y cuantitativa indirecta de Anticuerpos IgG contra la Rubéola en muestras de sangre humana seca recolectadas en papel de filtro. Los Anticuerpos IgG contra la Rubéola, presentes en la muestra de sangre seca, se eluyen y se unen a los Antígenos que recubren la microplaca formando complejos inmunes. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. Se añaden a la microplaca Anticuerpos Anti-IgG humanos conjugados con Peroxidasa, que luego se incuba. Los Anticuerpos Anti-IgG humanos conjugados con enzimas se unen a los Anticuerpos IgG presentes, unidos a la placa recubierta de Antígeno. Se realiza un nuevo lavado para eliminar el sobrante. Después de este paso, se agrega el Sustrato y se incuba produciendo un color azul, que indica la cantidad de Anticuerpos IgG Anti-Rubéola presentes en la muestra. 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- Estándar Referencia (A - E)** - Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Cinco (5) viales (A - E) de Estándares Referencia que contienen Anticuerpos IgG Anti-Rubéola a diferentes concentraciones en Solución Tampón que contiene surfactante, estabilizantes, colorante y conservante. **Potencialmente infeccioso.** Las concentraciones de los Estándares Referencia (A-E) varían de un lote a otro. Consulte las etiquetas de los viales.
- 2- Conjugado** - Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución Tampón, Anticuerpo Anti-IgG humano ligado a la Peroxidasa, tensioactivo, estabilizantes, colorante y conservante.
- 3- Placa Sensibilizada** - Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Placa sensibilizada con Antígenos de Rubéola purificados.
- 4- 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.
- 5- Sustrato** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución Tampón que contiene Peróxido de Urea, Tetrametilbencidina (TMB) y conservante.
- 6- Solución de Parada** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Ácido Clorhídrico 1 M.
- 7- Tampón de Elución** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución Tampón, tensioactivo, estabilizante y conservante.
- 8- Control Negativo DBS** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Muestra no reactiva para Anticuerpos Anti-Rubéola IgG impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso.**
- 9- Control Positivo DBS** – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Muestra reactiva para Anticuerpos Anti-Rubéola IgG impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso.**

PRESENTACIÓN

Reactivos	1	2	3
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Estándar Referencia (A – E)	1 Vial x 1 mL	1 Vial x 1 mL	1 Vial x 2 mL
2- Conjugado	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
3- Placa Sensibilizada	1 Unidad	2 Unidades	5 Unidades
4- Lavado Concentrado	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL
5- Sustrato	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
6- Solución de Parada	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
7-Tampón de Elución	1 Vial x 20 mL	1 Vial x 40 mL	1 Vial x 100 mL
8- Control Negativo DBS	1 Unidad	2 Unidades	3 Unidades
9- Control Positivo DBS	1 Unidad	2 Unidades	3 Unidades

EQUIPOS Y INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en la tabla 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-** Tritradora 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 o previa solicitud del SAC (Servicio de Asistencia 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 recogida en papel de 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 deben almacenarse lejos 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 durante más de 2 años debe realizarse a una temperatura de -20 °C.⁹

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de Abierto

Los resultados de la prueba de estabilidad demuestran que el kit BIOLISA RUBÉOLA IgG 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.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE TRABAJO

Solución de Lavado

Diluir el contenido de la ampolla N° 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 consultar con el SAC (Servicio de Asesoramiento al Cliente).

Antes de iniciar 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: Estándares Referencia (A - E), Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca colectadas en papel filtro (se recomienda probar 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-** Pipetear 100 µL y Estándares Referencia (A - E) en pocillos previamente determinados.
- 5-** Pipetear 100 µL de Tampón de Elución, incluso en el pocillo para el Blanco. No pipetear en los pocillos de los Estándares Referencia (A - E).
- 6-** Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos, cubrir los pocillos con sellador de placas.
- 7-** Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 8-** Retire el sellador de las cavidades.
- 9-** Después de la incubación, desechar el contenido de los pozos por aspiración (Técnica Washer para papel filtro). Utilice aproximadamente 300 µL de solución de lavado **previamente preparada** y realice un total de cinco (5) ciclos de lavado con agitación 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.
- 10-** Pipetee 100 µL de conjugado en todos los pocillos, **incluido el pocillo en Blanco**.
- 11-** Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra los pocillos con el sellador de placas.
- 12-** Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 13-** Retire el sellador de placas de los pocillos.
- 14-** Repetir el punto 9.
- 15-** Pipetee 100 µL de Sustrato en todos los pocillos, **incluido el pocillo del Blanco**.
- 16-** Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra los pocillos con el sellador de placas.
- 17-** Incubar durante 10 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 18-** Retire el sellador de placas de los pocillos.
- 19-** Pipetee 100 µL de solución de parada en todos los pocillos.
- 20-** Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos.
- 21-** Lectura con doble filtro: 450 nm / 620 nm en hasta 15 minutos (máximo).

VERIFICACIÓN TÉCNICA

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

ÍTEM	ABSORBÁNCIAS
Blanco	< 0,100
Estándar Referencia A	< 0,100
Estándar Referencia B	> 0,200 y < 0,600
Estándar Referencia C	> B y < D
Estándar Referencia D	> C y < E
Estándar Referencia E	> 1,200
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

Considere como Cut Off la absorbancia media obtenida con el Estándar Referencia B.

Ejemplo:

ÍTEM	ABSORBÁNCIAS
Estándar Referencia B	0,417
	0,419
Cut Off = Absorbância Média do Estándar Referencia B	Cut Off = (0,417 + 0,419) / 2 Cut Off = 0,418

Calcule el Índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el Cut Off.

Ejemplo:

ÍTEM	ABSORBÁNCIA
Muestra	1,346
Valor de Cut off	0,418
Índice = Muestra / Valor de Cut Off	1,346 / 0,418 = 3,22

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 corte de acuerdo con la instrumentación utilizada y la población investigada.

CUANTITATIVO

Se utiliza una curva de calibración para determinar la concentración de Anticuerpos IgG contra la Rubéola en muestras desconocidas.

Preparación de la Curva de Calibración

Registrar las absorbancias obtenidas en el lector de microplacas, como se muestra en el ejemplo 1. Calcular los promedios de los duplicados (si se realizan duplicados). Trace las absorbancias medias de cada estándar referencia frente a la concentración correspondiente en UI/mL (descrita en la etiqueta) en papel cuadrículado (antes de trazarlas en el gráfico) y trace la curva.

Ejemplo 1:

Estándar Referência	Concentración en UI/mL, ver etiqueta	Absorbância	Promedio de duplicados
A	0	0,029	0,030
		0,031	
B	15	0,417	0,418
		0,419	
C	30	0,822	0,823
		0,824	
D	60	1,420	1,414
		1,408	
E	120	2,142	2,143
		2,144	

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

RESULTADOS	CUALITATIVO	CUANTITATIVO
	ÍNDICE	CONCENTRACIÓN
Negativo (No Reactivo)	≤ 0,8	≤ 12
Indeterminado	0,8 y 1,2	12,0 – 18,0
Positivo (Reactivo)	≥ 1,2	≥ 18,0

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 1,346 e Índice de 3,22, presenta resultado positivo (Índice ≥ 1,2).

El cálculo de la concentración de las muestras analizadas también se puede realizar utilizando programas informáticos adecuados, mediante regresión lineal.

Muestra	Absorbância	Concentración calculada (UI/mL)	Resultado Cuan- titativo
1	0,054	0,0	< 1,7 UI/mL
2	2,562	Por encima del límite superior de detección	> 120,0 UI/mL
3	0,242	7,4	74,0 UI/mL

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. El producto no está indicado para el cribado neonatal, ya que la detección de Anticuerpos IgG en recién nacidos no tiene importancia clínica. El producto está indicado para el análisis de muestras de sangre total en papel filtro, y la dosificación de Anticuerpos IgG Anti-Rubéola suele estar indicada para el análisis de muestras de mujeres en el período prenatal.

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 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 52 muestras de sangre seca recolectadas en papel filtro negativas para Rubéola IgG, pero positivas para otras infecciones, con el fin de evaluar la posibilidad de reactividad cruzada de estos interferentes en el resultado de BIOLISA RUBÉOLA IgG DBS. Entre ellos 5 muestras positivas para HTLV, 10 muestras positivas para Sífilis, 6 muestras positivas para HBsAg, 5 muestras positivas para HCV, 7 muestras positivas para Enfermedad de Chagas, 6 muestras positivas para Zika, 4 muestras positivas para CMV, 4 muestras positivas para Toxoplasmosis y 5 muestras HIV positivas. No se observó reactividad cruzada con muestras positivas para HTLV, Sífilis, HBsAg, VHC, enfermedad de Chagas, Zika, CMV, Toxoplasmosis y HIV. Apesar 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	1,7699	0,8366	0,0225
Desvio Patrón	0,0244	0,0169	0,0027
Coefficiente de Variación (%)	1,3810	2,0193	11,898

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	1,7696	0,8404	0,0300
Desvio Patrón	0,0271	0,0235	0,0029
Coefficiente de Variación (%)	1,5349	2,7983	10,502

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica del kit BIOLISA RUBÉOLA IgG DBS es de 1,7 UI/mL.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICAS

El kit BIOLISA RUBÉOLA IgG 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 RUBÉOLA IgG DBS es del 99,9% y la especificidad clínica es del 99,9%.

		Resultado Referéncia		
		Positivo	Negativo	Total
BIOLISA RUBÉOLA IgG DBS	Positivo	151	0	151
	Negativo	0	41	41
	Total	151	41	192

Sensibilidad Clínica: >99,9% (151/151) IC 95% = 97,59 a 100%

Especificidad Clínica: >99,9% (41/41) IC 95% = 91,40 a 100%

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

La Rubéola es un virus RNA esférico de envoltura pequeña que pertenece a la familia Togaviridae. Se conoce comúnmente como sarampión alemán o de 3 días. La infección por el virus de la rubéola se transmite a través de gotitas de saliva, lo que provoca un sarpullido contagioso leve en niños o adultos jóvenes. En la infancia, la infección es una enfermedad benigna autolimitada caracterizada por febrícula, cefalea, linfadenopatía, artralgia y conjuntivitis. Sin embargo, la infección durante el embarazo, especialmente en el primer trimestre, puede provocar un aborto espontáneo, una infección intrauterina que cause la muerte del feto o anomalías congénitas. La Rubéola congénita depende del período en el que ocurre la infección y puede provocar complicaciones graves, como sordera, problemas oculares como cataratas y glaucoma, cardiopatía congénita y retraso mental. Los anticuerpos IgM contra la Rubéola se producen inicialmente, pueden alcanzar niveles detectables en 2 a 3 días y alcanzan su punto máximo 14 a 21 días después del inicio de los síntomas, que permanecen detectables durante las próximas 4 a 8 semanas. El diagnóstico de infección activa o reciente puede obtenerse por la presencia de anticuerpos IgM en la muestra inicial. Después de varios días, los anticuerpos IgG aparecen después de los IgM, alcanzando su punto máximo entre los 14 y los 21 días, con niveles variables que persisten durante toda la vida. La presencia de Anticuerpos Anti-Rubéola IgG es indicativa de infección previa y/o inmunidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Herrmann, KL. Rubella Virus. In: Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology 4th Edition (1985) 779-784.
- Turgeon, ML. Rubella Infection. In: Immunology and Serology in Laboratory Medicine, 2nd Edition (1996). 275-286.
- Chernesky, MA, Mahony JB. Rubella Virus. In: Manual of Clinical Microbiology, 6th Edition (1995) 968-973.
- Voller, A, Bidwell, DE, A simple Method for Detecting Antibodies to Rubella. Brit. J. Exp. Pathol. (1975) 56:338-339.
- Rawls WE, Chernesky MA. Rubella Virus. Manual Clinical Immunology (1976) 452-455.
- Millian, SJ, Wegman D. Rubella Serology: Applications, Limitations, and Interpretations. Amer. J. Pub. Health (1972) 170-176.
- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8): 1337–44. 2017 AACR
- 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.
- Coleta de sangue: Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais: Brasília, Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2010, 98 p. (Série TELELAB)
- 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.: (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 RUBÉOLA IgG DBS en la ANVISA: 10269360434

Revisión: Julio/2023

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL



NUMERO DE CATALOGO



NUMERO DE LOTE



FECHA DE FABRICACIÓN



FECHA DE VALIDEZ
(último día del mes)



LÍMITE DE TEMPERATURA
(tienda)



EL CONTENIDO ES SUFICIENTE
PARA <N> PRUEBA



VER INSTRUCCIONES
DE USO



PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO
IN VITRO



PROTEGER DE
LUZ Y CALOR



NO REUTILIZA



FABRICADO POR



CONTROLAR



CONTROL POSITIVO



CONTROL NEGATIVO



RIESGO BIOLÓGICO



INFLAMABLE



CORROSIVO



TÓXICO



NO UTILICE SI EL
EMBALAJE ESTÁ
DAÑADA



PRODUCTO
ESTERILIZADO



PELIGRO

BIOLISA RUBELLA IgG DBS

REF K276

INSTRUCTIONS FOR USE

FUNCTION

Indirect enzyme immunoassay (ELISA) for the quantitative and qualitative determination of IgG Antibodies to the Rubella virus 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 RUBELLA IgG DBS kit is a solid phase immunoenzymatic assay based on the principle of indirect qualitative and quantitative detection of IgG Antibodies to Rubella in dried human blood samples collected on filter paper. Rubella IgG Antibodies, present in the dried blood sample are eluted and bind to the Antigens coated on the microplate forming immune complexes. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. Anti-IgG human Antibodies conjugated to Peroxidase are added to the microplate, which is then incubated. The enzyme-conjugated Anti-IgG human Antibodies bind to the IgG Antibodies present, attached to the Antigen coated plate. A new wash is carried out to remove the surplus. After this step, the Substrate is added and incubated producing a blue color, which indicates the amount of Anti-Rubella IgG Antibodies present in the sample. 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- Reference Standards (A - E) - Store between 2 and 8°C. Contains: Five (5) vials (A - E) of Reference Standards containing IgG Anti-Rubella Antibodies at different concentrations in Buffer Solution containing surfactant, stabilizers, dye and preservative. **Potentially infectious**. The concentrations of the Reference Standards (A-E) vary from lot to lot. See vial labels.
2- Conjugate - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer Solution, Anti-IgG human Antibody linked to Peroxidase, surfactant, stabilizers, dye and preservative.
3- Sensitized Plate - Store between 2 and 8°C. Contains: Plate sensitized with purified Rubella Antigens.
4- 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.
5- Substrate – Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer Solution containing Urea Peroxide, Tetramethylbenzidine (TMB) and preservative.
6- Stop Solution – Store between 2 and 8°C. Contains: Hydrochloric Acid 1 M.
7- Elution Buffer – Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer Solution, surfactant, stabilizer and preservative.
8- DBS Negative Control – Store between 2 and 8°C. Contains: Non-reactive sample for Anti-Rubella IgG Antibodies impregnated on filter paper. **Potentially infectious**.
9- DBS Positive Control – Store between 2 and 8°C. Contains: Reactive sample for Anti-Rubella IgG Antibodies impregnated on filter paper. **Potentially infectious**.

PRESENTATION

Reagents	1	2	3
	96 cavities	192 cavities	480 cavities
1-Reference Standards (A – E)	1 Vial x 1 mL	1 Vial x 1 mL	1 Vial x 2 mL
2- Conjugated	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
3- Sensitized Plate	1 Unit	2 Units	5 Units
4- Concentrated Washing	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL
5- Substrate	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
6- Stop Solution	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
7- Elution Buffer	1 Vial x 20 mL	1 Vial x 40 mL	1 Vial x 100 mL
8- DBS Negative Control	1 Unit	2 Units	3 Units
9- 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 watch.
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 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 should be stored away 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 longer than 2 years must be carried out at a temperature of -20 °C.⁹

PROCESS DESCRIPTION

Stability After Opening

The results of the stability test prove that the BIOLISA RUBELLA IgG 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: Reference Standards (A - E), 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 cavity 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 and Reference Standards (A - E) into previously determined wells.
5- Pipette 100 µL of Elution Buffer, including in the well for the Blank. Do not pipette into the Reference Standards wells (A - E).
6- Gently homogenize for ± 30 seconds, cover the wells with plate sealer.
7- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
8- Remove the sealer from the cavities.
9- 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) 5 second shake wash cycles. 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.
10- Pipette 100 µL of Conjugate into all wells, **including the Blank well**.
11- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
12- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
13- Remove the plate sealer from the wells.
14- Repeat item 9.
15- Pipette 100 µL of Substrate into all wells, **including the Blank well**.
16- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
17- Incubate for 10 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
18- Remove the plate sealer from the wells.
19- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.
20- Gently homogenize for ± 30 seconds.
21- 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 Reference Standards are compatible with the values presented below:

ITEM	ABSORBANCES
Blank	< 0.100
Reference Standards A	< 0.100
Reference Standards B	> 0.200 and < 0.600
Reference Standards C	> B and < D
Reference Standards D	> C and < E
Reference Standards E	> 1.200
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

Consider as Cut Off the mean absorbance obtained with Reference Standard B.

Example:

ITEM	ABSORBANCES
Reference Standard B	0.417
	0.419
Cut Off = Average Absorbance of Reference Standard B	Cut Off = (0.417 + 0.419) / 2 Cut Off = 0.418

Calculate the Index by dividing the Sample absorbance by the Cut Off value.

Example:

ITEM	ABSORBANCES
Sample	1.346
Cut Off Value	0.418
Index = Sample / Cut Off Value	1.346 / 0.418 = 3.22

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.

QUANTITATIVE

A calibration curve is used to determine the concentration of Rubella IgG Antibodies in unknown samples.

Preparation of the Calibration Curve

Record the absorbances obtained in the microplate reader, as shown in example 1. Calculate the averages of the duplicates (if duplicates are performed). Plot the mean absorbances of each Reference Standard versus the Corresponding concentration in IU/mL (described on the label) on graph paper (before plotting them on the graph) trace the curve.

Example 1:

Reference Standard	Concentration in IU/mL, see label	Absorbance	Average of duplicates
A	0	0.029	0.030
		0.031	
B	15	0.417	0.418
		0.419	
C	30	0.822	0.823
		0.824	
D	60	1.420	1.414
		1.408	
E	120	2.142	2.143
		2.144	

INTERPRETATION OF RESULTS

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

RESULTS	QUALITATIVE	QUANTITATIVE
	INDEX	CONCENTRATION
Negative (Non-Reagent)	≤ 0.8	≤ 12
Undetermined	0.8 and 1.2	12.0 – 18.0
Positive (Reagent)	≥ 1.2	≥ 18.0

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 1.346 and index of 3.22, presents a positive result (index ≥ 1.2).

The calculation of the concentration of the tested samples can also be performed using adequate computer programs, through linear regression.

Sample	Absorbance	Calculated concentration (IU/mL)	Quantitative Result
1	0.054	0.0	< 1.7 IU/mL
2	2.562	Above the upper limit of detection	> 120.0 IU/mL
3	0.242	7.4	74.0 IU/mL

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.

PROCESS 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. The product is not indicated for neonatal screening, as the detection of IgG antibodies in neonates has no clinical significance. The product is indicated for the analysis of whole blood samples on filter paper, and the dosage of anti-rubella IgG antibodies is usually applied for the analysis of samples from women in the prenatal period.

INTERFERING

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 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 52 dried blood samples collected on filter paper negative for Rubella IgG, but positive for other infections, in order to assess the possibility of cross-reactivity of these interferents in the result of BIOLISA RUBELLA IgG DBS. Among them 5 positive samples for HTLV, 10 positive samples for Syphilis, 6 positive samples for HBsAg, 5 positive samples for HCV, 7 positive samples for Chagas Disease, 6 positive samples for Zika, 4 positive samples for CMV, 4 positive samples for Toxoplasmosis and 5 HIV positive samples. No cross-reactivity was observed with positive samples for HTLV, Syphilis, HBsAg, HCV, Chagas disease, Zika, CMV, Toxoplasmosis and HIV. 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	1.7699	0.8366	0.0225
Standard Deviation	0.0244	0.0169	0.0027
Coefficient of Variation (%)	1.3810	2.0193	11.898

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	1.7696	0.8404	0.0300
Standard Deviation	0.0271	0.0235	0.0029
Coefficient of Variation (%)	1.5349	2.7983	10.502

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity of the BIOLISA RUBELLA IgG DBS kit is 1.7 IU/mL.

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The BIOLISA RUBELLA IgG 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 RUBELLA IgG DBS kit is 99.9% and the clinical specificity is 99.9%.

		Result Reference		
		Positive	Negative	Total
BIOLISA RUBELLA IgG DBS	Positive	151	0	151
	Negative	0	41	41
	Total	151	41	192

Clinical Sensitivity: >99.9% (151/151) CI 95% = 97.59 to 100%

Clinical Specificity: >99.9% (41/41) CI 95% = 91.40 to 100%

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Rubella is a spherical, small-enveloped RNA virus belonging to the Togaviridae family. It is commonly known as German or 3-day measles. Rubella virus infection is spread through droplets of saliva, resulting in a mild contagious rash in children or young adults. In childhood, the infection is a self-limiting, benign illness characterized by low-grade fever, headache, lymphadenopathy, arthralgia, and conjunctivitis. However, infection during pregnancy, especially in the first trimester, can lead to miscarriage, intrauterine infection causing fetal death, or congenital anomalies. Congenital Rubella depends on the period in which the infection occurs and can result in serious complications including deafness, eye problems including cataracts and glaucoma, congenital heart disease and mental retardation. Rubella IgM antibodies are produced initially, can reach detectable levels within 2 - 3 days and peak 14 - 21 days after the onset of symptoms which remain detectable for the next 4 - 8 weeks. The diagnosis of active or recent infection can be obtained by the presence of IgM antibodies in the initial sample. After several days, IgG antibodies appear after IgM, peaking at 14 - 21 days, with varying levels persisting throughout life. The presence of anti-Rubella IgG antibodies is indicative of previous infection and/or immunity.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Herrmann, KL. Rubella Virus. In: Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology 4th Edition (1985) 779-784.
- Turgeon, ML. Rubella Infection. In: Immunology and Serology in Laboratory Medicine. 2nd Edition (1996). 275-286.
- Chernesky, MA, Mahony JB. Rubella Virus. In: Manual of Clinical Microbiology, 6th Edition (1995) 968-973. 4. Voller, A, Bidwell, DE, A simple Method for Detecting Antibodies to Rubella. Brit. J. Exp. Pathol. (1975) 56:338-339.
- Rawls WE, Chernesky MA. Rubella Virus. Manual Clinical Immunology (1976) 452-455.
- Millian, SJ, Wegman D. Rubella Serology: Applications, Limitations, and Interpretations. Amer. J. Pub. Health (1972) 170-176.
- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR
- 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.
- Coleta de sangue: Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais: Brasília, Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2010, 98 p. (Série TELELAB)
- 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
Tel.: (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

ANVISA registration for BIOLISA RUBÉOLA IgG DBS kit: 10269360434

Review: July/2023

UNIVERSAL SYMBOLOGY

CATALOG NUMBER

LOT NUMBER

MANUFACTURING DATE

VALIDITY DATE
(last day of the month)

TEMPERATURE LIMIT
(store)

CONTENT IS SUFFICIENT
FOR <N> TEST

SEE INSTRUCTIONS
FOR USE

IN VITRO DIAGNOSTIC
PRODUCT

KEEP AWAY
FROM SUNLIGHT

DO NOT REUSE

CAUTION

MADE BY

CONTROL

POSITIVE CONTROL

NEGATIVE CONTROL

BIOLOGICAL RISK

FLAMMABLE

CORROSIVE

TOXIC

DO NOT USE IF
PACKAGE IS
DAMAGED

PRODUCT
STERILIZED

DANGER