



D³ Double Duet™

DFA Respiratory Virus
SCREENING & ID KIT

Para exportar apenas - não para venda no E.U.A.

À identificação qualitativa do Influenza A, vírus sincicial respiratório (RSV), Metapneumovirus (MPV) e para rastrear a presença dos vírus Influenza B, Adenovirus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 e Parainfluenza 3, nas células do tracto respiratório (amostras directas) por imunofluorescência com anticorpos monoclonais.

PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.



UTILIZAÇÃO PREVISTA

O D³ Double Duet DFA (Direct Fluorescent Antibody) Respiratory Virus Screening & ID KIT da Diagnostic Hybrids, Inc destina-se à identificação qualitativa do Influenza A, vírus sincicial respiratório (RSV), Metapneumovirus (MPV) e para rastrear a presença dos vírus Influenza B, Adenovirus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 e Parainfluenza 3, nas células do tracto respiratório (amostras directas) por imunofluorescência com anticorpos monoclonais. Os resultados negativos não excluem a infecção por vírus influenza e não deve ser utilizado como a única base para diagnóstico, tratamento ou outras decisões de gestão da doença.

- As características de desempenho para o Influenza A foram estabelecidas quando os influenzas A/H3 e A/H1 eram os vírus Influenza A predominantes em circulação. Quando outros vírus Influenza A estão a surgir, as características de desempenho podem variar.
- Se suspeitar de uma infecção por um novo vírus Influenza A baseado nos critérios actuais de rastreio clínico e epidemiológico, recomendados pelas autoridades de saúde pública, as amostras devem ser colhidas com as precauções adequadas para controlo da infecção para novos tipos virulentos de vírus influenza e enviados para os departamentos de saúde locais ou estatais, para análise. A cultura viral não deve ser efectuada nestes casos, a não ser que esteja disponível uma instalação BSL3+ para receber as amostras e efectuar as culturas.¹

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Com a adição de novos fármacos antivirais para o tratamento da Influenza,² com testes mais rápidos e sensíveis para a detecção de vírus respiratórios^{3,4} e a necessidade crescente de ser mais selectivo na utilização dos antibióticos,⁵ a importância da detecção precoce e identificação do agente viral infectante, cresceu substancialmente. A detecção do vírus está a tornar-se mais importante, para a exclusão de bactérias como a causa das infecções respiratórias. A detecção e detecção com utilização de anticorpos monoclonais, continua a ser o método padrão de identificação nos laboratórios de virologia.

Influenza A and B

Os vírus Influenza (família Orthomyxoviridae) tem um genoma composto por RNA monocatenário, presente em 8 segmentos separados de ribonucleoproteínas. Esta segmentação do genoma é rara entre vírus e provavelmente contribui para o desenvolvimento rápido de novas estirpes de influenza, por intercâmbio de

segmentos génicos, se 2 vírus diferentes infectarem a mesma célula. Há 3 tipos de influenza, A, B e C. O tipo A tem vírus correspondentes nos pássaros e nos porcos, bem como nos seres humanos, enquanto os tipos B e C são apenas conhecidos no ser humano. Devido à possibilidade de outra pandemia causada pelo Influenza A, como a ocorrida em 1918 quando 25-35 milhões de pessoas morreram em todo o mundo, os Centers for Disease Control (CDC) e a World Health Organization (WHO), mantêm sob vigilância as estirpes de influenza e elaboram previsões acerca das estirpes adequadas para produção de vacinas.

A Influenza infecta, um número estimado de 120 milhões de pessoas nos EUA, na Europa e Japão anualmente e estima-se que haja 75 000 mortes anuais por pneumonia causada por influenza, nos EUA. A pneumonia primária viral e pneumonia secundária a infecções bacterianas, são as causas primárias de morbidade da infecção viral. As pandemias de influenza A ocorrem a cada 10 ou 30 anos e as epidemias, quer de Influenza A ou B ocorrem anualmente. As infecções são sazonais, tipicamente entre Novembro e Abril, no hemisfério norte. As complicações tendem a ocorrer nos jovens, idosos e indivíduos com doenças crónicas cardio-pulmonares.

O tempo de incubação é de apenas 1-3 dias com disseminação rápida por inalação, via gotículas aéreas e fomites. Caracteriza-se por febre, mialgia, cefaleia e faringite. Podem ocorrer superinfecções por outros vírus, por ex. Adenovirus.⁶

Adenovirus

Os Adenovírus (família Adenoviridae) são não-envelopado, de fita dupla de DNA vírus. Há 49 serotipos, divididos ainda em 6 grupos, de A a F, a maioria associada a infecções oculares e respiratórias. Geralmente, as infecções por adenovírus em adultos têm uma morbidade baixa, com excepção dos doentes imunocomprometidos e recrutas militares, a quem estas infecções podem causar pneumonia atípica. A disseminação do vírus é normalmente via gotículas aéreas e fomites que infectam as membranas mucosas do olho, tracto respiratório e intestinal.⁷

Vírus Parainfluenza

Os vírus Parainfluenza (família *Paramyxoviridae*) são vírus com envelope, com um genoma formado por RNA monocatenário negativo. Os 4 tipos diferentes, 1 a 4, causam laringotraqueobronquite e pneumonia viral em crianças com menos de 5 anos e causam doença respiratória superior em adultos. A Parainfluenza é a segunda maior causa de doença respiratória inferior nas crianças (a seguir ao RSV). A formação de anticorpos IgA é induzida com infecção no tracto respiratório superior e são mais protectores do que a IgG sérica. Como os anticorpos IgA não atravessam a placenta, os bebés não recebem protecção dos anticorpos maternos e serão provavelmente infectadas durante o primeiro ou segundo ano de vida. Os surtos causados pelos vírus parainfluenza ocorrem durante anos alternados no Outono (P1 e P2) ou ao longo do ano, com aumento de actividade na Primavera (P3).⁸

Vírus sincicial respiratório (RSV)

O RSV (família *Paramyxoviridae*) é um vírus com envelope, de DNA monocatenário negativo. As infecções por RSV causam bronquiolite viral e pneumonia em crianças pequenas e a comum constipação em adultos.⁹ A infecção por RSV é normalmente sazonal (Inverno e início da Primavera) com epidemias a durar até 5 meses. O pico da mortalidade devida ao RSV ocorre em bebés de 3-4 meses. Há 2 grandes subtipos, A e B; o subtipo B é caracterizado como a estirpe assintomática, que a maioria da população contrai. As doenças clínicas mais graves incluem as estirpes dos subtipos A que tendem a predominar na maioria dos surtos.¹⁰ O RSV é a causa viral primária de doença respiratória inferior em crianças pequenas. As re- infecções ocorrem, mas tendem a ser limitadas a infecções respiratórias superiores minor.¹¹

Human Metapneumovirus (hMPV)

O metapneumovirus humano (MPV) é um agente patogénico viral do sistema respiratório que causa um espectro de doenças, desde infecção assintomática até bronquiolite grave. Em 2001, van den Hoogen et al.¹² descreveram a identificação deste novo agente patogénico viral humano em amostras respiratórias expostas a cultura viral durante o Inverno. Metade dos 28 isolados iniciais de MPV foram cultivados de amostras de doentes com menos de um ano de idade e 96% foram isolados em crianças com menos de 6 anos de idade. Os estudos de seroprevalência indicaram que 25% de todas as crianças entre os 6-12 meses que foram analisadas na Holanda, tinham anticorpos detectáveis para o MPV; aos 5 anos de idade, 100% dos doentes tinham evidência de uma infecção anterior. Um outro relatório¹³ da Austrália descrevendo três casos adicionais de infecção por MPV apoia a posição de que este vírus recentemente descoberto é ubiqüitário e nos próximos anos poderá surgir informação adicional relacionada com a epidemiologia e a patogénese.

Conhece-se pouco acerca da patofisiologia da infecção por MPV, mas de modo similar ao pneumovírus relacionado, vírus sincicial respiratório humano (VRS), o MPV parece ter tropismo para o epitélio respiratório. O doente pode ser assintomático ou os sintomas podem ir desde queixas ligeiras no tracto respiratório superior até bronquiolite grave e pneumonia. Os peritos na área das infecções por pneumovírus estão de acordo em que a patofisiologia da infecção por MPV é provavelmente um paralelismo da infecção por VSR, incluindo a ausência de virémia.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O D³ DOUBLE DUET DFA RESPIRATORY VÍRUS SCREENING & ID KIT da Diagnostic Hybrids, Inc utiliza anticorpos monoclonais murinos específicos de antígenos virais, que são directamente marcados quer com R-Ficoeritrina (Influenza A ou RSV) ou isotiocianato de fluoresceína (Influenza B, Adenovírus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 e Metapneumovírus) para a identificação rápida destes vírus respiratórios.

O Kit contém 2 reagentes de coloração, cada um inclui uma mistura de anticorpos monoclonais individuais específicos de antígenos virais: Reagent 1 - R-Ficoeritrina (Influenza A) e Isotiocianato de Fluoresceína (Influenza B, Adenovírus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3); Reagent 2 - R-ficoeritrina (RSV) e Isotiocianato de Fluoresceína (MPV).

As células a ser testadas, que derivam quer de uma amostra clínica ou de cultura celular, são fixadas com acetona. Os Reagents 1 e 2 são adicionados para separar as preparações celulares e depois incubadas durante 15 a 30 minutos, entre 35° C a 37°C, as células coradas são lavadas com a solução de lavagem (Wash Solution) fornecida. É adicionada uma gota de meio de montagem (Mounting Fluid) e coloca-se uma lamela nas células preparadas. As células são examinadas com um microscópio de fluorescência.

Com o Reagent 1, as células infectadas com Influenza A fluorescem a amarelo dourado e as células infectadas com qualquer outro dos cinco vírus fluoresce a verde-maçã. As células não infectadas não apresentam fluorescência, mas serão coradas de vermelho com o contra-corante Azul de Evans. Se apenas são visualizadas as células fluorescentes a amarelo dourado, a amostra pode ser classificada como positiva para Influenza A. Se apenas são visualizadas células verde-maçã fluorescentes, o vírus específico pode ser identificado utilizando reagentes DFA individuais em células novas, em preparações celulares separadas (reagentes DFA individuais estão disponíveis na DHI). Se ambos os tipos de células fluorescentes podem ser visualizadas, o vírus adicional pode ser identificado com Reagentes DFA, em preparações celulares separadas.

Com o Reagent 2, as células infectadas por RSV fluorescem a amarelo dourado e as células infectadas com MPV vão fluorescer a verde maçã, enquanto as células não infectadas não contêm fluorescência, mas serão coradas a vermelho, pelo contra-corante Azul de Evans. Se apenas são visualizadas na amostra, células fluorescentes amarelas douradas, esta pode ser notificada como positiva para RSV. Se apenas são visualizadas células verde-

maçã fluorescentes, a amostra pode ser notificada como positiva para MPV. Se ambos os tipos de células fluorescentes podem ser visualizadas, a amostra pode ser notificada como positiva para RSV e MPV.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

O D³ Double Duet DFA Respiratory Virus Screening & ID Kit contém o seguinte:

Reagent 1

2 mL

Um frasco conta-gotas com uma mistura de anticorpos monoclonais murinos marcados com fluorescência, dirigidos contra antígenos virais respiratórios do Influenza A, Influenza B, Adenovírus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 e Parainfluenza 3. A solução aquosa estabilizada e tamponada, contém Azul de Evans como contra-corante e azida sódica a 0,1% como conservante.

Reagent 2

2 mL

Um frasco conta-gotas com uma mistura de anticorpos monoclonais murinos marcados com fluorescência, dirigidos contra antígenos virais respiratórios do vírus sincicial respiratório (RSV) e do Metapneumovírus (MPV). A solução aquosa estabilizada e tamponada, contém Azul de Evans como contra-corante e azida sódica a 0,1% como conservante.

Respiratory Virus Antigen Control Slides

2 lâminas

Lâminas controlo com poços contendo células de controlo positivas e negativas, embaladas individualmente. Cada poço positivo é identificado de acordo com as células infectadas por vírus presentes, ou seja, Influenza A, Influenza B, Adenovirus, Vírus Sincicial Respiratório (RSV), Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 e Parainfluenza O poço negativo contém células não infectadas. Cada lamina destinada-se a ser corada, apenas uma vez.

hMPV Antigen Control Slides

2 slides

Cada lâmina contém um poço com células não infectadas e um diferentes poço, deles com células infectadas com a estirpe de MPV. Cada lâmina destina-se a ser corada, *apenas uma vez*.

40X Wash Solution Concentrate

25 mL

Um frasco com um concentrado a 40X com Tween 20 e azida sódica a 4% (azida sódica a 0.1% após diluição a 1X com água desmineralizada) numa solução tamponada.

Mounting Fluid

15 mL

Um frasco conta-gotas com solução aquosa estabilizada e tamponada de glicerol e azida sódica a 0,1% como conservante.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Microscópio de fluorescência com a combinação correcta de filtros para FITC (pico de excitação = 490-nm, pico de emissão = 520-nm), também pode ser efectivamente utilizado para a R- ficoeritrina (pico de excitação = 490 nm, pico de emissão = 575 nm).

NOTA: A fluorescência da R-ficoeritrina também pode ser observada com um conjunto de filtros para a rodamina (pico de excitação= 566 nm, pico de emissão = 575 nm).

- **Influenza B DFA Reagent**, 2 mL. Um frasco conta-gotas com uma mistura de anticorpos monoclonais murinos marcados com fluoresceína, dirigidos contra antígenos produzidos por células infectadas por vírus Influenza B. A solução aquosa, estabilizada e tamponada contém azul de Evans como contra-corante e azida sódica a 0.1% como conservante (disponível na Quidel)
- **Adenovirus DFA Reagent**, 2 mL. Um frasco conta-gotas com uma mistura de anticorpos monoclonais murinos marcados com fluoresceína, dirigidos contra antígenos produzidos por células infectadas por vírus Adenovírus. A solução aquosa, estabilizada e tamponada contém azul de Evans como contra-corante e azida sódica a 0.1% como conservante (disponível na Quidel)
- **Parainfluenza 1 DFA Reagent**, 2 mL. Um frasco conta-gotas com uma mistura de anticorpos monoclonais murinos marcados com fluoresceína, dirigidos contra antígenos produzidos por células

infectadas por vírus Parainfluenza 1. A solução aquosa, estabilizada e tamponada contém azul de Evans como contra- corante e azida sódica a 0.1% como conservante (disponível na Quidel)

- **Parainfluenza 2 DFA Reagent**, 2 mL. Um frasco conta-gotas com uma mistura de anticorpos monoclonais murinos marcados com fluoresceína, dirigidos contra antígenos produzidos por células infectadas por vírus Parainfluenza 2. A solução aquosa, estabilizada e tamponada contém azul de Evans como contra- corante e azida sódica a 0.1% como conservante (disponível na Quidel)
- **Parainfluenza 3 DFA Reagent**, 2 mL. Um frasco conta-gotas com uma mistura de anticorpos monoclonais murinos marcados com fluoresceína, dirigidos contra antígenos produzidos por células infectadas por vírus Parainfluenza 3. A solução aquosa, estabilizada e tamponada contém azul de Evans como contra- corante e azida sódica a 0.1% como conservante (disponível na Quidel)
- Lamelas (22 x 50mm) para lâminas de antígeno controlo e para lâminas de amostras.
- Universal Transport Medium (available from Quidel).
- A acetona de grau reagente (>99% pura) entre 2°C e 8°C para fixação das lâminas de amostras preparadas.

NOTA: Mantenha o frasco com a acetone bem fechado para evitar a absorção higroscópica de água, que pode causar uma fluorescência de fundo, como uma névoa, inespecífica. As pipetas de vidro devem ser usadas para pipetar a acetona pura, pois as pipetas descartáveis de poliestireno ficarão fissuradas e serão solubilizadas pelo reagente puro.

- Pipetas graduadas estéreis: 10 mL, 5 mL, 1 mL.
- Pipetas Pasteur estéreis ou outras pipetas do tipo “transfer.”
- Solução de hipoclorito de sódio, 0.05% (1:100 diluição de lixívia doméstica).
- Câmara húmida (ex., placa de Petri tapada, com uma toalha de papel humedecida colocada no fundo).
- Lâminas de vidro para microscópio
- Lâminas de vidro multi-poços para microscópio limpas com acetona (lâminas com 2 poços e 8 poços, disponíveis na DHI).
- *Blotters* para lâminas de vidro multi-poços para microscópio: *blotters* absorventes para 2 e 8 poços, usados para o *blot* do líquido em excesso, da máscara para evitar o espalhamento do líquido ou de células coradas, de um poço para o outro.
- Cotonete estéril de flocos de nylon ou de polyester, não inibitória dos vírus respiratórios e da cultura celular
- Incubadora, 35°C a 37°C.
- Centrifuga com um rotor com um cesto de oscilação livre.
- Água desmineralizada para diluição da Wash Concentrate Solution.
- PBS estéril, para utilização na lavagem e suspensão de células.
- Contentor de Wash Container: Copo, garrafa de lavagem ou jarro Coplin para lavagem das lâminas.
- Fixing Container: Jarro Coplin, prato de laminas ou suporte de polietileno para laminas, para utilização na fixação de células nas lâminas.

AVISOS E PRECAUÇÕES

- Para uso em diagnóstico *in vitro*.
- As manipulações que representam perigos potenciais devem ser realizadas numa câmara de biossegurança de Classe II, sempre com a utilização de luvas. As culturas devem ser autoclavadas ou desinfectadas antes de serem eliminadas.
- A acetona, um reagente necessário para a análise, não é fornecido com o kit e é um solvente orgânico, inflamável e volátil. Utilize numa zona bem ventilada e mantenha longe de chamas e outras fontes de ignição.
- A azida sódica está incluída no Wash Solution Concentrate a 4%, e nas outras soluções deste kit, na concentração de 0.1%.

- ▶ A azida sódica é considerada venenosa. Se o Concentrado a 40X de PBS for engolido, procure aconselhamento médico imediatamente.
- ▶ Evite a eliminação deste material em sistemas de canalização de saneamento ou industriais. A azida sódica pode reagir com couro e tubagens de cobre para formar azidas metálicas altamente explosivas.
- ▶ Evite a libertação para o meio-ambiente.
- Contra-corante Azul de Evans é um potencial carcinogénio. Se houver contacto com a pele, lave com água imediatamente.
- Reagent 1 e Reagent 2 são fornecidos com a potência de trabalho. Qualquer diluição desses reagentes irá diminuir a sensibilidade.
- Os reagentes devem ser utilizados antes da data de expiração.
- A contaminação microbiana dos reagentes pode causar um decréscimo na sensibilidade.
- Armazene a 1X Wash Solution e PBS (Tampão fosfato salino), em recipientes limpos, para evitar a contaminação.
- Todas as amostras e materiais usados para os processar, devem ser considerados potencialmente infecciosos e manipulados de modo a evitar a infecção do pessoal de laboratório. A descontaminação é mais efectivamente alcançada com uma solução de hipoclorito de sódio (diluição 1:10 lixívia doméstica).
- Embora as lâminas de controlo, tenham demonstrado não ser infecciosas, as mesmas precauções tomadas na manipulação e na eliminação de outros materiais infecciosos, devem ser seguidos durante a sua utilização.
- Nunca pipete reagentes ou amostras clínicas à boca; evite todo o contacto de amostras clínicas com pele danificada.
- Evite derrames e a geração de aerossóis com amostras clínicas.
- Utilize uma técnica asséptica e equipamento e materiais estéreis para todos os procedimentos para cultura de tecidos.
- Reutilizáveis de vidro devem ser lavados e cuidadosamente lavados livre de todos os detergentes
- Não exponha o Reagent 1 ou Reagent 2 a luz forte durante a coloração ou armazenamento.
- A utilização de outros reagentes, que não os especificados, com os componentes deste kit, podem levar a resultados errados.
- Os testes devem ser realizados numa área com ventilação adequada.
- Elimine os recipientes e conteúdo não utilizado de acordo com federais, estatais e requisitos regulamentares locais.
- Usar vestuário adequado, luvas e protecção de rosto e olhos sempre que manusear o conteúdo deste kit.
- Lave bem as mãos após o manuseamento.
- Para obter informações adicionais sobre os símbolos de perigo, segurança, o manuseamento e a eliminação dos componentes contidos neste kit, consulte a Ficha de Dados de Segurança (SDS) disponível em quidel.com.

PREPARAÇÃO DA 1X WASH SOLUTION

1. Depois de conservar entre 2°C e 8°C, alguns sais no Wash Solution Concentrate podem ter cristalizado. Aqueça a solução à temperatura ambiente para re-dissolver os cristais e misturar.
2. Adicione o conteúdo de um Wash Solution Concentrate de 25 mL completamente dissolvido a 975 mL de água desmineralizada.
3. Rotule o frasco com Wash Solution 1X com um prazo de validade de sessenta dias (60) após reconstituição e conserve à temperatura ambiente (20°C a 25°C).

INSTRUÇÕES DE CONSERVAÇÃO

Tabela 1. Componentes do kit

Reagent 1	Conserve entre 2°C e 8°C no escuro
Reagent 2	
Mounting Fluid	
Respiratory Virus Antigen Control Slides	Conserve entre 2°C e 8°C
hMPV Antigen Control Slides	
Wash Solution Concentrate <i>NOTA:</i> O concentrado pode cristalizar quando conservado entre 2°C e 8°C. Os cristais irão dissolver quando o concentrado é aquecido à temp. ambiente.	Conserve líquido entre 2°C e 8°C antes de diluir.
1X Wash Solution	Conserve à temp. ambiente (20°C a 25°C).

ESTABILIDADE

Os componentes dos reagentes irão reter a sua potência completa ao longo da data de expiração impressa no rótulo de cada frasco quando conservado às temperaturas recomendadas. A exposição à luz do Reagent 1 e Reagent 2 deve ser minimizada.

Elimine a Wash Solution 1X se esta ficar turva.

COLHEITA DA AMOSTRA E PREPARAÇÃO

A colheita e manipulação adequada da amostra do doente são os factores mais importantes para a detecção bem sucedida do vírus respiratório. A colheita da amostra, processamento e cultura celular dos vírus deve ser realizada apenas por pessoal treinado nesses procedimentos. Deve ter-se cuidado durante toda a colheita e manipulação das amostras para evitar a formação de aerossóis.

Colheita das Amostras¹⁴

Os aspirados e os lavados com secreções do epitélio nasofaríngeo contêm grandes números de células epiteliais. As colheitas nasais, nasofaríngeas e da garganta, também são tipos adequados, para testes com métodos para cultura celular, embora possam não conter tantas células epiteliais como os aspirados e lavados.

Os aspirados podem ser colhidos com uma sonda nasofaríngea de nutrição de polietileno macio (pediátrica nº8), ligada a um dispositivo de colheita por aspiração, ligado por sua vez a um dispositivo de sucção.

Os lavados podem ser colhidos por instilação e aspiração de 1 a 2 mL de soro fisiológico na narina da doente, enquanto este está na posição de supino.

Os aspirados e os lavados devem ser diluídos em volumes iguais de meio de transporte contidos num tubo de centrífuga, com várias esferas de vidro estéril.

Transporte e conservação da amostra

Todos os agentes potencialmente infecciosos devem ser transportados de acordo com os requisitos regulamentares vários, entre os quais da International Air Transport Association (IATA), International Civil Aviation Organization, (ICAO), Titles 42 and 49 of the US Code of Federal Regulations, ou outros que possam ser aplicáveis.

As amostras devem ser transportadas em gelo úmido até ao laboratório e processadas e testadas, logo que possível e depois conservadas entre 2°C a 8°C.

As amostras devem ser conservadas entre 2°C e 8°C até 48 horas, antes de serem analisadas. Se for necessária uma conservação mais prolongada, a amostra deve ser conservada a -70°C ou a temperaturas inferiores.

A congelação e descongelação das amostras deve ser evitada, porque vai resultar na perda de viabilidade dos vírus, conduzindo à diminuição da sensibilidade da análise.

Preparação da amostra

Agite fortemente a amostra no vortex, durante 10 a 15 segundos antes da inoculação da cultura. Opcional: Adicione algumas esferas de vidro estéreis ao tubo antes de agitar, para romper as células e libertar qualquer vírus. Repita este passo para cada amostra.

PROCEDIMENTO

Comentários preliminares, Precauções

- Adira aos volumes e tempos recomendados no procedimento seguinte para assegurar a obtenção de resultados exactos.
- Para as cotonetes com amostras recebidas em meio de transporte com esferas de vidro, agite vigorosamente no vortex durante cerca de 15 segundos para dissociar as células aderentes. Para as cotonetes que são recebidas sem o meio de transporte, transfira-as para um tubo de meio de transferência com esferas de vidro e agite no vortex vigorosamente durante cerca de 15 segundos para dissociar as células aderentes.
- Quando corar com reagentes fluorescentes e examinar células ao microscópio à procura de fluorescência, é muito importante incluir controlos, positivos e negativos, para monitorizar o procedimento e o desempenho dos reagentes. Recomenda-se que estes controlos sejam analisados com cada lote de amostras de doentes.
- contentor fechado, humidificado para suporte das lâminas durante a incubação, deve ser mantido na incubadora, para que as lâminas assim que lá colocadas, estejam à temperatura da incubadora. Ao proceder assim, a solução de células e anticorpos atingem a temperatura mais rapidamente, resultando em colorações mais intensas nos períodos específicos de tempo.

Em Relação à Microscopia de Fluorescência

- É boa prática examinar os controlos positivos e negativos antes das amostras. Se um deles falhar, reveja os passos e as condições de realização do teste para determinar a(s) causa(s). Não notifique resultados até os controlos desempenharem adequadamente.
- Há 3 aspectos do microscópio de fluorescência que têm de funcionar adequada e optimamente para atingir a máxima luminosidade da fluorescência:
 - ▶ A fonte de luz de activação tem uma vida finita e ao envelhecer, o seu *output* diminui, resultando numa intensidade mais baixa de intensidade de fluorescência da coloração.
 - ▶ A fonte de luz é focada por várias lentes e espelho(s). Para obter uma intensidade máxima, estes devem estar adequadamente alinhados.
 - ▶ Os filtros utilizados no percurso da luz, devem ser adequados para a partícula fluorescente usada, neste caso a fluoresceína e a R-ficoeritrina. Ambos absorvem fortemente a 490 nm, mas a fluoresceína emite a 520 nm enquanto a R-ficoeritrina emite a 575 nm, permitindo a visualização das 2 fluorescências como cores diferentes, verde-maçã e amarelo dourado, respectivamente com o conjunto de filtros de fluoresceína.

- Há vários artefactos fluorescentes que podem ser observados nas monocamadas de células, a ser examinadas:
 - ▶ Detritos celulares, fios, etc, podem adsorver inespecificamente no Reagent 1 e Reagent 2, resultando em fluorescência de intensidade elevada. Estes podem ser identificados pela sua morfologia, ou seja, não têm a aparência de uma célula completa e tipicamente não parecem ser parte da monocamada, como as outras células.
 - ▶ Uma fluorescência enevoadada de baixo grau pode ser vista algumas vezes, especialmente em áreas que têm células empilhadas ou perto de orifícios, na monocamada de células. Em ambos os casos, a difusão dos anticorpos retidos, é retardada durante o passo de lavagem, resultando em fluorescência inespecífica.
 - ▶ A fluorescência intensa à volta da periferia dos poços das lâminas é indicativa da secagem do Reagente 1 e 2 durante a incubação, sugerindo que foi incubado durante demasiado tempo ou que a humidade não foi controlada.
 - ▶ A lavagem inadequada pode levar a uma fluorescência geral de baixo grau, devido aos anticorpos residuais que permanecem na monocamada de células.
- O sequestro ou desvanecimento da fluorescência das células coradas pode ocorrer na exposição à luz, especialmente luz de elevada intensidade. As lâminas devem ser protegidas tanto quanto possível, durante o ensaio.

ANÁLISE DIRECTA DE AMOSTRAS

1. Agite vigorosamente no vortex durante 10 a 15 segundos.
2. Centrifugue de 400 a 600xg durante 5 a 10 minutos.
3. Adicione 5 mL de PBS e agite vigorosamente durante 10 a 15 segundos.
4. Centrifugue a 400-600xg durante 5 a 10 minutos.
5. Remova o sobrenadante e a camada de muco acima do pellet de células, tendo cuidado para não danificar o pellet.
6. Repita os passos 3 a 5 até a camada de muco ter sido completamente removida.

NOTA: É importante remover todo o muco, pois pode causar fluorescência inespecífica.
7. Adicione 0.5 a 1 mL de PBS.
8. Misture a suspensão, pipetando várias vezes (pipetar e dispensar várias vezes), para ressuspender o pellet, formando uma suspensão ligeiramente turva.

NOTA: A qualidade da preparação da lâmina está dependente da concentração de células na suspensão; demasiadas células podem tornar difícil a leitura do resultado e muito poucas podem diminuir a sensibilidade do procedimento.
9. Coloque 25 µL da suspensão em 2 poços separados de uma lâmina, limpa com acetona e rotulada. Repita este passo para cada amostra.
10. Seque os poços completamente, ao ar.
11. Fixar as células para as lâminas usando acetona nova e arrefecida, durante 5 a 10 minutos.

Cuidado: acetona é volátil e inflamável; manter afastados de abrir chamas.
12. Retire as lâminas a partir do fixador e permitir que o ar seco.
13. Adicione uma gota do Reagent 1 para cobrir completamente as células secas e fixadas, no primeiro poço de cada lâmina e ao poço adequado da lâmina de Antigen Control.
14. Adicione uma gota do Reagent 2 para cobrir completamente as células secas e fixadas, no primeiro poço de cada lâmina e ao poço adequado da lâmina de Antigen Control.
15. Além disso, a cada um dos poços de uma nova Vírus Respiratórios Antigen e hMPV Antigen Control Slide adicionar uma gota de reagente 1 ou Reagente 2 para o adequado poços da lâmina de Antigen Diapositivo

NOTA: O lâminas de Antigen Control coradas devem ser apenas uma vez, pois ele contém poços individuais de virais células infectadas e não infectadas células.

16. Coloque as lâminas numa câmara húmida coberta, entre 35°C a 37°C durante 15 a 30 minutos.
17. Lave as células coloridas utilizando solução de lavagem. Se forem apenas algumas lâminas, tal pode ser efectuado utilizando um copo da solução de lavagem. Para muitas lâminas, um suporte de lâminas com capacidade para 10-20 lâminas, pode ser colocado num recipiente de solução de lavagem e mergulhado várias vezes para uma lavagem efectiva.
18. Elimine a solução de lavagem usada e repita o passo de lavagem com nova solução de lavagem.
19. Lave as células coloridas utilizando água desmineralizada. Se forem apenas algumas lâminas, tal pode ser efectuado utilizando um copo da água desmineralizada. Para muitas lâminas, um suporte de lâminas com capacidade para 10-20 lâminas, pode ser colocado num recipiente de solução de lavagem e mergulhado várias vezes para uma lavagem efectiva.
20. Suavemente blot o excesso de água desmineralizada. Adicione uma pequena gota de Mounting Fluid a cada poço com células e cubra os poços com uma lamela.
21. Adicione uma pequena gota de Mounting Fluid a cada poço com células e cubra os poços com uma lamella.
22. Examine as células coloridas e montadas, com um microscópio de fluorescência com ampliações de 200X a 400X.
23. Consulte a Secção VII., "Interpretação dos Resultados."

Controlo de Qualidade

Uma lâmina de Controlo de Antígeno hMPV e de vírus respiratório fresco é corada, cada vez que se realiza o procedimento de coloração, para assegurar o desempenho adequado da análise. Os poços positivos irão mostrar múltiplas células infectadas, quer com fluorescência amarela dourada (para Influenza A ou RSV) ou verde maçã fluorescente (para Influenza B, Adenovirus, Parainfluenza 1, 2, ou 3 ou MPV), enquanto as células negativas coram de vermelho, devido à contra-coloração incluída com Azul de Evans. O poço negativo irá mostrar apenas células negativas que coram de vermelho. Os controlos positivos e negativos têm de demonstrar uma fluorescência adequada para os resultados das amostras serem válidos. Os controlos também podem ajudar na interpretação das amostras dos doentes.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Recomenda-se que os controlos sejam examinados em primeiro lugar, para assegurar o desempenho adequado do teste, antes da análise das amostras. Numa reacção positiva observa-se fluorescência amarela dourada ou verde maçã nas células infectadas. As células não infectadas irão corar de vermelho, por contra-coloração com Azul de Evans, incluída no conjugado. Os analistas não devem confundir aglomerados celulares que podem fluorescer devido à retenção do anticorpo com o vírus da mancha específica. Ocasionalmente, células mortas, arredondadas devido à toxicidade da amostra ou conservação incorrecta, podem corar inespecificamente de verde-azeitona. A lavagem adequada entre os passos irá ajudar a eliminar este tipo de coloração inespecífica.

Padrões de Coloração Fluorescente das Células Infectadas por vírus respiratórios

- O padrão de coloração de fluorescência amarelo dourado "típico", para cada vírus é o seguinte:
 - ▶ Influenza A: A fluorescência é citoplasmática, nuclear ou ambas. A coloração citoplasmática é muitas vezes pontilhada com grandes inclusões.
 - ▶ Respiratory Syncytial Vírus: A fluorescência é citoplasmática e pontilhada com pequenas inclusões sinciciais.
- O padrão de coloração de fluorescência verde-maçã "típico", para cada vírus é o seguinte:
 - ▶ Influenza B: A fluorescência é citoplasmática, nuclear ou ambas. A coloração citoplasmática é muitas vezes pontilhada com grandes inclusões enquanto a nuclear é uniformemente brilhante.
 - ▶ Adenovirus: A fluorescência é citoplasmática e pontilhada ou nuclear brilhante ou ambas.
 - ▶ Parainfluenza 1, 2, 3: A fluorescência é citoplasmática e pontilhada com inclusões irregulares. Os

tipos 2 e 3 causam a formação de sincícios.

- ▶ Metapneumovirus: A fluorescência é citoplasmática e pontilhada com pequenas inclusões sinciciais.

Todo o ponto de células ou monocamada de células têm de ser examinadas quanto à presença de células infectadas por vírus e fluorescentes. Se não forem encontradas células fluorescentes quer no Reagent 1 ou 2, os resultados da análise da amostra devem ser notificados como “Não detecção de Influenza A ou B, Adenovírus, Vírus Sincicial Respiratório, Parainfluenza 1, 2, 3, ou Metapneumovírus.”

Se forem encontradas células fluorescentes amarelo dourado no Reagent 1, a amostra deveria ser notificada como: “Detecção de Influenza A.”

Se forem encontradas células fluorescentes verde maçã no Reagent 1, a amostra pode ser notificada como: “Presunção de detecção de Influenza B, Adenovirus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 ou Parainfluenza 3; identificação de um vírus específico não determinada”.

Para identificar qual dos outros cinco vírus respiratórios pode ser detectado, pode-se continuar os procedimentos de teste, corando com Reagentes DFA para vírus individualizados. O reagente DFA específico que apresenta células fluorescentes, representa a identificação do vírus respiratório. Nesse caso, deve ser notificado como: “...detectada por teste de amostra directa”, onde ‘...’ é o vírus adequado, por ex., Influenza B, Adenovírus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, ou Parainfluenza 3.

Se forem encontradas células fluorescentes amarelo dourado no Reagent 2, a amostra deveria ser notificada com: “Detecção de RSV”. Se forem encontradas células fluorescentes verde maçã no Reagent 2, a amostra deveria ser notificada como: “Detecção de MPV.”

A co-infecção com mais de um vírus infectante presente na amostra, foi notificada em vários estudos. A presença de múltiplos vírus pode ser indicada quando, num único resultado, surgem os dois tipos de células fluorescentes; também, um resultado apenas com células fluorescentes verde maçã pode demonstrar-se dever-se apenas a co-infecção (que seriam indicadas quando mais do que um poço da lâmina de 8 poços mostra células fluorescentes durante a coloração com um reagente DFA para um vírus individualizado). No caso de múltiplos vírus serem identificados, o resultado deveria ser notificado como “... e ... detectado pelo teste da amostra directa.”

LIMITATIONS OF PROCEDURE

- A colheita inadequada de amostras, armazenamento e transporte podem levar a resultados falso negativos.¹⁵
- Os tempos de incubação ou temperaturas, além das citadas nas instruções da análise podem dar resultados errados.
- A detecção de vírus vai variar grandemente dependendo da qualidade da amostra e subsequente manipulação. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção viral. Os resultados do teste devem ser interpretados conjuntamente com a informação disponível de estudos epidemiológicos, avaliação clínica do doente e outros procedimentos de diagnóstico.
- Os efeitos da terapêutica antiviral no desempenho do kit, ainda não foram estabelecidos.
- Os anticorpos monoclonais utilizados neste kit são de hibridomas, criados com células infectadas por vírus, como imunogénio. Os antígenos virais específicos determinados pelos anticorpos são indeterminados.
- Como os anticorpos monoclonais foram treinados utilizando estirpes definidas, estes podem não detectar todas as variantes antigénicas ou novas estirpes dos vírus, caso surjam. Os anticorpos

monoclonais podem não detectar estirpes de vírus que sofreram pequenas alterações de aminoácidos na região alvo de epítomos.

- desempenho do kit só pode ser assegurado quando os componentes utilizados no ensaio, são os fornecidos pela Diagnostic Hybrids.
- O armazenamento prolongado do Reagent 1 e Reagent 2 sob luz brilhante irá diminuir a intensidade da coloração.
- Uma coloração ligeira do fundo pode ocorrer com amostras contaminadas com estirpes de *Staphylococcus aureus* com grandes quantidade de proteína A. A proteína A irá ligar-se inespecificamente às partes Fc dos anticorpos conjugados. Essa ligação pode distinguir-se da ligação ao antígeno viral com base na morfologia, ou seja, a fluorescência da ligação ao *S. aureus* aparece como pequenos pontos brilhantes (~1-micron de diâmetro).

EXPECTED VALUES

As infecções por vírus respiratórios são muitas vezes sazonais, com o vírus Influenza tipicamente a estender-se de Novembro a Abril no hemisfério norte e as infecções por Adenovirus ocorrem mais frequentemente no fim do Inverno a início do Verão. A infecção por RSV também é normalmente sazonal (Inverno e início da Primavera), com a epidemia a durar até 5 meses, enquanto os surtos causados pelos vírus parainfluenza podem ocorrer ao longo de todo o ano. Os dados de prevalência do hMPV, ainda estão a ser desenvolvidos.

Os estudos clínicos descritos na secção X ('Características específicas de desempenho') foram efectuados com amostras respiratórias colhidas durante o Inverno e início da Primavera de 2005/2006. A prevalência de vírus respiratórios na população de amostras, que foi prospectivamente colhida e analisada fresca, de um centro clínico, está na Tabela 2 a seguir:

TABLE 2. Prevalência de virus respiratórios na população de estudio

Expected Values	Adenovirus	Influenza A	Influenza B	Parainfluenza 1	Parainfluenza 2	Parainfluenza 3	Virus sinciciall respiratório
Amostras frescas (n = 326)	18	32	19	2	0	5	18
Prevalência	5.5%	9.8%	5.8%	0.6%	0%	1.5%	5.5%

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

Características de desempenho clínico

Os anticorpos monoclonais utilizados no Reagent 1 (Influenza A, Influenza B, Adenovirus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 e Parainfluenza 3) e os anticorpos monoclonais do RSV no Reagent 2 foram avaliados em 3 centros contra um kit DFA Screening & Identification actualmente comercializado, para a detecção destes vírus nas células do tracto respiratório. Este estudo incluiu 819 amostras respiratórias. Destas, 18 amostras tinham um número insuficiente de células para serem avaliadas e 1 não pode ser avaliada, porque apresentou uma coloração inespecífica com o Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent, restando 800 para análise. O resumo destas avaliações está na TABELA 3, a seguir. Havia 10 amostras identificadas, com co-infecções: 3 Flu A+Para 3, 1 Flu B+Para 2, 1 Flu B+Para 3, RSV+Para 1, 3 RSV+Para 3 e 1 Adeno+Para 3.

Por causa das 10 co-infecções, os resultados do rastreio de ID são mais do que o Rastreio+ resultados.

Table 3. Resultados de amostra directa com Reagentes D³ DFA (objecto) Comparado com outros dispositivos

	Negativo	Rastreio +	Adenovirus	Influenza A	Influenza B	Parainfluenza 1	Parainfluenza 2	Parainfluenza 3	Virus sinciall respiratório
Resultados dispositivo:	542	258	26	117	37	5	3	11	69
Resultados objecto:	538	262	26	117	38	5	3	14	69
Percentagem positiva de concordancia ^a (PPA)		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
95% CI ^b - PPA		98.5%-100%	87.1%-100%	96.8%-100%	90.6%-100%	56.5%-100%	43.9%-100%	74.1%-100%	94.7%-100%
Percentagem negativa de concordancia ^c (NPA)	99.3%		100%	100%	99.9%	100%	100.0%	99.6%	100%
95% CI – NPA	98.1-99.7%		99.5-100%	99.4-100%	99.3-99.9%	99.5-100%	99.5-100%	98.9-99.9%	99.5-100%

^a “Positive Percent Agreement”, ou valores “PPA”, foram calculados de acordo com $\frac{\text{Total Number of Positive Results in Agreement by both Subject and Predicate Tests}}{\text{Total Number of Positive Results in Agreement by both Subject and Predicate Tests} + \text{Number of Results Positive by Predicate but Negative by Subject}}$ multiplicado por 100%.

^b “95% CI” refere-se aos intervalos de confiança a 95%, que foram calculados de acordo com o método Exacto (Clopper, C. e S. Pearson, Biometrika 26:404-413, 1934).

^c “Negative Percent Agreement”, ou valores “NPA”, foram calculados de acordo com $\frac{\text{Total Number of Negative Results in Agreement by both Subject and Predicate Tests}}{\text{Total Number of Negative Results in Agreement by both Subject and Predicate Tests} + \text{Number of Results Negative by Predicate but Positive by Subject}}$ multiplicado por 100%.

Os anticorpos MPV utilizados no Reagent 2 foram avaliados pelo Direct Specimen (DS) DFA e cultura rápida (RC) em dois centros com um total de 681 amostras. Destes, 1-DS e 1-R foram indeterminados e 18 amostras tiveram um número insuficiente de células a ser avaliadas, restando 661 para análise. O resumo destas avaliações está na Tabela 4, a seguir.

Tabela 4. Resultados D³ DFA MPV para amostra directa comparada com cultura rápida

	Local 1		Local 2		Combinado	
	Cultura rápida		Cultura rápida		Cultura rápida	
	+	-	+	-	+	-
Amostra directa	14	6	24	7	38	13
	1	358	1	250	2	608
	CPP = 93.3%		96.0%		95.0%	
	95% CI CPP = 70.2 - 98.8%		80.5 - 99.3%		83.5 - 98.6%	
	CPN = 98.3%		97.3%		97.9%	
	95% CI CPN = 96.4 - 99.2%		94.5 - 98.7%		96.4 - 98.8%	

Características de desempenho analítico – Teste de reactividade cruzada

O Reagent 1 e 2 do Kit D3 Double Duet DFA Respiratory Vírus Screening & ID foram analisados para reactividade cruzada contra uma grande variedade de células e microorganismos. Não se observou reactividade-cruzada para 67 estirpes virais (cultivadas e processadas para coloração) ou para 18 tipos de células hospedeiras em cultura. Trinta (30) culturas bacterianas foram coradas e examinadas para reactividade cruzada, incluindo *Staphylococcus aureus*, uma bactéria produtora de proteína A. A coloração do *S. aureus* surgiu como pequenos pontos fluorescentes (ver 'Limitações de Procedimento') enquanto todas as outras culturas bacterianas foram negativas.

As condições de estringência para os testes de reactividade cruzada foram alcançadas utilizando DFA's de concentrações elevadas e títulos elevados de microorganismos. Os DFAs (i.e., anticorpos monoclonais directamente fluoresceínados) foram preparados a 1.5X a concentração que é fornecida no kit. Cada um dos vírus testado foi preparado como monocamadas celulares infectadas (250 células infectadas inoculadas numa cultura de um frasco concha e incubadas durante 24 a 48 horas, para atingir uma infecção 3+ to 4+), e processadas e tingidas com os DFAs 1.5X, de acordo com o procedimento detalhado neste folheto informativo. As estirpes bacterianas foram cultivadas, processadas como suspensões, depois colocadas em lâminas de microscópio (com > 150 bactéria por campo microscópico ampliado 400X), depois coradas com os DFAs 1.5X, de acordo com o procedimento deste folheto informativo. As culturas celulares foram coradas, como monocamadas confluentes.

ASSISTANCE

To place an order or for technical support, please contact a Quidel Representative at 800.874.1517 (in the U.S.) or 858.552.1100 (outside the U.S.), Monday through Friday, from 8:00 a.m. to 5:00 p.m., Eastern Time. Orders may also be placed by fax at (740) 592-9820. For e-mail support contact customerservice@quidel.com or technicalsupport@quidel.com.

For services outside the U.S., please contact your local distributor. Additional information about Quidel, our products, and our distributors can be found on our website quidel.com.

REFERENCES

1. FDA Guidance Document: In Vitro Diagnostic Devices to Detect Influenza A Viruses: Labeling and Regulatory Path; Issued 4/10/2006
2. Englund, J.A., (2002). Antiviral therapy of influenza. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, 13(2):120-128.

3. Patel, N., Hartwig, R., Kauffmann, L. and Evans, M. (2000). Rapid influenza A and B culture 20-hour detection using R-Mix: A new gold standard. Presented at The Sixteenth Annual Clinical Virology Symposium, April 30-May 3, Clearwater Beach, FL.
4. Rodriguez, W.J., Schwartz, R.H. and Thorne, M.M. (2002). Evaluation of diagnostic tests for influenza in a pediatric practice. *Pediatr. Inf. Dis. J.*, 3:193-6
5. Gould, I.M. (2002). Antibiotic Policies and control of resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 15(4):395-400.
6. Bischofberger, N., Webster, R.G. and Laver, G. (1999). Dismantling Flu Viruses. *Scientific American*, January.
7. Foy, H.M. (1997). Adenoviruses. In: Evans, A., Kaslow, R., eds. *Viral Infections in Humans: Epidemiology and Control*. 4th ed., New York, Plenum, 119-138.
8. Easton, A.J., Eglin, R.P. (1989). Epidemiology of parainfluenza virus type 3 in England and Wales over a 10-year period. *Epidemiol. Infect.*, 102:531-535.
9. Fete, T.J., Noyes, B. (1996). Common (but not always considered) viral infections of the lower respiratory tract. *Pediatr. Ann.*, 25:10, 577-584.
10. Hall, C.B. (1981). Respiratory Syncytial Virus. In: Feigin, R. D., Cherry, J.D., eds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, Phila., W.B. Saunders, 1247-1267.
11. Hall, C.B., Hall, W.J., Gala, C.L., MaGill, F.B., Leddy, J.P. (1984). Longterm prospective study in children after respiratory syncytial virus infection. *J. Pediatr.*, 105:358-364.
12. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7:719-24.
13. Nissen MD, Siebert DJ, Mackay 1M, Sloots TP, Withers SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. *Med J Aust* 2002;176:188.
14. Eisenberg, Henry D. 1992. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, published by American Society for Microbiology, Washington DC, p 8.2.3.
15. Leland, Diane S. (1996). *Clinical Virology*, published by W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

REF

I-01-320000 – D³ Double Duet DFA Respiratory Virus Screening & ID Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
 Schiffgraben 41
 30175 Hannover,
 Germany



Diagnostic Hybrids, Inc. – a subsidiary of Quidel Corporation
 2005 East State Street, Suite 100
 Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PI2000000PT00 (12/18)

GLOSSARY

REF

Número de catálogo



Marca CE de conformidade

EC REP

Representante autorizado na Comunidade Europeia

LOT

Número do lote



Utilizar até



Fabricante



Limitação de temperatura



Utilização prevista



Consulte as instruções e-rotulagem de utilização



Não reutilize

IVD

Para diagnóstico *in vitro*

CONT NaN₃

Contém azida de sódio

NaN₃ 4%

Contém 4% de azida de sódio, quando não diluídas
