**Testovací souprava k detekci antigenů bovinní spongiformní encefalopatie-scrapie, EIA**

**HerdChek\* BSE-Scrapie Ag**

06-08519-11

Verze č. 11

Testovací souprava k detekci antigenů bovinní spongiformní encefalopatie-scrapie, EIA

**Pouze pro veterinární účely.** **Česká verze**

**Přehled**

Testovací souprava IDEXX HerdChek\* BSE-Scarpie Ag k detekci antigenů bovinní spongiformní encefalopatie (BSE)-scrapie je enzymatický imunotest (EIA) pro zjišťování abnormálního konformeru infekční prionové bílkoviny (PrPSc) ve vzorcích mozkové tkáně (nejlépe z obexu) získaných pitvou u skotu, malých přežvýkavců (ovcí a koz) a jelenovitých postižených BSE, scrapií nebo chronickým chřadnutím jelenovitých (CWD). U malých přežvýkavců test detekuje PrPSc také v lymfatických uzlinách nebo tkáni sleziny; u jelenovitých je možné test použít k detekci PrPSc v retrofaryngeálních lymfatických uzlinách (RPLN). Test je určen pro rychlou identifikaci vzorků, které obsahují PrPSc související s onemocněním. Test minimalizuje manipulaci se vzorkem a je možné jej automatizovat pro vysoce výkonné aplikace.

 **Testovací souprava k detekci antigenů bovinní spongiformní encefalopatie-scrapie, EIA**

Tato souprava je určena pouze pro veterinární účely.

Pro členské státy Evropské unie: Jedná se o rychlý test schválený v EU k in vitro detekci PrPSc související s BSE a scrapií u skotu a malých přežvýkavců. Tento test je možné v EU používat také k rychlému testování přenosné spongiformní encefalopatie (TSE) u jelenovitých. Tato souprava byla validována s použitím vzorků tonzil, retrofaryngeálních lymfatických uzlin a mozkového kmene jelenů wapiti (*Cervus canadensis*).

Výrobce rychlého testu musí mít funkční systém zajišťování kvality schválený referenční laboratoří Evropské unie (EURL), který zabrání výkyvům výkonnosti testu. Výrobce musí testovací protokol poskytnout laboratoři EURL. Úpravy týkající se nástrojů pro odběr vzorků, rychlého testu nebo testovacího protokolu (včetně odběru vzorků) je možné provést pouze po předchozím oznámení laboratoři EURL a za předpokladu, že daná úprava podle EURL nesnižuje citlivost, specificitu nebo spolehlivost rychlého testu. Toto zjištění bude sděleno Evropské komisi a národním referenčním laboratořím (na základě Nařízení (ES) č. 956/2010, kterým se mění Nařízení (ES) č. 999/2001).

Popis a zásady testování

Tato souprava využívá patentem chráněnou metodu, která je v licenci společnosti Microsens Biotechnologies (Londýn, Spojené království, podána žádost o patent) a která umožňuje detekci abnormálních prionů. Ligand specifický pro PrPSc je imobilizován na povrchu destičky pro zachycení antigenu. Testované vzorky se připraví homogenizací tkání a následným zředěním vzorku s pracovním ředicím roztokem na destičkách. Po aplikaci vzorku na destičku se konformer související s onemocněním váže na imobilizovaný ligand s vysokou afinitou. Destičky se promyjí, aby se odstranily nenavázané materiály, včetně normálního konformeru PrP proteinu. Po inkubaci s kondicionačním pufrem se zachycený antigen detekuje pomocí protilátky specifické pro PrP, která byla konjugována s křenovou peroxidázou (HRPO). Destička se promyje pro odstranění nenavázaného konjugátu a aplikuje se peroxidázový substrát. Následná barevná změna odpovídá relativním hodnotám PrPSc zachycené ligandem imobilizovaným v jamce mikrotitrační destičky.

Interpretace výsledků je založena na absorbanci vzorku. Vzorek, jehož hodnota A450 – AREF je nižší než mezní hodnota, vyhodnotí test HerdChek pro detekci antigenů BSE-scrapie jako negativní. Vzorek, jehož hodnota A450 – AREF je vyšší než mezní hodnota nebo se jí rovná, je klasifikován jako pozitivní na PrPSc. U všech pozitivních výsledků je nutné provést potvrzovací analýzu, např. imunohistochemický test.

Součásti soupravy

Všechny součásti uchovávejte při teplotě 2 – 8 °C.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Položka |  | 460 testů |
| A | Destičky pro zachycení antigenu | 5 destiček |
| N | Negativní kontrola – nereaguje s destičkou na zachycení antigenu; konzervováno azidem sodným | 5 x 1 ml |
| P | Pozitivní kontrola – neinfekční, reaguje s destičkou na zachycení antigenu; konzervováno azidem sodným | 5 x 1 ml |
| D1 | Ředicí roztok 1 – konzervováno azidem sodným | 20 ml |
| D2 | Ředicí roztok 2 – konzervováno azidem sodným | 5 x 200 µl |
| R | Rozpouštědlo pro rekonstituci | 20 ml |
| CB | Kondicionační pufr; konzervováno azidem sodným | 60 ml |
| CC | Koncentrát konjugátu; konzervační činidla: Bronidox L a methylisothiazolon | 300 µl |
| SRB-CC | Koncentrát konjugátu z mozku malých přežvýkavců; konzervační činidla: Bronidox L a methylisothiazolon | 300 µl |
| CD | Pufr na ředění konjugátu s detergenty a stabilizátory bílkovin; konzervační činidla: gentamicin a Proclin | 60 ml |
| W1 | 10X promývací roztok 1 – konzervováno azidem sodným | 450 ml |
| W2 | 10X promývací roztok 2 – konzervováno gentamicinem | 450 ml |
| T | TMB substrát | 60 ml |

**Poznámky:** V tabulce na konci tohoto dokumentu je uveden popis symbolů používaných v příbalové informaci a na etiketě této testovací sady.

Varování a upozornění týkající se reagencií jsou uvedena na konci této příbalové informace.

Požadované materiály a vybavení (není součástí balení)

* Přesné pipety a vícekanálové pipety vhodné pro dávkování od 25 do 200 μl. Objem reagencií uvedených v testovacím postupu vyžaduje přesnost pipety maximálně 5 %.
* Odměrné válce pro přípravu promývacích roztoků
* Kryty z tvrdého plastu nebo adhezivní kryty destiček a nosiče na dávkování reagencií
* Jednorázové nástroje pro odběr vzorků při pitvě nebo zařízení pro odběr vzorků
* Čtečka 96jamkových destiček (s filtry 450 nm a 620 – 650 nm) a promývačka
* Přístroje FastPrep\* (FP120A, FP220A), Precess 48\*, Precess 24\* nebo Precellys 24\*
* Příslušenství – destičky pro ředění, zkumavky s kuličkami na rozrušení tkání, prodloužené hroty pipet na přenos homogenátu a adhezivní kryty destiček (k dispozici od společnosti IDEXX)
* Osobní ochranné prostředky – bezpečnostní brýle, laboratorní pláště, jednorázové rukavice, návleky na boty, síťky na vlasy a masky na obličej
* Zastavovací roztok 0,5 – 1,0 N HCl nebo 1,0 N H2SO4
* Chlornan sodný (bělící činidlo), 1 N NaOH a 1 N HCl, deionizovaná voda
* Volitelné – robotické zařízení na zpracování vzorků s přesností pipetování ≤ 2,5 % měřenou analýzou CV (např. Tecan)
* Volitelné: třepačka mikrotitračních destiček (např. IKA MTS 2/4)
* Volitelné: inkubátor destiček udržující teplotu 32 – 37 °C a s minimálním prouděním vzduchu
* Volitelné: zahřívací jednotka pro mikrocentrifugační zkumavky 1,5 – 2 ml, která může udržovat teplotu 70 °C
* Volitelné: 1,5 – 2 ml kónické mikrocentrifugační zkumavky bez lemu a se šroubovacím uzávěrem

Odběr a příprava tkání

1. Tkáň mozku skotu a malých přežvýkavců
2. Odběr vzorků a laboratorní testování musí být v souladu s Nařízením (ES) č. 999/2001 (Příloha X, Kapitola C), které v oblasti odběru vzorků odkazuje na nejnovější vydání *Příručky pro diagnostické testy a vakcíny* Mezinárodního úřadu pro nákazy zvířat (OIE), v němž se uvádí: "Vzorek pro účely imunotestu by měl být odebrán přímo z obexu nebo co možná nejblíže obexu; místo odběru nicméně nesmí být od obexu vzdáleno více než 1,5 cm anteriorně." Pomocí resekčních nástrojů odeberte 0,30 g (± 0,05 g) nervové tkáně z pravé strany levé části mozkového kmene v úrovni obexu (pokud je to možné). Odebranou tkáň zvažte, aby bylo zajištěno správné množství vzorku. Pro odběr vzorku z obexu u skotu můžete také použít zařízení IDEXX pro odběr vzorků, jak je popsáno v Příloze. Personál odebírající vzorek z obexu musí být vyškolen v metodě odběru vzorků.

Obrázek 1 znázorňuje správnou oblast odběru vzorků.

**POZNÁMKA:** Po odebrání vzorku musí být pro potvrzující analýzu zachována úplná hemisekce mozkového kmene s intaktní oblastí obexu a mozečku (pokud je k dispozici).

1. Mozek / 2. Oblast odběru (obex) / 3. Mícha

**Obrázek 1.** Mozkový kmen u skotu.

© British Crown Copyright (únor 2005) – reprodukováno se svolením Veterinary Laboratories Agency.

1. Tkáň vložte do zkumavky pro rozrušení tkáně a těsně uzavřete uzávěr. Zkumavky obsahují keramické kuličky a pufr.
2. Pro použití s ​​testem IDEXX BSE-scrapie EIA byly validovány čtyři přístroje pro rozrušení tkáně. Zkumavky vložte do přístroje a proveďte homogenizaci podle návodu k použití daného přístroje. Není-li tkáň dostatečně rozrušena, proveďte jeden cyklus navíc.
	* Postup při použití přístroje FastPrep\*: Vzorky tkáně se homogenizují po dobu 40 sekund při maximální rychlosti (6,5 m/s). Je-li nutné provést další cyklus, nechte přístroj před dalším použitím vychladnout po dobu 5 – 10 minut.
	* Postup při použití přístrojů Precess 48\*, Precess 24\* a Precellys 24\*: Vzorky homogenizujte dvakrát po dobu 20 až 25 sekund při 6500 otáčkách za minutu. Před každým cyklem vyčkejte 5 sekund.
3. Homogenáty (čerstvé nebo rozmražené) mohou být uchovávány při teplotě 18 – 26 °C po dobu až 4 hodin před zahájením testu.

Počet vzorků, které lze připravit během jedné relace, je flexibilní. Homogenáty mohou být uchovávány po dobu až 24 hodin při teplotě 2 – 8 °C nebo mohou být uchovávány při teplotě ≤ -20 °C po dobu až 6 měsíců. Zmrazené homogenáty musí být před použitím rozmraženy a důkladně promíchány převracením zkumavky. Vzorky tkáně lze uchovávat při teplotě -80 °C.

1. Tkáň lymfatických uzlin nebo sleziny malých přežvýkavců
2. Odeberte 0,30 g (± 0,05 g) tkáně z lymfatických uzlin nebo sleziny. U lymfatických uzlin je třeba odebrat tkáň, aby bylo ve vzorku přítomno co nejvíce buněk se zárodečnými centry. Tkáň nakrájejte na 8 – 10 menších částí.
3. Při zpracovávání a uchovávání vzorku postupujte obdobně jako v případě mozkové tkáně.

**POZNÁMKA:** Tkáň lymfatických uzlin a sleziny není možné použít v kontextu oficiálního odběru vzorků a testování podle Nařízení (ES) č. 999/2001.

1. Tkáň mozku a lymfatických uzlin jelenovitých
2. Připravte zkumavky pro rozrušení tkáně tak, že z každé z nich odeberete 0,2 ml roztoku.
3. Odeberte 0,30 g (± 0,05 g) tkáně z retrofaryngeální lymfatické uzliny nebo mozku (nejlépe z obexu). Tkáň mozku a lymfatických uzlin je nutné testovat samostatně. U lymfatických uzlin je třeba odebrat tkáň, aby bylo ve vzorku přítomno co nejvíce buněk se zárodečnými centry. Tkáň lymfatické uzliny nakrájejte na 8 – 10 menších částí.

Vezměte prosím na vědomí, že v Německu musí být provedeno samostatné testování tkáně mozku i lymfatických uzlin. Toto rozhodnutí je v souladu s pokyny EURL (Pokyny referenční laboratoře EU pro TSE v oblasti detekce chronického chřadnutí jelenovitých, https://science.vla.gov.uk/tse-lab-net/documents/cwd-guidelines.pdf a Vědecké stanovisko týkající se chronického chřadnutí (II), Panelová diskuse EFSA o biologických rizicích (BIOHAZ), EFSA Journal 2018, 16 (1): 5132. str. 59).

1. Tkáň vložte do zkumavky pro rozrušení tkáně a těsně uzavřete uzávěr.
2. Zkumavky vložte do homogenizátoru a proveďte rozrušení tkáně podle návodu k použití daného přístroje. Není-li tkáň dostatečně rozrušena, proveďte jeden cyklus navíc.

Postup při použití přístroje FastPrep\*: Vzorky tkáně se homogenizují po dobu 30 sekund
při maximální rychlosti (6,5 m/s). Přístroj nechte pět minut vychladnout. Homogenizujte dalších
30 sekund při maximální rychlosti. Pokud se na pohled zdá, že tkáň není dostatečně rozrušena, proveďte jeden cyklus navíc.

Postup při použití přístrojů Precess 48\*, Precess 24\* a Precellys 24\*: Homogenizujte vzorky
po dobu 30 sekund při 6500 otáčkách za minutu. Přístroj nechte pět minut vychladnout. Homogenizujte dalších 30 sekund při 6500 otáčkách za minutu. Pokud se na pohled zdá, že tkáň není dostatečně rozrušena, proveďte jeden cyklus navíc.

Příprava činidel

Promývací roztoky (promývací roztok 1, promývací roztok 2)

Promývací koncentráty musí mít před použitím teplotu 18 – 26 °C a je třeba je promíchat, aby se rozpustily všechny vysrážené soli. Promývací koncentráty musí být před použitím naředěny destilovanou nebo deionizovanou vodou v poměru 1:10 (příklad: na 1 testovanou destičku 40 ml koncentrátu + 360 ml vody).

Ředicí roztok 2

Ředicí roztok 2 (D2) je dodán v lyofilizované formě. Roztok se připraví aplikací 200 μl ředícího rozpouštědla pro rekonstituci (R), nechá se přibližně 1 minutu stát a jemně se promíchá. Roztok použijte do 1 hodiny
po přípravě.

Pracovní ředicí roztok

Ředicí roztok 1 (D1) musí mít před použitím teplotu 18 – 26 °C. Pracovní ředicí roztok připravte aplikací
1 dílu ředicího roztoku 2 (D2, postup přípravy viz výše) do 25 dílů ředicího roztoku 1 (D1) a důkladně promíchejte (např. 120 μl D2 do 3,0 ml D1 na 1 destičku).

Při testování vzorků mozkové tkáně je třeba použít přibližně 2,75 ml pracovního ředicího roztoku
na 1 destičku. Při testování lymfatických uzlin nebo sleziny je nutné použít přibližně 5 ml pracovního ředicího roztoku na 1 destičku. Pracovní ředicí roztok je nutné použít v den, kdy byl připraven.

Negativní a pozitivní kontrola

Negativní a pozitivní kontrola jsou dodány v lyofilizované formě. Obě kontroly rekonstituujte aplikací 1 ml rozpouštědla pro rekonstituci. Roztok nechte stát přibližně 1 minutu a poté intenzivně promíchejte. Roztok použijte do 2 hodin po přípravě. **NEGATIVNÍ NEBO POZITIVNÍ KONTROLU NEŘEĎTE PRACOVNÍM ŘEDICÍM ROZTOKEM.**

HRPO-konjugované roztoky s protilátkami proti PrP

HRPO-konjugované roztoky s protilátkami proti PrP se připraví zředěním příslušného koncentrátu konjugátu (viz poznámka níže) s pufrem na ředění konjugátu (CD), jak je uvedeno na etiketě (příklad: pro ředění 1:100 je třeba aplikovat 120 µl koncentrátu konjugátu do 12 ml pufru na ředění konjugátu). Správný poměr ředění je uveden na etiketě koncentrátu konjugátu. Zředěný konjugát by měl být připraven a použit během 4 hodin.

**DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ:** Pro použití tohoto testu jsou k dispozici dva koncentráty konjugátu. Podle typu testované tkáně zvolte vhodný koncentrát:

* + **Koncentrát konjugátu (CC)** - tento konjugát použijte při testování vzorků tkáně mozku skotu a jelenovitých, vzorků lymfatických uzlin malých přežvýkavců a jelenovitých a vzorků tkáně sleziny malých přežvýkavců.
	+ **Koncentrát konjugátu mozku malých přežvýkavců (SRB-CC)** - tento konjugát použijte při testování mozkové tkáně malých přežvýkavců.
	+ U každého testovaného konjugátu musí být v jamkách destičky negativní a pozitivní kontrola.

Kyselý zastavovací roztok

Testovací souprava neobsahuje zastavovací roztok. Zastavovací roztok (0,5 až 1,0 N HCl nebo 1,0 N H2SO4) v pracovní koncentraci je možné zakoupit nebo připravit z koncentrátu.

Všechny tři níže popsané protokoly vyžadují, aby měly reagencie před použitím teplotu 18 – 26 °C. Roztoky potřebné k analýze si připravte ještě před zahájením testu. Všechny reagencie míchejte pomalým kroužením zkumavkou. Kontroly (negativní a pozitivní) naopak míchejte intenzivně a testujte je vždy
ve dvou jamkách. V průběhu testu by měla být destička uzavřena krytem.

Uchovávání připravených reagencií

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Položka | Objem pro rekonstituci | Doba použitelnosti |
| N/P | Negativní/pozitivní kontrola | 1 ml | 2 hodiny při 18 – 26 °C (6 měsíců při -20 °C) |
| D2 | Ředicí roztok 2 | 200 µl | 1 hodina při 18 – 26 °C (6 měsíců při -20 °C) |
|  | Pracovní ředicí roztok | N/A | 8 hodin při 18 – 26 °C |
|  | Roztoky HRPO:proti-PrP | N/A | 4 hodiny při 18 – 26 °C |
|  | Promývací roztok 1 – 1X | N/A | 1 týden při 18 – 26 °C |
|  | Promývací roztok 2 – 1X | N/A | 1 týden při 18 – 26 °C |

Nepoužitou část destiček uchovávejte v suché utěsněné nádobě, do níž neproniká světlo.

**Postup testování**

Vzorky homogenátů se připraví podle postupu popsaného v části Odběr a příprava tkání. **Alternativou k manuálnímu postupu popsanému v kroku 1 je použití robotického zařízení na zpracování vzorků. Toto zařízení můžete použít i poté, co byly na destičku pro zachycení antigenu aplikovány kontroly a zředěné vzorky (krok 3).**

Důležité: Během inkubace všech reagencií musí být každá testovací destička uzavřena pevným plastovým nebo adhezivním krytem. Pokud inkubace reagencií probíhá v biologické bezpečnostní skříni, musí být destičky uzavřeny adhezivními fóliemi.

**Testovací protokoly**

Pro test IDEXX BSE-scrapie EIA byly schváleny dva protokoly testování mozkové tkáně: Short a Ultra-Short (krátký a velmi krátký). Protokoly jsou stejně výkonné, pro dosažení kratší doby testování však vyžadují jiné vybavení. Protokoly jsou popsány v tabulce na následující straně.

**POZNÁMKA:** Protokol pro testování tkáně sleziny a lymfatických uzlin malých přežvýkavců se liší
od protokolů Short a Ultra-Short a je popsán v tabulce níže.

Ředění vzorku pracovním ředicím roztokem

Vytvořte šablonu znázorňující umístění vzorku na destičce pro zachycení antigenu a na destičce pro ředění. Pro každou kontrolu testovací soupravy vyčleňte dvě jamky. Pracovní ředicí roztok je možné
na destičku pro ředění aplikovat před přidáním vzorku nebo až po jeho přidání. Poměr ředění je 30 μl pracovního ředicího roztoku na 120 μl homogenátu vzorku (u vzorků sleziny a lymfatických uzlin malých přežvýkavců je to 50 μl ředicího roztoku na 100 μl homogenátu vzorku).

Homogenáty promíchejte převrácením zkumavky a pak opatrně pipetujte vzorek tak, že prodloužený hrot pipety prostrčíte přes kuličky ve zkumavce pro rozrušení tkáně a nasajete vzorek. Jednotlivé vzorky opatrně aplikujte na destičku pro ředění a dbejte na to, aby se v homogenátu netvořily bublinky a na okraji jamek destičky pro ředění nezůstávaly zbytky homogenátu.

Po zředění homogenátu vzorky důkladně promíchejte a opět dbejte na to, aby se netvořily bublinky. Vzorek promíchejte buď pipetou, nebo s použitím třepačky destiček. Pokud použijete třepačku, budete muset nastavit rychlost a čas tak, aby došlo k úplnému promíchání vzorku bez vylití vzorku z jamek. Test je třeba dokončit do 2 hodin.

Použití třepačky pro inkubaci vzorků (protokol Short a Ultra-Short)

Protokoly Short a Ultra-Short počítají s pomalou rotací (200 ±100 ot./min) na platformě třepačky destiček, a to pouze během inkubace vzorku. Třepačka by měla zajistit mírný horizontální kruhový pohyb. I když se vzorek v každé jamce mikrotitrační destičky mírně pohybuje, nemusí to být na pohled zřejmé. Při pohybu by rozhodně nemělo docházet ke vzdouvání hladiny vzorku ke stěnám jamky. Časy inkubace jsou odpovídajícím způsobem zkráceny pro případ inkubace vzorků a konjugátů. Podrobnosti jsou uvedeny v následující tabulce. V rámci protokolu testování tkáně sleziny/lymfatických uzlin malých přežvýkavců je vždy nutné zajistit stacionární inkubaci.

Testovací protokoly

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Postup testování** | **Protokol Short (krátký)** | **Protokol Ultra-Short (velmi krátký)** | **Protokol pro testování vzorků sleziny/lymfatických uzlin malých přežvýkavců** |
| Typ vzorku | Mozek skotu, malých přežvýkavců a jelenovitých, lymfatické uzliny jelenovitých | Mozek skotu a malých přežvýkavců | Lymfatické uzliny a slezina malých přežvýkavců |
| Krok | Činnost | 18 – 26 °CVšechny kroky | 32 – 37 °C:1 Pouze inkubace(kroky 3,5,8,10)18 – 26 °C: Všechny ostatní kroky, včetně promývání | 18 – 26 °C Všechny kroky |
| 1 | Aplikace vzorku na destičku pro ředění | 120 μl vzorku s 30 μl pracovního ředícího roztoku | 100 μl vzorku s 50 μl pracovního ředícího roztoku |
|  DŮKLADNĚ PROMÍCHEJTE - viz část "Ředění vzorku pracovním ředicím roztokem". |
| 2 | Přenesení vzorku na destičku k zachycení antigenu | Pipetou přeneste 100 μl zředěného vzorku na testovací destičku; promíchejte kontroly a aplikujte 100 μl každé kontroly do dvou jamek; destičku uzavřete krytem. |
| 3 |  Inkubace na destičce pro zachycení antigenu | 45 – 60 min; pomalé třepání 200 ± 100 ot./min | 20 – 60 min; pomalé třepání 200± 100 ot./min | 2 – 3 hodiny stacionárně |
| 4 | Promytí 1X promývacím roztokem 1 | Jamky se promyjí 6 krát ~350 μl 1X promývacího roztoku 1. |
| 5 | Kondicionér:Aplikace/inkubace | Aplikujte 100 μl kondicionačního pufru do každé jamky; přikryjte destičku; inkubujte 10 ± 1 min |
| 6 | Promytí 1X promývacím roztokem 2 | Jamky se promyjí 3 krát ~350 μl 1X promývacího roztoku 2. |
| 7 | Aplikace konjugátu | Aplikujte 100 μl zředěného konjugátu (u vzorků mozku skotu a jelenovitých použijte CC, u vzorků mozku malých přežvýkavců použijte SRB-CC) a uzavřete destičku krytem. | Aplikujte 100 μl konjugátu zředěného CC a uzavřete destičku krytem. |
| 8 | Inkubace konjugátu | 45 – 50 min | 25 – 30 min | 60 – 75 min |
| 9 | Promytí 1X promývacím roztokem 2 | Jamky se promyjí 5 krát ~350 μl 1X promývacího roztoku 2. |
| 10 | Aplikace/inkubace substrátu | Do každé jamky aplikujte 100 μl substrátu; uzavřete destičku krytem; inkubujte po dobu 15 ± 1 min, chraňte před přímým slunečním zářením (nepoužívejte adhezivní kryt). |
| 11 | Aplikace zastavovacího roztoku/Odečtení výsledku | Aplikujte 100 μl kyselého zastavovacího roztoku; před odečtením optické hustoty (450 nm) s použitím referenční vlnové délky (AREF) 620 až 650 nm můžete destičku ponechat po dobu až 30 min na temném místě |

1. Inkubovat při 32 – 37 °C znamená vložit testovací destičku do inkubátoru, který je předehřátý na teplotu 32 až 37 °C.

Přehled možností testování

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Mozek skotu** | **Mozek malých přežvýkavců** | **Lymfatické uzliny a slezina malých přežvýkavců** | **Mozek a RPLN jelenovitých** |
| **Příprava vzorku:** |  |  |  |  |
| **Odběr tkáně stříkačkou** | Ano | Ne | Ne | Ne |
| **Krájení tkáně**(předběžná homogenizace) | Ne | Ne | Ano | Ano (RPLN)Ne (mozek) |
| **Podmínky testu:** |  |  |  |  |
| **Koncentrát konjugátu** | CC | SRB-CC | CC | CC |
| **Pracovní ředicí roztok** (poměr pracovního ředicího roztoku a vzorku) | 30 µl/120 µl | 30 µl/120 µl | 50 µl/100 µl | 30 µl/120 µl |
| **Schválené protokoly** | **Short a Ultra-Short** | **Short a Ultra-Short** | **Slezina/lymfatické uzliny malých přežvýkavců** | **Short** |
| **Mezní hodnota testu** | NCx̄ + 0,120 | NCx̄ + 0,180 | NCx̄ + 0,180 | NCx̄ + 0,150 |
| **Uplatňuje se volitelný protokol tepelné úpravy** | Ano | Ne | Ne | Ne |

**Interpretace výsledků**

Aby test byl platný, musí být hodnota A450 – AREF průměru negativní kontroly (NCx̄) menší než 0,150 a hodnota A450 – AREF průměru pozitivní kontroly (PCx̄) ≥ 0,400.

Výpočty

Výpočet průměrné negativní kontroly:



 Výpočet průměrné pozitivní kontroly:



Výpočet mezní hodnoty:

Mezní hodnota u skotu = + 0,120

Mezní hodnota u malých přežvýkavců = + 0,180

Mezní hodnota u jelenovitých = + 0,150

**POZNÁMKA:** Definice AREF viz krok 11 v diagramu testovacího postupu.

Výsledky

Interpretace výsledků je založena na absorbanci vzorku. Vzorek, jehož hodnota A450 – AREF je nižší než mezní hodnota, vyhodnotí test HerdChek pro detekci antigenů BSE-scrapie jako negativní. Vzorky, jejichž hodnota A450 – AREF je vyšší než mezní hodnota nebo se jí rovná, jsou zpočátku klasifikovány jako reaktivní s PrPSc. Daný homogenát je proto třeba dvakrát testovat pomocí testovací soupravy IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Ag.

Opakovaný test mozkové tkáně u skotu lze provést s použitím původního homogenátu tkáně nebo homogenátu připraveného pomocí volitelného protokolu tepelné úpravy u skotu, jak je popsáno níže. Pokud je hodnota u opakovaného testu vyšší než mezní hodnota testu nebo se jí rovná, vzorek je považován za pozitivní. Vzorek je považován za negativní, pokud je hodnota u obou opakovaných testů menší než mezní hodnota testu. V rámci EU by měly být všechny vzorky u skotu, jež jsou zpočátku klasifikovány jako reaktivní a po opakování testu s protokolem tepelné úpravy označeny jako negativní, hlášeny jako negativní.

Vzorky malých přežvýkavců a jelenovitých je třeba podrobit dvěma opětovným testům, a to přímo s použitím původního tkáňového homogenátu. Homogenáty malých přežvýkavců nebo jelenovitých TEPELNĚ NEUPRAVUJTE. Pokud je hodnota u opakovaného testu vyšší než mezní hodnota testu nebo se jí rovná, vzorek je považován za pozitivní. Vzorek je považován za negativní, pokud je hodnota u obou opakovaných testů menší než mezní hodnota testu.

V členských státech EU musí být všechny vzorky, které jsou na základě rychlých testů označeny jako pozitivní, odeslány do národní referenční laboratoře pro TSE ve vaší zemi nebo do referenční laboratoře EU, kde budou podrobeny potvrzujícím analýzám.

Volitelný protokol tepelné úpravy původně reaktivních homogenátů u skotu: (Protokol tepelné úpravy se vztahuje pouze na vzorky odebrané u skotu.)

Odeberte 230 ± 20 μl tkáňového homogenátu, který byl při prvním testu klasifikován jako reaktivní, a přeneste jej do 1,5 až 2 ml zkumavky s konickým dnem a šroubovacím uzávěrem. Zkumavku přeneste
do zahřívací jednotky předehřáté na 70 ± 2 °C a zahřívejte ji po dobu 10 ± 1 minut. Poté zkumavku vložte do držáku v prostředí o teplotě 18 – 26 °C a nechte ji nejméně 20 minut chladnout. Homogenát je třeba opětovně testovat do dvou hodin po tepelné úpravě, a to dvakrát pomocí testovací soupravy IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Ag.

Upozornění

* TMB (tetramethylbenzidin) substrát nevystavujte silnému světlu nebo oxidačním činidlům. Pro dávkování TMB používejte čisté nebo jednorázové plastové vybavení.
* Je třeba dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci součástí soupravy. Jednotlivé součásti soupravy nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti a nemíchejte součásti z různých šarží.
* Některé součásti soupravy obsahují jako konzervační látku azid sodný (viz popis součástí sestavy). Je třeba dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci anti-PrP-HRPO konjugátu roztoky obsahujícími azid.
* Veškeré reagencie uchovávejte při teplotě 2 – 8 °C. Před použitím nechte reagencie ohřát na teplotu 18 – 26 °C a po použití je opět vraťte do prostředí s předepsanou teplotou uchovávání (viz Uchovávání připravených reagencií).
* Pro každou reagencii, s níž budete při testu pracovat, použijte samostatný nosič pro dávkování reagencií. Nesmí dojít ke zkřížené kontaminaci substrátu TMB a zředěného roztoku konjugátu. Nepoužitý roztok TMB nenalévejte zpět do lahvičky.
* Mezi promýváním mikrotitračních destiček a aplikací reagencií nesmí být prodleva delší než 5 minut.

Bezpečnostní informace

* Všichni členové personálu musí absolvovat odpovídající školení týkající se rizik spojených s BSE a scrapií a doporučených postupů dekontaminace. Postupy biologické bezpečnosti musí být důsledně dodržovány v souladu s národními bezpečnostními předpisy.
* Kondicionační pufr obsahuje chaotropní látky; zabraňte zasažení pokožky a sliznic.
* TMB substrát může dráždit pokožku a oči; zabraňte přímému kontaktu.
* Ředicí roztok 1 obsahuje detergenty ve vysoké koncentraci; zabraňte přímému kontaktu.
* V laboratoři nepoužívejte skleněné nádoby.

Příloha

Odběr vzorků obexu u skotu pomocí zařízení IDEXX pro odběr vzorků

Společnost IDEXX poskytuje zařízení pro odběr vzorků, které umožňuje alternativní způsob odběru vzorků obexu u skotu. Jedná se o stříkačku pro odběr vzorků. Zařízení IDEXX pro odběr vzorků je schváleno laboratoří EURL. Pokyny v části věnované odběru vzorků nenahrazují další informace nebo pokyny, které jsou v souladu s Nařízením (ES) č. 999/2001 a pozměňujícími nařízeními. Pokud není možné identifikovat správnou anatomickou oblast pro odběr vzorků, použijte resekční nástroje, jak je popsáno v části Odběr a příprava tkání.

1. Mozkový kmen by měl být odebrán na jatkách přes týlní otvor s použitím vhodného nástroje nebo lžičky pro odběr vzorků. Oblast obexu v mozku určíte podle charakteristického vrubu ve tvaru písmene "V" na horním povrchu mozkového kmene (viz schéma v části Odběr a příprava tkání). Pokud není možné identifikovat správnou anatomickou oblast pro odběr vzorků, použijte resekční nástroje, jak je popsáno v části Odběr a příprava tkání.
2. Mozkový kmen položte tkání ve tvaru písmene "V" nahoru. Špičku stříkačky pro odběr vzorků vsuňte přibližně do hloubky 3 mm (aby stříkačka v tkáni držela) do odříznutého konce kaudálního mozkového kmene na straně, odkud má být má odebrán vzorek. Pokud je vzdálenost od základny míchy k vrcholu části ve tvaru písmene "V" delší než 3 – 4 cm, může být nutné tkáň míchy zkrátit.
3. Pevně držte píst stříkačky. Ukazováčkem zatlačte vnější válec stříkačky do mozkového kmene a dbejte na to, aby se píst nemohl v žádném směru pohnout. Na Obrázku 2 jsou znázorněny hlavní cílové oblasti odběru vzorků obexu, na něž je třeba nasměrovat stříkačku. Jakmile je válec stříkačky zasunut do vzorku, musí zůstat uvnitř zvolené strany mozkového kmene, aby nedošlo k poškození opačné strany. Pro potvrzující analýzy musí být k dispozici úplná hemisekce mozkového kmene s intaktním obexem.



**Obrázek 2.** Průřez bovinního mozkového kmene na úrovni obexu s označením hlavních cílů pro odběr vzorků tkáně: 1) *tractus solitarius*, 2) jádro trojklaného nervu, 3) dorsální motorické jádro bloudivého nervu (diagram převzat z *Příručky pro diagnostické testy a vakcíny* OIE, kapitola 2.4.6)

1. Válec stříkačky projde mozkovým kmenem až do oblasti obexu. Ujistěte se, že stříkačka pronikla
do horní části oblasti odběru vzorků (viz Obrázek 1). Válec by nyní měl obsahovat vzorek obexu.

**POZNÁMKA:** Požadovaný vzorek (tj. oblast obexu) se nachází ve špičce válce.

1. Otáčejte válcem, abyste izolovali vzorek, a opatrně vyjměte stříkačku z tkáně.
2. Pokud z konce stříkačky visí větší část tkáně, nasajte ji mírným povytažením pístu. Nyní již můžete se stříkačkou manipulovat a vytlačit tak vzduch ve špičce a odstranit mezery mezi jednotlivými částmi vzorku.

**Poznámka:** Na vnitřní straně stříkačky jsou v pravidelných odstupech "zarážky" nebo drážky, které kladou při pohybu pístu určitý odpor. Díky rozestupům těchto zarážek je možné přesně změřit objem vzorku.

1. Jakmile je tkáň ve válci stříkačky, zatlačte píst k nejbližší zarážce. Ve vzorku mezi pístem a špičkou stříkačky by neměly být žádné mezery. Ze špičky stříkačky může vyčnívat přebytečná část vzorku.
2. Menší zbytky tkáně otřete o plochý povrch odvažovací misky. Během tohoto procesu nestlačujte píst, vzorek by mohl být vytlačen ze stříkačky nebo stlačen, čemuž je třeba zabránit.
3. Zkumavku pro rozrušení tkáně držte svisle v jedné ruce a stříkačku ve druhé ruce. Špičku stříkačky mírně zasuňte do zkumavky pro rozrušení tkáně. Do zkumavky na rozrušení tkáně vytlačte přesné množství tkáně obexu tak, že pístem přejedete jednu zarážku a zastavíte se u druhé. Objem mezi zarážkami je 150 μl; do zkumavky je třeba aplikovat celkem 300 μl (ekvivalent 0,30 g ± 0,05 g tkáně).
4. Zkumavku uzavřete a pokračujte homogenizací vzorku.

Personál odebírající vzorky obexu pomocí zařízení společnosti IDEXX pro odběr vzorků musí být řádně vyškolen v používání tohoto zařízení, aby odebíral vzorky ze správné oblasti mozkového kmene. Každý technik by měl monitorovat přesnost odběru pomocí pravidelných kontrol hmotnosti vzorků. Pro případ, že výsledky neodpovídají stanoveným kriteriím přijatelnosti, je třeba mít k dispozici program nápravných opatření. Zařízení IDEXX pro odběr vzorků je jednorázové a po každém odběru by mělo být zlikvidováno, aby nedošlo ke zkřížené kontaminaci.

Omezení odpovědnosti

Společnost IDEXX ani její poskytovatelé licencí, v maximální možné míře povolené zákonem, za žádných okolností nenesou vůči vám či jiné osobě odpovědnost za ztrátu zisku či nemožnost použití, dále
za zvláštní, náhodné, následné, nepřímé, exemplární, sankční nebo vícenásobné náhrady škody, včetně ztráty dobrého jména, dat nebo zařízení nebo za přerušení činnosti vyplývající z výroby, prodeje, dodávek nebo používání našich produktů či služeb nebo ze selhání nebo zpoždění při poskytování těchto produktů nebo služeb.

Technická podpora:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 nebo +1 207 556 4890

IDEXX Europe Tel.: +800 727 43399

\*HerdChek je známka nebo registrovaná známka společnosti IDEXX Laboratories, Inc. nebo jejích přidružených společností v USA a/nebo dalších zemích. Všechny další názvy a loga společností a produktů jsou známkami nebo registrovanými známkami jejich držitelů.

Informace o patentu: idexx.com/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Popis symbolů

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Číslo šarže** |
|  | **Sériové číslo** |
|  | **Katalogové číslo** |
|  | **Autorizovaný zástupce v Evropském společenství** |
|  | **Použijte do** |
|  | **Výrobce** |
|  | **Důležitá změna v pokynech pro uživatele** |

Nebezpečí



|  |
| --- |
| H302 / H314 / H410 / P303+P361+P353 / P501 |
| **Pozitivní kontrola** - Zdraví škodlivý při požití. Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Vysoce toxický pro vodní organismy s dlouhodobými účinky. PŘI POTŘÍSNĚNÍ KŮŽE (nebo vlasů): Okamžitě sundejte veškerý kontaminovaný oděv. Opláchněte či osprchujte kůži vodou. Likvidujte v souladu s místními / regionálními / národními / mezinárodními předpisy. |

|  |
| --- |
| H315 / H318 / P280 / P332+P313 / P305+P351+P338 / P310 |
| **Negativní kontrola** - Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné poškození očí. Používejte ochranné rukavice / ochranu očí / ochranu obličeje. V případě podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut jemně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazeny a lze je snadno vyjmout. Pokračujte v oplachování. Okamžitě volejte toxikologické informační středisko/vyhledejte lékaře. |
| H315 / H319 / P280 / P332+P313 / P337+P313 |
| **Ředicí roztok 1** - Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice / ochranu očí / ochranu obličeje. V případě podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření. Pokud podráždění očí přetrvává: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření. |

|  |
| --- |
| H316 / H334 / P304+P340 / P332+P313 |
| **Ředicí roztok 2** - Způsobuje podráždění kůže. Při vdechnutí může vyvolat alergické nebo astmatické příznaky nebo dýchací potíže. PŘI NADÝCHÁNÍ: Při ztíženém dýchání vyveďte postiženého na čerstvý vzduch a dbejte na to, aby byl v klidové pozici, v níž se mu lépe dýchá. V případě podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření. |
| EUH208 |
| **Pufr na ředění konjugátu** - obsahuje Proclin. Může způsobit alergickou reakci. |

|  |
| --- |
| H302 / H412 / P501 |
| **Kondicionační pufr** - Zdraví škodlivý při požití. Škodlivý pro vodní organismy s dlouhodobými účinky. Likvidujte v souladu s místními / regionálními / národními / mezinárodními předpisy. |

|  |
| --- |
| H316 / P332+P313 |
| **Promývací roztok 1** - Způsobuje podráždění kůže. V případě podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření. |

One IDEXX Drive Westbrook, Maine 04092 USA

idexx.com

Držitel rozhodnutí o schválení IDEXX Europe B.V.

P.O. Box 1334 NL–2130 EK Hoofddorp

idexx.com