

**Kit de testare pentru detecția antigenului
Encefalopatiei Spongiforme Bovine -
Scrapie, ELISA**

**HerdChek* BSE-Scrapie
Antigen**



IDEXX

06-08519-11

Versiunea #11



Kit de testare pentru detecția antigenului Encefalopatiei Spongiforme Bovine - Scrapie, ELISA

Destinat exclusiv uzului veterinar.

Versiunea în limba română



Prezentare generală

IDEXX HerdChek* Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-Scrapie Antigen Test Kit (*Kitul IDEXX HerdChek de testare pentru detecția antigenului Encefalopatiei Spongiforme Bovine - ESB*) este un test imunoenzimatic (ELISA) de capturare a antigenului pentru detecția proteinei cu o formă anormală, proteina prionică (PrP^{Sc}), în cadrul analizei post-mortem a țesuturilor din creier (preferabil de la nivelul obexului) provenind de la bovine, rumegătoare mici (oi și capre) și cervide infectate cu ESB, scrapie, sau boala (sindromul) oboselii cronice (*chronic wasting disease - CWD*). Pentru aplicațiile în cazul rumegătoarelor mici, testul va detecta de asemenea PrP^{Sc} în probe din ganglionii limfatici sau din țesutul din splină; în cazul cervidelor, testul va detecta de asemenea PrP^{Sc} în probe din ganglionii limfatici retrofaringieni (*retropharyngeal lymph nodes - RPLN*). Este conceput pentru identificarea rapidă a probelor ce conțin PrP^{Sc} asociate bolii, implicând o manevră minimă a probei, și poate fi automatizat asigurând posibilitatea de testare a unui număr mare de probe. Acest kit este destinat exclusiv uzului veterinar.

Pentru statele membre ale Uniunii Europene: Acesta este un test rapid aprobat de UE pentru detecția in vitro a PrP^{Sc} specifice ESB și scrapie în cazul bovinelor și rumegătoarelor mici. Acest test poate fi utilizat de asemenea în UE pentru testarea rapidă a cervidelor pentru detecția encefalopatiei spongiforme transmisibile (EST) (*transmissible spongiform encephalopathy - TSE*). Validarea acestui kit a fost efectuată utilizând probe (din tonsilele, ganglionii limfatici retrofaringieni și din trunchiul cerebral) recoltate de la elan (*Cervus canadensis*).

Producătorul testului rapid trebuie să dețină un sistem de asigurare a calității aprobat de către Laboratorul de Referință al Uniunii Europene (*European Union Reference Laboratory - EURL*), care să asigure performanța continuă, fără modificări, a testului. Producătorul trebuie să pună protocolul testului la dispoziția EURL. Nu se poate efectua nici o modificare a instrumentarului de recoltare, a testului rapid, a protocolului (nici a etapei de recoltare) decât după notificarea în prealabil a EURL, și doar în condițiile în care EURL decide că acele modificări nu diminuează sub nici o formă sensibilitatea, specificitatea sau fiabilitatea testului rapid. Concluziile vor fi comunicate Comisiei UE și laboratoarelor naționale de referință (în baza Reglementării (CE) Nr. 956/2010, care rectifică Reglementarea (CE) Nr. 999/2001).

Descriere și principii

Acest kit utilizează o metodă brevetată sub licența Microsens Biotechnologies (Londra, Regatul Unit; brevet în curs de emitere), care permite detecția prionilor anormali. Un ligand specific PrP^{Sc} este imobilizat pe suprafața plăcii de capturare (fixare) a antigenului. Probele de testare sunt pregătite prin omogenizarea țesuturilor și apoi diluarea probei cu diluantul plăcii de lucru. După distribuirea probei pe placă, proteina anormală asociată bolii se fixează cu o afinitate sporită pe ligandul imobilizat. Plăcile sunt spălate pentru a îndepărta materialele nefixate, inclusiv forma normală a proteinei PrP. După incubare cu tampon de tratare, antigenul fixat este apoi detectat folosind un anticorp specific PrP care a fost conjugat cu peroxidază din hrean (*horseradish peroxidase - HRPO*). Placa este spălată pentru a elimina conjugatul nefixat și se adaugă un substrat peroxidază. Dezvoltarea culorii depinde de cantitățile relative de PrP^{Sc} capturate de ligandul imobilizat pe godeul plăcii de microtitru.

Interpretarea rezultatelor analizei probelor se realizează în funcție de absorbanta probelor. O probă a cărei valoare A₄₅₀-AREF este mai mică decât valoarea cutoff este considerată de către kitul de testare IDEXX HerdChek BSE-Scrapie ELISA ca fiind negativă. Probele a căror valoare A₄₅₀-AREF este mai mare sau egală cu valoarea cutoff sunt considerate ca fiind pozitive pentru PrP^{Sc}. Pentru toate rezultatele testelor indicate ca fiind pozitive, este necesară efectuarea unei analize de confirmare, cum ar fi testul immuno-histo-chimic.

Componentele kitului

Păstrați toate componentele la 2-8°C.

Reactiv	460 teste
A Plăci pentru capturarea antigenului	5 plăci
N Control Negativ - Nereactiv cu placa de capturare a antigenului; conservat cu azidă de sodiu	5 x 1 mL
P Control pozitiv - Neinfecțios, reactiv cu placa de capturare a antigenului; conservat cu azidă de sodiu	5 x 1 mL
D1 Componenta 1 de diluție a plăcii; conservat cu azidă de sodiu	20 mL
D2 Componenta 2 de diluție a plăcii	5 x 200 µL
R Diluant de reconstituire	20 mL
CB Tampon de tratare; conservat cu azidă de sodiu	60 mL
CC Conjugat concentrat; conservat cu Bronidox L și methylisothiazolone	300 µL

IDEXX



SRB-CC Conjugat concentrat pentru țesutul cerebral al rumegătoarelor mici; conservat cu Bronidox L și methylisothiazolone	300 µL
CD Tampon pentru diluția conjugatului cu detergenți și stabilizatori proteici; conservat cu gentamicină și Proclin	60 mL
W1 Soluție de spălare 1 (10X); conservată cu azidă de sodiu	450 mL
W2 Soluție de spălare 2 (10X); conservată cu gentamicină	450 mL
T Substrat TMB	60 mL

Note: A se vedea tabelul de la finalul insertului tehnic pentru descrierea simbolurilor utilizate în cadrul insertului și pe etichetele acestui kitului.

A se vedea finalul acestui insert tehnic pentru riscuri și măsuri de precauție cu privire la reactivi.

Materiale și echipamente necesare (dar nefurnizate în kit)

- Pipete de precizie și pipete multi-canal adecvate pentru pipetarea unui volum între 25 și 200 µL. Volumele de reactivi menționate în secțiunea Procedura de testare necesită o precizie de pipetare mai mică sau egală cu 5%.
- Cilindri gradati pentru soluțiile de spălare
- Capace din plastic tare sau dispozitive adezive pentru acoperirea plăcilor și tăvi pentru distribuirea reactivilor
- Instrumente sau dispozitive de unică folosință pentru disecția și recoltarea probelor
- Cititor pentru plăci de 96 de godeuri (echipat cu filtre de 450-nm și 620–650-nm) și spălător
- Instrument FastPrep* (FP120A, FP220A), Precogn 48*, Precogn 24* sau Precellys 24*
- Kit de accesorii - plăci de diluție, tuburi cu particule (bile/beads) pentru omogenizarea țesuturilor, vârfuri lungi de pipetă pentru transferul probei omogenizate și dispozitive adezive pentru acoperirea plăcilor (disponibile pentru achiziționare de la IDEXX)
- Echipament de protecție - ochelari de protecție, halate de laborator, mănuși de unică folosință, botoși de protecție, bonete și măști de protecție
- Soluție stop 0,5-1,0 N HCl sau 1,0 N H₂SO₄
- Hipoclorit de sodiu (înălbitor), 1N NaOH și 1N HCl, apă deionizată
- Opțional - instrument pentru procesarea automată a mostrelor cu o precizie de pipetare de ≤2,5% conform măsurătorii analizei CV (Tecan, de exemplu)
- Opțional - agitator pentru microplăci (de exemplu IKA MTS 2/4)
- Opțional - incubator pentru plăci, care poate menține temperatura de 32-37°C, cu flux minim de aer
- Opțional - unitate dry heat block pentru microtuburi de 1,5-2mL (având capacitatea de a menține o temperatură de 70°C)
- Opțional - microtuburi conice de 1,5-2 mL, cu capac înfiletant, fără margine

Recoltarea și pregătirea probelor de țesut

A. Țesut cerebral provenind de la bovine și rumegătoare mici

1. Recoltarea și testarea în laborator trebuie să respecte Reglementarea (CE) No 999/2001, Anexa X, Capitolul C, care se referă, din punct de vedere al recoltării probelor, la ultima ediție a Manualului Standardelor pentru Teste de Diagnostic și Vaccinuri pentru Animalele Terestre al Oficiului Internațional de Epizootii (OIE) (*Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines of the International Office of Epizootic Diseases - OIE*), în care se menționează: "Proba recomandată pentru analiza imunologică trebuie să fie recoltată din obex, sau cât mai aproape posibil de acesta, dar nu mai departe de 1,5 cm anterior față de obex." Recoltați 0,30 g (±0,05 g) de țesut nervos din partea stângă sau din partea dreaptă a trunchiului cerebral, de la nivelul obexului (acolo unde este posibil), cu ajutorul instrumentelor de disecție și cântăriți proba pentru a vă asigura că ați obținut cantitatea corectă. În mod alternativ, dispozitivul IDEXX de recoltare a probelor poate fi utilizat pentru recoltarea din obexul bovinelor, conform celor descrise în Anexă.

Personalul care urmează să realizeze recoltarea din obex trebuie instruit în ceea ce privește metoda de recoltare.

Figura de mai jos indică zona corectă de recoltare a probei.

NOTĂ: După recoltarea probei, o hemisecțiune completă a trunchiului cerebral cu o regiune intactă a obexului și a cerebelului (dacă este prezent) trebuie păstrate în vederea efectuării testelor de confirmare.

IDEXX



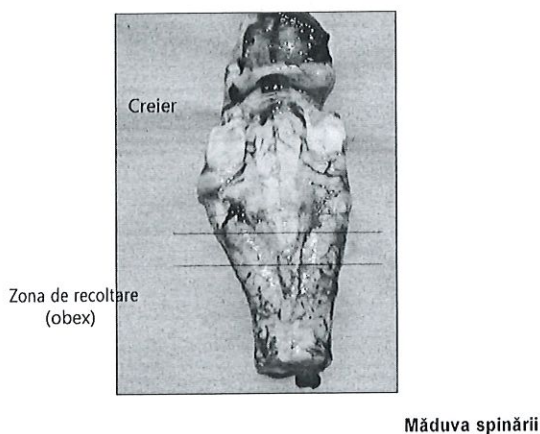


Figura 1. Trunchi cerebral bovin.

© British Crown Copyright (Februarie 2005) reprodus cu permisiunea Agenției Laboratoarelor Veterinare.

2. Introduceți țesutul într-un tub pentru omogenizare și înfiletați bine capacul. Tuburile sunt furnizate cu particule (bile/beads) ceramice și soluție tampon.
3. Patru instrumente de omogenizare a țesutului au fost validate pentru a fi utilizate împreună cu testul IDEXX BSE- Scrapie ELISA. Așezați tuburile în instrument și realizați procedura de omogenizare conform indicațiilor echipamentului respectiv. Dacă rezultatul procesului de mărunțire nu este satisfăcător, repetați încă un ciclu.
 - Programul instrumentului FastPrep*: Mărunțiți probele timp de 40 de secunde la viteză maximă (6,5 m/s). Dacă este necesară rularea unui al doilea ciclu, instrumentul trebuie lăsat să se răcească timp de 5–10 minute între cicluri.
 - Programul instrumentelor Precess 48*, Precess 24* și Precellys 24*: Mărunțiți probele de 2 ori timp de 20 până la 25 de secunde la 6500rpm, cu o pauză de 5 secunde între cicluri.
4. Omogenatele (proaspete sau dezghețate) pot fi ținute la 18–26°C timp de până la 4 ore înainte de începerea analizei.

Numărul probelor ce urmează a fi pregătite în cadrul unei singure sesiuni este flexibil. Omogenatele pot fi păstrate timp de până la 24 de ore la 2–8°C sau pot fi ținute la ≤-20°C timp de până la 6 luni. Înainte de utilizare, probele congelate trebuie dezghețate și omogenizate temeinic prin mișcări ușoare de inversiune a tubului. Probele de țesut pot fi păstrate la -80°C.

B. Țesut provenit din ganglionii limfatici sau splina rumegătoarelor mici

1. Recoltați 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de țesut din ganglionii limfatici sau splină. În cazul ganglionilor limfatici, țesutul trebuie recoltat astfel încât să maximizeze prezența celulelor centrului germinal. Mărunțiți țesutul în 8–10 fragmente mici.
2. Continuați cu procesarea și păstrarea probelor conform indicațiilor furnizate pentru țesutul cerebral.

NOTĂ: Țesutul provenit din ganglionii limfatici sau din splină nu poate fi utilizat în contextul recoltării și testării oficiale conform cadrului Reglementării (CE) Nr. 999/2001.



C. Țesut provenit din creierul și ganglionii limfatici ai cervidelor

1. Pregătiți tuburile de omogenizare a țesutului prin îndepărtarea a 0,2 ml de soluție din fiecare tub.
2. Recoltați 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de țesut din ganglionii limfatici retrofaringieni sau din creier (preferabil de la nivelul obexului). Țesuturile din creier și din ganglionii limfatici trebuie testate în mod individual. În cazul ganglionilor limfatici, țesutul trebuie recoltat astfel încât să maximizeze prezența celulelor centrului germinal. Mărunțiți țesutul recoltat din ganglionii limfatici în 8–10 fragmente mici.

Vă rugăm să țineți seama de faptul că, în Germania, este necesară atât testarea individuală a țesutului cerebral, cât și cea a țesutului din ganglionii limfatici. Această decizie respectă recomandările orientărilor EURL (TSE EU Reference Laboratory Guidelines for the detection of Chronic Wasting disease in cervids, <https://science.vla.gov.uk/tse-lab-net/documents/cwd-guidelines.pdf> și Scientific opinion on chronic wasting disease (II), EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), EFSA Journal 2018;16(1):5132. 59 pp.).

3. Introduceți țesutul într-un tub pentru omogenizare și înfiletați bine capacul.

IDEXX



4. Așezați tuburile în instrument și realizați procedura de omogenizare conform indicațiilor echipamentului respectiv. Dacă rezultatul procesului de mărunțire nu este satisfăcător, repetați încă un ciclu.

Programul instrumentului FastPrep*: Mărunțiți probele timp de 30 de secunde la viteza maximă (6,5 m/s). Lăsați instrumentul să se răcească timp de cinci minute. Repetați operațiunea de mărunțire pentru încă 30 de secunde la viteza maximă. Dacă în cazul inspecției vizuale rezultatul procesului de mărunțire nu este satisfăcător, repetați încă un ciclu.

Programul instrumentelor Precress 48*, Precress 24* și Precellys 24*: Mărunțiți probele timp de 30 de secunde la 6500rpm. Lăsați instrumentul să se răcească timp de cinci minute. Repetați operațiunea de mărunțire pentru încă 30 de secunde la 6500rpm. Dacă în cazul inspecției vizuale rezultatul procesului de mărunțire nu este satisfăcător, repetați încă un ciclu.

Pregătirea reactivilor

Soluțiile de spălare (Soluția de spălare 1, Soluția de spălare 2)

Soluțiile de spălare concentrate trebuie lăsate să ajungă la 18–26°C și omogenizate pentru a asigura dizolvarea sărurilor precipitate. Înainte de utilizare, fiecare concentrat de spălare trebuie diluat 1:10 cu apă distilată sau deionizată (de exemplu, 40 mL de concentrat plus 360 mL de apă per placă ce urmează a fi testată).

Componenta 2 de diluție a plăcii

Componenta 2 de diluție a plăcii (D2) este furnizată sub forma unui compus liofilizat. Soluția este preparată prin adăugarea a 200 µL de diluant de reconstituire (R), se lasă timp de aproximativ 1 minut, apoi se omogenizează ușor. A se utiliza în decurs de 1 oră de la preparare.

Diluantul plăcii de lucru

Componenta 1 de diluție a plăcii (D1) trebuie lăsată să ajungă la 18–26°C. Pregătiți diluantul plăcii de lucru prin adăugarea unei părți din componenta 2 de diluție a plăcii (D2; preparată conform celor de mai sus) la 25 părți din componenta 1 de diluție a plăcii (D1) și omogenizați temeinic (de exemplu, 120 µL D2 la 3,0 mL D1 per placă).

Sunt necesari aproximativ 2,75 mL de diluant al plăcii de lucru per placă atunci când testați probe din țesut cerebral. Testarea probelor din ganglionii limfatici sau din splină necesită aproximativ 5 mL de diluant pentru placa de lucru per placă. Diluantul plăcii de lucru trebuie pregătit și utilizat în aceeași zi.

Controlul negativ și controlul pozitiv

Controlul negativ și controlul pozitiv sunt furnizate sub formă de liofilizat. Reconstituiți fiecare control prin adăugarea a 1 mL de diluant de reconstituire. Lăsați soluția timp de aproximativ 1 minut și apoi omogenizați temeinic. Utilizați soluția în decurs de 2 ore de la preparare. **NU DILUAȚI CONTROLUL NEGATIV ȘI NICI CONTROLUL POZITIV ÎN DILUANTUL PLĂCII DE LUCRU.**

Soluțiile de anticorpi anti-PrP conjugați cu peroxidază de hrean (HRPO)

Soluțiile de anticorpi anti-PrP conjugați cu peroxidază de hrean (HRPO) sunt pregătite prin diluarea conjugatului concentrat corespunzător (a se vedea nota de mai jos) în diluant pentru conjugat (*conjugate diluent* - CD) conform indicațiilor de pe etichetă (de exemplu, o diluție de 1:100 ar necesita 120 µL de conjugat concentrat la 12 mL de diluant pentru conjugat). Consultați eticheta conjugatului concentrat pentru a afla factorul de diluție corect. Soluția de conjugat (diluat) trebuie pregătită și utilizată în decurs de 4 ore.

NOTĂ IMPORTANTĂ: În kitul de testare sunt furnizate două conjugate concentrate ce pot fi utilizate. Selectați conjugatul concentrat corespunzător tipului de țesut pe care urmează să îl testați:

- **Conjugat concentrat (CC)** - Utilizați acest conjugat atunci când testați probe de creier bovin și probe de creier provenite de la cervide, probe recoltate din ganglionii limfatici ai rumegătoarelor mici și ai cervidelor și probe de splină recoltate de la rumegătoare mici.
- **Conjugat concentrat pentru țesutul cerebral al rumegătoarelor mici (*Small-ruminant brain conjugate concentrate* - SRB-CC)** - Utilizați acest conjugat atunci când testați probe de țesut cerebral recoltat de la rumegătoare mici.
- Godeuri pentru controlul negativ și controlul pozitiv trebuie incluse pentru fiecare tip de conjugat testat.

Soluție Stop pe bază de acid



IDEXX



Soluția stop pentru analiză nu este furnizată în kitul de testare. Soluția stop (0,5–1,0 N HCl sau 1,0 N H₂SO₄) poate fi achiziționată la concentrația de lucru corespunzătoare sau pregătită din soluție concentrată.

Toate cele trei protocoale descrise mai jos necesită aducerea reactivilor la o temperatură de 18–26°C înainte de utilizare. Înainte de începerea testării, pregătiți soluțiile ce urmează a fi utilizate pe cadrul analizei. Omogenizați conținutul tuturor reactivilor prin rotirea ușoară a flacoanelor. Controalele (negativ și pozitiv) trebuie omogenizate temeinic și testate în duplicat. Un dispozitiv de acoperire a plăcii trebuie utilizat pentru acoperirea plăcii pe durata analizei.

Păstrarea reactivilor preparați

Articol	Volum de reconstituire	Valabilitate
N/P Control negativ/pozitiv	1 mL	2 ore la 18–26°C (6 luni la -20°C)
D2 Componenta 2 de diluție a plăcii	200 µL	1 oră la 18–26°C
Diluantul plăcii de lucru	NA	8 ore la 18–26°C
Soluții HRPO:anti-PrP	NA	4 ore la 18–26°C
Soluție de spălare 1 - 1X	NA	1 săptămână la 18–26°C
Soluție de spălare 2 - 1X	NA	1 săptămână la 18–26°C

Eventualele cantități de plăci neutilizate trebuie păstrate într-un recipient etanș, cu un desicant în interior și la întuneric.

Procedura de testare

Omogenatele probelor sunt pregătite conform indicațiilor oferite în secțiunea Recoltarea și pregătirea probelor de țesut. Se poate utiliza un echipament pentru procesarea automată a probelor în locul metodei manuale de la Etapa 1 sau imediat ce controalele și diluate au fost adăugate pe placa de capturare a antigenului (Etapa 3).

Important: În timpul tuturor operațiunilor de incubare a reactivilor, acoperiți fiecare placă de testare cu un dispozitiv dur din plastic sau cu un dispozitiv adeziv de acoperire a plăcii. Dacă operațiunile de incubare a reactivilor se realizează într-un cabinet de siguranță biologică, plăcile trebuie acoperite cu folii adezive.

Protocoalele de testare

Există două protocoale aprobate pentru testarea probelor de țesut cerebral cu ajutorul kitul IDEXX BSE-Scrapie ELISA: protocolul Scurt și protocolul Ultra-Scurt. Protocoalele oferă o performanță identică, dar necesită utilizarea unor echipamente diferite pentru reducerea timpului de testare. Protocoalele sunt detaliate în tabelul de pe pagina următoare.

NOTĂ: Protocolul de testare al probelor de splină și ganglioni limfatici recoltate de la rumegătoare mici este diferit de protocoalele Scurt și Ultra-Scurt, și este descris în tabelul Protocoalelor de Testare de mai jos.

Diluția probei folosind diluantului plăcii de lucru

Stabiliți un șablon care să indice localizarea poziției probelor pe placa de capturare a antigenului și pe placa de diluție. Rezervați godeurile pentru controalele negativ și pozitiv (furnizate în kit), care vor fi testate în duplicat. Diluantul plăcii de lucru poate fi adăugat pe placa de diluție înainte sau după distribuirea probei. Proporția este de 30 µL de diluant al plăcii de lucru la 120 µL de omogenat din probă (în cazul probelor de splină și ganglioni limfatici recoltate de la rumegătoare mici proporția este de 50 µL de diluant la 100 µL de omogenat din probă).

Resuspendați omogenatele prin mișcări ușoare de inversiune a tuburilor și apoi pipetați cu atenție proba introducând vârful lung al pipetei de transfer printre particule (beads) și extrăgând proba din tubul de omogenizare a țesutului. Distribuiți cu atenție fiecare probă pe placa de diluție, evitând crearea bulelor de aer în interiorul omogenatului și evitând lăsarea urmelor de probă pe marginile godeurilor plăcii de diluție.

După diluarea omogenatelor, amestecați temeinic probele, evitând crearea bulelor de aer. Omogenizarea poate fi realizată cu ajutorul unei pipete sau al unui agitator pentru plăci. Dacă utilizați un dispozitiv de agitare (shaker) a plăcilor, va fi necesar să reglați viteza și timpul de operare pentru a asigura omogenizarea completă fără a împrăști probele. Efectuați testarea în decurs de 2 ore.

IDEXX



Utilizarea agitatorului (shaker) pentru plăci pentru incubarea probelor (Protocolul Scurt și Protocolul Ultra-Scurt)

Protocolele Scurt și Ultra-Scurt implică o rotație la viteză mică (200 ± 100 rpm) pe un agitator cu platformă pentru plăci doar pentru etape de incubare a probelor. Agitatorul pentru plăci trebuie să redea o mișcare ușoară circulară în plan orizontal. Cu toate că probele din fiecare godeu al plăcilor de microtitru se vor mișca ușor, este posibil ca acest lucru să nu poată fi observat. Mișcarea nu trebuie să fie foarte energică pentru a nu împinge proba peste marginea godeului. Timpul de incubare este redus corespunzător pentru incubarea probei și a conjugatului, conform celor detaliate în tabelul următor. În cadrul protocolului de testare a probelor recoltate din splina/ganglionii limfatici ai rumegătoarelor mici, procedurile de incubare nu implică agitarea plăcilor.



IDEXX



Protocoloale de testare

Procedura de testare		Protocolul Scurt	Protocolul Ultra-Scurt	Protocol pentru probe de splină/ganglioni limfatici rumegătoare mici
Tipul de probă		Țesut cerebral bovine, rumegătoare mici și cervide, ganglioni limfatici cervide	Țesut cerebral bovine și rumegătoare mici	Țesut din splină și ganglioni limfatici ai rumegătoarelor mici
Etapă	Operațiune	18–26°C Toate etapele	32–37°C ¹ : Doar incubare (etapele 3,5,8,10) 18–26°C: Toate celelalte etape inclusiv etapele de spălare	18–26°C Toate etapele
1	Distribuirea probei pe placa de diluție	120 µL de probă cu 30 µL de diluant al plăcii de lucru		100 µL de probă cu 50 µL de diluant al plăcii de lucru
		OMOGENIZAȚI TEMEINIC – a se vedea secțiunea "Diluția probei folosind diluantul plăcii de lucru".		
2	Distribuirea probei pe placa de capturare a antigenului	Pipetați 100 µL de probă diluată pe placa de testare; omogenizați controalele, adăugați 100 µL în duplicat; acoperiți placa cu un dispozitiv de acoperire a plăcii.		
3	Incubarea plăcii de capturare	45–60 min.; agitare la viteză mică 200 ±100 rpm	20–25 min.; agitare la viteză mică 200±100 rpm	2–3 ore fără agitare
4	Spălare folosind Soluția de Spălare 1 (1X)	Spălați godeurile de 6 ori cu ~350 µL de Soluție de spălare 1 (1X).		
5	Soluție de tratare: Adăugare / Incubare	Adăugați în fiecare godeu 100 µL de tampon de tratare; acoperiți placa; incubați timp de 10 ±1 min.		
6	Spălare folosind Soluția de Spălare 2 (1X)	Spălați godeurile de 3 ori cu ~350 µL de Soluție de spălare 2 (1X).		
7	Adăugarea conjugatului	Adăugați 100 µL de conjugat diluat (pentru probe de țesut cerebral bovin și probe recoltate de la cervide utilizați CC; pentru probe de țesut cerebral recoltat de la rumegătoare mici utilizați SRB-CC) și acoperiți placa cu un dispozitiv de acoperire a plăcii.		Adăugați 100 µL de conjugat concentrat (CC) diluat și acoperiți placa cu un dispozitiv de acoperire a plăcii.
8	Incubarea conjugatului	45–50 min.	25–30 min.	60–75 min.
9	Spălare folosind Soluția de Spălare 2 (1X)	Spălați godeurile de 5 ori cu ~350 µL de Soluție de spălare 2 (1X).		
10	Adăugarea / Incubarea Substratului	Adăugați 100 µL de substrat în fiecare godeu; acoperiți placa; incubați timp de 15 ±1 min. departe de lumina directă a soarelui (nu utilizați folie adezivă pentru acoperirea plăcii).		
11	Adăugarea soluției stop / Citirea plăcii	Adăugați 100 µL de soluție stop pe bază de acid; placa poate fi menținută timp de până la 30 de min. la întuneric înainte de citirea densității optice (450 nm) folosind o lungime de undă de referință de (AREF) 620 nm până la 650 nm.		

1. Incubarea la 32–37°C înseamnă introducerea plăcii de testare într-un incubator care a fost pre-încălzit la 32–37°C.

IDEXX





Recapitularea formatelor kitului

	Creier bovin	Creier rumegetoare mici	Splina și ganglioni limfatici rumegetoare mici	Creier și ganglioni limfatici retrofaringieni cervide
Pregătirea probelor:				
Siringa de recoltare a probei de țesut	Da	Nu	Nu	Nu
Mărunțirea țesutului (pre-omogenizare)	Nu	Nu	Da	Da (GLRF) Nu (Creier)
Procedura de testare:				
Conjugat Concentrat	CC	SRB-CC	CC	CC
Diluantul plăcii de lucru (raport cantitativ diluant placă de lucru / probă)	30 μL/120 μL	30 μL/120 μL	50 μL/100 μL	30 μL/120 μL
Protocoale aprobate	Scurt și Ultra Scurt	Scurt și Ultra Scurt	Splina și ganglioni limfatici rumegetoare mici	Scurt
Valoarea Cutoff a testului	NCx + 0,120	NCx + 0,180	NCx + 0,180	NCx + 0,150
Protocol de tratare termică aplicabil opțional	Da	Nu	Nu	Nu

Interpretarea rezultatelor

Pentru ca analiza să fie validă, media controlului negativ (NCx) trebuie să aibă o valoare $A_{450}-A_{REF}$ mai mică decât 0,150, iar media controlului pozitiv (PCx) trebuie să aibă o valoare $A_{450}-A_{REF} \geq 0,400$.

Efectuarea Calculurilor

Calculul mediei controlului negativ (NCx):

$$NCx = \frac{A1 (A_{450} - A_{REF}) + B1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Calculul mediei controlului pozitiv (PCx):

$$PCx = \frac{C1 (A_{450} - A_{REF}) + D1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Calculul valorii cutoff:

$$\text{Cutoff bovine} = NCx + 0.120$$

$$\text{Cutoff rumegetoare mici} = NCx + 0.180$$

$$\text{Cutoff cervide} = NCx + 0.150$$



NOTĂ: Pentru definiția A_{REF} , consultați etapa 11 a tabelului Procedura de Testare.

Rezultate

Interpretarea rezultatelor analizei probelor se bazează pe absorbanta acestora. Probele indicând valori $A_{450}-A_{REF}$ mai mici decât valoarea cutoff sunt considerate de către IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit ca fiind negative. Probele indicând valori $A_{450}-A_{REF}$ mai mari sau egale cu valoarea cutoff sunt clasificate ca fiind inițial reactive pentru PrP^{Sc}, iar omogenatul trebuie retestat în duplicat cu kitul de testare IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit.

IDEXX





Retestarea probelor de țesut cerebral bovin poate fi efectuată din omogenatul de țesut cerebral inițial sau din omogenat pregătit folosind Protocolul Opțional de Tratare termică a probelor de origine bovină, descris mai jos. Dacă vreuna dintre valorile de retestare este egală sau mai mare decât valoarea cutoff a testului, proba este considerată ca fiind pozitivă. Proba este considerată ca fiind negativă atunci când valoarea ambelor replicare retestate este mai mică decât valoarea cutoff a testului. În cadrul UE, toate probele de origine bovină reactive inițial și care sunt indicate ca fiind negative ca urmare a retestării cu ajutorul protocolului de tratare termică trebuie declarate negative.

Probele provenite de la rumegătoarele mici și de la cervide trebuie retestate în duplicat direct din omogenatul de țesut inițial - NU tratați termic omogenatele prevenind de la rumegătoarele mici sau de la cervide. Dacă vreuna dintre valorile de retestare este egală sau mai mare decât valoarea cutoff a testului, proba este considerată ca fiind pozitivă. Proba este considerată negativă atunci când valorile de retestare ale ambelor replicare sunt mai mici decât valoarea cutoff a testului.

În statele membre ale UE toate probele indicate ca fiind pozitive prin efectuarea unui test rapid trebuie trimise către Laboratoarele Naționale de Referință din statul respectiv pentru detecția EST sau către Laboratorul de Referință al Uniunii Europene în vederea efectuării testelor de confirmare.

Protocolul opțional de tratare termică pentru omogenatele bovine inițial reactive: (Protocolul de tratare termică se aplică numai probelor de origine bovină.)

Extrageți 230 ± 20 μ L din omogenatul de țesut inițial reactiv și transferați într-o fiolă de 1,5–2 mL prevăzută cu capac cu sistem de înfiletare și având partea inferioară conică. Așezați fiola într-o unitate dry heating block care a fost preîncălzită la $70 \pm 2^\circ\text{C}$. Încălziți tubul timp de 10 ± 1 min. și apoi așezați tubul pe un suport deschis la $18\text{--}26^\circ\text{C}$ timp de cel puțin 20 de minute pentru a lăsa proba să se răcească. Omogenatul trebuie retestat în decurs de două ore de la tratarea termică, în duplicat, cu ajutorul kitului de testare IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit.

Măsuri de precauție

- Nu expuneți substratul tetramethylbenzidine (TMB) la lumină puternică sau la agenți oxidanți. Pentru distribuirea TMB utilizați dispozitive curate din plastic, de unică folosință.
- Trebuie să fiți atenți pentru a evita contaminarea componentelor kitului. Nu utilizați componentele după data de expirare a acestora, și nu amestecați componente provenind din kituri având loturi diferite.
- Unele componente ale kitului conțin azidă de sodiu drept conservant (a se vedea descrierea componentelor kitului). Trebuie să fiți atenți pentru a evita contaminarea conjugatului anti-PrP-HRPO cu soluții ce conțin azidă de sodiu.
- Păstrați toți reactivii la $2\text{--}8^\circ\text{C}$. Lăsați reactivii să ajungă la $18\text{--}26^\circ\text{C}$ înainte de a-i utiliza, și repuneți-i la temperatura corespunzătoare de păstrare după utilizare (a se vedea secțiunea Păstrarea reactivilor preparați).
- Folosiți tăvi diferite de distribuire pentru fiecare reactiv utilizat în cadrul analizei. Evitați contaminarea încrucișată a substratului TMB cu soluția de conjugat diluat. Nu turnați înapoi în flacon soluția TMB neutilizată.
- Nu lăsați plăcile de microtitru să stea mai mult de 5 minute între etapele de spălare și adăugarea reactivilor.

Informații cu privire la siguranță

- Tot personalul din laborator trebuie să fie instruit corespunzător cu privire la riscurile legate de ESB și scrapie și la procedurile de decontaminare recomandate. Procedurile de siguranță biologică trebuie respectate cu strictețe, conform recomandărilor cuprinse în reglementările naționale de siguranță.
- Soluția tamponată de tratare conține solvenți; evitați contactul cu pielea și cu membranele mucoase.
- Substratul TMB poate irita pielea și ochii; evitați contactul direct.
- Diluantul 1 al plăcii conține concentrații mari de detergenți; evitați contactul direct.
- Evitați utilizarea în laborator a recipientelor din sticlă.

IDEXX



Anexă

Recoltarea de țesut din obexul bovin cu ajutorul dispozitivului IDEXX de recoltare a probelor

IDEXX pune la dispoziție un dispozitiv de recoltare a probelor, ca alternativă a metodei de extracție a obexului bovin. Acest dispozitiv este o seringă de recoltare. Dispozitivul IDEXX de recoltare a probelor este aprobat de către EURL. Orientările oferite în această secțiune referitoare la recoltare nu exclud alte informații sau instrucțiuni care sunt conforme cu reglementarea (CE) 999/2001 și cu modificările ulterioare ale acestei reglementări. Atunci când nu este posibilă identificarea zonei anatomice corecte de recoltare, folosiți instrumentele de disecție conform celor descrise în secțiunea **Recoltarea și pregătirea probelor de țesut**.

1. Trunchiul cerebral trebuie prelevat la abator prin foramenul occipital utilizând un instrument special sau o spatulă de recoltare a probelor. Identificați zona obexului luând drept reper zona în formă de "V" de pe suprafața superioară a trunchiului cerebral (a se vedea figura de la capitolul Recoltarea și pregătirea probelor de țesut). Atunci când nu este posibilă identificarea zonei anatomice corecte de recoltare, folosiți instrumentele de disecție conform celor descrise în secțiunea Recoltarea și pregătirea probelor de țesut.
2. Poziționați trunchiul cerebral cu secțiunea în formă de "V" a țesutului în poziție verticală. Introduceți vârful seringii de recoltare a probei până la capătul caudal al bulbului rahidian, pe partea din care urmează să recoltați proba, la aproximativ 3 mm (suficient încât vârful seringii să fie plasat în siguranță). Este posibil să fie necesar să tăiați excesul de țesut de la nivelul măduvei spinării dacă distanța dintre baza măduvei spinării și secțiunea în formă de "V" este mai mare de 3–4 cm.
3. Mențineți ferm pistonul seringii. Cu degetul arătător apăsați corpul seringii în trunchiul cerebral, având grijă ca pistonul să nu se miște în nici o direcție. Consultați Figura 2 pentru direcționarea corespunzătoare a seringii astfel încât să ajungă la zonele importante de recoltare a țesutului din obex. Pe măsură ce corpul seringii pătrunde în probă, acesta trebuie să rămână pe partea aleasă a trunchiului cerebral pentru a împiedica deteriorarea părții opuse. O hemisecțiune completă a trunchiului cerebral având obexul intact trebuie să fie păstrată în vederea efectuării testelor de confirmare.

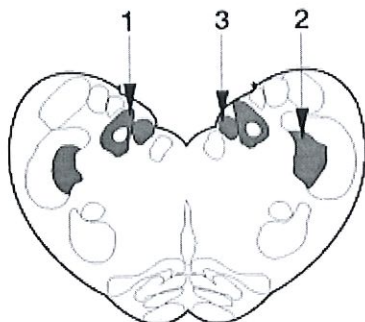


Figura 2. Secțiune transversală a trunchiului cerebral al bovinei, la nivelul obexului, identificând zonele cheie pentru recoltarea țesutului: 1) tractusul solitar, 2) nucleul nervului trigemen, 3) nucleul motor dorsal al nervului vag (figura este preluată din *Manualul pentru Teste de Diagnostic și Vaccinuri al OIE*, capitolul 2.4.6.)

4. Corpul seringii va trece prin trunchiul cerebral și apoi în regiunea obexului. Asigurați-vă de faptul că seringă a pătruns în partea superioară a zonei de recoltare (a se vedea Figura 1). Astfel, corpul seringii ar trebui să conțină deja proba de obex.
NOTĂ: Proba necesară (cum ar fi proba de obex) se regăsește înspre vârful corpului seringii.
5. Răsuciți corpul seringii pentru a izola proba și îndepărtați cu atenție seringă de țesut.
6. Dacă o cantitate semnificativă de țesut rămâne suspendată în vârful seringii, trageți-o în corpul seringii prin retractarea ușoară a pistonului. Seringă poate fi acum manevrată pentru a îndepărta aerul din vârf și pentru a elimina spațiul dintre fragmentele de probă.

IDEXX



Notă: În interiorul seringii se regăsesc mai multe spații sau șanțuri regulate de înfrânare a pistonului ce pot fi simțite pe măsură ce pistonul este mișcat în seringă. Spațiul dintre aceste limitatoare furnizează o măsurare precisă a volumului de probă.

7. După obținerea probei de țesut în seringă, împingeți pistonul pentru a-l alinia cu cea mai apropiată creștătură. Proba nu trebuie să conțină spații goale între piston și vârful seringii. Este posibil ca o parte a materialului de probă în exces să se iasă în afara vârfului seringii.
8. Eliminați orice reziduu de țesut care ar putea rămâne pe suprafața exterioară. Nu apăsați pistonul în timpul acestei operațiuni deoarece proba va fi expulzată sau presată; nici unul dintre cele două cazuri nu este de dorit.
9. Țineți într-o mână tubul de omogenizare a probei în poziție verticală, iar în cealaltă mână țineți seringă cu vârful exact la marginea tubului, în interiorul acestuia. Distribuți în tub o cantitate măsurată de țesut din obex prin împingerea pistonului de la un șanț al seringii și oprindu-vă la următorul. Volumul dintre două șanțuri este 150 μ L; se distribuie în tub o cantitate totală de 300 μ L (echivalentul a 0,30 g $\pm$ 0,05 g de țesut).
10. Înfiletați capacul tubului și continuați cu omogenizarea probei.

Personalul din laborator care recoltează probe de obex cu ajutorul dispozitivului IDEXX de recoltare a probei trebuie să fie bine instruit cu privire la utilizarea dispozitivului pentru a vă asigura de faptul că recoltarea se efectuează din zona corectă a trunchiului cerebral. Fiecare tehnician trebuie să monitorizeze exactitatea prelevării prin efectuarea unor verificări periodice ale greutății probei. Un program de acțiuni de corectare trebuie implementat în cazul în care rezultatele nu sunt armonizate cu criteriile de acceptanță definite. Dispozitivul IDEXX de recoltare a probelor este de unică folosință și trebuie aruncat după fiecare recoltare pentru a preveni contaminarea încrucișată.

Limitarea responsabilității

În limitele maxime permise de lege, sub nici o formă IDEXX sau furnizorii săi de licențe nu vor fi responsabili în fața dumneavoastră sau a altor persoane pentru pierderea profitului sau a utilizării, sau pentru daune speciale, accidentale, semnificative, indirecte, punitive sau compensații multiple, inclusiv dar fără a se limita la pierderea fondului comercial, a datelor sau echipamentelor sau pentru întreruperea activității economice, rezultând din producția, vânzarea, furnizarea sau utilizarea produselor sau serviciilor noastre sau pentru nelivrarea sau livrarea cu întârziere a acestor produse sau servicii.

Pentru asistență tehnică:

IDEXX SUA Tel: +1 800 548 9997 sau +1 207 556 4890

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

*HerdChek este o marcă comercială sau o marcă comercială înregistrată aparținând IDEXX Laboratories, Inc. sau asociaților săi din Statele Unite și/sau din alte state. Toate celelalte denumiri de produse sau denumiri ale companiilor și siglele sunt mărci comerciale ale deținătorilor respectivi.

Informații cu privire la brevet: idexx.com/patents.

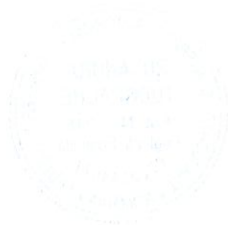
© 2018 IDEXX Laboratories, Inc. Toate drepturile rezervate.

IDEXX



Descrierea simbolurilor

	Cod lot (Lot)
	Număr serie
	Număr de catalog
	Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană
	A se utiliza până la data de
	Producător
	Modificări majore în cadrul instrucțiunilor de utilizare



IDEXX



Pericol



H302 / H314 / H410 / P303+P361+P353 / P501

Controlul Pozitiv – Nociv în cazul înghițirii. Provoacă arsuri grave ale pielii și leziuni oculare grave. Foarte toxic pentru organismele acvatice având efecte de lungă durată. ÎN CAZUL CONTACTULUI CU PIELEA (sau cu părul): Îndepărtați imediat toate hainele contaminate. Clătiți pielea cu apă sau faceți duș. Îndepărtați produsul/recipientul în conformitate cu reglementările locale / regionale / naționale / internaționale.

H315 / H318 / P280 / P332+P313 / P305+P351+P338 / P310

Controlul Negativ – Provoacă iritația pielii. Provoacă leziuni oculare grave. Purtați mănuși de protecție / ochelari de protecție / mască de protecție. În cazul iritației pielii: Consultați un medic. ÎN CAZUL CONTACTULUI CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă timp de câteva minute. Scoateți lentilele de contact în cazul în care purtați și în cazul în care acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. Apelați imediat un Centru de Informare Toxicologică sau consultați un medic.

H315 / H319 / P280 / P332+P313 / P337+P313

Componenta 1 de diluție a plăcii – Provoacă iritația pielii. Provoacă iritații oculare grave. Purtați mănuși de protecție / ochelari de protecție / mască de protecție. În cazul iritației pielii: Consultați un medic. În cazul în care iritația pielii persistă: Consultați un medic.

H316 / H334 / P304+P340 / P332+P313

Componenta 2 de diluție a plăcii – Provoacă o ușoară iritație a pielii. Poate provoca simptome de alergii sau astm sau dificultate în respirație în cazul în care este inhalat. ÎN CAZUL INHALĂRII: În cazul dificultății în respirație, transportați victima la aer curat și mențineți-o în repaus, într-o poziție confortabilă care favorizează respirația. În cazul iritației pielii: Consultați un medic.

EUH20

Diluant Conjugat – Conține Proclin. Poate provoca reacții alergice.



IDEXX

H302 / H412 /

Soluție tampon de tratare – Nociv în cazul înghițirii. Foarte toxic pentru organismele acvatice având efecte de lungă durată. Îndepărtați produsul/recipientul în conformitate cu reglementările locale / regionale / naționale / internaționale.

H316 / P332+P313

Soluția de spălare 1 – Provoacă o ușoară iritație a pielii. În cazul iritației pielii: Consultați un medic.



IDEXX





IDEXX

One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092 SUA
idexx.com

IDEXX Europe B.V.
P.O. Box 1334
NL-2130 EK Hoofddorp
idexx.com

