Výrobce rychlého testu musí mít zaveden a odsouhlasen s Komunitní referenční laboratoří systém kontroly kvality, který zajistí neměnnou kvalitu testu. Výrobce je povinen předložit Komunitní referenční laboratoři testovací protokol. Modifikace vzorkovacích pomůcek, rychlého testu či pracovního postupu včetně vzorkování mohou být provedeny pouze po jejich oznámení Komunitní referenční laboratoři a potvrzením, že Komunitní referenční laboratoř neshledala snížení citlivosti, specificity či spolehlivosti rychlého testu v důsledku těchto změn. Tato zpráva musí být komunikována s Komisí a Národní referenční laboratoří.

**AppliedBiosystems - PrioSTRIP BSE Kit**

**Souprava pro 480 analýz včetně kontrol (470 vzorků)**

**Testovací souprava pro in-vitro detekci TSE související PRPSC.**

**Tato testovací souprava je v rámci EU schválena jako rychlý test pro program rychlého testování skotu v návaznosti na směrnici EU No.999/201 v platném znění**

**Pracovní postup – příbalový leták** verze 3.0 CZ

**1. Úvod**

Různé tkáně zvířat infikovaných priony obsahují patologicky změněnou, pro nemoc specifickou, formu prionového proteinu (PrP).

Tento patologický prion se u skotu nazývá PrPSc. Normální isoforma PrP je označována PrPc (celulární forma PrP).

PrPSc se liší od PrPc odolností vůči proteáze. Působením proteázy je PrPc rozložen, zatímco molekulová velikost PrPSc se jen sníží z původních 32-35 kD na 27-30kD. Zbývající fragment PrPSc, odolný vůči proteázám, je dále označován PrP27-30.

Applied Biosystems- PrioSTRIP BSE kit je imunochromatografická metoda určená k detekci PrPSc v homogenátu mozkové tkáně. Přesnost a spolehlivost testu PrioSTRIP BSE kit je založena na jedinečných vlastnostech reakčních roztoků a vysoké vazebné afinitě dvou monoklonálních protilátek vázajících se na prionový protein.

**2. Princip testu**

Po odebrání a registraci jsou vzorky analyzovány pomocí imunochromatografického testu PrioSTRIP BSE kit. Jeho provedení se skládá ze čtyř kroků zahrnujících homogenizaci, proteolytické trávení, preinkubaci a detekci. 470 homogenizovaných vzorků lze analyzovat během 2,5 hodiny.

Vzorky jsou odebrány a zaevidovány. Homogenát je připraven z definované části mozkové tkáně (medulla oblongata) odebrané z oblasti obexu mozkového kmene. Strávení enzymem Proteázou K úplně rozštěpí PrPc, zatímco PrPSc je pouze redukován na fragment velikosti 27-30kD. Po zastavení proteolytické reakce, je PrPSc detekován pomocí testu PrioSTRIP BSE kit.

Strávené homogenáty jsou inkubovány s konjungátem protilátky. PrPSc obsažený v homogenátech se naváže na konjungát, což je monoklonální protilátka označená latexovými kuličkami. Ponořením hřebenu PrioSTRIP BSE kit do směsi vzorku (stráveného homogenátu) a konjungátu, začne docházet k jeho nasakování do membrány. Komplexy konjungát+PrP jsou zachyceny druhou (detekční) protilátkou v testovací lince. Volný (nenavázaný) konjugát je nasakován dál ke kontrolní lince, na kterou se váže pro kontrolu správného průběhu.

**3. Obsah soupravy**

Souprava je určena pro 470 vzorků. Uchovávejte reagencie při teplotě 5±3°C. Datum exspirace je uvedené na obalu soupravy. Doba použitelnosti zředěných, otevřených či obnovených složek je uvedena níže. Bezpečnostní předpisy a prohlášení R&S a jsou uvedeny v Příloze IV. Tohoto příbalového letáku.

**Složka 1 - Homogenizační pufr** **(5xkonc.)**

(5xkoncentrovaný, před použitím rozřeďte)

Tři lahvičky, z nichž každá obsahuje 220 ml 5xkoncentrovaného homogenizačního pufru. Pracovní homogenizační roztok připravíte smícháním 1 dílu koncentrovaného homogenizačního pufru se 4 díly ultra čisté vody.

Doba použitelnosti pracovního homogenizačního roztoku: 1 týden při teplotě 5±3°C.

Barva zátky lahvičky: fialová

**Složka 2 - Trávicí pufr** **(pro přímé použití)**

Jedna ampule obsahuje 7,5 ml trávicího pufru. Barva zátky lahvičky: bílá.

**Složka 3 - Trávicí destičky** **(bezbarvé destičky)**

5 bezbarvých mikrotitračních destiček pro proteolytické trávení.

**Složka 4 - Krycí fólie**

10 kusů krycí fólie pro překrytí trávicích destiček během inkubace.

**Složka 5 - Proteáza K** **(pro přímé použití)**

Jedna ampule obsahuje 7,5 ml Proteázy K pro trávení normálního PrPc během proteolytického trávení.

Barva zátky ampule: žlutá.

**Složka 6** **- Zastavovací roztok (pro přímé**

**použití)**

Jedna ampule obsahuje 7,5 ml roztoku, který blokuje proteolytické působení Proteázy K.

Barva zátky ampule: červená.

**Složka 7 - Vzorkový pufr (pro přímé použití)**

Jedna lahvička obsahuje 80 ml vzorkového pufru.

Barva roztoku: zelená.

**Vytemperujte na teplotu 22±3°C minimálně 2 hodiny před použitím.**

Před použitím zkontrolujte pohledem případný výskyt sraženin (rozpusťte důkladným protřepáním).

**Složka 8** **- Testovací destička (bílá destička)**

5 bílých mikrotitračních destiček s plochým dnem pro inkubaci hřebenu PrioSTRIP.

**Složka 9** - **Konjugační pufr (1x) (pro přímé použití)**

Jedna láhev obsahuje 50 ml konjugačního pufru.

Barva zátky: modrá.

**Složka 10 - Konjugát (lyofilizovaný)**

5 lahviček obsahujících lyofilizovaný konjugát modré barvy. Konjugát se rekonstituuje přidáním 9 ml konjugačního pufru (složka 9). Po obnovení okamžitě a před každým použitím důkladně promíchejte na vortexu po dobu min. 15 vteřin.

Doba použitelnosti rekonstituovaného konjugátu: 1 týden při teplotě 5±3 °C.

**Složka 11** **- PrioSTRIP hřebeny**

10 sáčků, z nichž každý obsahuje 6 hřebenů. Každý PrioSTRIP hřeben je určen k analýze 8 vzorků.

Nepoužité hřebeny vraťte zpět do sáčku, uzavřete jej a skladujte při teplotě 5±3 °C.

**Nechte vytemperovat na teplotu na 22±3 °C po dobu 30 minut před otevřením sáčku.**

Doba použitelnosti otevřených sáčků: 2 týdny při teplotě 5±3 °C

**Složka 12** **- Pozitivní kontrola (lyofilizovaná)**

5 lahviček s lyofilizovanou pozitivní kontrolou. Jedna lahvička pozitivní kontroly se rekonstituuje přidáním **nejprve** 200 µl ultra čisté vody a poté 200 µl vzorkového pufru (složka 7). Důkladně promíchejte na vortexu opakovaným převracením.

Doba použitelnosti rekonstituované kontroly: 12 hodin při teplotě 22±3 °C.

Barva zátky ampule: červená.

**Složka 13 - Negativní kontrola (lyofilizovaná)**

5 ampulí s lyofilizovanou negativní kontrolou. Jedna ampule negativní kontroly se rekonstituuje přidáním **nejprve** 200µl ultra čisté vody a poté 200 µl vzorkového pufru (složka 7). Důkladně promíchejte na vortexu opakovaným převracením.

Doba použitelnosti rekonstituované kontroly: 12 hodin při teplotě 22±3 °C.

Barva zátky ampule: bílá.

**3.1. Další materiál obsažený v soupravě**

- 5 x list PrioSTRIP formulář pro vizuální interpretaci výsledků. V případě potřeby udělejte fotokopie.

- Příbalový leták.

- Listy s nálepkami pro natištění etiket čárových kódů.

- kalibrační list šarže PrioSTRIPu

**4. Další potřebný materiál**

**Tučným písmem** zvýrazněné položky byly validovány pro použití s testem PrioSTRIP. Použití jiných zařízení je na zodpovědnosti uživatele.

**4.1. Obecné**

Laboratoř a její vybavení musí odpovídat národním bezpečnostním předpisům.

- Ultra čistá voda splňující minimálně ekvivalent stupně 3 dle ISO 3696:1987 (E)

- Jedno kanálová pipeta (10-100 µl)

- Jedno kanálová pipeta (100-1000 µl)

- Jedno kanálová pipeta (1-5 ml)

- Multikanálová pipeta (5-50 µl)

- Multikanálová pipeta (50-300 µl)

- Pipetovací špičky (dle doporučení výrobce pipety)

- Nádobky na roztoky

- 5ml kónické zkumavky

- Vortex

**4.2. Homogenizace**

- Jednorázové skalpely a pinzety

- Laboratorní váhy

- Dispenser pro pracovní homogenizační roztok

- 1.2 ml 96jamková destička (použijte jako MASTER destičku)

- **Požadované vybavení**

**\* PrioGENIZER (Homogenizační zařízení se 6 držáky a jedním nosičem; Prionics, kat. číslo: 10000)\* Homogenizační nádobka PrioClip (Prionics, kat. číslo: 10010)**

**nebo**

**FASTH/FASTH 2/MediFASTH homogenizační zařízení s homogenizační nádobkou Prypcon**

**4.3. Trávení**

- Inkubátor pro mikrodestičky (dosahující minimálně teploty 50°C)

**4.4. Předinkubace**

V případě potřeby je možné objednat samostatně positivní (kat. číslo: 3000012)

a negativní kontrolu (kat. číslo: 3000013) s uvedením čísla šarže PrioSTRIP kitu.

Použít lze pouze kontroly se stejnou šarží, jako mají kontroly v soupravě.

**4.5. Analýza výsledků**

- Přístroj a software PrioSCAN

**5. Pracovní postup**

****

**Národní bezpečnostní předpisy pro práci s priony musí být přísně dodržovány (viz též část „Bezpečnostní předpisy a prohlášení R&S“, příloha IV). PrioSTRIP BSE kit musí být prováděn v laboratořích vhodných k tomuto účelu. Osoby provádějící testování musí být obecně proškoleny pro práci s priony a zvláště pro provádění testu PrioSTRIP BSE kit.**

Vzorky je nutno považovat za potenciálně infekční a všechny předměty, které s nimi přišly do styku za potenciálně kontaminované.

**Údaje o chemickém nebezpečí jsou v části „Bezpečnostní předpisy a prohlášení R&S“ (příloha IV).**

**¨**

**5.1. Poznámky**

K dosažení optimálních výsledků pomocí PrioSTRIP BSE kit je nutné dodržet:

- **Protokol pracovního postupu musí být přísně dodržován.**

- Pipetovací špičky musí být vyměněny po každém pipetování.

- Zvláště se doporučuje použití pipetovacích špiček s filtrem a jiných pipet pro každý jednotlivý pipetovací krok. Přesnost pipet musí být pravidelně kontrolována.

- Pro každý roztok musí být použita separátní nádoba.

- Všechny roztoky (kromě těch, které jsou použity při trávení, přenosu homogenátů z homogenizačních nádob PRYPCON a kontrolních vzorků) lze pipetovat multikanálovými pipetami.

- Žádné součásti soupravy nesmí být používány po datu exspirace, nebo pokud jsou na nich patrné změny.

- Jednotlivé součásti testovací soupravy nemohou být používány po uplynutí doby jejich použitelnosti či v případě, že dojde ke změně jejich vzhledu v době použitelnosti.

- Jednotlivé součásti testovací soupravy s odlišnou šarží nesmějí být používány společně.

- K testu musí být použita ultra čistá voda.

- Skalpely a nástroje pro vícenásobné použití musí být dekontaminovány v návaznosti na nařízení platná v zemi použití.

**5.2. Vzorkování a homogenizace**

- Skalpelem odeberte 0,45- 0,7g nervové tkáně z levé nebo pravé strany mozkového kmenu a převažte pro zajištění správného množství.

Vzorkování a laboratorní testování musí být prováděno dle Směrnice Evropské unie No. 999/2001 Kapitola C, která odkazuje na pravidla pro sběr vzorků dle posledního vydání „Manual Standards for Diagnostic Test and Vaccines of the International Office of Epizootic Diseases (OIE)“, které říká: „Požadovaný vzorek pro immunoassay by měl být odebrán z obexu či jeho nejbližšího možného okolí, nejdále však 1,5 cm vně obexu“. Plocha 4 na obrázku níže znázorňuje místa, odkud má být vzorek odebírán.

**Medulla oblongata (obex region)**

Odebraná tkáň je asi 8 cm dlouhý kus mozkového kmene / cervical spinal cord.

1) Mozkový kmen

2) Mozek

3) Oblast obexu

4) Místo ze kterého má být odebrán vzorek pro PrioSTRIP

5) Místo ze kterého má být odebrán kontrolní vzorek národní referenční laboratoří BSE.

Poznámka:

Po odběru tkáně vzorku musí být celý včetně nepoškozené části obexu uschován pro případnou kontrolní analýzu.

**5.2.1. Přípravné kroky**

- Připravte **pracovní homogenizační roztok** – zředěním 1 dílu **homogenizačního pufru (5xkonc., složka 1)** se 4 díly  ultra čisté vody dle přílohy I.

**5.2.2. Homogenizace**

- Vložte vzorek mozkové tkáně z oblasti obexu o velikosti 0,45-0,70 g do homogenizační nádobky Prypcon. Použijte váhy.

- Dispenserem přidejte desetinásobné objemové množství pracovního homogenizačního roztoku (w/v, např. 5 ml roztoku na 0,50 g tkáně) a pomocí zařízení PRIOGENIZERTM neboFASTH/FASTH2/ MediFASTH vzorek zhomogenizujte (45 vteřin ± 5 vteřin, 20.000 RPM ± 1.000 RPM).

- Přeneste 1ml suspenze každého homogenátu do MASTER destičky, jamky A1 a B1 vynechejte.

- Homogenizační nádobky PrioCLIPTM  a Prypcon po vzorcích, které vyšly negativně na TSE, mohou být po vymytí znovu použity (viz příloha III.)

**5.3. Proteolytické trávení**

**5.3.1. Přípravné kroky**

- Asi 1 hodinu před použitím zapněte inkubátor na mikrodestičky a nechejte jej vyhřát na 47 °C.

- Připravte trávicí roztok dle Přílohy I. Doba jeho použitelnosti je 15±1 min při tep. 22±3 °C.

- Přidejte **50 µl trávicího roztoku** do každé jamky trávicí destičky (složka 3, bezbarvá destička). Vynechejte jamky A1 a B1.

**5.3.2. Proteolytické trávení**

- Přeneste **100 µl** (homogenát nejprve promíchejte opakovaným (alespoň 3x) natažením do pipety) každého **homogenátu** z MASTER destičky do odpovídající jamky na trávicí destičce. Potom můžete MASTER destičku uzavřít a skladovat při teplotě 5±3°C po dobu 8 hodin nebo při -20 °C až -80°C po dobu 12 měsíců. Opakovaným natažením (alespoň 3x) do pipety vždy promíchejte homogenát s trávícím roztokem.

- Překryjte trávicí destičku krycí fólií (složka 4).

- Destičku vložte do vyhřátého inkubátoru a nechejte proběhnout trávení po dobu 60±2 min při teplotě 47±1 °C.

- Zastavte trávení přidáním **10 µl zastavovacího roztoku (složka 6)** do každé jamky (mimo A1,B1) pomocí multikanálové pipety. Promíchejte minimálně třikrát opětovným natažením do pipety.

- Po přidání zastavovacího roztoku může být trávicí destička překryta krycí fólií a uchována po dobu až 5 dní při teplotě -20 až -80°C.

**5.4. Preinkubace**

**5.4.1. Přípravné kroky**

- **Minimálně 2 hodiny před použitím nechejte vzorkový pufr (složka 7) vytemperovat na teplotu 22±3 °C.**

- Rekonstituujte **kontrolní vzorky (složky 12 a 13)** přidáním nejprve **200 µl ultra čisté vody** a poté 200 **µl vzorkového pufru (složka 7, zelený roztok)**. Promíchejte vortexem a několikanásobným převrácením zkumavky.

- V případě potřeby je možné objednat kontroly samostatně (viz. 4.4)

**5.5 Detekce**

**5.5.1 Preinkubace**

- Pomocí multikanálové pipety přidejte **150 µl vzorkového pufru (složka 7)**, (před použitím důkladně promíchejte) do každého natráveného homogenátu v trávicí destičce a lehce promíchejte opětovný napipetováním.

- Inkubujte při teplotě 22±3 °C po dobu 15±1 min.

- Nejprve napipetujte **12µl** rekonstituované **negativní kontroly** do jamky **B1**, a **12µl** rekonstituované **pozitivní kontroly** do jamky **A1** testovací destičky (složka 8, bílá destička, pipetovací schéma viz příloha II).

- Přeneste **12 µl preinkubovaného vzorku** (opět alespoň 3x promíchejte opakovaným natažením do pipety před přenesením) z trávicí destičky do testovací destičky. Vizuálně kontrolujte přesnost přenosu.

**5.5.2. Přípravné kroky**

- Rekonstituujte **lyofilizovaný konjugát (složka 10)** přidáním **9 ml konjugačního pufru (složka 9)**. Po smíchání a před každým použitím důkladně promíchejte ve vortexu po dobu min. 15 vteřin.

- **Sáčky s PrioSTRIP hřebeny (složka 11) nechejte vytemperovat alespoň 30 minut před otevřením při teplotě 22±3 °C.**

**5.5.3. Detekce**

- Pomocí multikanálové pipety přidejte **80 µl rekonstituovaného konjugátu** do každé jamky testovací destičky (přes vzorky i kontroly). Promíchejte pomalým dvojnásobným natažením do pipety.

- Ponořte PrioSTRIP hřebeny do jamek se vzorkovou směsí. Hřeben umístěte na testovací destičku tak, aby proužek A byl vložen do jamky v řadě A, proužek B do jamky v řadě B atd.

- Nechejte PrioSTRIP hřebeny inkubovat v jamkách po dobu **20±1 min** při teplotě 22±3 °C.

- Vyhodnoťte a oskenujte výsledky do 10 minut.

**5.6. Vyhodnocení výsledků**

**5.6.1. Vizuální vyhodnocení**

K vizuální interpretaci je potřeba dvou osob, které individuálně vyhodnotí každý vzorek. Na každém vzorku musí být viditelná kontrolní linka.

PrioSTRIP formulář pro vizuální interpretaci výsledků je dodáván pro každou PrioSTRIP testovací destičku. Pečlivě dodržujte instrukce na tomto formuláři.

Vzorek je:

- **negativní** pokud je viditelná pouze kontrolní linka,

- **prvotně reaktivní** pokud je současně viditelná kontrolní i testovací linka (1-2 mm pod kontrolní linkou),

- **neprůkazný** pokud se neobjeví žádná linka.



Negativní

Prvotně

reaktivní

* Kontrolní linka
* Testovací linka

Potom si obě osoby vzájemně porovnají výsledky. Pozitivní a negativní kontroly musí ukazovat správné výsledky. Jestliže neukazují správně, jsou všechny destičky neplatné a musí být retestovány, počínaje homogenátem.

Výsledky:

Všechny vzorky, které byly alespoň jednou osobou vyhodnoceny jako prvotně reaktivní, musí být retestovány v duplikátu, počínaje odpovídajícími homogenáty.

Oba výsledky z opakovaného testu prvotně reaktivního vzorku jsou individuálně vyhodnoceny oběma osobami. Obě vyhodnocení se porovnají, a pokud alespoň jedna z osob vyhodnotí výsledek jako pozitivní, je vzorek hodnocen jako pozitivní, tato skutečnost musí to být oznámena Národní referenční laboratoři pro BSE, kam se také odesílá vzorek mozkové tkáně k potvrzení pozitivního výsledku. Mohou však platit i další národní směrnice. Jestliže obě osoby vyhodnotí výsledky jako negativní, je vzorek negativní.

Jestliže zjistila jedna nebo obě osoby, že je vzorek neplatný, musí se test opakovat. Výsledek vyplívající z retestování musí být individuálně vyhodnocen oběma osobami.

Obě osoby porovnají svoje výsledky.

* Jestliže obě osoby vyhodnotí výsledky jako negativní, je vzorek negativní
* Jestliže jedna nebo obě osoby vyhodnotí výsledky jako neprůkazné, měl by být vzorek přednesen národní referenční laboratoři BSE.
* Jestliže jedna nebo obě osoby vyhodnotí výsledky jako prvotně reaktivní, měl by být vzorek považován jako prvotně reaktivní a měl by být retestován.

Ke každé PrioSTRIP testovací destičce je přiložen PrioSTRIP formulář pro vizuální interpretaci výsledků. Postupujte podle instrukcí uvedených na tomto formuláři.

**5.6.2. Vyhodnocení pomocí zařízení PrioSCAN**

PrioSCAN převádí modré linky na stripech na digitální data. Hodnoty získané pomocí zařízení PrioSCAN jsou udávány v jednotkách relativní hustoty (RDU – Relative Dendsity Unit). Cutoff hodnota je specifická pro každou jednotlivou šarži a získáte ji spolu se soupravou.

Vzorek je:

* Negativní, pokud jsou naměřené hodnoty menší než hodnota cutoff.
* Prvotně reaktivní, jestliže jsou naměřené hodnoty vyšší než cutoff.
* Neprůkazný, pokud se neobjeví žádná linka.

Jestliže negativní nebo pozitivní kontrola nebo obě neukáží správní výsledky, je destička neplatná a všechny vzorky musí být retestovány.

Výsledky:

Všechny vzorky zjištěné jako prvotně reaktivní, musí být retestovány v duplikátu, počínaje homogenátem. V případě, že byl jeden nebo oba výsledky vyhodnoceny jako pozitivní nebo neprůkazné, výsledky se musí předat Národní referenční laboratoři BSE.

Všechny vzorky zjištěné jako neprůkazné, musí být retestovány počínaje homogenátem.

* Jestliže je výsledek vyhodnocen jako negativní, je vzorek negativní.
* Jestliže je výsledek vyhodnocen jako neprůkazný, musí být vzorek přednesen národní referenční laboratoři BSE.
* Jestliže je výsledek vyhodnocen jako prvotně reaktivní, měl by být vzorek považován jako prvotně reaktivní a měl by být retestován v duplikátu, počínaje homogenátem.

**V případě vizuálního i automatického vyhodnocování:**

Vzorky a odpovídající tkáně, které poskytují pozitivní či dubiózní výsledky na rychlém testu musí být poslány k potvrzení do Národní referenční laboratoře.

V případě, že laboratoře pracující v návaznosti na směrnici EU 999/2001 a provádí vizuální vyhodnocení, musí provést trvalý záznam všech hřebenů (například oskenováním či vyfotografováním.

**5.7. Obecné poznámky**

**Tento manuál je považovaný za úplný a přesný k datu svého vydání. AppliedBiosystems nepřijímá žádnou odpovědnost za jakékoli škody vzniklé použitím tohoto manuálu.**

**5.7.1. Spolehlivost**

AppliedBiosystems zaručuje, že její produkty splňují příslušné zveřejněné specifikace, jsou-li užívány v souladu s platnými instrukcemi a v rámci deklarované doby použitelnosti. A neposkytuje žádné jiné vyjádřené nebo odvozené záruky. Neexistují žádné záruky obchodovatelnosti nebo způsobilosti pro konkrétní účel. Záruka zde poskytovaná a údaje, specifikace a popisy produktů společnosti AppliedBiosystems objevující se v katalozích a publikacích jí vydaných smějí být pozměněny jen s písemně vyjádřeným souhlasem pracovníka společnosti. Prezentace a publikace, ústní či písemné, jež jsou v rozporu, tj. neslučitelné, s tímto ujednáním, jsou neautorizované, a tudíž nespolehlivé.

V případě porušení výše zmíněné záruky bude výhradní povinností společnosti AppliedBiosystems opravit nebo nahradit, podle jejích možností, daný produkt nebo jeho část. To vše za předpokladu, že zákazník uvědomí AppliedBiosystems bezodkladně o jakémkoli takovém porušení. Jestliže však ani po vyvinutí přiměřeného úsilí není AppliedBiosystems schopen opravit či nahradit produkt nebo jeho část, pak musí zákazníkovi vrátit veškeré finanční prostředky vydané za takový produkt nebo jeho část.

Společnost AppliedBiosystems není odpovědná za následné, případné, zvláštní nebo jiné nepřímé škody vyplývající z ekonomických ztrát nebo poškození majetku utrpěné zákazníkem při užívání jejích produktů.

Společnost AppliedBiosystems je certifikována dle ISO 9001:2000.

**6. Příloha I - Tabulka ředění homogenizačních a trávicích roztoků**

**Homogenizační pracovní roztok**

Smíchejte dle tabulky níže **ultra čisté vody** a homogenizačního **pufru (5x konc. složka 1)**, pro získání požadovaného objemu homogenizačního pracovního roztoku:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Objem homogenizačního pracovního roztoku** | **Objem homogenizačního pufru (5xkonc.), složka 1** | | | **Objem ultra čisté vody** |
| 250 ml | = | 50 ml | + | 200 ml |
| 500 ml | = | 100 ml | + | 400 ml |
| 1000 ml | = | 200 ml | + | 800 ml |
| 1500 ml | = | 300 ml | + | 1200 ml |

Doba použitelnosti homogenizačního pracovního roztoku je: 1 týden při skladování v 5±3 °C

**Trávicí roztok**

V plastové zkumavce (např. 50 ml reakční zkumavka) smíchejte dle tabulky níže uvedené množství homogenizačního pracovního roztoku, trávicího pufru (složka 2) a proteázy K (složka 5). Složky smíchávejte v tomto pořadí, těsně před použitím.

Doba použitelnosti trávicího roztoku: 15±1 min při teplotě 22±3 °C.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Počet destiček** | **Objem trávicího roztoku** | | **Objem homog. pracovní roztok.** | **Objem trávícího pufru, složka 2** | | | **Objem Proteázy K, slož. 5** |
| 1 | 6 ml | = | 3,6 ml | + | 1,2 ml | + | 1,2 ml |
| 2 | 12 ml | = | 7,2 ml | + | 2,4 ml | + | 2,4 ml |
| 3 | 18 ml | = | 10,8 ml | + | 3,6 ml | + | 3,6 ml |
| 4 | 24 ml | = | 14,4 ml | + | 4,8 ml | + | 4,8 ml |
| 5 | 30 ml | = | 18,0 ml | + | 6 ml | + | 6 ml |

**7. Příloha II – Pipetovací schémata**

Doporučené pipetovací schéma pro **Master** a **Trávící** (složka 3, bezbarvá destička) **destičku**.



Doporučené pipetovací schéma pro **Testovací destičku** (složka 8, bílá destička)



+ pozitivní kontrola, - negativní kontrola

**8. Příloha III. – PrioCLIP/ Prypconvymývací protokol**

8.1. Obecné pokyny

Dohledatelnost vzorků:

PrioCLIP/Prypcon homogenizační nádobky musí být označeny číslem vzorku. Označení nádobek může být odstraněno až po vydání výsledků.

Opětovné použití:

PrioCLIP/Prypcon - Homogenizační nádobky nesmí být použity více než 5x, každé jednotlivé použití na nich musí být vyznačeno značkou.

**K vymývání nepoužívejte desinfekční prostředek obsahující chlornan.**

8.2 Přípravné kroky

Naplňte 2 nádoby dostatečným množstvím deionizované vody (nejméně 25 l), tak aby byl zajištěn dostatečný ponor PrioCLIPů/Prypconů během vymývacích kroků.

8.3 Vyprázdnění nádobek

Obsah nádobek po negativních vzorcích vylijte do autoklávovatelné, tepelně odolné nádoby.

**Nádobky, jejichž obsah byl identifikován, jako prvotně reaktivní nesmí být znovu použity a musí být zlikvidovány dle národních bezpečnostních směrnic.**

8.4 Vymývání

Ponořte prázný PrioCLIP/Prypcon do nádoby s deionizovanou vodou a důkladně jej properte.

Vizuálně zkontrolujte homogenizační nádobku kvůli možnému poškození a kontaminaci tkání. Případné poškozené či kontaminované nádobky vyřaďte.

Ponořte nádobky a inkubujte po dobu nejméně 30 minut při 22±3 °C.

8.5 Sušení

Vyndejte PrioCLIP/Prypcon z nádoby s vodou, vytřepejte zbývající vodu a úplně dosušte při 22±3 °C.

Eventuálně je možné nádobky vysušit v  sušárně. Umístěte nádobky na tepelně odolný povrch, Zahřívejte je 2 hodiny při 85±5 °C a sušte přes noc při 50 °C v sušičce.

Nádobky vizuálně zkontrolujte. Vyřaďte poškozené nebo obsahující zbytky tekutiny.

8.6 Likvidace odpadu

Homogenáty a vymývací roztoky musí být zlikvidovány v souladu s národními bezpečnostními směrnicemi.

**9. Příloha IV - Bezpečnostní předpisy a prohlášení R &S**

**Bezpečnostní předpisy**

1. **Národní bezpečnostní předpisy musí být důsledně dodržovány.**

2. **Směrnice ACDP**

Laboratoře **MUSÍ** odpovídat národním bezpečnostním předpisům. Další informace vydané Poradním výborem pro nebezpečné patogeny (ACDP) - jsou k dispozici pod názvem „Látky způsobující přenosnou spongioformní encefalopatii, bezpečnost práce a prevence infekce“, ministerstvo zdravotnictví, Londýn, Velká Británie (lze objednat u Stationery Office, ISBN 0113221665, telefonní číslo +44 (20) 78739090). Aktuální verze je dostupná na www adrese www.doh.gov.uk/PolicyAndGuidance/HealthAndSocialCareTopics/CJD/CJDGeneralInformation/fs/en .

**Prohlášení H&P**

**Složka 1 - Homogenizační pufr (5xkonc.)**

Bezpečnostní kód: Není klasifikován dle směrnice EU.

**Složka 2 - Trávicí pufr**

Bezpečnostní kód:

H302 - Zdraví škodlivý při požití.

H315 - Dráždí oči a kůži.

P260 - Nevdechujte prach/dým/

plyn/mlhu/páry/aerosoly.

P305+P351+P338+P313 - PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou.

Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Vyhledejte lékařskou pomoc.

P501 – Odstraňte obsah/obal.

P280 + P281 - Používejte ochranné rukavice/

ochranný oděv/ ochranné

brýle/obličejový štít. Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

**Složka 3 - Trávicí destičky (bezbarvé destičky)**

Bezpečnostní kód: Není klasifikován dle směrnice EU.

**Složka 4 - Krycí fólie**

Bezpečnostní kód: Není klasifikován dle směrnice EU.

**Složka 5 - Proteáza K**

Bezpečnostní kód: Není klasifikován dle směrnice EU.

**Složka 6 - Zastavovací roztok**

Bezpečnostní kód: Není klasifikován dle směrnice EU.

**Složka 7 - Vzorkový pufr**

Bezpečnostní kód:

H302 - Zdraví škodlivý při požití.

H315 - Dráždí oči a kůži.

P260 - Nevdechujte prach/dým/

plyn/mlhu/páry/aerosoly

P305+P351+P338+P313 - PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou.

Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout

snadno. Pokračujte ve vyplachování. Vyhledejte lékařskou pomoc

P501 – Odstraňte obsah/obal.

P280 + P281 - Používejte ochranné rukavice/

ochranný oděv/ ochranné

brýle/obličejový štít. Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

**Složka 8 - Testovací mikrotitrační destička (bílé destičky)**

Bezpečnostní kód: Není klasifikován dle směrnice EU.

**Složka 9 - Konjugáční pufr**

Bezpečnostní kód: Není klasifikován dle směrnice EU.

**Složka 10 - Konjugát**

Bezpečnostní kód: Není klasifikován dle směrnice EU.

**Složka 11 - PrioSTRIP hřebeny**

Bezpečnostní kód: Není klasifikován dle směrnice EU.

**Složka 12 - Pozitivní kontrola**

Bezpečnostní kód: Není klasifikován dle směrnice EU.

**Složka 13 - Negativní kontrola**

Bezpečnostní kód: Není klasifikován dle směrnice EU.

**10. Kontakty:**

**Výhradní zástupce v ČR a SR:**

**Výrobce:**





**Applied Biosystems**

 Platinastraat 33, 8211 AR Lelystad,

The Netherlands

**thermofisher.com/support**