

BD ProbeTec ET *Legionella pneumophila* (LP) Amplified DNA Assay



8010960

2006/04

Português

Patente EUA N° 5,270,184; 5,547,861; 5,648,211; 5,712,124; 5,744,311; 5,846,726; 5,851,767; 5,866,336; 5,919,630; 5,928,869; 5,958,700; 6,054,279; 6,090,552; 6,117,635; 6,251,609; 6,316,200; 6,656,680; 6,743,582.

Consulte o glossário de símbolos no fim do folheto informativo.

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BD ProbeTec ET *Legionella pneumophila* (LP) Amplified DNA Assay** (Ensaio de ADN Amplificado de *Legionella pneumophila* **BD ProbeTec ET**), para utilização com o Sistema **BD ProbeTec ET**, utiliza a tecnologia de Amplificação por deslocamento de cadeia (SDA - Strand Displacement Amplification) para a detecção qualitativa directa do ADN de *Legionella pneumophila* (grupos serológicos 1 - 14) em amostras de expectoração de doentes nos quais há suspeita clínica de pneumonia. Destina-se a auxiliar no diagnóstico presuntivo de doença do legionário em conjunto com a cultura e outros métodos.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A doença do legionário pode ser adquirida por inalação de aerossóis contendo *Legionella* ou por microaspiração de água contaminada. Em estudos realizados na Europa e na América do Norte foi referido que a *Legionella* é responsável por 2 a 15% dos casos de pneumonia adquirida na comunidade (CAP - community acquired pneumonia) que requerem internamento hospitalar. A taxa de fatalidade dos casos para os doentes com doença do legionário é de 5 a 30%, apresentando os doentes idosos e imunocomprometidos um risco de morte mais elevado.¹ Foram identificadas quarenta espécies diferentes de *Legionella*, metade das quais está relacionada com doença em seres humanos. A *Legionella pneumophila* é responsável por 90% dos casos não diagnosticados de doença do legionário. Apesar de serem conhecidos catorze grupos serológicos de *L. pneumophila*, 80% das infecções por *L. pneumophila* são causadas pelo grupo serológico 1.²

A importância do estabelecimento de um diagnóstico de pneumonia e respectiva etiologia é realçada pela crescente preocupação sobre a utilização excessiva de antibióticos. Os resultados dos testes de diagnóstico de *L. pneumophila* devem ser disponibilizados o mais rapidamente possível ao médico, uma vez que foi demonstrado que a mortalidade aumenta se houver um atraso na administração de terapêutica apropriada. Nos métodos de cultura tradicionais, é necessário um período mínimo de dois dias para o crescimento de microrganismos *Legionella* a partir de amostras de expectoração positivas e um total de sete dias para finalizar um resultado negativo. Como auxiliares à cultura, existem kits de imunoenensaio enzimático disponíveis no mercado para detecção do antígeno de *L. pneumophila* grupo serológico 1 em amostras de urina.³ Contudo, os testes de diagnóstico das infecções por *Legionella* que fornecem resultados rápidos com boa sensibilidade e especificidade continuam a ser limitados.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O **BD ProbeTec ET *Legionella pneumophila* (LP) Amplified DNA Assay** baseia-se na amplificação e detecção simultâneas de ADN alvo, utilizando "primers" de amplificação e uma sonda de detecção com marcação fluorescente. Os reagentes de SDA encontram-se liofilizados em dois micropoços individuais descartáveis. A amostra processada é adicionada ao micropoço de inicialização, que contém os "primers" de amplificação, a sonda de detecção com marcação fluorescente e outros reagentes necessários para a amplificação. Os "primers" amplificam uma região com 68 pares de bases do gene potenciador de infectividade de macrófagos (mip - macrophage infectivity potentiator) da *L. pneumophila*, que se mantêm em todos os grupos serológicos da espécie. Após a incubação, a mistura da reacção é transferida para o micropoço de amplificação, que contém duas enzimas (uma ADN polimerase e uma endonuclease de restrição) necessárias à SDA. Os micropoços de amplificação são selados para impedir a contaminação e, em seguida, incubados num leitor de fluorescência, com controlo de temperatura, que monitoriza as reacções quanto à formação de produtos amplificados. Cada uma das reacções co-amplifica e detecta um Controlo de amplificação interno (IAC - Internal Amplification Control), com o objectivo de verificar se existem as condições adequadas para a amplificação e para reduzir a possibilidade de apresentação de um resultado falso negativo devido à presença de inibidores do ensaio. A presença ou ausência de ADN de *L. pneumophila* é determinada pelo cálculo dos resultados PAT (Passes After Threshold - Passagem após limiar) para a amostra, com base em valores limiares predeterminados. O instrumento apresenta automaticamente estes resultados como positivos, negativos ou indeterminados.

REAGENTES E MATERIAIS

Cada embalagem de reagentes **BD ProbeTec ET *Legionella pneumophila* (LP) Amplified DNA Assay** contém:

Micropoços de inicialização de *Legionella pneumophila* (LP), (1 x 24)

6 oligonucleótidos $\geq 7,5$ pmol, dNTP $\geq 15,2$ nmol, 2 sondas de detecção $\geq 22,5$ pmol,

Oligonucleótido sintético ≥ 1500 cópias

Micropoços de amplificação de *Legionella pneumophila* (LP), (1 x 24)

Enzima de restrição: ≥ 33 unidades, ADN polimerase ≥ 14 unidades

10 coberturas de placas de inicialização, 16 seladores de placas de amplificação (1/2), 8 sacos para resíduos

BD ProbeTec ET Respiratory and Media Diluent and Control Kit (CF*/LP/MP):**

Conteúdo: Diluente Respiratório e de Meios: Bicina, Fosfato de Potássio, Hidróxido de Potássio, DMSO e Proclin; 10 Controlos Positivos (CF/LP/MP): ≥ 1050 ng DNA de Esperma de Salmão, $\geq 47,3$ μ g Tris, $\geq 9,0$ μ g EDTA, ≥ 3600 Cópias de Plasmídeo de CF, ≥ 4800 Cópias de Plasmídeo de LP, ≥ 5400 Cópias de Plasmídeo de MP; 10 Controlos Negativos (CF/LP/MP): ≥ 1050 ng DNA de Esperma de Salmão, $\geq 47,3$ μ g Tris, $\geq 9,0$ μ g EDTA; 100 Tubos de 2 mL com Tampa de Encaixe

* Refere-se ao Ensaio de DNA Amplificado **BD ProbeTec ET** para a Família *Chlamydiaceae* (CF)

** Refere-se ao Ensaio de DNA Amplificado **BD ProbeTec ET *Mycoplasma pneumoniae*** (MP)

Instrumentos, equipamento e acessórios: **BD ProbeTec** ET Instrument and Instrument Plate (Instrumento e Placa de Instrumento), **BD ProbeTec** ET Lysing Heater (Aquecedor para Lise), **BD ProbeTec** ET Priming and Warming Heater (Aquecedor para Inicialização e Aquecimento), **BD ProbeTec** ET Pipettor (Pipetador), Suporte e Fonte de Alimentação, Suporte de Tubos de Amostra de 2 mL, **BD ProbeTec** ET Accessories Kit (Kit de Acessórios), **BD ProbeTec** ET Pipette Tips (Pontas de Pipeta).

Material Necessário mas Não Fornecido: Câmara de Segurança Biológica de Classe II (BSC), agitador vortex, congelador sem descongelação automática a -20°C e/ou -70°C (ou mais baixa), microcentrífuga com capacidade para 16 000 x g, recipientes de banho-maria, termómetro digital, suporte para recipiente de banho-maria com tampa de rosca, outros suportes para tubos de amostra apropriados, QIAGEN QIAamp DNA Stool Mini Kits, Etanol a 96 - 100%, **BBL Cultreswab** EZ Swabs (Zaragatoas), Tubos de Amostra de 2 mL e Tampas **BD ProbeTec** ET, luvas descartáveis, marcadores resistentes a álcool, micropipetas com capacidade para distribuir volumes de 25 - 1000 µL, pontas de pipeta resistentes a aerossóis, água destilada, *L. pneumophila* ATCC 33152 (Philadelphia-1), Albumina Bovina (Fracção V) a 0,2% (P/V) em soro fisiológico a 0,85% (P/V), hipoclorito de sódio a 1% (v/v) com Alconox*.

* Dissolva 7,5 g de Alconox com 1 L de solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) e misture. Prepare diariamente.

Requisitos de Armazenamento e Manuseamento: As embalagens de reagentes **BD ProbeTec** ET LP podem ser armazenadas entre 2 e 33°C. Não utilizar as embalagens de reagentes fechadas após o fim do prazo de validade. Depois da abertura de uma bolsa, os micropoços permanecerão estáveis durante 12 semanas, desde que tenham sido correctamente resselados, ou até ao prazo de validade, o que ocorrer primeiro. Não congelar.

O **BD ProbeTec** ET Respiratory and Media Diluent and Control Kit (CF/LP/MP) pode ser armazenado entre 2 e 33°C. Não utilizar os reagentes após o fim do prazo de validade. Não congelar.

Advertências e Precauções

Para diagnóstico *in vitro*.

1. Nas amostras podem existir microorganismos patogénicos, incluindo os vírus das hepatites e o vírus da imunodeficiência humana. No manuseamento de todos os itens contaminados com sangue e outros fluidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções padrão"⁴⁻⁷ e as linhas de orientação da instituição.
2. O manuseamento e preparação das amostras do tracto respiratório inferior antes do passo de incubação a 70°C devem ser executados numa Câmara de segurança biológica de classe II (BSC).
3. Durante o passo de incubação a 70°C, utilizar um suporte para recipiente de banho-maria com uma tampa de rosca, para possibilitar uma contenção adicional relativamente a amostras do tracto respiratório inferior com potencial risco biológico.
4. O **BD ProbeTec** ET Respiratory and Media Diluent contém dimetil sulfoxido (DMSO). O DMSO é altamente tóxico por inalação, em contacto com a pele ou por ingestão. Evitar o contacto com os olhos e usar sempre luvas durante o manuseamento. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediatamente com água abundante e consultar um médico. Em caso de contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com água.
5. Consultar o QIAamp DNA Stool Mini Kit Handbook para obter informações de segurança sobre os reagentes QIAGEN utilizados neste procedimento. Não eliminar os reagentes QIAGEN para soluções com lixívia. Não expor os reagentes QIAGEN a lixívia.
6. Têm havido relatórios que sugerem que os kits de extracção de ADN QIAGEN não são adequados para a reacção em cadeia da polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) da *Legionella* devido à possibilidade de os reagentes serem contaminados com ADN de *Legionella*.^{8,9} Apesar da probabilidade desta ocorrência ser baixa, e de terem sido identificadas nestes estudos outras espécies de *Legionella* além de *L. pneumophila*, o utilizador deve verificar o desempenho de todos os novos lotes de reagentes QIAGEN antes de os utilizar com amostras de doentes.
7. Apesar de não serem necessárias áreas de trabalho dedicadas, pelo facto de o desenho do **BD ProbeTec** ET reduzir a possibilidade de contaminação por produtos de amplificação no ambiente de teste, são necessárias outras precauções para controlar a contaminação, especialmente para evitar a contaminação de amostras durante o processamento.
8. As bolsas de reagente que contenham micropoços de inicialização e de amplificação não usados DEVEM ser cuidadosamente seladas após a abertura. Antes de voltar a selar as bolsas de reagente, verificar se contém dessecante.
9. A placa que contém os micropoços de amplificação DEVE ser correctamente selada com o selador da placa de amplificação, antes de deslocar a placa do Aquecedor para Inicialização e Aquecimento **BD ProbeTec** ET para o instrumento **BD ProbeTec** ET. A selagem garante uma reacção fechada para amplificação e detecção e é necessária para evitar a contaminação do instrumento e da área de trabalho com produtos da reacção de amplificação. Nunca retirar o material de selagem dos micropoços.
10. Os micropoços de inicialização com líquido residual (após transferência de líquido dos micropoços de inicialização para os micropoços de amplificação) representam uma fonte de contaminação. Selar cuidadosamente os micropoços de inicialização com o selador de placas, antes de os eliminar.
11. Para evitar a contaminação do ambiente de trabalho com produtos da reacção de amplificação, utilizar os sacos para resíduos fornecidos nas embalagens de reagentes para eliminar micropoços de amplificação testados. Certificar-se de que todos os sacos estão correctamente fechados, antes de os eliminar.
12. TROCAR AS LUVAS nos passos especificados durante o processamento de amostras e procedimento de ensaio, de forma a evitar a contaminação cruzada das amostras. Se as luvas contactarem com a amostra, trocar imediatamente de luvas para evitar contaminar outras amostras.
13. Caso a área de trabalho ou o equipamento sejam contaminados com amostras ou controlos, limpar minuciosamente a área contaminada com hipoclorito de sódio a 1% (v/v) com Alconox e lavar minuciosamente com água. Antes de prosseguir com outros testes, deixar a superfície secar completamente. Antes de limpar eventuais reagentes de processamento de amostras QIAGEN, limpar as áreas afectadas com água antes de utilizar a solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) com Alconox.
14. Utilizar apenas o Pipetador **BD ProbeTec** ET e as Pontas de Pipeta **BD ProbeTec** ET para transferência de amostras processadas para os micropoços de inicialização e transferência de amostras dos micropoços de inicialização para os micropoços de amplificação.
15. Para eliminação de pontas de pipetas, tubos de ensaio, micropoços e outros materiais descartáveis usados, seguir as práticas laboratoriais estabelecidas. Eliminar os materiais descartáveis com cuidado. Selar e eliminar os reservatórios de resíduos, quando atingirem ¾ da capacidade ou diariamente (o que ocorrer primeiro).
16. Não permutar nem misturar micropoços, controlos ou reagentes de processamento provenientes de kits com números de lote diferentes.
17. Contactar os Serviços Técnicos, se ocorrer situações invulgares, tais como derrame no instrumento **BD ProbeTec** ET ou contaminação com ADN que não possa ser removida através de limpeza.

COLHEITA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

1. Colheita de amostras

A colheita de amostras deve ser efectuada de acordo com as recomendações do *Clinical Microbiology Procedures Handbook*¹⁰ (Manual de Procedimentos de Microbiologia Clínica) ou do manual de procedimentos do seu laboratório.

2. Armazenamento e transporte de amostras

- As amostras podem ser armazenadas/transportadas entre 18 e 33°C durante um período inferior a 6 h.
- As amostras podem ser refrigeradas entre 2 e 8°C durante um período inferior a 3 dias.
- As amostras podem ser refrigeradas a uma temperatura inferior ou igual a -20°C durante um período inferior a 14 semanas.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Consulte o Manual do Utilizador do Sistema **BD ProbeTec ET** para obter instruções específicas sobre a utilização e manutenção dos componentes do sistema.

A. Preparação do Instrumento:

1. O instrumento deve estar ligado; todos os instrumentos deverão aquecer antes de iniciar o ensaio.
 - a. O aquecedor para inicialização e aquecimento requer aproximadamente 90 min para aquecimento e estabilização.
A temperatura definida para o componente de inicialização do aquecedor para inicialização e aquecimento é de 72,5°C.
A temperatura definida para o componente de aquecimento do aquecedor para inicialização e aquecimento é de 54°C.
 - b. O instrumento **BD ProbeTec ET** é controlado através de software e requer aproximadamente 30 min para aquecer.
2. As temperaturas dos aquecedores devem ser verificadas antes do início do ensaio. Registe as temperaturas no **Registo de Manutenção do Sistema BD ProbeTec ET**.
 - a. Aquecedor para inicialização e aquecimento
O termómetro do aquecedor para inicialização deve situar-se entre 72 e 73°C.
O termómetro do aquecedor para aquecimento deve situar-se entre 53,5 e 54,5°C.
3. Verifique a temperatura exibida no ecrã do instrumento **BD ProbeTec ET**. A temperatura deve situar-se entre 47,5 e 55°C. Registe as temperaturas no **Registo de Manutenção do Sistema BD ProbeTec ET**.

B. Pipetador:

Consulte o Manual do Utilizador do Sistema **BD ProbeTec ET**, para obter explicações pormenorizadas sobre as funções do teclado do Pipetador **BD ProbeTec ET**. Para além disso, é necessário limpar o Pipetador **BD ProbeTec ET** após cada utilização. Consulte o representante dos Serviços Técnicos para obter orientações sobre a limpeza e manutenção correctas do Pipetador **BD ProbeTec ET**.

Para efectuar o ensaio **BD ProbeTec ET** LP são necessários os seguintes programas: O programa 1 transfere líquido das amostras processadas para os micropoços de inicialização LP. O programa 5 transfere líquido dos micropoços de inicialização LP para os micropoços de amplificação LP. Programe o pipetador da seguinte forma:

Programa 1:

1. LIGUE o pipetador. O pipetador irá emitir um sinal sonoro, mostrar rapidamente "ZERO", mostrar rapidamente o n.º de versão do software e, por fim, emitirá novo sinal sonoro.
2. Prima a tecla azul "Prog" (Programa). Prima a tecla "Vol" (Volume), até ser exibido "1", para seleccionar o programa 1. Prima "Enter".
3. Para entrar no modo de programação, prima e mantenha premida a tecla "Prog". Mantendo a tecla "Prog" premida, prima em simultâneo a tecla de função especial com uma ponta de pipeta ou a extremidade de um clipe de papel.
4. Prima "Fill" (Encher). Prima a seta para cima, até ser exibido **200**. Prima "Enter".
5. Prima "Disp" (Distribuir). Prima a tecla de seta para cima, até ser exibido **150**. Prima "Enter".
6. Prima novamente "Enter", para guardar o programa e sair. Será emitido um sinal sonoro para indicar que a programação foi concluída.
7. Verifique o seu programa, premindo o gatilho para avançar passo a passo. À medida que efectua cada um dos passos, estabeleça a velocidade de aspiração/distribuição utilizando a tecla "Vol". Em cada passo, aparecerá o indicador de velocidade. Utilize a tecla "Vol" para regular o indicador de velocidade, de forma a mostrar 2 quadrados para os passos "Encher" e "Distribuir".

Programa 5

1. Prima a tecla "Prog". Prima a tecla "Vol", até ser exibido "5", para seleccionar o programa 5. Prima "Enter".
2. Para entrar no modo de programação, prima e mantenha premida a tecla "Prog". Mantendo a tecla "Prog" premida, prima em simultâneo a tecla de função especial com uma ponta de pipeta ou a extremidade de um clipe de papel.
3. Prima "Fill". Prima a seta para cima, até ser exibido **100**. Prima "Enter".
4. Prima "Disp". Prima a tecla de seta para cima, até ser exibido **100**. Prima "Enter".
5. Prima "Mix" (Misturar). Prima a tecla de seta para cima, até ser exibido **50**. Prima "Enter".
6. Prima novamente "Enter", para guardar o programa e sair. Será emitido um sinal sonoro para indicar que a programação foi concluída.
7. Verifique o seu programa, premindo o gatilho para avançar passo a passo. À medida que efectua cada uma dos passos, estabeleça a velocidade de aspiração/distribuição/mistura utilizando a tecla "Vol". Em cada passo, aparecerá o indicador de velocidade. Utilize a tecla "Vol" para ajustar o indicador de velocidade, de forma a mostrar 2 quadrados para as funções de aspiração e distribuição. Utilize a tecla "Vol" para regular a velocidade de mistura, de forma a serem mostrados 3 quadrados.

Revisão de Programa

Os programas devem ser revistos antes do início do procedimento. Para rever o programa, LIGUE o pipetador. Prima a tecla azul "Prog". Prima a tecla "Vol", até ser exibido o número de programa apropriado (1 ou 5). Prima a tecla "Enter". Utilize o gatilho do pipetador para avançar através de cada um dos passos do programa.

Programa 1: Este programa aspira 200 µL; distribui 150 µL para o micropoço LP. O visor do pipetador deverá exibir:
Fill 200 µL – S ■■

Dispense 150 µL – S ■■

Programa 5: Este programa aspira 100 µL; distribui 100 µL e mistura três vezes 50 µL. O visor do pipetador deverá exibir:
Fill 100 µL – S ■■

Dispense 100 µL – S ■■

Mix 50 µL – S ■■■

Zero (intermitente)

C. Disposição da Placa:

O instrumento **BD ProbeTec** ET elabora um Relatório de Disposição da Placa, depois de o tipo de ensaio, a identificação da amostra, os números de lote do controlo e do kit serem introduzidos no sistema. Este relatório mostra a disposição física de amostras e controlos para cada placa a ser testada. Esta orientação é utilizada para a placa de micropoços de inicialização e para a placa de micropoços de amplificação. Para o ensaio LP, os micropoços de inicialização são tiras de micropoços de cor cinzenta uniforme. Os micropoços de amplificação são tiras de micropoços com riscas cinzentas.

D: Processamento de Amostras do Tracto Respiratório Inferior:

Notas sobre o Procedimento:

- Antes de iniciar o procedimento, reveja o QIAGEN QIAamp DNA Stool Mini Kit Handbook relativamente a notas e precauções importantes.
 - Antes de iniciar o processamento de amostras, encha um recipiente de banho-maria com água destilada e aqueça a 70°C (± 5°C).
 - Utilize marcadores resistentes ao álcool para identificar os recipientes e os tubos.
 - Troque as pontas de pipeta entre todas as transferências de líquido. Recomenda-se a utilização de pontas com barreira contra aerossóis.
 - Antes da utilização, aguarde até que o **BD ProbeTec** ET Respiratory and Media Diluent (CF/LP/MP) atinja a temperatura ambiente e misture suavemente, por inversão.
 - Distribua uma alíquota da quantidade necessária de **BD ProbeTec** ET Respiratory and Media Diluent (CF/LP/MP) para um recipiente limpo. Para calcular a quantidade necessária, utilize 0,4 mL para cada amostra e adicione 1 a 2 mL, para maior facilidade de pipetagem. **Para evitar a contaminação do diluente - não verta o diluente excedente novamente para dentro do frasco.**
1. Prepare os reagentes QIAGEN (consultar "Preparação de reagentes" no QIAamp DNA Stool Mini Kit Handbook).
 2. Deixe as amostras atingirem a temperatura ambiente.
 3. Identifique um tubo com tampa de pressão de 2 mL para cada amostra a ser testada.

Todos os passos indicados a seguir devem ser executados numa Câmara de Segurança Biológica (BSC):

4. Agite as amostras no vortex durante 5 a 15 s, para homogeneizar.
5. Pipete 350 µL de amostra para o tubo identificado.

NOTA: Poderá ser difícil pipetar com exactidão as amostras de expectoração. Nesse caso, utilize as graduações existentes na face lateral do tubo para ajudar a garantir que é colocado no tubo o volume correcto. Em alternativa, utilize um tubo com 350 µL de água, para servir como guia.

6. TROQUE DE LUVAS após a adição de amostras.
7. Pipete 150 µL de tampão QIAGEN ASL para cada um dos tubos de ensaio.
8. Pipete 25 µL de Proteinase K QIAGEN para cada um dos tubos de ensaio.
9. Pipete 500 µL de tampão de lise QIAGEN AL para cada um dos tubos de ensaio.
10. Tape os tubos e agite no vortex durante 5 s. Coloque os tubos num suporte de recipiente para banho-maria com uma tampa de rosca.

Todos os passos indicados a seguir devem ser executados numa Câmara de Segurança Biológica (BSC):

11. Incube os tubos num recipiente de banho-maria a 70°C (± 5°C) durante 15 min.
12. Após este período, retire os tubos do recipiente de banho-maria e centrifugue (16 000 x g) durante aproximadamente 5 s.
13. Retire os tubos da centrífuga. Abra os tubos e adicione 500 µL de etanol a 96-100%.
14. Volte a tapar os tubos e agite no vortex durante 5 s.
15. Centrifugue as amostras (16000 x g) durante aproximadamente 5 s.
16. Para cada amostra, identifique uma coluna de centrifugação e um tubo de colheita QIAGEN.
17. Transfira 700 µL de amostra para a coluna de centrifugação QIAGEN correctamente identificada.
18. Centrifugue os tubos (16 000 x g) durante 1 min.
19. Transfira as colunas para os novos tubos de colheita QIAamp. Elimine os tubos que contêm o filtrado.
20. Transfira, com cuidado, mais 700 µL da amostra para a coluna apropriada.
21. Centrifugue os tubos (16 000 x g) durante 1 min.
22. Transfira as colunas para os tubos de colheita QIAamp limpos. Elimine os tubos que contêm o filtrado.
23. Abra as colunas QIAamp e adicione 500 µL de tampão de lavagem QIAGEN AW1 a cada coluna.
24. Centrifugue os tubos (16 000 x g) durante 1 min.
25. Transfira as colunas para os novos tubos de colheita QIAamp. Elimine os tubos que contêm o filtrado.
26. Abra as colunas QIAamp e adicione 500 µL de tampão de lavagem QIAGEN AW2 a cada coluna.
27. Centrifugue os tubos (16 000 x g) durante 3 min.
28. Transfira as colunas para tubos de colheita QIAamp finais, correctamente identificados. Elimine os tubos que contêm o filtrado.

NOTA: Neste momento, o tubo de colheita deve ser identificado.

NOTA: Tenha cuidado para assegurar que não existe líquido aderente ao fundo da coluna. A transferência de lavagem residual para o tubo de colheita pode afectar os resultados.

29. Abra as colunas e adicione 225 µL de tampão de eluição QIAGEN AE a cada coluna.

30. Incube 1 min à temperatura ambiente.

31. Centrifugue os tubos (16 000 x g) durante 1 min.

32. Elimine as colunas.

33. Identifique um tubo com tampa de rosca de 2 mL para cada amostra.

34. Transfira 400 µL de Respiratory and Media Diluent (CF/LP/MP) para cada um dos tubos com tampa de rosca.

NOTA: Encha um recipiente de banho-maria com água destilada e ferva para utilização no passo 38.

35. Transfira 200 µL de líquido de eluição para o tubo correctamente identificado com 400 µL de Respiratory and Media Diluent (CF/LP/MP).

36. Tape o tubo e agite no vortex durante 5 s.

37. Prepare os controlos. Consultar **Preparação de controlo de amostras do tracto respiratório inferior (Secção E)**.

38. Transfira as amostras e os controlos para um suporte para recipiente de banho-maria.

39. Coloque o suporte no recipiente de banho-maria a ferver durante 5 min.

40. No fim deste período de tempo, retire o suporte no recipiente de banho-maria e deixe os tubos arrefecerem à temperatura ambiente durante 15 min.

ADVERTÊNCIA: tenha cuidado para evitar queimaduras provocadas pela água a ferver, o suporte para recipiente de banho-maria ou as superfícies do recipiente de banho-maria que possam estar quentes.

41. Depois de os tubos arrefecerem, centrifugue-os (16 000 x g) durante aproximadamente 5 s.

NOTA: Depois de ferver as amostras:

- Podem ser armazenadas entre 18 e 33°C durante um período máximo de 6 h e podem ser testadas sem ser necessário repetir a fervura.
 - Podem ser armazenadas até 3 dias, entre 2 e 8°C. Antes de serem testadas, as amostras devem voltar a ser agitadas no vortex e fervidas.
 - Podem ser armazenadas até 14 semanas, à temperatura de ≤ -20°C. É necessário descongelar as amostras à temperatura ambiente, voltar a agitar no vortex e repetir a fervura, antes de serem testadas.
42. As amostras estão prontas para o **Procedimento de teste do Ensaio BD ProbeTec ET LP (Secção F)**.

E. Preparação do Controlo de Amostras do Tracto Respiratório Inferior:

- Para cada série de tubos (placa) a ser testada, prepare um tubo de controlo negativo (CF/LP/MP) e um tubo de controlo positivo (CF/LP/MP). Se uma placa contiver mais de um número de lote da embalagem de reagente, os controlos devem ser testados com cada lote.
- Inverta suavemente o tampão QIAGEN AE e o diluente de amostras do tracto respiratório e de meios, antes da utilização.
- Retire a tampa do tubo de controlo negativo (CF/LP/MP).
- Utilizando uma pipeta nova para cada um dos tubos de controlo, adicione 200 µL de tampão QIAGEN AE.
- Utilizando uma pipeta nova para cada um dos tubos de controlo, adicione 400 µL de diluente de amostras do tracto respiratório e de meios.
- Recoloque as tampas nos tubos, apertando bem.
- Retire a tampa do tubo de controlo positivo (CF/LP/MP).
- Utilizando uma pipeta nova para cada um dos tubos de controlo, adicione 200 µL de tampão QIAGEN AE.
- Utilizando uma pipeta nova para cada um dos tubos de controlo, adicione 400 µL de diluente de amostras do tracto respiratório e de meios.
- Recoloque as tampas nos tubos, apertando bem.
- Agite os tubos de controlo no vortex durante 5 s.
- Os controlos estão agora prontos para serem fervidos. Consultar **Processamento de amostras do tracto respiratório inferior (Secção D)**.

F. Procedimento de Teste para o Ensaio BD ProbeTec ET LP:

NOTA: Antes de efectuar este procedimento de teste, disponha as amostras e os controlos processados num suporte com capacidade para tubos de ensaio de 2 mL, tais como o suporte de tubos de ensaio **BD ProbeTec ET** de 2 mL, compatível com o Pipetador **BD ProbeTec ET**.

- Retire e elimine as tampas das amostras e controlos arrefecidos.
 - Antes de prosseguir, TROQUE DE LUVAS para evitar a contaminação.
 - Utilizando o Relatório de Disposição da Placa, prepare a placa do micropoço de inicialização - consultar **Disposição da placa (Secção C)**.
 - Volte a selar as bolsas do micropoço, conforme indicado a seguir.
 - Coloque a bolsa numa superfície plana. Com uma mão, mantenha a extremidade aberta plana.
 - Enquanto aplica pressão, deslize os dedos através da face exterior do selo, de uma extremidade da bolsa para a outra.
 - Examine para garantir que a bolsa está fechada.
 - Selecione o programa 1 no Pipetador **BD ProbeTec ET**.
 - Encaixe as pontas de pipetas. Expanda o Pipetador **BD ProbeTec ET**, puxando totalmente o botão de afastamento.
- NOTA: Certifique-se de que as pontas estão bem encaixadas no pipetador, para evitar derrames.
- Aspire 200 µL da 1ª coluna de amostras.
 - Esvazie suavemente o pipetador, toque com as pontas das pipetas nas paredes laterais dos poços e distribua 150 µL na coluna correspondente de micropoços de inicialização (1 A - H).
- NOTA: Não esvazie o pipetador sobre as amostras ou micropoços, pois poderá ocasionar contaminação. Os movimentos abruptos poderão originar a formação de gotículas ou aerossóis.

9. Elimine as pontas. Pressione o gatilho do pipetador para redefinir o pipetador.
NOTA: Elimine as pontas com cuidado para evitar a ocorrência de derrames ou gotículas que possam contaminar a área de trabalho.
10. Encaixe novas pontas, expanda o pipetador e aspire 200 µL da 2ª coluna de amostras.
11. Esvazie suavemente o pipetador, toque com as pontas das pipetas nas paredes laterais dos poços e distribua 150 µL na coluna correspondente de micropoços de inicialização (2 A - H).
12. Elimine as pontas.
13. Continue a transferir as restantes amostras para essa série.
14. Tape a placa do micropoço de inicialização com a cobertura de placa de inicialização e deixe a placa incubar à temperatura ambiente durante, pelo menos, 20 min. (Pode permanecer até 6 h.) NOTA: Volte a tapar as amostras processadas com novas tampas. TROQUE DE LUVAS.
15. No fim da incubação da reacção de inicialização, prepare a placa do micropoço de amplificação. Configure os micropoços de amplificação na placa de forma a corresponderem ao Relatório de Disposição da Placa (igual à placa de inicialização). Volte a selar a bolsa do micropoço, conforme descrito no passo n.º 4.
16. Retire a cobertura da placa de micropoços de inicialização e transfira a placa para o aquecedor para inicialização. Coloque **IMEDIATAMENTE** a placa de micropoços de amplificação no aquecedor para aquecimento.
17. **Marque 10 min no temporizador. (NOTA: O tempo neste passo é fundamental.)**
18. No fim do período de incubação de 10 min (± 1 min), selecione o programa 5 no pipetador.
19. Encaixe novas pontas de pipeta e transfira 100 µL da 1ª coluna da placa de micropoços de inicialização para a 1ª coluna da placa de micropoços de amplificação. Deixe as pontas da pipeta tocarem nas paredes laterais dos poços e distribua o líquido. Após a distribuição, deixe o pipetador misturar automaticamente o líquido dos poços. Levante cuidadosamente o pipetador, afastando-a da placa. Evite tocar noutros poços.
20. Elimine as pontas. Encaixe novas pontas e continue a transferir a mistura da reacção dos micropoços de inicialização para os micropoços de amplificação, coluna a coluna, utilizando pontas novas para cada coluna.
21. Quando terminar a transferência da última coluna, retire a protecção do selador da placa de amplificação (um selador de amplificação (1/2) cobrirá 6 colunas, no máximo. Se a placa exceder 6 colunas, TEM de ser utilizado um selador completo). Segure o selador pelas extremidades e aplique-o sobre os micropoços. Utilize as guias no aquecedor para aquecimento, como auxiliar para aplicar o selador. Pressione o selador para baixo, de forma a garantir que todos os micropoços ficam totalmente selados.
22. Na interface do utilizador do instrumento **BD ProbeTec ET**, desloque o transportador para fora, abra a porta e levante a cobertura da placa. Transfira **IMEDIATAMENTE** (máximo de 30 s) a placa de micropoços de amplificação selada para o instrumento **BD ProbeTec ET** e inicie a análise. (Consulte o Manual do Utilizador do Sistema **BD ProbeTec**, para obter instruções pormenorizadas.)
23. Depois de iniciar a análise, prossiga com a parte do procedimento de limpeza descrita a seguir:
 - a. Sele os micropoços de inicialização com um selador de placa de amplificação e retire a placa do aquecedor para inicialização e aquecimento. **ADVERTÊNCIA:** A temperatura é superior a 70°C. Utilize uma luva resistente ao calor para retirar a placa.
 - b. Deixe a placa arrefecer na bancada durante 5 min.
 - c. Retire os micropoços de inicialização selados da placa, segurando ambos os lados do selador e levantando os poços a direito, como uma unidade. Coloque os micropoços selados num saco para resíduos e sele.
 - d. Limpe a placa de metal:

Lave a placa com solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v)-Alconox.

Lave a placa com água.

Envolva a placa numa folha de papel limpa e deixe secar completamente ao ar, antes de voltar a utilizar.
24. Quando a análise estiver concluída, será elaborada uma cópia impressa dos resultados do teste.
25. Desloque o transportador da placa para fora da plataforma, abra a porta e retire a placa. Feche a porta e volte a colocar a plataforma da placa no interior do instrumento.
26. Retire os micropoços de amplificação selados da placa. **ATENÇÃO: Não retire o material de selagem dos micropoços.** Os micropoços selados podem ser facilmente removidos como uma unidade, segurando na parte superior e inferior do selador e levantando-os a direito para fora da placa. Coloque os micropoços selados num saco para resíduos. Sele o saco.
27. Limpe a placa de metal:

Lave a placa com solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v)-Alconox.

Lave a placa com água.

Envolva a placa numa toalha de papel limpa e deixe secar completamente ao ar, antes de voltar a utilizar.
28. Após a última análise do dia, execute os seguintes procedimentos de limpeza:
 - a. Sature toalhas de papel ou compressas de gaze com solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) com Alconox e aplique nos topos das bancadas e nas superfícies exteriores do aquecedor para inicialização e aquecimento, do suporte de tubos de ensaio de 2 mL, dos recipientes de banho-maria, da centrífuga e do Instrumento **BD ProbeTec ET**. Deixe a solução actuar nas superfícies durante 2 a 3 min. Sature toalhetes de papel ou compressas de gaze com água e remova a solução de limpeza. Substitua frequentemente os toalhetes de papel ou as compressas de gaze, quando aplicar a solução de limpeza e quando lavar com água. Humedeca toalhetes de papel ou compressas de gaze com hipoclorito de sódio a 1% (v/v) com Alconox e limpe o manípulo do pipetador (APENAS O MANÍPULO). Após um período de 2 a 3 min, limpe o manípulo com toalhetes de papel ou compressas de gaze humedecidas com água.
 - b. Mergulhe o suporte para recipientes de banho-maria e as placas em hipoclorito de sódio a 1% (v/v) com Alconox, durante 1 a 2 min. Lave minuciosamente com água e deixe secar ao ar.
 - c. Volte a encher o pipetador.
 - d. Elimine o saco para resíduos e o saco de materiais com risco biológico selados, de acordo com os procedimentos estabelecidos para eliminação de resíduos contaminados.
29. Execute os seguintes procedimentos pelo menos uma vez por semana:
 - a. Elimine a água utilizada nos banhos-maria.
 - b. Limpe os recipientes de banho-maria com hipoclorito de sódio a 1% (v/v) com Alconox. Lave com água e deixe secar ao ar.
 - c. Volte a encher com água destilada.

Controlo de Qualidade

Os requisitos do controlo de qualidade devem ser efectuados de acordo com os regulamentos ou requisitos de acreditação europeus e/ou nacionais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do seu laboratório. É recomendado que o utilizador consulte as normas do CLSI (anteriormente NCCLS) e os regulamentos da CLIA que dizem respeito a este assunto, para obter orientações sobre as práticas de controlo de qualidade apropriadas. O diluente de amostras do tracto respiratório e de meios e os controlos são fornecidos em conjunto no Respiratory and Media Diluent and Control Kit (CF/LP/MP). Em cada série de ensaios numa placa e para cada novo número de lote do kit de reagentes devem ser incluídos um controlo positivo e um controlo negativo. Os controlos devem ser colocados de forma aleatória. O controlo positivo monitoriza falhas substanciais nos reagentes. O controlo negativo monitoriza a contaminação ambiental e/ou de reagentes. Os controlos positivo e negativo devem ser testados como positivo e negativo, respectivamente, de forma a relatar os resultados da amostra. Se o desempenho dos controlos não for o esperado, a série do ensaio é considerada inválida e o instrumento não apresenta os resultados do doente. Caso os controlos da análise não forneçam os resultados esperados, repita toda a série utilizando um novo conjunto de controlos, novos micropoços e amostras processadas. Se, para um teste de repetição, a amostra processada continuar a ser inadequada, volte a processar outra alíquota da amostra primária. Se a repetição dos controlos não apresentar os resultados esperados, contacte os Serviços Técnicos (consultar "Interpretação dos resultados do teste").

No micropoço de inicialização encontra-se um Controlo de amplificação interno (IAC) liofilizado. O IAC contém ácido nucleico alvo, que é amplificado na presença da matriz da amostra. O IAC foi concebido para confirmar a validade da reacção de amplificação e identificar a inibição potencial proveniente da amostra processada.

Controlos De Processamento De Amostras

Os controlos de processamento de amostras podem ser testados de acordo com os requisitos dos organismos de acreditação apropriados. Um controlo positivo deve testar todo o sistema de ensaio. Para este fim, amostras com resultados positivos podem servir como controlos para serem processadas e testadas em conjunto com amostras desconhecidas. As amostras utilizadas como controlos de processamento devem ser armazenadas, processadas e testadas de acordo com o folheto informativo do produto. Os controlos de processamento de amostras que simulam amostras do tracto respiratório inferior também podem ser preparados tal como descrito abaixo:

1. Retire um frasco de *L. pneumophila* ATCC 33152 (Philadelphia-1) liofilizada do armazenamento a uma temperatura de -20°C ou inferior.
2. Reidrate com 1 mL de soro fisiológico a 0,85% (p/v) com albumina bovina (fracção V) a 0,2% (p/v).
3. Dilua a *L. pneumophila* de stock reidratada numa proporção de 1:100 000 em soro fisiológico a 0,85% (p/v) com albumina bovina (fracção V) a 0,2% (p/v).
4. Pipete 350 µL de *L. pneumophila* diluída para um tubo com tampa de pressão.
5. Processe conforme descrito em **Processamento de amostras do tracto respiratório inferior (Secção D)**.

Monitorização da Presença de Contaminação com ADN

Pelo menos uma vez por mês, deverá efectuar os procedimentos de teste descritos em seguida, de forma a monitorizar a área de trabalho e as superfícies do equipamento em relação à contaminação com ADN. A monitorização ambiental é essencial para detectar a contaminação antes da ocorrência de um problema.

1. Para cada uma das áreas* a ser testada, utilize uma zaragatoa **BBL CultureSwab EZ**.
2. Identifique um tubo com tampa de rosca de 2 mL para cada área a ser testada. Pipete 600 µL de diluente de amostras do tracto respiratório e de meios para cada um dos tubos, e adicione 300 µL de tampão QIAGEN AE ou água destilada de grau molecular. Agite no vortex durante 5 s, para misturar.
3. Mergulhe a primeira zaragatoa no diluente preparado no passo 2 e limpe a primeira área com um movimento de varrimento alargado.
4. Rode a zaragatoa no diluente, pressionando contra a face lateral do tubo. Volte a tapar o tubo e agite no vortex durante 5 s. Elimine a zaragatoa.
5. Repita o procedimento para todas as áreas a serem testadas.
6. Coloque os tubos num suporte para recipiente de banho-maria e aqueça num banho-maria de água a ferver durante 5 min. Retire o suporte do banho-maria e deixe as amostras arrefecerem 15 min à temperatura ambiente.
7. Depois de os tubos arrefecerem, centrifugue-os (16 000 x g) durante aproximadamente 5 s.
8. Enquanto os tubos estiverem a aquecer, utilize toalhas limpas saturadas com água para remover resíduos da mistura de tampão das superfícies testadas.
9. Logo que as amostras tenham arrefecido, prossiga para o **Procedimento de teste do Ensaio BD ProbeTec ET LP (Secção F)**.

*As áreas recomendadas para serem testadas incluem: superfícies do suporte para recipiente de banho-maria, microcentrifuga, aquecedor para inicialização e aquecimento, placas de micropoços pretos, manípulo do pipetador, teclas tácteis do instrumento, teclado do instrumento, superfícies secas dos recipientes de banho-maria, superfícies dos suportes de amostras e bancadas de trabalho, incluindo as áreas de processamento de amostras.

Caso uma área apresente um resultado positivo, limpe a área com solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) com Alconox, preparada de fresco. Certifique-se de que toda a área fica molhada com a solução de limpeza. Deixe actuar na superfície durante, pelo menos, 2 min ou até secar. Se necessário, retire o excesso de solução de limpeza com uma toalha limpa. Limpe a área com uma toalha limpa saturada com água e deixe a superfície secar. Volte a testar a área. Repita até serem obtidos resultados negativos. Se a contaminação não for resolvida, contacte os Serviços Técnicos para mais informações.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE

A presença ou ausência de ADN de *L. pneumophila* é determinada pelo cálculo dos resultados PAT (Passes After Threshold - Passagem após limiar) para a amostra, com base em valores limiares predeterminados. O resultado PAT é utilizado para avaliar a grandeza do sinal produzido em resultado da reacção. Para esta métrica, números mais elevados indicam que o limiar foi alcançado em fases iniciais da amplificação, enquanto números mais baixos indicam que o limiar foi alcançado mais tarde no decurso da reacção. A grandeza do resultado PAT não constitui uma indicação do nível de ADN de *L. pneumophila* presente na amostra.

Se os resultados do controlo do ensaio não forem os esperados, não apresente o relatório dos resultados do doente. Consulte a secção Controlo de qualidade relativamente aos valores de controlo esperados. Os resultados apresentados são determinados tal como é indicado a seguir:

Resultado PAT				
Alvo LP	Alvo IAC	Resultado	Interpretação	Relatório
> 0	> ou = 0	Positivo	ADN de <i>L. pneumophila</i> detectado pela SDA.	Positivo para microrganismos pertencentes aos grupos serológicos 1 a 14 de <i>L. pneumophila</i> , sugerindo infecção actual. São necessários testes adicionais para identificar o grupo serológico, se tal for necessário para fins epidemiológicos.
= 0	> 0	Negativo	ADN de <i>L. pneumophila</i> não detectado pela SDA.	Presumível negativo para microrganismos pertencentes aos grupos serológicos 1 a 14 de <i>L. pneumophila</i> numa amostra do tracto respiratório inferior, sugerindo a ausência de infecção recente ou actual. A infecção por <i>Legionella</i> não pode ser excluída porque: 1) outros grupos serológicos além dos grupos 1 - 14 e outras espécies de <i>Legionella</i> podem causar a doença e 2) o nível de ADN presente poderá situar-se abaixo do limite de detecção do teste.
= 0	= 0	Indeterminado		Controlo de amplificação inibido. Necessário teste adicional para interpretação do resultado. ^a

^a Repetir o Ensaio **BD ProbeTec** ET LP a partir do tubo de ensaio processado. Se a amostra processada não tiver um volume insuficiente, repita o teste a partir da amostra original. Se, após a repetição, o resultado for positivo ou negativo, interprete conforme descrito abaixo. Se, após a repetição, o resultado for indeterminado, deverá ser pedida uma nova amostra.

Determinação do limiar para LP e IAC:

Os valores limiares para o ADN alvo de *L. pneumophila* e IAC foram inicialmente estabelecidos utilizando análises da curva característica do operador receptor elaborada com os dados obtidos a partir de controlos positivos e negativos. Estes valores limiares foram observados em estudos clínicos e com amostras retrospectivas do tracto respiratório inferior positivas e negativas para *L. pneumophila*. Os valores limiares foram validados em seguida em estudos clínicos adicionais.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- O Ensaio **BD ProbeTec** ET LP é específico apenas para os grupos serológicos 1 - 14 de *L. pneumophila*. Não foram testados outros grupos serológicos de *L. pneumophila*.
- O Ensaio **BD ProbeTec** ET LP não detectará infecções provocadas por outras espécies de *Legionella*.
- As características de desempenho do Ensaio **BD ProbeTec** ET LP apenas foram estabelecidas com amostras de expectoração. O desempenho com outros tipos de amostras não foi determinado.
- O Ensaio **BD ProbeTec** ET LP apenas foi avaliado com doentes com idade igual ou superior a 13 anos.
- Tal como acontece com muitos testes de diagnóstico, os resultados obtidos com o Ensaio **BD ProbeTec** ET LP devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas e laboratoriais que o médico possua.
- Um resultado de teste negativo não exclui a possibilidade de infecção, uma vez que os resultados dos testes podem ser afectados pela colheita incorrecta de amostras, erro técnico, confusão de amostras, antibioterapia simultânea ou a presença de uma quantidade de ADN de *L. pneumophila* na amostra abaixo da sensibilidade analítica do teste.
- O Ensaio **BD ProbeTec** ET LP não pode ser utilizado para avaliar o sucesso ou a falha de terapêutica, uma vez que os ácidos nucleicos de *L. pneumophila* podem persistir após terapêutica antimicrobiana.
- O Ensaio **BD ProbeTec** ET LP não foi avaliado com amostras ambientais (por exemplo, água potável ou em testes da qualidade da água).
- O desempenho óptimo deste ensaio requer a colheita e manuseamento adequados das amostras.
- A utilização do Ensaio **BD ProbeTec** ET LP está limitada a pessoal com formação no procedimento de ensaio e no Sistema **BD ProbeTec** ET.
- O Ensaio **BD ProbeTec** ET LP fornece resultados qualitativos. Não pode ser estabelecida nenhuma correlação entre a grandeza do valor PAT e a quantidade de ADN de *L. pneumophila* presente numa amostra.

RESULTADOS ESPERADOS

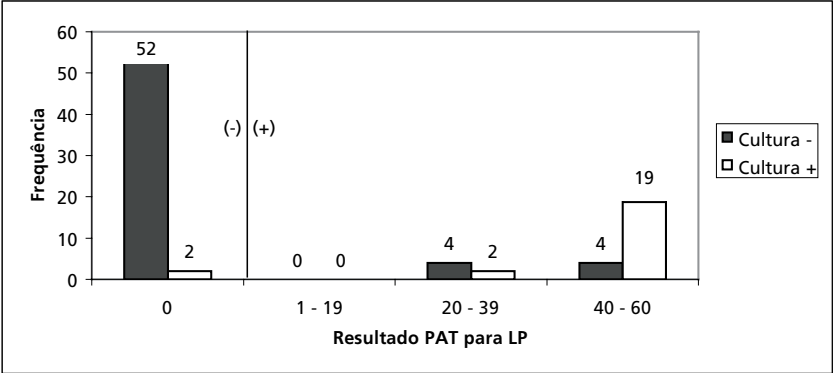
A. Prevalência

O grau de positividade observado nos testes de *L. pneumophila* é variável, dependendo do método de teste utilizado, da idade do doente, da presença de factores de risco subjacentes, da localização geográfica e, mais importante, da prevalência local da doença, incluindo possíveis situações de surtos.

B. Distribuição da Frequência dos Resultados PAT

Em quatro centros clínicos dos EUA, Europa e Canadá foi colhido um total de 83 amostras retrospectivas de expectoração, que foram testadas com o Ensaio **BD ProbeTec** ET LP. A distribuição da frequência dos valores PAT para LP comparada com cultura é mostrada na figura 1.

Figura 1: Distribuição da frequência dos resultados PAT para LP comparada com cultura



Resultado da cultura	0	1 – 19	20 – 39	40 – 60	Total
Negativo	52	0	4	4	60
Positivo	2	0	2	19	23
Total	54	0	6	23	83

C. Controlos

Durante a avaliação clínica, foram observadas falhas do controlo para o Ensaio **BD ProbeTec** ET LP em uma entre 46 análises (ou seja, uma análise apresentou um erro de procedimento). Os resultados PAT para LP para as restantes 45 análises estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos resultados PAT para LP para controlos de amostras do tracto respiratório e de meios

Controlo	N	Intervalo	5º percentil	Média	Mediana	95º percentil
Negativo para LP	45	0 – 0	0	0	0	0
Positivo para LP	45	29,4 – 50,7	40,1	46,7	47,6	49,7

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Estudo Prospectivo

Durante a época de doenças respiratórias de 2002 - 2003, o Ensaio **BD ProbeTec** ET LP foi avaliado de forma prospectiva em sete centros clínicos nos Estados Unidos da América e no Canadá. Em cada doente foi colhida uma amostra de expectoração e uma amostra de urina. As amostras de expectoração foram testadas utilizando o Ensaio **BD ProbeTec** ET LP, a cultura de *Legionella* e um ensaio de anticorpos por fluorescência directa. As amostras de urina foram testadas utilizando um ensaio de antígenos urinários de *L. pneumophila* disponível no mercado.

Um total de 118 doentes cumpriu os critérios para inclusão no estudo (ou seja, pneumonia evidente em radiografia, doentes ≥ 13 anos de idade, antibioterapia ≤ 14 dias, colheita de tipos de amostra válidos, execução de métodos de referência apropriados, etc.). Dos 118 doentes, houve 114 resultados válidos para o Ensaio **BD ProbeTec** ET LP. Os resultados da análise das amostras de expectoração foram comparados com os resultados de cultura do mesmo tipo de amostras para calcular as características de desempenho. Uma amostra foi considerada positiva se o resultado da cultura foi positivo. Um resultado foi considerado negativo se o resultado da cultura foi negativo.

Todos os resultados iniciais indeterminados foram repetidos a partir da amostra processada ou da amostra original (no caso de existir uma quantidade insuficiente de amostra processada). Não foram incluídas nas características de desempenho as amostras que obtiveram um resultado indeterminado inicialmente e na repetição (ou seja, final). As amostras que obtiveram um resultado inicial indeterminado e um resultado positivo ou negativo na repetição foram incluídas nas características de desempenho. As amostras cujo resultado inicial tenha sido indeterminado mas cuja análise não pôde ser repetida devido a um volume de amostra insuficiente, permanecerem com um resultado de "indeterminado inicial" e não foram incluídas nas características de desempenho.

A comparação entre os resultados da análise das amostras de expectoração no Ensaio **BD ProbeTec** ET LP e da cultura é resumida na Tabela 2.

Tabela 2: Ensaio BD ProbeTec ET LP - resultados prospectivos comparados com cultura de amostras de expectoração

comparação com cultura			
Local	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Indeterminado inicial/ final
1	NA	100% (17/17) (80,5% – 100%)	0/0
2	NA	100% (2/2) (15,8% – 100%)	0/0
3	NA	100% (31/31) (88,8% – 100%)	0/0
6	NA	100% (33/33) (89,4% – 100%)	2/0 ^b
7	NA	100% (31/31) (88,8% – 100%)	3/2 ^c
Global	NA	100% (114/114) ^a (96,8% – 100%)	5/2

^a Das 114 amostras negativas em cultura, todas obtiveram resultados negativos no ensaio de anticorpos por fluorescência directa. Oitenta e sete dos 114 doentes foram igualmente testados com um ensaio de antígeno urinário, tendo obtido resultados negativos.

^b Uma amostra com resultado negativo repetido foi incluída no cálculo da especificidade. Uma amostra não tinha um volume suficiente para repetição da análise.

^c Duas amostras mantiveram resultados indeterminados após a repetição da análise. Uma amostra não tinha um volume suficiente para repetição da análise.

NA = Não aplicável

Estudo Retrospectivo

O Ensaio **BD ProbeTec** ET LP foi igualmente avaliado com 83 amostras de expectoração, retrospectivas, obtidas em centros clínicos nos Estados Unidos da América, Europa e Canadá. As amostras retrospectivas foram congeladas até um período máximo de seis anos, tendo sido a maioria das amostras (65,1%; 54/83) armazenada durante menos de dois anos. Todos os locais registaram o resultado da cultura original para cada uma das amostras retrospectivas. Todos os locais testaram as amostras de expectoração no Ensaio **BD ProbeTec** ET LP e compararam os resultados com os resultados da cultura. Uma amostra foi considerada positiva se o resultado da cultura foi positivo. Uma amostra foi considerada negativa se o resultado da cultura foi negativa.

A comparação entre os resultados da análise das amostras de expectoração, retrospectivas, no Ensaio **BD ProbeTec** ET LP e da cultura é resumida na Tabela 3.

Tabela 3: O Ensaio BD ProbeTec ET LP - resultados retrospectivos comparados com cultura de amostras de expectoração

Local	Resultado para LP	Cultura		Estimativas da concordância da percentagem (IC 95%)			
		Positiva	Negativa	Total	Positiva	Negativa	Global
6	Positivo	1	0	1			
	Negativo	0	0	0			
	Total	1	0	1	100% (1/1) (2,5% – 100%)	NA	100% (1/1) (2,5% – 100%)
8	Positivo	16	5	21			
	Negativo	1	24	25			
	Total	17	29	46	94,1% (16/17) (71,3% – 99,9%)	82,8% (24/29) (64,2% – 94,2%)	87% (40/46) (73,7% – 95,1%)
9	Positivo	1	3	4			
	Negativo	0	22	22			
	Total	1	25	26	100% (1/1) (2,5% – 100%)	88% (22/25) (68,8% – 97,5%)	88,5% (23/26) (69,8% – 97,6%)
10	Positivo	3	0	3			
	Negativo	1	6	7			
	Total	4	6	10	75% (3/4) (19,4% – 99,4%)	100% (6/6) (54,1% – 100%)	90% (9/10) (55,5% – 99,7%)
Global	Positivo	21	8 ^a	29			
	Negativo	2 ^b	52	54			
	Total	23 ^c	60	83	91,3% (21/23) (72% – 98,9%)	86,7% (52/60) (75,4% – 94,1%)	88% (73/83) (79% – 94,1%)

^a Oito amostras apresentaram resultados negativos na cultura e positivos no Ensaio **BD ProbeTec** ET LP. Todas as oito amostras obtiveram resultados positivos num ensaio de antígeno urinário. O teste da PCR foi realizado em seis das oito amostras; a totalidade das seis amostras obteve um resultado positivo com a PCR.

^b Duas amostras apresentaram resultados positivos na cultura e negativos no Ensaio **BD ProbeTec** ET LP. Ambas as amostras obtiveram resultados negativos num ensaio de antígeno urinário. O teste da PCR foi realizado em ambas as amostras. Apenas uma apresentou um resultado positivo neste teste.

^c As 23 amostras com resultados positivos na cultura apresentaram a seguinte distribuição de grupos serológicos: 47,8% (11/23) do grupo serológico 1; 17,4% (4/23) do grupo serológico 3; 13,0% (3/23) do grupo serológico 4; 4,3% (1/23) do grupo serológico 5; 4,3% (1/23) do grupo serológico 6 e 13% (3/23) sem informação disponível em relação ao grupo serológico.

NA = não aplicável

NOTA: O método de PCR utilizado para testar os resultados discordantes entre a cultura e o Ensaio **BD ProbeTec** ET LP não foi um método aprovado pela FDA.

Estudos Analíticos

O volume da reacção de amplificação no Ensaio **BD ProbeTec** ET LP é de 100 µL de amostra processada.

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do Ensaio **BD ProbeTec** ET LP em 14 grupos serológicos diferentes de *L. pneumophila* foi determinada através da diluição de suspensões bacterianas para níveis de 0, 150, 300 e 450 unidades formadoras de colónia (UFC) por reacção. As amostras foram processadas e analisadas em triplicado. Com base em 100% de positividade, a sensibilidade analítica para os grupos serológicos 2 - 10 e 12 foi de 150 UFC/reacção; contudo, o limite de detecção (LOD - Limit of Detection) real pode ser inferior ao nível mais baixo testado. Com base em 100% de positividade, a sensibilidade analítica para os grupos serológicos 1 e 11 foi de 300 UFC/reacção; foi de 450 UFC/reacção para o grupo serológico 13 e 700 UFC/reacção para o grupo serológico 14.

A sensibilidade analítica do Ensaio **BD ProbeTec** ET LP na presença de uma matriz de amostras do tracto respiratório inferior foi determinada através da adição de um stock de *L. pneumophila* grupo serológico 1 infectadas com macrófagos a expectoração em níveis de 0, 150, 300 e 450 UFC por reacção. As amostras foram processadas e analisadas em triplicado. Com base em 100% de positividade, a sensibilidade analítica para as amostras do tracto respiratório inferior adicionadas foi de 150 UFC/reacção; contudo, o limite de detecção real pode ser inferior ao nível mais baixo testado.

Especificidade Analítica

Utilizando o Ensaio **BD ProbeTec** ET LP avaliaram-se 79 microrganismos (69 bactérias, uma levedura e nove vírus). Os isolados bacterianos foram testados em concentrações que variaram entre 1 x 10⁶ UFC/mL a 1 x 10⁸ UFC/mL. Os vírus foram testados numa concentração de 1 x 10⁶ partículas virais/mL. *Coccidioides immitis* foi preparado como uma suspensão de micélios equivalente a um padrão n.º 5 de McFarland. Nenhum dos microrganismos testados produziu um resultado positivo ou foi inibido pelo IAC (tabela 4).

Tabela 4: Ensaio BD ProbeTec ET LP - Especificidade analítica

<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Legionella erytha</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Legionella fairfieldensis</i>	Vírus sincial respiratório, estirpe longa
Adenovirus-5	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Legionella feeleii</i>	Rhinovirus
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Enterovirus (Echovirus)	<i>Legionella gormanii</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i> serótipo <i>Enteritidis</i>
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Legionella hackeliae</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i> serótipo Typhi
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Legionella jordanis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , produtor de proteína A
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Legionella maceachernii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , não produtor de proteína A
<i>Branhamella catarrhalis</i>	Herpesvirus-1	<i>Legionella oakridgensis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , não produtor de proteína A
<i>Candida albicans</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Legionella spiritisensis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serótipo L2	Vírus influenza A	<i>Legionella worsleiensis</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> , AR-39	Vírus influenza B	<i>Moraxella osloensis</i>	<i>Streptococcus do Grupo B</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Kingella kingae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> tipo 4	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Tatlockia (Legionella) micdadei</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Legionella anisa</i>	<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Veillonella parvula</i>
Cytomegalovirus	<i>Legionella bozemanii</i>	Vírus parainfluenza I	
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Legionella cherrii</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Legionella ciniciantiensis</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	
	<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Prevotella oralis</i>	

Substâncias Interferentes

Substâncias potencialmente interferentes, que se podem encontrar em amostras do tracto respiratório inferior, foram testadas com o Ensaio **BD ProbeTec** ET LP na ausência de alvo ou na presença de 750 UFC/reacção de *L. pneumophila*. Nas concentrações apresentadas na Tabela 5 e na ausência de alvo, nenhuma das substâncias testada produziu um resultado positivo ou inibiu o IAC. Quando o alvo estava na presença das substâncias nas concentrações apresentadas na Tabela 5, todas as amostras testadas produziram um resultado positivo.

Tabela 5: Ensaio de LP BD ProbeTec ET - Substâncias pesquisadas relativamente a interferência

Amostras do tracto respiratório inferior	
Substâncias testadas	Concentração
Sangue total (heparina)	2,65%
Lidocaína a 2%	0,21%
Solução de indução de expectoração (NaCl a 3%)	0,32%
Azitromicina	0,42 µg/mL
Penicilina G	17 µg/mL
Tetraciclina	2,3 µg/mL
Doxiciclina	26,5 µg/mL
Ciprofloxacina	4,88 µg/mL
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	5 x 10 ⁶ cells/mL
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	1,06 x 10 ⁷ EBs/mL
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> e <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	1,06 x 10 ⁷ células/mL e 1,06 x 10 ⁷ CE/mL, respectivamente

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do Ensaio **BD ProbeTec** ET LP foi avaliada em três laboratórios, através do teste de um painel constituído por 24 amostras adicionadas a PBS/BSA. O painel era composto por 12 amostras negativas para *L. pneumophila*; três eram amostras positivas fracas (300 UFC/reacção) e três eram amostras positivas elevadas (500 UFC/reacção) para *L. pneumophila*; e três amostras positivas fracas (30 corpos elementares/reacção, 300 UFC/reacção, 900 células/reacção, respectivamente) e três amostras positivas elevadas (50 corpos elementares/reacção, 500 UFC/reacção, 1500 células/reacção, respectivamente) contendo *Chlamydomphila pneumoniae* (CP), *L. pneumophila* (LP) e *Mycoplasma pneumoniae* (MP). Um operador em cada local testou os painéis uma vez por dia, durante três dias. É apresentado um resumo dos resultados na Tabela 6.

Tabela 6: Estimativas de reprodutibilidade do tracto respiratório inferior por nível de amostra

Membro do painel	N			Em dias diferentesNo mesmo local		Em diferentes locais	
		% correcto	PAT médio	DP	% CV	DP	% CV
LP-HIGH	27	100,0%	47,2	0,94	2,00	1,42	3,02
LP-LOW	27	100,0%	44,8	0,44	0,98	2,06	4,59
CP/LP/MP-HIGH	27	100,0%	46,2	1,13	2,45	1,79	3,88
CP/LP/MP-LOW	26 ^a	100,0%	43,0	0,00	0,00	2,59	6,01
Negativo	108	100,0%	0,0	—	—	—	—
IAC com amostras negativas para LP	108	100,0%	47,8	0,43	0,91	0,34	0,70

^a Uma amostra excluída da análise devido a um erro de procedimento.

APRESENTAÇÃO

Estão disponíveis os seguintes produtos **BD ProbeTec** ET:

N.º de Cat. Descrição

440728	BD ProbeTec ET <i>Legionella pneumophila</i> (LP) Amplified DNA Assay
440731	BD ProbeTec ET Respiratory and Media Diluent and Control Kit
440457	BD ProbeTec ET Accessories Kit (10 coberturas de placas de inicialização, 16 seladores de placas de amplificação 1/2 e 8 sacos para resíduos)
440458	BD ProbeTec ET Pipette Tips 6 x 120
440661	BD ProbeTec ET 2 mL Sample Tubes and Caps, 200 cada
440679	BD ProbeTec ET 2 mL Caps, 100
440477	BD ProbeTec ET Instrument, Fora dos EUA
440478	BD ProbeTec ET Instrument, E.U.A. e Canadá
440479	BD ProbeTec ET Priming and Warming Heater, 220V
440480	BD ProbeTec ET Priming and Warming Heater, 120V
440487	BD ProbeTec ET Pipettor
440502	BD ProbeTec ET Lysing Rack

BIBLIOGRAFIA

- Cloud J.L., Carroll K.C., Pixton P., Erall M., Hillyard D.R. (2000) Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J Clin Micro 38:1709-1712
- Stout, J.E., Yu, V.L. 2000. Legionellosis. N. Engl. J. Med. 337: 682-687.
- Bartlett, J.G., Dowell, S.F., Mandell, L.A., File, T.M., Musher, D.M., Fine, M.J. 2000. Guidelines from the Infectious Diseases Society of America - Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Clin.Infect. Dis. 31:347-82.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.

- Garner. J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. 17: 53-80.
- U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
- Van der Zee, A., Peeters, M., de Jong, C., Verbakel, H., 2002. QIAGEN DNA extraction kits for sample preparation for *Legionella* PCR are not suitable for diagnostic purposes. J. Clin. Microbiol. 40 (3): 1126.
- Evans, G.E. et al. 2003. Contamination of QIAGEN DNA extraction kits with *Legionella* DNA. J. Clin. Microbiol. 41 (7): 3452-3453.
- Isenberg, H.D. (ed.) 1992. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.



Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare



Use by / Spotřebujte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použite do / Usar antes de / Använd före /
 YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) /
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) /
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) /
 VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) /
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) /
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mēnesio pabaiga) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) /
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiaca) /
 aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden)



Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalog numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalogové číslo / Número de catálogo



Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatus esindaja Euroopa Nõukogus / Valtututetu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autorisert representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Representante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU



In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk mediceinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaite / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietais / In vitro diagnostisk mediceinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicínsk anordning för in vitro-diagnostik



Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperatuurlimiet / Temperatuuri piirang / Lämpötilarajoitus / Temperature limite / Zulässiger Temperaturbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hömörsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenie teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning



Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeda kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
800-638-8663



BENEX Limited
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon, County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20
Fax: 353-61-47-25-46

Alconox is a trademark of Alconox, Inc.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

QIAamp is a trademark of QIAGEN Inc.

CultureSwab is a trademark of Difco Laboratories, subsidiary of Becton, Dickinson and Company.

BD, BD Logo, BBL and ProbeTec are trademarks of Becton, Dickinson and Company. © 2006 BD.