

Trusa TeSeE SAP Combi

Protocolul Scurt

 192

 384

 768

 3551186

 3551192

 3551191

KIT DE REACTIVI PENTRU PURIFICAREA ȘI DETECȚIA *IN VITRO* A PrPSc LA BOVINE, OVINE, CAPRINE ȘI CERVIDEE

Acest test este aprobat în Uniunea Europeană ca test rapid în programele de testare a ESB și a scrapiei la bovine, oi și capre, stabilite în conformitate cu Anexa III, capitolul A al Reglementării (CE) Nr. 999/2001

Instrucțiunile actuale EURL TSE sugerează doar utilizarea testelor rapide EST pentru detectarea MCC la cervidee care au trecut prin validările și aprobările primite din partea USDA și/sau CFIA pentru utilizarea pe țesut de la cervidee. Pentru măsurile vizate în supravegherea cervideelor în statele membre ale UE, vă rugăm să consultați ghidurile EURL (Ghidurile Laboratorului European de Referință pentru EST pentru detectarea bolii cronice cahectizante la cervidee, <ftp://ftp.izsto.it/EURL%20TSE/RAPID%20TESTS/Test%20protocols/>).

Acest test kit a fost supus validărilor și a primit aprobarea USDA și CFIA pentru utilizarea de țesut de la cervidee pentru detectarea bolii cronice cahectizante la cervidee.



2020/06

CUPRINS

1 - GENERALITĂȚI

2 - TRUSA TeSeE SAP Combi

2 - 1 Principiul

2 - 2 Prelevatele

2 - 3 Componentele truselor TeSeE SAP Combi

2 - 4 Prepararea reactivilor

2 - 5 Conservare, valabilitate

2 - 6 Modul de lucru

2 - 7 Calcularea și interpretarea rezultatelor

2 - 7 Limitele testului

3 - MATERIALE NECESARE NEINCLUSE ÎN TRUSE

4 - PRECAUȚII

5 - MĂSURI DE IGIENĂ ȘI PROTECȚIA MUNCII

6 - BIBLIOGRAFIE

1 – GENERALITĂȚI

Encefalopatiile spongiforme transmisibile (EST) sunt maladii lente degenerative ale sistemului nervos central cauzate de agenți transmisibili neconventionali (ATNC), denumiți în mod curent prioni.

În general, EST se clasifică după etiologie în EST iatrogene, familiale și/sau sporadice. Scrapia ovinelor este cunoscută încă din secolul al XVIII-lea, demonstrându-se caracterul său transmisibil (inclusiv la caprine). Cu toate acestea, modalitățile de contaminare a animalelor în turmă rămân puțin cunoscute. EST s-au mai descris la caprioare și elan (maladia cronică cașectizantă, MCC) și la bovine (encefalopatia spongiformă bovină, ESB).

Și oamenii sunt susceptibili la anumite forme de EST. Există dovezi convingătoare care susțin transmiterea ESB de la bovine la om, probabil prin consumul de carne contaminată.

În afara acestei variante noi a maladiei Creutzfeldt-Jakob (MCJv), alte forme întâlnite la oameni de EST sunt boala Kuru și maladia Creutzfeldt-Jakob iatrogenă.

Formele ereditare pure (cum ar fi sindromul Gertsman-Straüssler-Scheinker [SGS]) și/sau MCJ sporadică au fost demonstrate la om, dar incidența acestora este scăzută. Nu se cunoaște dacă în regnul animal există cazuri similare de EST sporadice.

Principalele trăsături ale acestor maladii sunt următoarele:

- evoluția progresivă lentă, însă întotdeauna fatală,
- absența agenților infecțioși clasici,
- acumularea progresivă, în sistemul nervos central, a unei izoforme anormale a proteinei prionice naturale (PrP), denumită PrP^{Sc}. Această izoformă se caracterizează prin proprietăți biochimice particulare și în special printr-o rezistență crescută la proteaze.

Perioada de incubare surprinzător de lungă ce precede simptomele neurologice sugerează că în situsuri extranervoase și în special în țesuturile limfoide periferice pot avea loc evenimente importante pentru patogenia EST.

În ciuda numeroaselor necunoscute și/sau incertitudini, detecția PrP^{Sc} anormală este în prezent recunoscută ca metodă de confirmare a diagnosticului EST. Această detecție se efectuează în mare parte post-mortem din prelevate de țesut nervos.

PrP^{Sc} anormală a mai fost detectată și în anumite țesuturi limfoide și organe: în centrul germinativ splenic, ganglionii limfatici, amigdale, și/sau țesuturi limfoide asociate mucoaselor (dar numai la nivel de cercetare), în modele animale sau la oi cu scrapie, cerbi și elani cu MCC, ca și la pacienți cu MCJv.

Reactivii propuși de CEA - "Commissariat à l'Énergie Atomique – (Comisariatul francez pentru energie atomică), dezvoltati, produși și comercializați de Bio-Rad, permit detecția PrP^{Sc} din prelevate de țesuturi nervoase de origine animală.

Testarea se realizeaza cu reactivii si materialele accesorii urmatoare:

- Trusa TeSeE™ SAP (192 testări)	cod: 3551186
- Trusa TeSeE™ SAP (384 testări)	cod: 3551192
- Trusa TeSeE™ (768 testări)	cod: 3551191
- Tuburi de omogenizare (384 tuburi)	cod: 3551139
- Tuburi de omogenizare (768 tuburi)	cod: 3551137
- Seringi și ace de calibrare (x 200)	cod: 3551174
Sau Seringi Spelling TSE + ace VITA(X200)	cod : 12007909
sau Plăci filtrante (x 50)	cod: 3551179
- Microplăci cu godeuri adânci (x 50)	cod: 3590132
- Sfere medii (x 2000)	cod: 3551171*

*Doar pentru tesuturi periferice

2 – Trusa TeSeE™ Combi

2-1 PRINCIPIUL

Reactivii trusei TeSeE™ permit purificarea, concentrarea, solubilizarea si detectia PrP^{Sc} din eșantioane de țesut prelevat de la animalele infectate.

Trusa de detecție TeSeE™ este concepută pe baza unei tehnici imuno-enzimatică (în format sandwich) ce folosește 2 anticorpi monoclonali pentru detecția proteinei prionice anormale, rezistentă la proteinază K în țesuturile prelevate de la animale infectate.

Faza solida consta in 12 barete formate din cate 8 godeuri de polistiren invelite cu primul anticorp monoclonal. Al doilea anticorp monoclonal este cuplat cu peroxidaza.

2-2 PRELEVATELE (PROBELE BIOLOGICE)

- **Bovine** : Purificarea PrP^{Sc} se efectuează din eșantioane recoltate de la nivelul sistemului nervos central (SNC). Prelevarea trunchiului cerebral se realizează cu trusa de prelevare BSE extraction tool (cod : 3551130).

Deoarece PrP^{Sc} are distribuție eterogenă în sistemul nervos central, pentru asigurarea detecției optime prelevările trebuie făcute cu precădere din obexul trunchiului cerebral.

Seringa de prelevare (cod: 3551175) permite prelevarea rapidă și facilă, de o manieră sigură, a obexului. Pentru instrucțiuni detaliate si procedura usoara de prelevare vă rugăm să consultați protocolul referitor la prelevare.

- **Rumegătoare mici și cervide** : Purificarea PrP^{Sc} se efectuează din eșantioane recoltate de la nivelul sistemului nervos central (SNC) si/sau țesuturi periferice (ganglioni limfatici, splină,...). Trusa de extracție pentru rumegătoare mici (cod : 3551184) poate fi folosită atât la prelevarea trunchiului cerebral cât și a cerebelului.

Deoarece PrP^{Sc} are distribuție eterogenă în sistemul nervos central, pentru asigurarea detecției optime, prelevările trebuie făcute cu precădere din obexul trunchiului cerebral.

Probele se și se cântăresc individual.

Notă : alte țesuturi (amigdale, ileum, pleoapă,...) se vor folosi doar în scop de cercetare.

Dacă purificarea se face în următoarele 24 de ore, eșantioanele vor fi păstrate între +2°C și

+8°C, sau se vor congela dacă se dorește păstrarea lor pe durata a câteva luni. Eșantioanele nu se vor congela/decongela mai mult de 3 ori. În caz de necesitate de transport, eșantioanele trebuie ambalate în conformitate cu reglementările naționale în vigoare.

2-3 COMPOZIȚIA TRUSEI TeSeE™

ETICHETĂ	TIPUL REACTIVULUI	PREZENTARE			PĂSTRARE
		3551186 (192 testari)	3551192 (384 testari)	3551191 (768 testari)	
Reactiv A	Soluție denaturantă	1 flacon (55 ml)	1 flacon (120 ml)	1 flacon (240 ml)	+2°C/+8°C
Reactiv B	Soluție de clarificare Colorant: albastru de bromfenol	1 flacon (55 ml)	1 flacon (120 ml)	2 flacoane (120 ml)	+2°C/+8°C
Reactiv C	Tampon de resolubilizare Colorant: verde de malachit	1 flacon (7 ml)	1 flacon (14 ml)	1 flacon (28 ml)	+2°C/+8°C
PK	Proteinază K Colorant: roșu de fenol	1 flacon (0.5 ml)	2 flacoane (0.5 ml)	4 flacoane (0.5 ml)	+2°C/+8°C
R1	Microplaca: 12 barete de cate 8 godeuri sensibilizate cu un anticorp monoclonal anti-PrP	2 placi	4 placi	8 placi	+2°C/+8°C
R2	Soluție de spălare: Concentrat 10x de tampon Tris-NaCl pH 7,4. Conservant: ProClin™ 300 (0,01%)	1 flacon (250 ml)	2 flacoane (250 ml)	4 flacoane (250 ml)	+2°C/+25°C
R3	Control (martor) negativ: Tampon TFS pH 7,2 suplimentat cu albumină serica bovină (ASB). Conservant: ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacon (4 ml)	2 flacoane (4 ml)	4 flacoane (4 ml)	+2°C/+8°C
R4	Control (martor) pozitiv: Tampon TFS pH 7,4 suplimentat cu peptide de sinteză neinfecțioase, liofilizat. Conservant: ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacon (q.s 4 ml)	2 flacoane (q.s. 4 ml)	4 flacoane (q.s. 4 ml)	+2°C/+8°C
R6	Diluent de probe: Tampon TFS pH 7,2 suplimentat cu ASB și roșu de fenol. Conservant: ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacon (35 ml)	1 flacon (70 ml)	1 flacon (140 ml)	+2°C/+8°C
R7	Conjugat: Solutie concentrată 10x de anticorpi monoclonali anti-PrP marcați cu peroxidază, în tampon TFS, pH 7.1 suplimentat cu proteine bovine și colorată cu roșu de fenol. Conservant: ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacon (2.8 ml)	2 flacoane (2.8 ml)	4 flacoane (2.8 ml)	+2°C/+8°C
R8	Tampon substrat pentru peroxidază: Soluție de acid citric și acetat de sodiu pH 4,0 ce conține 0,015% H ₂ O ₂ și 4% dimetil sulfoxid (DMSO)	1 flacon (60 ml)	1 flacon (120 ml)	2 flacoane (120 ml)	+2°C/+8°C
R9	Cromogen: Soluție de tetrametil benzidina (TMB)	1 flacon (5 ml)	1 flacon (10 ml)	1 flacon (20 ml)	+2°C/+8°C
R10	Soluție de stopare: Acid sulfuric 1 N	1 flacon (28 ml)	1 flacon (56 ml)	1 flacon (112 ml)	+2°C/+8°C
	Folii adezive	8	12	16	

Urmatorii reactivi sunt componente generice: Reactivul A, reactivul B, diluentul de probe (R6), solutia de spalare (R2), tamponul substrat pentru peroxidaza (R8), cromogenul (R9) si solutia de stopare (R10).

Ele se pot folosi cu toate loturile de kituri TeSeE™SAP.

2-4 PREPARAREA REACTIVILOR

Înainte de utilizare reactivii din trusele TeSeE SAP Combi trebuie lăsați să se echilibreze la temperatura camerei (de la +18°C la +30°C) timp de 30 minute.

1 - Reactivi gata de utilizare

Reactivii A, B, C, controlul negativ (R3), diluentul de probe (R6) și soluția de stopare (R10) sunt gata de utilizare.

Microplacile (R1):

Înainte de deschiderea ambalajului vidat ce conține o substanță de deshidratare, lăsați microplaca să ajungă la temperatura ambiantă (+18°C/+30°C) în ambalajul de protecție, cu scopul preîntâmpinării condensării apei în godeuri. Deschideți la punctul de sudură și reintroduceți imediat barețele nefolosite în ambalaj.

Închideți ermetic ambalajul, eliminând aerul din interior, apoi păstrați la 2°C - 8°C.

2 - Reactivi de preparat

Proteinaza K:

Reactivul A este tamponul de diluare a proteinazei K.

Soluția trebuie preparată după cum urmează (4 μl de proteinază K în 1 ml de reactiv A) :

NUMĂRUL DE PROBE	REACTIV A	PROTEINAZĂ K
2	1 ml	4 μl
10	3 ml	12 μl
18	5 ml	20 μl
26	7 ml	28 μl
34	9 ml	36 μl
42	11 ml	44 μl
50	13 ml	52 μl
58	15 ml	60 μl
66	17 ml	68 μl
74	19 ml	76 μl
82	21 ml	84 μl
90	23 ml	92 μl

Volumele indicate trebuie pipetate exact. Vârful de pipetă ce conține PK trebuie clătit corect prin cicluri succesive de aspirație/ejecție în reactivul A.

După reconstituire, omogenizați soluția prin răsturnarea de câteva ori a flaconului, până la obținerea unei soluții omogene de culoare roșie.

Soluția de spălare (R2):

Diluati soluția de spălare R2 în proporție de 1/10 ori cu apă distilată sau apă ultrapură (de exemplu 100 ml de reactiv R2 se diluează cu 900 ml de apă distilată).

Controlul pozitiv (R4):

Loviți de masa de laborator cu blândețe flaconul cu controlul pozitiv (R4) în scopul desprinderii substanței ce aderă eventual la dopul de cauciuc. Deschideți flaconul și dizolvați conținutul

acestui în 4 ml de diluent R6. Astupați la loc flaconul și lăsați-l în așteptare timp de 1 minut, omogenizand delicat din când în când pentru a favoriza dizolvarea.

Conjugatul (R7):

Diluați reactivul R7 în proporție de 1/10 cu soluția de spălare proaspăt preparată (de exemplu: 0,1 ml de reactiv R7 în 0,9 ml de soluție de spălare reconstituită), ținând seama că 1 ml de conjugat gata de utilizare este suficient pentru 1 baretă. Omogenizați ușor. Evitați folosirea vortexului pentru omogenizare.

Soluția de dezvoltare enzimatică (R8 + R9):

Diluați reactivul R9 în proporție de 1/11 cu reactivul R8 (de exemplu: 0,1 ml de reactiv R9 cu 1 ml de reactiv R8), ținând cont ca 1,1 ml de soluție de revelare enzimatică este suficient pentru 1 baretă. Omogenizați delicat. Evitați folosirea vortexului pentru omogenizare.

2-5 CONSERVARE ȘI VALABILITATE

Trusa TeSeE SAP Combi trebuie păstrată la o temperatură cuprinsă între +2°C și +8°C. Toți reactivii sunt stabili la această temperatură până la data indicată pe trusă (înainte și după deschiderea flacoanelor).

După diluție soluția de proteinază K reconstituită păstrată la temperatura camerei (+18°C până la +30°C) trebuie utilizată în maxim 6 ore.

Valabilitatea reactivilor după reconstituire este următoarea:

ETICHETĂ	REACTIVI	VALABILITATE
R1	Microplaca în punga închisă ermetic	1 lună la +2°C +8°C
R2	Soluția de spălare diluată	24 de ore la temperatura ambiantă (+18°C la +30°C) 2 săptămâni la +2°C +8°C
R4	Control pozitiv reconstituit	2 ore la temperatura ambiantă (+18°C +30°C) 4 ore la +2°C +8°C 6 luni la -20°C Se recomandă să divizați soluția reconstituită în alicote de 0,5 ml și să le depozitați imediat la -20°C. Nu congelați/decongelați mai mult de 3 ori.
R7	Soluția de conjugat reconstituit (în soluția de spălare diluată)	8 ore la temperatura ambiantă (+18°C +30°C)
R8 + R9	Soluția de revelare enzimatică	6 ore la temperatura ambiantă (+18°C +30°C), obligatoriu la întuneric

2-6 MODUL DE LUCRU

Pentru metoda semi-automată a protocolului de purificare, vă rugăm să consultați manualul de utilizare a sistemului TeSeE NSP.

Procedeul de lucru manual :

1. Prelevarea probelor:

- Pentru probele prelevate de la nivelul obexului recoltați o cantitate de 350 +/- 40 mg de țesut nervos.
- Pentru probele de noduli limfoizi retrofaringieni, introduceți o sferă medie înainte de a introduce proba în tubul de omogenizare (cod : 3551171).

Recoltați o masă de 200 mg $\pm$ 20 mg de țesut din 2-3 zone diferite din afara cortexului nodulului limfoid. Taiati tesutul in 2-3 bucati mai mici.

Introduceți probele în tuburile de omogenizare. Inchideți bine tuburile și treceți la etapa de omogenizare în omogenizator (sistemul Ribolyser® sau TeSeE™ PRECESS 24™ sau Precellys Evolution system).

Notă : Urmăriți concluziile raportate de către EFSA ca Opinie științifică asupra bolii cronice cahectizante(II), Panoul EFSA privind Pericolele Biologice(BIOHAZ), Jurnalul EFSA 2018 ;16(1):5132, 59 pp., Laboratorul European de Referință EURL recomandă în mod curent ghidul EURL(Ghidul TSE EU Laboratorul de Referință Reference Laboratory pentru detectia bolii cronice cahectizante la cervide, <ftp://ftp.izsto.it/EURL%20TSE/RAPID%20TESTS/Test%20protocols/>) privind testarea atât a obexului cât și a nodulilor limfoizi retrofaringieni pentru detectia CWD la cervide, pentru a maximiza sensibilitatea supravegherii. Pentru mai multe informații, adresați-vă Laboratorului National de Referință.

* Vă rugăm să rețineți că în Germania trebuie întreprinse atât testări individuale ale creierului, cât și ale țesutului ganglionilor limfatici.

2. Omogenizarea probelor:

Notă: Atunci când pentru măcinarea eșantionului urmează să fie utilizată o perla medie, TeSeE Precess 24 nu poate fi utilizat, deoarece este posibil să apară scurgeri.

Plasați tuburile pe suportul circular al omogenizatorului. Efectuați un ciclu de agitare la parametrii următori:

	Țesut din obex		Țesut din limfonoduli	
	Ribolyser	TeSeE™ Precess 48 TeSeE™ Precess 24 Precellys Evolution	Ribolyser	TeSeE Precess 48 Precellys Evolution
Timp (sec.)	45	-	45	-
Viteză	6.5	-	6.5	-
Nr ciclurilor	2	N/A	2	N/A
Program	-	Program/ TSE 1		Program 2/TSE2

*Lăsați 5 minute pauză între fiecare ciclu de agitare pentru a permite aparatului să se racească.

Dacă omogenizarea este insuficientă, mai puteți efectua alte 1-2 cicluri suplimentare de agitare. De asemenea temperatura tubului trebuie să revină la temperatura ambiantă (18°C - 30°C) între fiecare ciclu. Acest lucru se poate realiza prin introducerea tuburilor în gheață pisată.

3. Transferul probelor:

Scoateți tuburile de omogenizare din omogenizator, resuspendați conținutul prin răsturnare înainte de deschide tuburile.

Transferați omogenatul prin una din următoarele metode:

- **Metoda seringii de calibrare**

Prelevați 250 µl cu ajutorul seringii de calibrare (cod : 3551174 sau Ref : 12007909), având grijă să scufundați acul seringii dedesubtul stratului de sfere ceramice, pentru a preveni aspirarea fragmentelor de țesut omogenizate necorespunzător.

Transferați fiecare porție de 250 µl într-o eprubeta Eppendorf de 2 ml sau într-o microplacă cu godeuri adânci (cod : 3590132).

- **Metoda plăcii filtrante**

Transferul și filtrarea se fac separat utilizând o placă filtrantă (cod : 3551179) și o placă cu godeuri adânci (cod : 3590132), utilizând una din următoarele tehnici de filtrare.

- Tehnica de vid :

Potriveți placa cu godeuri adânci (cod : 3590132) (placa principală) în partea de jos a dispozitivului de vid, așezați ghidajul dispozitivului și apoi placa filtrantă (cod : 3551179). Prelevați cel puțin 400µl ($\leq 1000\mu\text{l}$) cu un vârful de 1000µl și transferați într-un godeu al plăcii filtrante (cod : 3551179), excludeți primele 6 poziții (de la A1 la F1). Lipiți o folie de plastic deasupra plăcii de filtrare. Setați manometrul de vid al pompei (cod : 3590350) la 25,4 cm Hg ($\pm 2,5\%$). Comutați mecanismul pe pompă și verificați manometrul pentru un vid corect, apoi deschideți valva dispozitivului pentru 1 min $\pm$ 6 secunde. Închideți valva, dezactivați pompa și realizați vidul de la dispozitiv.

- Tehnica de centrifugare :

Transferați cel puțin 400 µl ($\leq 1000\mu\text{l}$) cu un vârful de 1000 µl în fiecare godeu al plăcii filtrante (cod 3551179), întâi montate pe o placă cu godeuri adânci (cod 3590132) (placa principală), excludeți primele 6 poziții (de la A1 la F1). Lipiți o folie de plastic deasupra plăcii de filtrare. Centrifugați ansamblul (placa filtrantă și placa cu godeuri adânci) pentru 1 min la 500 g. Aveți grijă să țineți placa filtrantă în siguranță, pe poziție, pe placa cu godeuri adânci.

Notă : Centrifuga trebuie să fie echipată cu rotor pentru microplaci cu godeuri adânci (cod : 3590136) corespunzătoare centrifugii Eppendorf 5804R (code: 3591396).

După fiecare tehnică aruncați placa filtrantă și transferați 250 µl din probele filtrate într-o altă placă cu godeuri adânci (placa de purificare) pentru protocolul manual sau așezați direct placa principală la bordul NSP (studiați manualul de operare al NSP TeSeE™).

Notă: În această etapă, omogenatele rămase în tuburile de omogenizare, micro-tuburile și placa cu godeuri adânci după transferul probelor pot fi pastrate închise:

	la temperatura ambiantă (+18°C la +30°C) timp de 8 ore	la +2°C/+8°C (în gheață sau în frigider) timp de 15 ore	la congelator la -20°C timp de 1 an*
Tuburi de omogenizare sau micro tuburi	DA	DA	DA
Placa cu godeuri adânci	DA	DA	NU

*Esantioanele înghețate se dezgheata la temperatura ambiantă (18°C - 30°C). Esantioanele pot fi supuse la cel mult de 3 cicluri de congelare/decongelare. Înainte de repunerea în lucru, probele trebuie omogenizate întotdeauna prin răsturnare.

4. Tratamentul cu proteinază K (PK):

Repartizați 250 μ l ($\pm$ 10%) de soluție de PK diluată (vedeti paragraful 2.4) în fiecare microtub sau placa de purificare. Nu depășiți intervalul de 5 minute pentru distributia proteinazei K reconstituite între prima și ultima proba. Omogenizați imediat prin rasturnare de 10 ori tuburile închise bine sau placile cu godeuri adanci sigilate cu folie de aluminiu. Nu depășiți 2 minute între omogenizare și incubarea la 37°C.

Incubați la 37 $\pm$ 2°C într-o baie uscată termostată (termobloc), timp de 10 $\pm$ 1 minute.

Notă: Dacă utilizați placă cu godeuri adânci, baia uscată termostată (termoblocul) trebuie să fie echipată cu suport adaptat pentru astfel de plăci.

5. Precipitarea PrP^{Sc} cu reactivul B:

Scoateți microtuburile sau placa cu godeuri adânci din termobloc. Deschideți tuburile și distribuiți 250 μ l ($\pm$ 10%) de reactiv B în toate micro-tuburile sau in godeurile microplacii cu godeuri adânci. Respectați aceeași ordine de pipetare ca și în etapa 4. Nu depășiți intervalul de 2 minute între scoaterea din incubator și etapa de omogenizare cu reactivul B. Omogenizarea se face în aceleași condiții ca și în etapa 4.

6. Concentrarea PrP^{Sc} (centrifugare):

În cel mult 30 minute după distribuirea și amestecarea reactivului B: centrifugați microtuburile sau placa de purificare după cum urmează :

Centrifugare	Micro tuburi		Placă cu godeuri adânci
Viteză (g)	20 000	15 000	2 000
Timp (mm)	5	7	10
Temperatură (°C)	20	20	4

Notă: Pentru plăcile cu godeuri adânci alocăți 5 minute în plus la 37°C sau 10 minute în plus la temperatura camerei (între 18°C - 30°C) înainte de centrifugare.

7. Clarificarea probelor:

Eliminați supernatantul prin răsturnarea micro-tuburilor deasupra unui recipient de deșeuri biologice. Uscați bine microtuburile răsturnându-le pe o hârtie absorbantă timp de 5 minute.

Sau încălcați placa cu godeuri adânci pe unitatea DW40 (cod : 3590137). Selectați programul «TSE DW » și selectați numărul de barete care vor fi folosite. Placa cu godeuri adânci trebuie să fie uscată la sfârșitul procesului DW40, prin răsturnarea plăcii pe hârtie absorbantă timp de 5 minute.

Adăugați 25 μ l ($\pm$ 10%) de reactiv C în fiecare microtub sau godeu adanc.

Nu depășiți intervalul de 10 minute între sfârșitul operației de uscare a tuburilor și repartiția reactivului C.

Incubați imediat timp de 5 $\pm$ 1 minute la 100°C $\pm$ 5°C. Nu depășiți 2 minute între adăugarea reactivului C și începutul incubării. Microplaca cu godeuri adanci nu trebuie sigilată în timpul incubării.

Notă: Dacă utilizați placă cu godeuri adânci, baia uscată termostată (termoblocul) trebuie să fie echipată cu suport adaptat pentru astfel de plăci.

Scoateți microtuburile sau placa cu godeuri adânci din incubator și omogenizați-le la vortex (5 $\pm$ 2 secunde).

Probele din micro tuburi sau placa cu godeuri adanci pot fi conservate 5 ore la 2°C - 8°C sau congelate 72 de ore la -20°C. Probele congelate trebuie dezghețate la temperatura camerei (18°C - 30°C) și omogenizate cu un vortex (5 $\pm$ 2 secunde).

Probele purificate se diluează cu 125 μ l ($\pm$ 10%) reactiv R6. Probele diluate trebuie omogenizate cu un vortex (5 sec. $\pm$ 2 sec.) chiar înainte de distribuirea lor în placa (R1).

1. Scoateți cadrul suport și numărul de barete necesare (R1) din ambalajul protector. Reintroduceți în ambalaj baretele nefolosite împreună cu materialul deshidratant și închideți ambalajul ermetic.
2. Preparați controlul pozitiv (R4) conform indicațiilor din capitolul 2.4.2.
3. Pentru fiecare serie de teste și fiecare microplacă pipetați 100 μ l ($\pm$ 10%) de martor/probe în godeuri în ordinea de mai jos.
 - Godeurile A1, B1, C1, D1: control negativ (R3)
 - Godeurile E1, F1: control pozitiv (R4)
 - Godeurile G1, H1, etc...: probe diluate cu reactivul R6.
 Probele se lucrează în singlet.
4. Acoperiți placa cu folie adezivă și incubați timp de 30 min $\pm$ 2 min la 37°C $\pm$ 2°C.
5. Preparați soluția de spălare (R2).
6. Preparați soluția de conjugat (R7).
7. Îndepărtați folia adezivă și efectuați 3 cicluri de spălare.
 Condițiile optime de spălare se realizează cu spălătoarele de microplăci PW40, PW41 sau 1575 de la Bio-Rad, cu programul TSE 3.
 Nu lăsați microplaca goală mai mult de 5 minute după ultimul ciclu de spălare. Înainte de a trece la următoarea etapă, scurgeți bine baretele prin răsturnare pe o hârtie absorbantă.
8. Adăugați 100 μ l ($\pm$ 10%) de soluție de conjugat (R7) în fiecare godeu.
9. Acoperiți cu folie adezivă și incubați 30 min $\pm$ 2 min la 2°C - 8°C.
10. Preparați soluția de revelare enzimatică (R8 + R9).
11. Îndepărtați folia adezivă și efectuați 5 cicluri de spălare.
 Condițiile optime de spălare se realizează prin folosirea spălătoarelor de microplăci PW40, PW41 sau 1575 de la Bio-Rad cu programul TSE 5.
 Nu lăsați microplaca goală mai mult de 5 min după ultimul ciclu de spălare. Înainte de a trece la etapa următoare, uscați bine baretele prin răsturnare pe hârtie absorbantă.
12. Adăugați 100 μ l ($\pm$ 10%) de soluție de revelare (R8 + R9) în fiecare godeu și lăsați microplaca la întuneric și la temperatura ambiantă (18°C - 30°C) timp de 30 min $\pm$ 5 min. Nu acoperiți cu folie adezivă pe durata acestei incubări.
13. Adăugați 100 μ l ($\pm$ 10%) de soluție de stopare (R10) în fiecare godeu, în aceeași secvență și în același ritm de distribuție cu cele realizate în etapa de pipetare a soluției de revelare.
14. Stergeți bine fundul plăcii și citiți densitățile optice la 450 nm - 620 nm (mod bicromatic) în maxim 30 minute de la stoparea reacției enzimatică (baretele NU trebuie expuse la lumină înainte de citire).

Parametrii de spalare a microplacilor

NAME: TSE 3

EDIT mode function	PLATE	Monifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROS SW ASP	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	1*8 (PW40/1575) 2*8 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0,3	800	2,5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	3	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP	Plate	Yes	0,3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NAME: TSE 5

EDIT mode function	PLATE	Monifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROS SW ASP	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	1*8 (PW40/1575) 2*8 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0,3	800	2,5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	5	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP	Plate	Yes	0,3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

PLATE NAME: FLAT 01 (PW40/PW41) - FLAT 03 (1575)

BOT. SHAPE	ASP. HOR. POS.	CENTERING	ASP. VERT. POS.	BOT. VERT. POS.	B.W. VERT. POS.	HORIZONTAL SPEED	VERTICAL SPEED	ASP. DOWNW. SPEED	DISP. UPW. SPEED	BOT. DOWNW. SPEED	BOT. UPWARD SPEED	SHAKING AMPLITUDE	SHAKING SPEED
Flat	1,4	0,3	13,5	9,5	9,5	6	8	6	9	6	9	1	9

2-7 CALCULUL ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

1) Calculul mediei densităților optice (DO) la controlul negativ

DO R3 = media celor 4 valori ale DO citite în godeurile R3

2) Calculul valorii cut-off (prag)

2.1. Probe de la bovine si rumegătoare mici

Valoarea prag este egala cu: $\overline{DO\ R3} + 0,210$

Exemplu:

DO R3 = 0,020

Valoarea prag = $0,020 + 0,210 = 0,230$

2.2. Probe de la cervide

Valoarea prag este egala cu: $DO\ R3 + 0,110$

Exemplu:

DO R3 = 0,020

Valoarea prag = $0,020 + 0,110 = 0,130$

3) Condițiile de validare a testului

• **Controlul negativ (R3):**

a) *Validarea valorilor individuale ale controlului negativ:*

Densitatea optică a fiecarui godeu negativ trebuie să fie mai mica de 0,150.

Cu toate acestea, se poate elimina cel mult o valoare aberantă dacă aceasta este mai mare sau egală cu 0,150.

Testul trebuie repetat dacă mai mult de o valoare a controlului negativ depășește această limită.

b) *Omogenitatea valorilor controlului negativ:*

Calculați absorbția medie a controalelor negative cu valorile individuale valide rămase.

Valorile individuale ce depășesc media controalelor negative cu + 40% ($DO\ R3 + 40\%$) trebuie eliminate.

-Dacă s-a eliminat o valoare la punctul a), se mai poate elimina încă o valoare la punctul b).

-Dacă nu s-a eliminat nici o valoare la punctul a), se pot elimina maxim două valori la punctul b).

Testarea trebuie repetată dacă mai mult de două valori ale controlului negativ au fost eliminate conform criteriilor a)+b).

• **Controlul pozitiv (R4):**

Media densităților optice obținute pentru controlul pozitiv (DO R4) trebuie să fie mai mare sau egală cu 1,000.

Testarea trebuie repetată dacă media densitatilor optice obținute pentru controlul pozitiv (DO R4) este mai mică decât această limită.

4) Interpretarea rezultatelor:

Probele ale căror densități optice sunt mai mici decât valoarea prag (cut-off) se consider ca fiind negative conform instrucțiunilor trusei TeSeE SAP.

Totuși, rezultatele situate chiar sub valoarea prag (valoarea prag -10%) trebuie interpretate cu prudență, iar probele corespunzătoare trebuie retestate în duplicat, pornind de la omogenatul original.

Eșantioanele ale caror densitati optice sunt mai mari sau egale cu valoarea prag sunt

considerate ca inițial reactive conform cu instrucțiunile trusei TeSeE SAP și trebuie retestate în duplicat pornind de la omogenatul original, înainte de interpretarea definitivă.

După repetarea testării, eșantionul se clasifică ca fiind pozitiv în conformitate cu instrucțiunile trusei TeSeE SAP dacă cel puțin una din cele 2 măsuratori este pozitivă (mai mare sau egală cu valoarea prag). Proba se va clasifica ca fiind negativă în conformitate cu instrucțiunile trusei TeSeE SAP atunci când cele două valori sunt mai mici decât valoarea prag.

Eșantioanele retestate în duplicat și găsite negative în conformitate cu instrucțiunile trusei TeSeE SAP, dar pentru care una din cele două valori la repetare este apropiată de valoarea prag (valoarea prag - 10%) trebuie interpretate cu prudență.

2-8 LIMITELE TESTULUI

Pot apărea dificultăți la etapa de omogenizare în cazul în care folosiți eșantioane deshidratate sau țesuturi periferice. Dacă este necesar, pentru aceste tipuri de eșantioane etapa de omogenizare (etapa nr. 2 din protocolul de lucru) va trebui eventual repetată de mai multe ori.

Un rezultat negativ înseamnă că eșantionul analizat nu conține PrP^{Sc} în cantități detectabile la testarea cu trusele TeSeE™ SAP Combi. Totuși, deoarece este posibil ca nivelele scăzute de PrP^{Sc} să nu poată fi detectate, un rezultat negativ nu poate exclude definitiv posibilitatea unei infecții.

Orice eșantion care generează un rezultat pozitiv reproductibil în conformitate cu criteriile de interpretare ale testului, trebuie confirmat în acord cu reglementările în vigoare cu laboratorul național de referință sau cu laboratorul comunitar de referință în circumstanțe excepționale.

3 - MATERIALE NECESARE NEINCLUSE ÎN TRUSĂ

- Apă distilată sau apă ultrapură.
- Hipoclorit de sodiu 20000 ppm (concentrație finală) și soluție de hidroxid de sodiu de 1M (concentrație finală).
- Hârtie absorbantă.
- Mănuși de unică utilizare
- Ochelari de protecție sau mască cu vizieră.

Etapa de purificare:

- Microtuburi de 2 ml de polipropilenă, cu dop și stativ corespunzător.
- Pipete reglabile automate sau semiautomate, pentru pipetare volume de la 20 la 500 μL
- Omogenizator de țesuturi: Ribolyser TeSeE™ PRECESS 24 sau TeSeE™ PRECESS 48 sau Precellys Evolution)
- Centrifuga* adaptată microtuburilor folosite.
- Un incubator uscat termobloc* pentru microtuburi termostatat la 37°C ± 2°C și un al doilea incubator termostatat la 100°C ± 5°C.

Pentru purificarea semiautomata a probelor: sistemul TeSeE™ NSP.

Etapa de detecție:

- Pipete fixe sau reglabile automate sau semiautomate, pentru pipetare 50, 100, 200 și 1000 μL.
- Eprubete gradate de 10 ml, 20 ml și 100 ml.
- Containere pentru deșeuri contaminate.
- Incubator pentru microplaci termostatat la 37°C ± 2°C.
- Camera rece de 2°C - 8°C.
- Spălător* de microplăci automat sau semiautomat.

- Cititor de microplăci* (echipat cu filtre de 450 nm și 620 nm).
- Cititor de microplăci* pentru automatizarea etapelor protocolului de lucru. Performanțele sistemului trebuie să răspundă cerințelor protocolului de testare.

* Contactați Bio-Rad pentru lista instrumentelor disponibile.

4 - PRECAUȚII

Calitatea rezultatelor depinde de respectarea bunelor practici de laborator, după cum urmează:

- Reactivii trebuie păstrați la 2°C - 8°C.
- Nu folosiți reactivi expirați.
- Nu folosiți soluție de proteinază K reconstituită și păstrată la temperatura ambiantă (+18°C + 30°C) mai mult de 6 ore.
- Nu amestecați în aceeași serie de lucru reactivi din truse TeSeE SAP Combi din loturi diferite, cu excepția reactivilor generici: soluție de spălare (R2), diluent de probe (R6), substrat tamponat pentru peroxidază (R8), cromogen (R9), soluție de stopare (R10), tuburi de omogenizare, reactiv A și reactiv B.
- Soluția de spălare (R2), diluentul de probe (R6), substratul tamponat pentru peroxidază (R8), cromogenul (R9), soluția de stopare (R10) și tuburile de omogenizare se pot folosi cu toate trusele din gama TeSeE™ (TeSeE™ și TeSeE SAP și TeSeE ovine/caprine).
- Lăsați reactivii să revină la temperatura ambiantă (+18°C - 30°C) timp de 30 minute înainte de utilizare.
- Reconstituiți cu grijă reactivii, evitând orice posibilitate de contaminare.
- Nu efectuați testarea în prezenta vaporilor reactivi (acizi, baze, aldehide) sau a prafului, deoarece ar putea altera activitatea enzimatică a conjugatului.
- Folosiți numai eprubete de polipropilenă.
- Sticlăria trebuie spălată foarte bine, clătită cu apă distilată sau preferabil de unică folosință.
- Nu lăsați microplaca mai mult de 5 minute între terminarea etapelor de spălare și pipetarea următorului reactiv.
- Reacția enzimatică este foarte sensibilă la contactul cu metale sau ioni metalici. Prin urmare, nici un element metalic nu trebuie să intre în contact cu soluțiile care conțin conjugat sau substrat.
- Soluția de revelare (substratul tamponat + cromogenul) trebuie să fie incoloră. Apariția unei colorații la câteva minute după reconstituire indică faptul că acesta nu poate fi utilizat și trebuie înlocuit. Soluția de revelare trebuie să fie preparată, de preferință în recipiente de plastic de unică utilizare, iar recipientele din care se distribuie sau de sticlăria să fie spălate în prealabil cu acid clorhidric 1 N, clătite temeinic cu apă distilată și uscate. Păstrați aceasta soluție de revelare la întuneric.
- Schimbați vârfurile de pipetă la fiecare eșantion.
- Spălarea godeurilor reprezintă o etapă esențială a protocolului de lucru: respectați numărul de cicluri de spălare recomandat și verificați ca toate godeurile să fie umplute complet, apoi golite complet. O spălare prost efectuată poate genera rezultate incorecte.
- Nu folosiți niciodată același recipient și aceeași pipetă pentru pipetarea conjugatului și a soluției de revelare.

5 - MĂSURI DE IGIENĂ ȘI PROTECȚIA MUNCII

În general, măsurile de igienă, de biosecuritate și bunele practici de laborator se stabilesc în conformitate cu recomandările autorității de reglementare din fiecare țară.

- Toți reactivii trusei sunt destinați exclusiv diagnosticului *in vitro*.
- Purtați mănuși de unică folosință la manipularea reactivilor și a probelor și spălați-vă mâinile cu grijă după încetarea lucrului.
- Nu pipetați niciodată cu gura.

- Utilizați recipiente de polipropilenă pentru evitarea rănirii cu sticlărie spartă.
- Orice material ce vine în contact cu eșantioanele și soluțiile de spălare trebuie tratate ca materiale contaminate.
- Evitați stropirea cu probe sau cu soluții ce conțin probe de testat.
- Suprafețele contaminate trebuie curățate cu hipoclorit de sodiu 20000 ppm (clor). Dacă lichidul de contaminare este un acid, suprafețele contaminate trebuie mai întâi neutralizate cu hidroxid de sodiu înainte de aplicarea clorului. Suprafețele trebuie clătite cu apă distilată, uscate cu etanol și șterse cu hârtie absorbantă. Materialele folosite la curățenie trebuie aruncate într-un recipient special pentru deșeuri contaminate.
- Eșantioanele, materialele și produsele contaminate trebuie eliminate după decontaminare:
 - fie prin scufundare în hidroxid de sodiu 1M (concentrație finală) timp de 1 oră la temperatura ambiantă (+18°C + 30°C).
 - fie prin scufundare în hipoclorit de sodiu 20000 ppm timp de 1 oră la temperatura ambiantă (+18°C + 30°C).
 - sau prin autoclavare la minim 134°C cel puțin 18 minute, la presiune 3 bari.

Nota: NU SE SUPUN AUTOCLAVĂRII soluțiile ce conțin hipoclorit de sodiu sau reactiv B.

- Orice operație legată de realizarea testului de depistare a unei encefalopatii spongiforme transmisibile (EST) face obiectul unor reglementări stricte și trebuie efectuată într-un laborator izolat, în care accesul este limitat și controlat, destinat în exclusivitate acestei activități. Operatorul trebuie să poarte echipament de protecție, halat, încălțăminte suplimentară de protecție (botoși de plastic), mănuși, mască cu vizieră sau una simplă și ochelari de protecție.
- Operatorii trebuie să fie instruiți în mod special în ceea ce privește riscul lucrului cu agenții EST sau prioni și asupra modalităților de decontaminare validate pentru agenții infecțioși neconvenționali. Măsurile de biosecuritate trebuie să fie conforme cu recomandările autorității responsabilă cu reglementările la nivel național.
- Evitați orice contact al pielii sau mucoaselor cu tamponul substrat, cromogenul și soluția de stopare.
- Înainte de eliminare, neutralizați și/sau autoclavați orice soluție de spălare sau lichidele de spălare folosite, cât și orice lichid ce conține probele biologice.
- Pentru recomandări referitoare la hazard și măsuri de precauție pentru aceasta trusa, vă rugăm să țineți cont de pictogramele redată pe etichetele flacoanelor de reactivi și de informațiile furnizate la sfârșitul acestui document cu instrucțiuni de utilizare. Fișa tehnică de siguranță se regăsește pe site-ul producătorului www.bio-rad.com.

6 – BIBLIOGRAFIE

1. J. GRASSI, E. COMOY, S. SIMON, C. CREMINON, Y. FROBERT, S. TRAPMANN, H. SCHIMMEL, S.A.C. HAWKINS, J. MOYNAGH, JP DESLYS, G.A.H. WELLS (2001) Rapid Test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. The Veterinary Record (149) 577-582.
2. JP. DESLYS, E. COMOY, S. HAWKINS, S. SIMON, H. SCHIMMEL, G. WELLS, J. GRASSI, J. MOYNAGH (2001) Screening slaughtered cattle for BSE - Nature (409) 476-477.
3. E. COMOY (2000) Contribution au développement d'un test de diagnostic post mortem des bovins atteints d'Encephalopathie Spongiforme Bovine. Thèse de doctorat vétérinaire (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort).

4. EUROPEAN COMMISSION Directorate General DG XXIV (1999). Preliminary Report : The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible Spongiform Encephalopathy in bovines.
5. JP. DESLYS (1999) Prevention du risque d'Encephalopathie Spongiforme Subaiguë Transmissible. La Revue du Praticien (49) 966-970.
6. R. KNIGHT (1999) The relationship between new variant Creutzfeldt-Jakob Disease and Bovine Spongiform Encephalopathy - Vox sanguinis (76) 203-208.
7. D. DORMONT (1997) Les Agents Transmissibles Non Conventionnels ou prions - Virologie (1) 11-22
8. F. HILLA, M. DESBRULAI, S. JOINER, KCL SIDLE, I. GOWLAND, J. COLLINGE, LJ. DOEY, P. LANTOS (1997) The same prion strain causes CJ disease and BSE - Nature (389) 448-450.
9. Cl. LASMEZAS, JP. DESLYS, O. ROBAIN, D. DORMONT (1997) L'agent secret des maladies à prions - La Recherche 46-53.
10. AM. HAYWOOD (1997) Transmissible Spongiform Encephalopathies. The New England Journal of Medicine (337-25) 1821-1828.
11. J. COLLINGE, KC. SIDLE, J. MEADS, J. IRONSDIE, AF. HILL (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD. Nature (383) 685-690.
12. RG. WILL, J. IRONSDIE, M. ZEIDLER, SN. COUSENS, K. ESTIBEIRO, A. ALPEROVITCH, S. POSER, M. POCCHIARI, A. HOFMAN, PG. SMITH (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the U.K. - Lancet (347) 911-925.
13. SB. PRUSINER & AL (1993) Immunologic and molecular biologic studies of prion protein in Bovine Spongiform Encephalopathy. The Journal of Infectious Diseases (167) 602-613

Seringa de prelevare

cod 3551175

**METODA DE PRELEVARE A PROBELOR PENTRU TESTELE BIO-RAD DE
SCREENING EST**



CUPRINS

1 – GENERALITĂȚI

1-1 PRELEVAREA PROBELOR LA ABATOR

1-2 PRLEVAREA EȘANTIOANELOR DE TESTAT ÎN LABORATOR

2 – SERINGA DE PRELEVARE BIO-RAD

3 – CANTITATEA DE PROBĂ NECESARĂ TESTĂRII

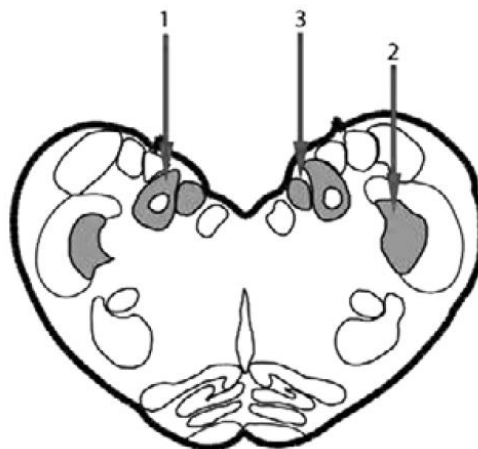
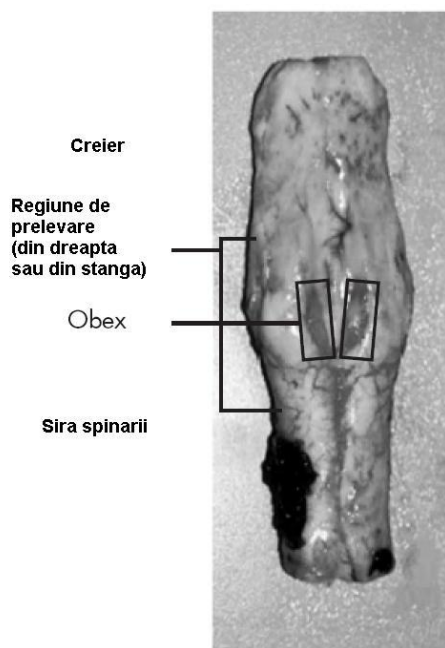
4 – MODUL DE LUCRU

5 – PRECAUȚII/SFATURI UTILE

6 – MĂSURI DE IGIENĂ ȘI PROTECȚIA MUNCII

1 – GENERALITĂȚI

Testele Bio-Rad TSE de screening se execută din prelevate de 350 ± 40 mg de țesut nervos central (SNC). Regiunea anatomică specifică destinată detecției PrP^{Sc} la animalele infectate este trunchiul cerebral, mai exact aria nucleului nervului vag, în regiunea obexului. Această regiune este aria trunchiului cerebral în care PrP^{Sc} are cea mai mare concentrație.



Secțiune a trunchiului cerebral la nivelul obexului reprezentând situsurile țintă pentru diagnosticul histopatologic și imunohistochimic în ESB (nucleul tractului solitar [1] și nucleul tractului V trigeminal [2]) și în scrapie (nucleul dorsal al nervului vag [3]). (Sursă: OIE - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals)

1 - 1 Prelevarea probelor la abator

Trunchiul cerebral se prelevează ușor și repede cu ajutorul unei linguri speciale sau al altui dispozitiv adecvat, prin foramenul occipital, fără deschiderea cavității craniene.



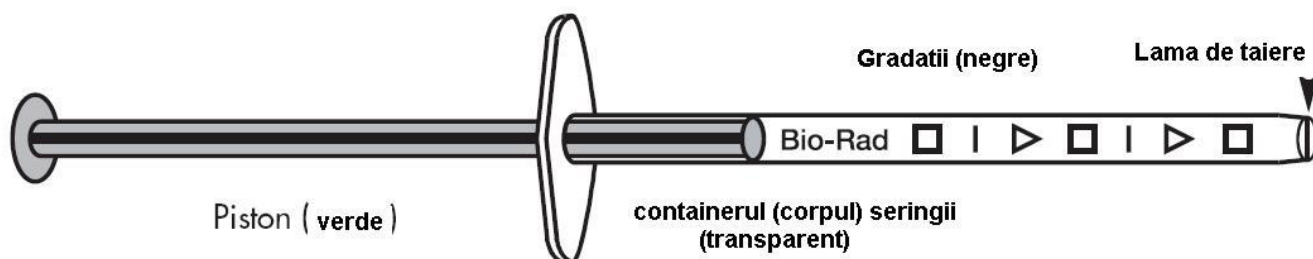
1 - 2 Prelevarea eșantioanelor de testat în laborator

Întregul trunchi cerebral se trimite la laborator pentru testare, asigurându-se respectarea măsurilor de biosecuritate recomandate de autoritatea de reglementare din fiecare țară. În laborator se va tăia cantitatea adecvată de material cerebral (cu un bisturiu,...) din regiunea obexului, folosind pentru prelevare seringă specială de prelevare **Bio-Rad sample syringe (cod: 3551175)** ce asigură recoltarea rapidă și sigură a cantității necesare de material din aria recomandată, fără risc de rănire.

În cele ce urmează se descrie procedeul propriu-zis de colectare a probelor din regiunea obexului folosind seringă de prelevare Bio-Rad, fără a deteriora țesutul prelevat.

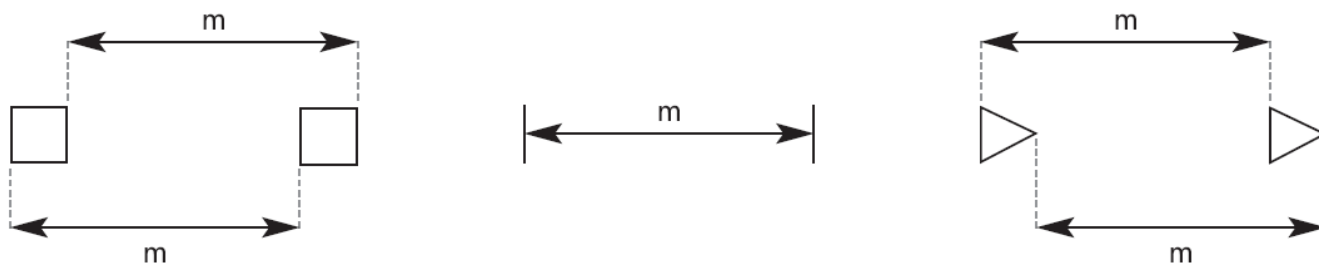
2 – SERINGA BIO-RAD DE PRELEVARE PROBE

Seringa Bio-Rad este alcătuită dintr-un piston de culoare verde și un corp de seringă transparent. Corpul seringii este gradat prin serii de forme geometrice (□ ▷ |).



3 - CANTITATEA DE PROBĂ NECESARĂ TESTĂRII

Masa de probă recoltată trebuie să ocupe spațiul dintre două simboluri de aceeași formă, corespunzător unei mase (m) de 350 +/- 40 mg.



4 – MODUL DE LUCRU

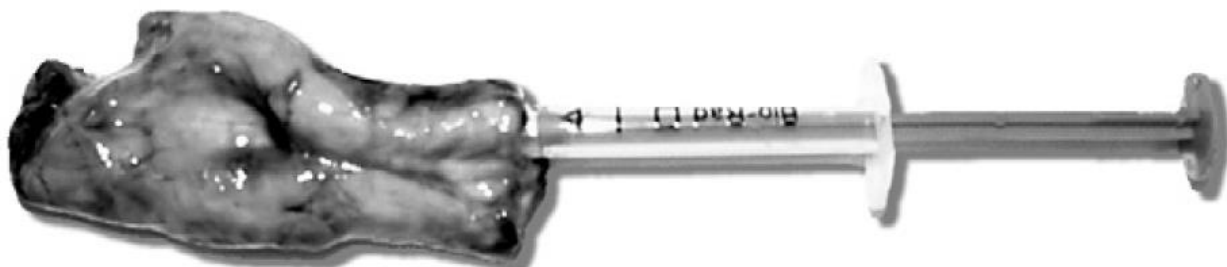
- Luați o seringă de prelevare și trageți în afară pistonul verde până la aproximativ 1 cm de garda corpului seringii, apoi împingeți pistonul înapoi în poziția de bază.
- Apucați ferm trunchiul cerebral cu o mână, folosind o bucată de folie de unică folosință (de exemplu o bucată de pungă de plastic, mănușă, etc.) pentru evitarea contaminării probelor între ele. Capătul terminal al trunchiului cerebral trebuie să rămână accesibil. Dacă trunchiul cerebral recepționat are măduva prea lungă, trebuie să o scurtați. Persoanele care efectuează prelevările trebuie instruite în legătură cu localizarea precisă a zonei de interes pentru prelevare.
- Folosiți cealaltă mână pentru a plasa capătul deschis al seringii de prelevare în partea dreaptă sau în partea stângă a capătului caudal al trunchiului cerebral.

Notă: după recoltarea probei, o semisecțiune completă a trunchiului cerebral cu o regiune intactă de obex trebuie să rămână disponibilă pentru testarea de confirmare.



- Introduceți treptat corpul seringii în trunchiul cerebral în timp ce țineți nemișcat pistonul verde (relativ la trunchiul cerebral).

Notă: Pe durata colectării probei din regiunea obexului, aveți grijă ca corpul seringii să rămână în jumătatea trunchiului cerebral aleasă pentru prelevare.



- Opriti mișcarea atunci când capătul corpului seringii a atins limita superioară a zonei de prelevare.
- Tăiați miezul probei prin răsucirea corpului seringii cu o tură completă.
- Scoateți încet seringă de prelevare din trunchiul cerebral, având grijă să nu deteriorați țesuturile din jur. Trunchiul cerebral rămas poate fi reintrodus în containerul său original.
- Verificați dacă s-au prins bule de aer în porțiunea de probă recoltată. La nevoie comprimați proba închizând capătul corpului seringii și presând cu pistonul verde până la eliminarea bulelor de aer. În același timp, asigurați-vă că nu se pierde țesut pe lângă deschiderea corpului seringii.
- Ținând astupat capătul corpului seringii, deplasați pistonul verde până la cel mai apropiat simbol marcat pe corpul seringii.
- Verificați că proba prelevată acoperă cel puțin o zonă "m" corespunzătoare, așa cum este definită în capitolul anterior al acestui document (reprezentând masa de probă necesară testării).
- Luați un tub de omogenizare și scoateți-i capacul, iar cu seringă de prelevare împingeți cu grijă pistonul verde până la următorul simbol identic pentru a realiza depunerea unei cantități corecte de țesut ("m") în eprubeta de omogenizare. Reamintiți-vă că mișcarea pistonului trebuie să atingă poziția corespunzătoare următorului simbol, așa cum este indicat în "Cantitatea de probă necesară testării".

- Tăiați proba prin presarea capătului seringii de prelevare contra marginii interioare a tubului de omogenizare.
- Probele de calitate proastă trebuie fie secționate sau, dacă prezintă grad avansat de autoliză, trebuie pipetate în eprubetă.
- Porțiunea nefolosită de probă din siringa de prelevare se poate păstra prin introducerea seringii de prelevare cu totul în containerul original în care rămâne și restul de trunchi cerebral.

5 – PRECAUȚII / SFATURI UTILE

Întocmai ca în cazul oricărui dispozitiv de pipetare, Bio-Rad recomandă ca operatorii ce folosesc seringi de prelevare să fie monitorizați periodic, pentru un număr semnificativ statistic de probe prelevate, asigurând în acest fel reproductibilitatea maselor de țesut prelevate.

Seringile de prelevare sunt de unică utilizare, acestea trebuie apoi aruncate pentru a preveni contaminarea încrucișată.

Proba trebuie prelevată cu toate precauțiile necesare pentru reducerea la minim a riscului de contaminare a operatorilor.

Seringile folosite se aruncă după decontaminare (consultați MĂSURILE DE IGIENĂ ȘI PROTECȚIA MUNCII).

Dacă proba prelevată nu umple întreg corpul seringii în ciuda respectării procedurii de prelevare, este recomandabil să se cântărească proba.

6 – MĂSURI DE IGIENĂ ȘI PROTECȚIA MUNCII

Condițiile de igienă, măsurile de biosecuritate și bunele practici de laborator trebuie să fie stabilite și aplicate în conformitate cu recomandările autorității de reglementare din fiecare țară.

Siringa de prelevare este destinată în exclusivitate procedurilor de diagnostic “in vitro”.

Purtați mănuși de unică folosință la manipularea reactivilor și a probelor, și spălați-vă temeinic mâinile după terminarea lucrului.

Orice echipament ce a venit în contact direct cu probele biologice trebuie considerat contaminat.

Suprafețele contaminate trebuie curățate cu soluție de hipoclorit de sodiu la concentrație 20000 ppm. Dacă lichidul de contaminare este un acid, suprafețele contaminate trebuie mai întâi neutralizate cu hidroxid de sodiu înainte de a le decontamina cu hipoclorit de sodiu. Suprafețele trebuie clătite cu apă distilată, uscate cu etanol și șterse cu șervețele absorbante. Materialele folosite la curățenie trebuie aruncate în containerul special de deșeuri contaminate.

Probele, echipamentele și produsele contaminate trebuie aruncate după decontaminarea printr-una din următoarele metode:

- prin scufundare în hidroxid de sodiu 1 M (concentrație finală) timp de 1 oră la temperatura camerei (+18°C la +30°C).
- prin scufundare în soluție de hipoclorit de sodiu 20000 ppm timp de 1 oră la temperatura camerei (+18°C la +30°C).
- prin autoclavare la o temperatură de cel puțin 134°C timp de minim 18 minute, la presiune de 3 bari.
- **Notă: Soluțiile ce conțin clor nu se autoclavează niciodată.**

Toți operatorii ce participă la testările de screening pentru encefalopatiile spongiforme transmisibile (EST) se supun măsurilor de securitate locale în vigoare și trebuie efectuate în laboratoare cu acces controlat și limitat, dedicate în exclusivitate acestui tip de activitate. Protecția muncii pentru acești operatori se asigură prin purtarea halatului de laborator sau a costumelor speciale, a botoșilor peste încălțăminte, a două perechi de mănuși și a măștii cu vizieră sau a măștii simple și a ochelarilor de protecție.

Operatorii trebuie să fie special instruiți în ceea ce privește riscul asociat cu agenții EST sau prionii, cu metodele de decontaminare validate pentru agenți infecțioși neconvenționali. Măsurile de biosecuritate trebuie să respecte indicațiile autorității de reglementare din țara vizată.