**Kombinovaná sada TeSeE SAP COMBI KIT**

**Krátký protokol testu**

**Počet testů:**

|  |  |
| --- | --- |
|  **192** |  **3551186** |
|  **384** |  **3551192** |
|  **768** |  **3551191** |

SOUPRAVA PRACOVNÍCH ČINIDEL *IN VITRO* PROVYČIŠTĚNÍ A DETEKCI PrPSc U SKOTU, OVCÍ, KOZ A JELENOVITÝCH

V Evropské unii je tento test schválen jako rychlý test pro programy testování BSE a klusavky u skotu, ovcí a koz, které jsou zavedeny v souladu s přílohou III kapitolou A nařízení (ES) č. 999/2001.

Současné pokyny TSE EURL doporučují pro detekci CWD u jelenovitých používat rychlotesty TSE, které prošly validací a získaly schválení USDA a/nebo CFIA pro použití s tkání jelenovitých. Pro členské státy EU, které provádějí cílený dozor nad jelenovitými, viz pokyny EURL (TSE EU Reference Laboratory Guidelines for the detection of Chronic Wasting disease in cervids, ftp://ftp.izsto.it/ EURL%20TSE/RAPID%20TESTS/Test%20protocols/).

Tato testovací souprava prošla validací a získala schválení USDA a CFIA pro použití s jelení tkání pro detekci CWD u jelenovitých.

**VÝHRADNÍ DISTRIBUTOR PRO ČR A DRŽITEL ROZHODNUTÍ O SCHVÁLENÍ:**

***O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.***

Bořetická 2668/1, Praha 9

info@oks.cz, www.biopro.cz

**OBSAH**

1. OBECNÉ INFORMACE
2. Souprava TeSeE SAP Combi Kit

2.1. Princip

2.2. Vzorky

2.3. Složení kombinovaných souprav TeSeE SAP Combi Kit

2.4. Příprava činidel

2.4.1. Činidla připravená k použití

2.4.2. Činidla, která se ředí

2.5. Skladování, doba skladování

2.6. Postup analýzy

 2.6.1. Odběr vzorků

 2.6.2. Homogenizace (drcení) vzorků

 2.6.3. Přenos vzorku

 2.6.4. Štěpení Proteinázou K

 2.6.5. Srážení PrPSc činidlem B

 2.6.6. Zakoncentrování PrPSc

 2.6.7. Projasnění vzorku

2.7. Výpočet a vyhodnocení výsledků

2.8. Limity zkoušky

1. MATERIÁL POTŘEBNÝ K TESTU, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY
2. PŘEDPISY
3. HYGIENICKÉ A BEZPEČNOSTNÍ POKYNY
4. ODKAZY

# 1 - OBECNÉ INFORMACE

Přenosné spongiformní encefalopatie (TSE) jsou pomalá degenerativní onemocnění centrálního nervového systému vyvolaná strukturně abnormálními proteiny, běžně nazývanými priony.

TSE se obecně dělí podle etiologie na iatrogenní, familiární a/nebo sporadické. Klusavka ovcí byla zaznamenána již v 18. století a její přenos byl prokázán (včetně přenosu na kozy). Způsoby nákazy ve stádech však zůstávají nejasné. TSE byly popsány také u jelenů a losů (chronické chřadnutí, CWD) a u krav (bovinní spongiformní encefalopatie, BSE).

K některým formám TSE jsou vnímaví i lidé. Existují důkazy o tom, že bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) se přenesla ze skotu na člověka, pravděpodobně konzumací kontaminovaného masa.

Kromě této variantní formy Creutzfeldt-Jakobovy choroby (vCJD) patří mezi další formy Creutzfeldt-Jakobovy choroby u lidí také Kuru a iatrogenní Creutzfeldt-Jakobova choroba.

U lidí byly prokázány čistě dědičné formy (např. Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom [GSS]) a/nebo sporadické formy CJD, ale jejich výskyt je nízký. Dosud se neprokázalo, zda se podobné sporadické případy TSE vyskytují i u zvířat.

Hlavními charakteristikami těchto onemocnění jsou:

* pomalu postupující, ale vždy fatální průběh,
* nepřítomnost běžných infekčních faktorů,
* postupné hromadění abnormální izoformy přirozeného prionového proteinu (PrP) nazývaného PrPSc v centrálním nervovém systému. Tato izoforma se vyznačuje neobvyklými biochemickými vlastnostmi a zejména zvýšenou odolností vůči proteázám.

Nápadně dlouhá inkubační doba, která předchází neurologickým příznakům, naznačuje, že se klíčové změny vedoucí k rozvoji TSE mohou odehrávat přednostně v mimonervových oblastech, zejména v periferních lymfatických tkáních.

Popsaná metoda je určena k diagnostice BSE i TSE prostřednictvím detekce abnormálně strukturního PrPSc. Tato detekce se provádí především z posmrtně odebraných nervových tkání.

Abnormální PrPSc byl také zjištěn v řadě lymfoidních tkání a orgánů, v zárodečných centrech sleziny, lymfatických uzlinách, tonzilách a/nebo slizniční lymfoidní tkáni na zvířecích modelech nebo u ovcí trpících klusavkou, jelenů a losů (chronické chřadnutí, CWD) a lidských pacientů s variantní formou Creutzfeldt-Jakobovy choroby (vCJD).

Činidlo navržené "Commissariat à l'Énergie Atomique – CEA" (Francouzskou komisí pro atomovou energii), vyvinuté, vyráběné a prodávané společností Bio-Rad, umožňují detekci PrPSc ve vzorcích nervových tkání odebraných zvířatům.

Test se provádí s následujícími činidly a příslušenstvím:

-TeSeE SAP Combi Kit (192 testů) kat. #: 3551186

- TeSeE SAP Combi Kit (384 testů) kat. #: 3551192

- TeSeE SAP Combi Kit (768 testů) kat. #: 3551191

- Homogenizační zkumavky (384 ks) kat. #: 3551139

- Homogenizační zkumavky (768 ks) kat. #: 3551137

- Odběrová stříkačka a jehla (200 ks) kat. #: 3551174

nebo TSE odběrová stříkačka + jehla VITA (200 ks) kat. #:12007909

nebo Filtrační destička (50 ks) kat. #: 3551179

- Mikrodestičky „Deepwell“ (50 ks) kat. #: 3590132

- Střední brusné kuličky (2 000 ks) kat. #: 3551171\*

*\* Pouze pro periferní tkán*ě*.*

# 2 -TeSeE SAP Combi Kit

## 2.1 Princip

Činidla soupravy TeSeE SAP Combi Kit umožňují vyčištění, koncentraci, vyčeření a detekci PrPSc ze vzorků tkání získaných z infikovaných zvířat.

Test TeSeE SAP je imunoenzymatická technika (sendvičový formát) využívající 2 monoklonální protilátky k detekci abnormálního prionového proteinu rezistentního vůči proteináze K v tkáních odebraných infikovaným zvířatům.

Reagenční destička se skládá z 12 proužků po 8 jamkách potažených první monoklonální protilátkou. Druhá monoklonální protilátka je vázána na peroxidázu.

## 2.2 Vzorky

* **Skot:** Vyčištění PrPSc se provádí na vzorcích z centrální nervové soustavy (CNS). K odběru vzorku z mozkového kmene lze použít extrakční nástroj BSE (kat. č.: 3551130).

Vzhledem k tomu, že distribuce PrPSc je v centrální nervové soustavě nepravidelná, musí být pro optimální detekci přednostně vybrána oblast obexu z mozkového kmene. Snadný a rychlý odběr vzorků z oblasti obexu může být bezpečným způsobem proveden odběrovou stříkačkou (kat. č.: 3551175). Podrobné pokyny ke správnému postupu odběru vzorků naleznete v protokolu k odběru vzorků.

* **Malí přežvýkavci a jelenovití:** Přečistění PrPSc se provádí na vzorcích z centrální nervové soustavy (CNS) a/nebo\* periferních tkání (lymfatické uzliny, slezina apod.). K odběru mozkového kmene i mozečku lze použít extrakční nástroj pro malé přežvýkavce (kat. č.: 3551184). Vzhledem k tomu, že distribuce PrPSc je v centrální nervové soustavě nepravidelná, musí být pro optimální detekci přednostně vybrána oblast obexu z mozkového kmene.

Vzorky se odřezávají a váží jednotlivě.

*Poznámka:*

*Ostatní tkáně (mandle, ileum, oční víčko apod.) lze použít pouze pro výzkumné účely. Vzorky se skladují při teplotě 2-8 °C, pokud se vyčištění provede do 24 hodin nebo je lze skladovat zmrazené po dobu až 6 měsíců. Výrobce upozorňuje, aby uživatel nepřekročil maximálně 3 cykly zmrazení/rozmrazení. Pokud je nutné tyto vzorky přepravovat, měly by být zabaleny v souladu s platnými lokálními právními předpisy.*

**2.3 Složení reagenční soupravy TeSeE SAP Combi Kit:**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **OZNAČENÍ** | **TYP ČINIDEL** | **VELIKOST BALENÍ** | **SKLADOVÁNÍ** |
| **3551186** **(192 testů)** | **3551192** **(384 testů)** | **3551191** **(768 testů)** |
| Činidlo A | Denaturační roztok | 1 lahvička(55 ml) | 1 lahvička (120 ml) | 1 lahvička (240 ml) | 2-8 °C |
| Činidlo B | Vyjasňující roztokBarvivo: bromfenolová modř | 1 lahvička(55 ml) | 1 lahvička (120 ml) | 2 lahvičky (120 ml) | 2-8 °C |
| Činidlo C | Rozpouštěcí pufr Barvivo: malachitová zeleň | 1 lahvička(7 ml) | 1 lahvička (14 ml) | 1 lahvička (28 ml) | 2-8 °C |
| PK | Roztok s Proteinázou K Barvivo: fenolová červeň | 1 lahvička(0,5 ml) | 2 lahvičky (0,5 ml) | 4 lahvičky (0,5 ml) | 2-8 °C |
| R1 | Mikrotitrační destička: 12 proužků po 8 jamkách potažených monoklonální protilátkou anti-PrP | 2 destičky | 4 destičky | 8 destiček | 2-8 °C |
| R2 | Promývací roztok: pH 7,4: 10násobně koncentrovaný pufr Tris-NaCl. Konzervační látka: ProClin 300 (0,01 %) | 1 lahvička (250 ml) | 2 lahvičky (250 ml) | 4 lahvičky (250 ml) | 2-25 °C |
| R3 | Negativní kontrola: PBS pufr pH 7,2 doplněný BSA Konzervační látka: ProClin 300 (0,1 %) | 1 lahvička(4 ml) | 2 lahvičky (4 ml) | 4 lahvičky (4 ml) | 2-8 °C |
| R4 | Pozitivní kontrola: PBS pufr pH 7,4 doplněný neinfekčním syntetickým peptidem. Lyofilizovaný.Konzervační látka: ProClin 300 (0,1 %) | 1 lahvička(q.s. 4 ml) | 2 lahvičky(q.s. 4 ml) | 4 lahvičky(q.s. 4 ml) | 2-8 °C |
| R6 | Ředidlo pro vzorky: Konzervační látka: PBS pufr pH 7,2 doplněný BSA a fenolovou červení: ProClin 300 (0,1 %) | 1 lahvička(35 ml) | 1 lahvička (70 ml) | 1 lahvička (140 ml) | 2-8 °C |
| R7 | Konjugát: 10krát koncentrovaná monoklonální protilátka anti-PrP označená peroxidázou v roztoku PBS pufru pH 7,1 doplněném hovězími proteiny a barveném fenolovou červení. Konzervační látka: ProClin 300 (0,1 %) | 1 lahvička(2,8 ml) | 2 lahvičky (2,8 ml) | 4 lahvičky (2,8 ml) | 2-8 °C |
| R8 | Peroxidázový pufr: Roztok kyseliny citronové a octanu sodného o pH 4,0 obsahující 0,015 % peroxidu vodíku a 4 % dimethylsulfoxidu (DMSO). | 1 lahvička(60 ml) | 1 lahvička (120 ml) | 2 lahvičky (120 ml) | 2-8 °C |
| R9 | Chromogen: Roztok tetrametylbenzidinu (TMB) | 1 lahvička(5 ml) | 1 lahvička (10 ml) | 1 lahvička (20 ml) | 2-8 °C |
| R10 | Stop roztok: 1N Kyselina sírová | 1 lahvička(28 ml) | 1 lahvička (56 ml) | 1 lahvička (112 ml) | 2-8 °C |
|  | Přilnavé fólie | 8 kusů | 12 kusů | 16 kusů | 2-25 °C |

Dále uvedená činidla jsou generické komponenty: činidlo A, činidlo B, ředící roztok vzorku (R6), promývací roztok (R2), peroxidázový pufr (R8), chromogen (R9) a stop roztok (R10). Lze je použít se všemi šaržemi souprav TeSeE SAP Combi Kit.

**5 [CZ]**

## 2.4 Příprava činidel

Pokud odebíráte soupravu s činidly z chladničky, nechejte činidla kombinovaných souprav TeSeE SAP Combi Kit před použitím po dobu 30 minut samovolně ohřát na pokojovou teplotu (20-25 °C).

**2.4.1 - Činidla připravená k použití**

Činidla A, B, C, negativní kontrola (R3), roztok pro ředění vzorku (R6) a stop roztok (R10) jsou připraveny k použití.

**Mikrotitrační destičky (R1)**

Před otevřením zataveného sáčku s vysoušedlem nechejte mikrodestičku v ochranném obalu samovolně ohřát na pokojovou teplotu (20-25 °C), aby nedošlo ke kondenzaci vody v jamkách. Otevřete v místě sváru a nepoužité řádky ihned vraťte do sáčku.

Po vytlačení vzduchu sáček pevně uzavřete a skladujte při teplotě 2-8 °C.

**2.4.2 – Činidla, která se ředí:**

**Roztok s Proteinázou K (PK)**

Činidlo A je ředicí roztok pro proteinázu K.

Zředěný roztok Proteinázy K připravte podle následující tabulky.

*Základní poměr: 4 μl proteinázy K v 1 ml činidla A*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **POČET VZORKŮ** | **ČINIDLO A** | **PROTEINÁZA 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 |

Objemy musí být pipetovány přesně. Špičku obsahující roztok s Proteinázou K důkladně vypláchněte postupnými aspiračními/distribučními cykly v činidle A.

Po naředění roztok promíchejte postupným převracením, dokud nezískáte rovnoměrně červený homogenní roztok.

**Promývací roztok (R2):**

Promývací roztok R2 nařeďte v poměru 1:9 v destilované nebo deionizované vodě (například 100 ml činidla R2 do 900 ml destilované vody).

**Pozitivní kontrola (R4):**

Jemně poklepejte lahvičkou s pozitivní kontrolou (R4) o laboratorní stůl, aby se oddělil veškerý materiál ulpělý na pryžové zátce. Otevřete lahvičku a rozpusťte obsah ve 4 ml ředícího roztoku R6. Lahvičku znovu uzavřete a nechte ji přibližně 1 minutu stát, přičemž ji jemně promíchejte kroužením, abyste podpořili rozpouštění.

**Konjugát (R7):**

Nařeďte činidlo R7 v poměru 1:9 v čerstvě naředěném promývacím roztoku (například 0,1 ml činidla R7 do 0,9 ml naředěného promývacího roztoku), přičemž nezapomeňte, že 1 ml konjugátu připraveného k použití postačí na 1 řadu jamek. Jemně promíchejte pomalým převracením. Nepoužívejte vířivé míchadlo.

**Enzymatický projasňovací** **roztok (R8 + R9):**

Nařeďte činidlo R9 v činidle R8 v poměru 1:10 (příklad: 0,1 ml činidla R9 do 1 ml činidla R8), přičemž nezapomeňte, že 1,1 ml enzymatického projasňovacího roztoku postačí na 1 řadu jamek. Jemně promíchejte pomalým převracením. Nepoužívejte vířivé míchadlo typu vortex.

## 2.5 Skladování, doba použitelnosti

Sady TeSeE SAP Combi kit uchovávejte při teplotě 2-8 °C. Všechna činidla jsou při této teplotě stabilní až do data použitelnosti uvedeného na soupravě (před i po otevření lahviček).

Po naředění musí být připravený roztok Proteinázy K (PK) uchováván při pokojové teplotě (20-25 °C) a spotřebován do 6 hodin.

**Skladovatelnost činidel po přípravě je následující:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **OZNAČENÍ** | **PRODUKT V SOUPRAVĚ** | **ŽIVOTNOST** |
| R1 | Mikrotitrační destička v těsněuzavřeném sáčku | 1 měsíc při teplotě 2-8 °C. |
| R2 | Zředěný promývací roztok | 24 hodin při pokojové teplotě (20-25 °C) nebo 2 týdny při 2-8 °C. |
| R4 | Naředěná pozitivní kontrola | 2 hodiny při pokojové teplotě (20-25 °C) nebo 4 hodiny při 2-8 °C nebo 6 měsíců zamražené při -20 °C.Výrobce doporučuje rozdělit naředěný roztok pozitivní kontroly na podíly po 0,5 ml, okamžitě je zamrazit a dále uchovávat při -20 °C. Zmražený roztok můžete podrobit maximálně 3 po sobě jdoucím cyklům zmrazení/rozmrazení. |
| R7 | Naředěný roztok konjugátu (zředěným promývacím roztokem) | 8 hodin při pokojové teplotě (20-25 °C). |
| R8 + R9 |  Enzymatický projasňovacího roztok | 6 hodin při pokojové teplotě (20-25 °C), vždy chraňte před světlem. |

## 2.6 Postup analýzy

Informace o poloautomatickém zpracování vzorku a čistícím protokolu naleznete v návodu k obsluze TeSeE NSP, který je k dispozici na vyžádání u výrobce.

**Postup pro ruční zpracování:**

**2.6.1. Odběr vzorků:**

* U vzorků mozkové tkáně (obexu) odeberte 350 ± 40 mg nervové tkáně.
* Pro vzorky retropharyngeálních lymfatických uzlin přidejte před vložením vzorku do homogenizační zkumavky kuličky střední velikosti (kat. č.: 3551171). Odeberte 200 ± 20 mg lymfatické tkáně ze 2-3 různých oblastí vnější kůry lymfatické uzliny. Tkáň nakrájejte na 2-3 menší kousky.

Vložte vzorek do homogenizační zkumavky. Zkumavku pevně uzavřete a přejděte ke kroku drcení (pro drcení je možné použít některý z následujících přístrojů: Ribolyser, systém TeSeE Precess 24, systém TeSeE Precess 48 nebo systém Precellys Evolution).

*Poznámka: V návaznosti na záv*ě*ry uvedené ve v*ě*deckém stanovisku EFSA ke chronickému ch*ř*adnutí (II), Panel EFSA pro biologická nebezpe*č*í (BIOHAZ), EFSA Journal 2018; 16(1):5132,59 s., doporu*č*uje aktuálně laborato*ř *EURL ve svých pokynech (TSE EU Reference Laboratory Guidelines for the detection of Chronic Wasting disease in cervids, ftp://ftp.izsto.it/EURL%20TSE/RAPID%20TESTS/ Test%20protocols/) testování vzorků obexu i retropharyngeálních lymfatických uzlin pro detekci CWD u jelenovitých, aby se maximalizovala efektivita národního dozoru. Další informace získáte ve své národní referenční laboratoři.*

*\* Vezměte prosím na vědomí, že v Německu musí být provedeno individuální vyšetření mozkové tkáně i tkáně lymfatických uzlin.*

# 2.6.2. Homogenizace (drcení) vzorků:

*Poznámka: Pokud mají být k drcení vzorku použity kuličky střední velikosti, nelze použít systém TeSeE Precess 24, protože by mohlo dojít k úniku.*

Vložte zkumavky do korunky homogenizátoru. Proveďte jeden cyklus drcení s následujícími parametry přístroje:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Tkáň Obex | Tkáň lymfatických uzlin |
| Ribolyser | TeSeE Precess 48TeSeE Precess 24Precellys Evolution | Ribolyser | TeSeE Precess 48Precellys Evolution |
| Čas (sec.) | 45 | - | 45 | - |
| Rychlost | 6.5 | - | 6.5 | - |
| Počet cyklů | 2 | NEUPLATŇUJE SE | 2 | NEUPLATŇUJE SE |
| Program | - | Program / TSE1 | - | Program 2 / TSE2 |

Během drtících cyklů se přístroj zahřívá, mezi jednotlivými cykly drcení nechejte přístroj vychladnout.

Pokud je drcení nedostatečné, lze provést další 1 nebo 2 cykly.

Během drtících cyklů se zkumavky se vzorky zahřívají, mezi jednotlivými cykly drcení nechejte zkumavky zchladnout na pokojovou teplotu (20-25 °C).

V případě potřeby ponořte zkumavky do ledové tříště s vodou, tím dojde k jejich ochlazení.

# 2.6.3. Přenos vzorku:

Vyjměte z přístroje drtící zkumavky a homogenát znovu několikrát promíchejte opakovaným převrácením zkumavky. Homogenát přeneste jednou z následujících metod:

**• Metoda kalibrační stříkačky**

Kalibrační injekční stříkačkou (kat. č.: 3551174 nebo Ref.: 12007909) odeberte 250 μl a dbejte na to, abyste jehlu ponořili až do pelety s kuličkami, nenabírejte neúplně rozmělněné fragmenty tkáně.

Přeneste vzorek o objemu 250 μl do 2 ml mikrozkumavky typu Eppendorf nebo do destičky s hlubokými jamkami (kat. č.: 3590132).

**• Metoda filtračních destiček**

Přenos a filtraci proveďte odděleně pomocí filtrační destičky (kat. č.: 3551179) a destičky s hlubokými jamkami (kat. č.: 3590132) a to jednou z následujících filtračních technik:

**- Vakuová technika:**

Do spodní části vakuového rozdělovače nasaďte hlubokotěsnou destičku (kat. č.: 3590132) (hlavní destička), umístěte vedení rozdělovače a poté filtrační destičku (kat. č.: 3551179). Odeberte alespoň 400 μl (≤ 1000 μl) špičkou pro odběr 1000 μl a přeneste do jedné jamky filtrační destičky (kat. č.: 3551179), vynechte prvních 6 pozic (od A1 do F1). Filtrační destičku pečlivě utěsněte plastovou fólií. Nastavte vakuometr pumpy (kat. č.: 3590350) na 25,4 cm Hg (± 2,5 %). Zapněte vývěvu a zkontrolujte správnost vakua na manometru, poté otevřete rozdělovací ventil na 1 minutu ± 6 s. Zavřete ventil, vypněte vývěvu a uvolněte podtlak z rozdělovače.

**- Technika odstřeďování:**

Odeberte alespoň 400 μl (≤ 1000 μl) špičkou pro odběr 1000 μl a přeneste do jedné jamky filtrační destičky (kat. č.: 3551179), která byla předtím nasazena na destičku s hlubokými jamkami Deepwell (kat. č.:3590132) (hlavní destička), vynechte prvních 6 pozic (od A1 do F1). Odstřeďujte celý systém (filtrační destičku i destičku s hlubokými jamkami Deepwell) po dobu 1 minuty při 500 G. Dbejte na to, aby byla filtrační destička na destičce Deepwell pevně usazena.

*Poznámka: Odstředivka musí být vybavena rotorem Deepwell (kat. č.: 3590136)*

*pro odstředivku 5804R Eppendorf (kat. č.: 3591396).*

Po provedení obou technik zlikvidujte filtrační destičku a přeneste 250 μl přefiltrovaného vzorku do jiné nepoužité destičky Deepwell (čistící destička pro vzorky) pokud používáte manuální protokol nebo přímo umístěte hlavní destičku do přístroje NSP (viz návod k obsluze TeSeE NSP).

*Poznámka: V této fázi mohou být homogenizační zkumavky po drcení, mikrozkumavky a destička typu Deepwell po přenosu vzorku uloženy uzavřené:*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Při pokojové teplotě(20-25 °C) po dobu 8 hodin | Při teplotě 2-8 °C(v ledu nebo v chladničce)po dobu 15 hodin | Při -20 °C na 1 rok\* |
| Drtící zkumavky a mikrozkumavky | Ano | Ano | Ano |
| Destička Deepwell | Ano | Ano | Ne |

**\*** Zmražené vzorky musí být pozvolna rozmrazeny při pokojové teplotě (20-25 °C). Můžete je podrobit maximálně 3 po sobě jdoucím cyklům zmrazení/rozmrazení. Vzorky musí být před použitím vždy promíchány pomalým převracením.

# 2.6.4. Štěpení Proteinázou K:

Do každé mikrozkumavky nebo jamek destičky typu Deepwell nadávkujte 250 μl (±10 %) zředěného roztoku Proteinázy K (PK) [viz bod 2.4]. Dbejte na to, abyste mezi prvním a posledním vzorkem nepřekročili interval 5 minut pro přenos zředěného roztoku Proteinázy K (PK). Uzavřené mikrozkumavky nebo jamky destičky typu Deepwell utěsněné hliníkovou fólií ihned 10krát promíchejte převrácením. Po promíchání vložte mikrozkumavky nebo destičku typu Deepwell do inkubátoru nejpozději do 2 minut. Inkubujte při teplotě 37 °C ± 2 °C v inkubátoru s topným blokem po dobu 10 minut ± 1 minuta.

*Poznámka:* Při *použití systému Deepwell musí být topný blok vybaven stojanovým adaptérem Deepwell pro topný blok.*

# 2.6.5. Srážení PrPSc činidlem B:

Vyjměte mikrozkumavky nebo destičky typu Deepwell z inkubátoru s topným blokem. Mikrozkumavky otevřete a rozdělte 250 μl (± 10 %) činidla B do všech mikrozkumavek nebo jamek destičky typu Deepwell. Dodržujte stejné pořadí dávkování, jak je popsáno v kroku 4. Mezi výstupem z inkubátoru a promícháním nemá uplynout delší doba než 2 minuty. Promíchání se provádí za stejných podmínek jako v kroku 4.

# 2.6.6. Zakoncentrování PrPSc:

Vzorky odstřeďte v mikrozkumavkách nebo čistící destičce typu Deepwell podle následujících parametrů nejpozději do 30 minut po přenosu a promíchání s činidlem B.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Odstřeďování | Mikrozkumavky | Destička typu Deepwell |
| Rychlost (g) | 20 000 | 15 000 | 2 000 |
| Čas (min) | 5 | 7 | 10 |
| Teplota (°C) | 20 | 20 | 4 |

*Poznámka: U destiček typu Deepwell ponechte před odstředěním 5minutovou prodlevu*

*při teplotě 37 °C nebo 10minutovou prodlevu při pokojové teplotě (20-25 °C).*

# 2.6.7. Projasnění vzorku:

Supernatant (tekutou fázi) odstraňte převrácením mikrozkumavek nad nádobou na odpad. Mikrozkumavky vysušte převrácením na savý papír po dobu 5 minut.

Pokud pracujete s destičkou typu Deepwell, vložte ji do jednotky DW40 (kat. č.: 3590137). Vyberte program "TSE DW" a zvolte počet proužků, kde má proběhnout reakce. Jamky destičky typu Deepwell na konci procesu DW40 vysušte převrácením destičky na savém papíru na dobu 5 minut.

Do všech mikrozkumavek nebo jamek destičky typu Deepwell nadávkujte 25 μl (± 10 %) činidla C. Dávkování činidla C musíte stihnout v limitu do 10 minut po ukončení sušení.

Ihned (nejpozději do 2 minut) inkubujte po dobu 5 minut ± 1 minuta při teplotě 100 ± 5 °C. Během inkubace destičku typu Deepwell neuzavírejte těsnící fólií.

*Poznámka:* Při *použití systému Deepwell musí být topný blok vybaven stojanovým adaptérem Deepwell pro topný blok.*

Vyjměte mikrozkumavky nebo destičku typu Deepwell z inkubátoru a přítomné vzorky promíchejte na míchadle typu vortex po dobu 5 ± 2 s.

Vzorky v mikrozkumavkách nebo destičce typu Deepwell lze skladovat 5 hodin při teplotě 2-8 °C nebo 72 hodin při teplotě -20 °C. Zmrazené vzorky rozmrazujte pozvolna při pokojové teplotě (20-25 °C) a promíchejte na míchadle typu vortex po dobu 5 ± 2 s.

K přečištěným vzorkům přidejte 125 μl (± 10 %) činidla R6. Těsně před dávkováním na destičku (R1) promíchejte zředěné vzorky na míchadle typu vortex po dobu 5 ± 2 s.

1. Vyjměte stojan na mikrodestičky a požadovaný počet řádků (R1) z ochranného obalu. Řádky, které nespotřebujete, vraťte zpět do sáčku na mikrodestičky a hermeticky jej uzavřete.
2. Připravte pozitivní kontrolu (R4), jak je popsáno v kapitole 2.4.2.
3. Pro každou sérii testů a každou jednotlivou destičku dávkujte 100 μl (± 10 %) kontroly nebo vzorku do jamek v následujícím pořadí:
* jamky A1, B1, C1, D1: negativní kontrola (R3)
* jamky E1, F1: pozitivní kontrola (R4)
* jamky G1, H1 atd.: vzorek naředěný činidlem (R6)
1. Pečlivě utěsněte přilnavou fólií a inkubujte 30 minut ± 2 minuty při 37 °C ± 2 °C.
2. Připravte si promývací roztok (R2).
3. Připravte si roztok konjugátu (R7).
4. Odstraňte přilnavou fólii a proveďte 3 promývací cykly.

Optimálních podmínek promytí dosáhnete například s promývacími systémy PW40, PW41 nebo 1575 Bio-Rad s programem TSE 3.

Po posledním promývacím cyklu nenechávejte mikrodestičku stát déle než 5 minut. Před následujícím krokem osušte obrácením na savém papíře.

1. Do každé jamky přeneste 100 μl (±10 %) roztoku konjugátu (R7).
2. Pečlivě utěsněte přilnavou fólií a inkubujte 30 minut ± 2 minuty při teplotě 2-8 °C.
3. Připravte si roztok enzymatického projasnění (R8+R9).
4. Odstraňte přilnavou fólii a proveďte 5 promývacích cyklů.

Optimálních podmínek promytí dosáhnete například s promývacími systémy PW40, PW41 nebo 1575 Bio-Rad s programem TSE 5.

Po posledním promývacím cyklu nenechávejte mikrodestičku stát déle než 5 minut.

Před následujícím krokem osušte obrácením na savém papíře.

1. Do každé jamky přeneste 100 μl (±10 %) enzymatického projasňovacího roztoku (R8+R9) a inkubujte v temnu při pokojové teplotě (20-25 °C) po dobu 30 minut ± 2 minuty. Při této inkubaci nepoužívejte přilnavou fólii.
2. Do každé jamky přidejte 100 μl (±10 %) stop roztoku (R10) ve stejném pořadí a se stejnou dávkovací rychlostí jako u roztoku pro enzymatické projasnění.
3. Důkladně otřete dno destičky a do 30 minut po zastavení reakce stanovte optickou hustotu OD při 450 nm - 620 nm (režim bichromatismu) (řádky musí být před odečtením vždy chráněny před světlem).

**Parametry promývacího systému pro mikrodestičky:**

**NÁZEV: TSE 3**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| EDIT mode function | PLATE | Manifold | STRIPS | Method | Mode | CROS SW ASP. | ASP. TIME | VOLUME | OVER FLOW | LIQUID | FLOW | BOT. WASH NUMBER | BOTTOM TIME | BOT.ASP.NUMBER | SHAKE TIME | Nr. 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 | - | - | - |

**NÁZEV: TSE 5**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| EDIT mode function | PLATE | Manifold | STRIPS | Method | Mode | CROS SW ASP. | ASP. TIME | VOLUME | OVER FLOW | LIQUID | FLOW | BOT. WASH NUMBER | BOTTOM TIME | BOT.ASP.NUMBER | SHAKE TIME | Nr. 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 | - | - | - |

**NÁZEV DESTIČKY: FLAT 01 (PW40/PW41) - FLAT 03 (1575)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| BOT:SHAPE | ASP.Horizontal Position  | CENTERING | ASP.Vertical Position | BOT.Vertical Position | B.W.Vertical Position | HORIZONTAL SPEED | VERTICAL SPEED | ASP. Downward speed | DISP. Upward speed | BOT. Downward 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 |

**12 [CZ]**

## 2.7 Výpočet a vyhodnocení výsledků:

**1) Výpočet průměrné optické hustoty (OD) negativní kontroly**

OD R3 = průměrná hodnota OD ze čtyř jamek R3

**2) Výpočet mezní hodnoty**

2.1 Vzorky skotu a malých přežvýkavců:

Mezní hodnota se rovná: OD R3 + 0,210

Příklad:

OD R3 = 0,020

Mezní hodnota = 0,020 + 0,210 = 0,230

2.2 Vzorky jelenovitých:

Mezní hodnota se rovná: OD R3 + 0,110

Příklad:

OD R3 = 0,020

Mezní hodnota = 0,020 + 0,110 = 0,130

**3) Podmínka ověření testu**

**• Negativní kontrola (R3):**

*a)* Ověření *výsledků testem negativního kontrolního roztoku:*

Optická hustota každé negativní kontroly musí být nižší než 0,150.

Vyloučit můžete maximálně jednu odlehlou hodnotu, pokud je její optická hustota vyšší nebo rovna 0,150.

Test se musí opakovat, pokud více než jedna negativní kontrola leží mimo tento limit.

*b) Homogenita hodnot negativního kontrolního roztoku:*

Vypočítejte průměr negativních kontrol.

Hodnoty vyšší než průměr negativních kontrol + 40 % (OD R3 + 40 %) se musí vyloučit.

* + Pokud je v bodě a) vyloučena jedna individuální hodnota, lze v bodě b) vyloučit jednu další hodnotu.
	+ Pokud není v bodě a) vyloučena žádná záporná kontrolní hodnota, lze v bodě b) vyloučit maximálně dvě hodnoty.

Test se musí opakovat, pokud jsou vyloučeny více než dvě hodnoty negativní kontroly [kritéria a) +b)].

**• Pozitivní kontrola (R4):**

Průměrná optická hustota pozitivní kontroly (R4 OD) musí být vyšší nebo rovna 1,000. Test se musí opakovat, pokud je průměr hodnot optických hustot pozitivní kontroly (R4 OD) nižší než 1,000.

**4) Vyhodnocení výsledků**

Vzorky s optickou hustotou nižší, než je mezní hodnota, se podle pokynů k použití soupravy TeSeE SAP Combi Kit považují za negativní.

Výsledky, které se nacházejí těsně pod mezní hodnotou (mezní hodnota - 10 %), je však třeba hodnotit obezřetně a příslušné vzorky by měly být znovu otestovány ve dvou opakováních, počínaje původním homogenizovaným materiálem.

Vzorky s optickou hustotou vyšší nebo rovnou mezní hodnotě se podle pokynů k použití soupravy TeSeE SAP Combi Kit považují za původně reaktivní a před konečným hodnocením by měly být znovu testovány ve dvou opakováních, počínaje původním homogenizovaným materiálem.

Po opakování testu se vzorek považuje za pozitivní podle pokynů k použití soupravy TeSeE SAP Combi Kit, pokud je alespoň jedno ze dvou měření pozitivní (větší nebo rovno mezní hodnotě). Vzorek je podle pokynů k soupravě TeSeE SAP Combi Kit považován za negativní, pokud jsou tyto dvě hodnoty menší než mezní hodnota.

Vzorky, které byly opakovaně testovány v duplikátech a u nichž bylo zjištěno, že jsou negativní podle pokynů k soupravě TeSeE SAP Combi Kit, ale u nichž se jedna ze dvou hodnot blíží hraniční hodnotě (hraniční hodnota - 10 %), je třeba interpretovat opatrně a s přihlédnutím k dalším laboratorním testům.

## 2.8 Limity testu

Při použití dehydratovaných vzorků nebo periferních tkání mohou nastat potíže při drcení.

V případě potřeby může být u tohoto typu vzorku nutné krok drcení (krok č. 2 postupu) několikrát opakovat.

Negativní výsledek znamená, že testovaný vzorek neobsahuje žádný PrPSc detekovatelný pomocí soupravy TeSeE SAP Combi kit. Protože však nemusí být detekovány velmi nízké hladiny PrPSc, nevylučuje takový negativní výsledek možnost infekce.

Každý vzorek s opakovaně pozitivním výsledkem podle kritérií pro interpretaci testu musí být potvrzen v souladu s národní referenční laboratoří pro TSE nebo ve výjimečných případech v referenční laboratoři.

**3 – MATERIÁL POTŘEBNÝ K TESTU, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY**

* Destilovaná nebo deionizovaná voda.
* Chlornan sodný o koncentraci 20 000 ppm a 1 M hydroxid sodný.
* Absorpční papír.
* Jednorázové ochranné rukavice.
* Ochranné brýle nebo maska s kšiltem.
1. **Krok vyčištění:**
* 2 ml polypropylenové mikrozkumavky s uzávěry a vhodným stojanem na zkumavky.
* Automatické nebo poloautomatické nastavitelné pipety pro dávkování objemů

od 20 μl do 500 μl.

* Systémy pro drcení tkání: TeSeE PRECESS 24, TeSeE PRECESS 48 nebo Precellys Evolution.
* Odstředivka\* přizpůsobená pro mikrozkumavky.
* Jeden topný blok pro mikrozkumavky s termostatem na 37 °C ± 2 °C a jeden topný blok pro mikrozkumavky s termostatem na 100 °C ± 5 °C.
* Pro poloautomatické čištění vzorku: TeSeE NSP System.
1. **Krok detekce:**
* Automatické nebo poloautomatické nastavitelné nebo fixní pipety pro dávkování

50 μl, 100 μl, 200 μl a 1000 μl. Zkumavky pro odměřování 10 ml, 20 ml, 100 ml.

* Nádoby na kontaminovaný odpad.
* Inkubátor mikrodestiček s termostatem nastavitelným na 37 °C ± 2 °C.
* Chladící komora s nastavitelným chlazením na 2-8 °C.
* Automatický nebo poloautomatický systém promývání mikrodestiček\*.
* Přístroj pro čtení mikrodestiček\* (vybavený filtry 450 nm a 620 nm).
* Systém\* pro automatizaci jednotlivých fází protokolu testu. Výkon systému musí odpovídat požadavkům specifikovaným výrobcem soupravy.

*\* Seznam dostupných přístrojů získáte od společnosti Bio-Rad.*

# 4 – PŘEDPISY

Kvalita výsledků závisí na dodržování následujících správných laboratorních postupů a na dodržování zásad správné laboratorní praxe:

* Činidla, u kterých je to nutné, se musí skladovat při teplotě 2-8 °C.
* Nepoužívejte činidla s prošlou dobou použitelnosti.
* Rozpuštěnou a při pokojové teplotě (20-25 °C) skladovanou Proteinázu K (PK) nepoužívejte déle než 6 hodin po rozpuštění.
* Při stejné manipulaci nemíchejte činidla pocházející z různých šarží souprav TeSeE SAP Combi Kit, s výjimkou generických činidel: promývací roztok (R2), ředidlo pro vzorky (R6), peroxidázový substrátový roztok (R8), chromogen (R9), stop roztok (R10), homogenizační zkumavky, činidlo A a činidlo B.
* Promývací roztok (R2), roztok pro ředění vzorků (R6), peroxidázový substrátový roztok (R8), chromogen (R9), stop roztok (R10) a homogenizační zkumavky lze použít se všemi soupravami z produktové řady TeSeE (TeSeE, TeSeE SAP a TeSeE sheep/goat assays).
* Před použitím nechte všechna činidla minimálně 30 minut ohřát na pokojovou teplotu (20-25 °C).
* Důkladně nařeďte činidla, u kterých je to stanoveno pracovním protokolem.
* Testy neprovádějte v přítomnosti reaktivních par (kyselin, zásad, aldehydů) nebo prachu, které by mohly změnit enzymatickou aktivitu používaných sloučenin.
* Používejte pouze polypropylenové zkumavky.
* Používejte dokonale umyté skleněné nádobí opláchnuté destilovanou vodou nebo nejlépe jednorázový materiál.
* Po dokončení promývacího kroku nenechávejte mikrodestičku stát déle než 5 minut před dávkováním činidel.
* Enzymatická reakce je velmi citlivá na všechny kovy nebo kovové ionty. Proto se do kontaktu s různými roztoky obsahujícími konjugovaný komplex nebo substrát nesmí dostat žádný kovový prvek.
* Roztok pro projasnění (substrátový pufr + chromogen) musí být bezbarvý. Pokud se zbarvení objeví několik minut již po rozpuštění nebo ředění, činidlo nelze použít a musí se vyměnit. Tento roztok by měl být přednostně připraven z jednorázových plastových nádob a distribučního materiálu nebo skleněném nádobí, které bylo předem promyto v kyselině chlorovodíkové (1M), opláchnuto v destilované vodě a pečlivě vysušeno. Tento roztok skladujte chráněný před světlem.
* Pro každý vzorek použijte novou pipetovací špičku.
* Promývání jamek je v pracovním protokolu nezbytným krokem: dodržujte doporučený počet promývacích cyklů a zajistěte, aby byly všechny jamky zcela naplněny a poté zcela vyprázdněny. Nedostatečné promytí může vést k nesprávným výsledkům.
* Nikdy nepoužívejte stejnou nádobu a pipetu ke společnému dávkování roztoku konjugátu a projasňovacího roztoku.

# 5 – HYGIENICKÉ A BEZPEČNOSTNÍ POKYNY

Obecně platí, že hygienické podmínky, opatření pro biologickou bezpečnost a správná laboratorní praxe musí být v souladu s místními doporučeními.

* Všechna činidla soupravy jsou určena k použití při diagnostice "*in vitro*".
* Při manipulaci s činidly a vzorky používejte jednorázové rukavice a po manipulaci s nimi si důkladně umyjte ruce.
* Nepipetujte ústy.
* Používejte polypropylenové nádoby, abyste se vyhnuli poranění rozbitým sklem.
* Všechny materiály, které jsou v přímém kontaktu se vzorky a promývacími roztoky, je třeba považovat za kontaminované.
* Vyvarujte se rozstřikování roztoků obsahujících vzorky.
* Kontaminované povrchy je třeba vyčistit roztokem chlornanu sodného (bělidlo) o koncentraci 20 000 ppm. Pokud je kontaminující kapalinou kyselina, musí se kontaminované povrchy před použitím bělidla nejprve neutralizovat hydroxidem sodným. Povrchy se musí opláchnout destilovanou vodou, vysušit etanolem a otřít savým papírem. Materiál použitý k čištění musí být vyhozen do speciální nádoby na kontaminovaný odpad.
* Vzorky, materiál a kontaminované výrobky musí být po dekontaminaci odstraněny:
	+ buď namočením do 1 M hydroxidu sodného (konečná koncentrace) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě (20-25 °C),
	+ nebo máčením v roztoku chlornanu sodného o koncentraci 20 000 ppm po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě (20-25 °C),
	+ nebo autoklávováním při teplotě nejméně 134 °C po dobu nejméně 18 minut pod tlakem 3 barů. Poznámka: nikdy neautoklávujte roztoky obsahující roztok chlornanu sodného nebo činidlo B.
* Všechny operace spojené se screeningovými testy na přenosnou spongiformní encefalopatii (TSE) podléhají předpisům a musí být prováděny v izolované laboratoři s omezeným a kontrolovaným přístupem určené výhradně pro tuto činnost. Pro zajištění bezpečnosti obsluhy je vyžadován laboratorní plášť, svrchní obuv, rukavice, maska s hledím nebo jednoduchá maska s ochrannými brýlemi.
* Pracovníci musí absolvovat zvláštní školení týkající se rizik spojených s původci TSE nebo priony a ověřených způsobů dekontaminace nekonvenčních původců. Opatření biologické bezpečnosti musí být v souladu s doporučeními běžných orgánů dané země.
* Zabraňte jakémukoli kontaktu roztoku substrátu, chromogenu a stop roztoku s pokožkou a sliznicemi.
* Neutralizujte a/nebo autoklávujte všechny promývací roztoky nebo odpady z promývání nebo jakékoli kapaliny obsahující biologické vzorky před jejich odstraněním.
* Doporučení týkající se nebezpečí a bezpečnostních opatření v souvislosti s touto testovací soupravou naleznete na piktogramech uvedených na štítcích činidel a v informacích uvedených na konci tohoto návodu k použití. Bezpečnostní list je k dispozici na [adrese www.bio-rad.com.](http://www.bio-rad.com/)

# 6 – ODKAZY

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 postmorten diagnosis of BSE in central nervous system tissue. The Veterinary Record (149) 577-582.

1. 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.

1. 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).

1. EUROPEAN COMMISSION Directorate General DG XXIV (1999). Preliminary Report: The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible Spongiform Encephalopathy in bovines.
2. JP. DESLYS (1999)

Prevention du risque d’Encephalopathie Spongiforme Subaiguë Trans-missible. La Revue du Praticien (49) 966-970.

1. R. KNIGHT (1999)

The relationship between new variant Creutzfeldt-Jakob Disease and Bovine Spongiform Encephalopathy – Vox sanguinis (76) 203-208.

1. D. DORMONT (1997)

Les Agents Transmissibles Non Conventionnels ou prions – Virologie (1) 11-22.

1. F. HILLA, M. DESBRULAIS, 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.

1. CI. LASMEZAS, JP. DESLYS, O. ROBAIN, D. DORMONT (1997)

L’agent secret des maladies à prions – La Recherche 46-53.

1. AM. HAYWOOD (1997)

Transmissible Spongiform Encephalopathies. The New England Journal of Medecine (337-25) 1821-1828.

1. J. COLLINGE, KC. SIDLE, J. MEADS, J. IRONSIDE, AF. HILL (1996)

Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of «new variant» CJD. Nature (383) 685-690.

1. RG. WILL, J. IRONSIDE, 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.

1. SB. PRUSINER & AL (1993)

Immunologic and molecular biologic studies of prion protein in Bovine Spongiform Encephalopathy. The Journal of Infectious Diseases (167) 602-613.

**Vzorkovací (odběrová) souprava**

**3551175**

**ZPŮSOB ODBĚRU VZORKŮ PRO TSE SCREENINGOVOU ANALÝZU**

**spole**č**nosti Bio-Rad**

**OBSAH**

1 - OBECNÉ INFORMACE

1.1 Odběr vzorků na jatkách

1.2 Postup odběru vzorků v laboratoři

2 - POMŮCKA PRO ODBĚR VZORKU spol. Bio-Rad

3 - HMOTNOST VZORKU, KTERÝ SE MÁ ODEBRAT

4 - PRACOVNÍ POSTUP

5 - BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A POKYNY

6 - ZDRAVOTNÍ A BEZPEČNOSTNÍ POKYNY

**1 - OBECNÉ INFORMACE**

Screeningové testy TSE společnosti Bio-Rad se provádějí na vzorku 350 ± 40 mg centrální nervové tkáně (CNS). Specifickou anatomickou oblastí pro detekci PrPSc u infikovaných zvířat je mozkový kmen, přesněji oblast jádra bloudivého nervu v oblasti obexu. V této oblasti mozkového kmene je PrPSc nejvíce koncentrován.

Mozek

Oblast odběru vzorků (vpravo nebo vlevo)

Mícha

Obex

Příčný řez *mozkovým kmenem na úrovni obexu, který identifikuje klí*č*ová cílová místa pro diagnostiku pomocí histopatologie a imunohistochemie u BSE (jádro solitárního traktu [1] a jádro trigeminálního traktu V [2]) a klusavky (dorzální jádro trigeminálního traktu V [3]).*

**(Zdroj: OIE - Příručka diagnostických testů a vakcín**

**pro suchozemská zvířata)**

## 1.1 Odběr vzorků na jatkách

Mozkový kmen můžete snadno a rychle odebrat vhodným nástrojem nebo lžičkou pro odběr vzorků přes okcipitální otvor, aniž by se otevírala dutina lebeční.

*odběr vzorků pomocí sběrné lžíce spol. Bio-Rad*

## 1.2 Postup odběru vzorků v laboratoři

Celý vzorek mozkového kmene odešlete do testovací laboratoře, která zajistí, aby byla dodržena všechna místní příslušná biologická bezpečnostní opatření. V laboratoři odřízne (skalpelovým nožem) odborný personál příslušné množství mozkové tkáně z oblasti obexu.

Níže je popsán postup, jak účinně odebrat vzorek z oblasti obexu pomocí injekční stříkačky Bio-Rad, aniž by došlo k poškození tkáně.

# 2 – POMŮCKA PRO ODBĚR VZORKU spol. Bio-Rad

Nástroj na odběr vzorku (výrobce spol. Bio-Rad) se skládá ze zeleného pístu a průhledného válce. Tělo nástroje je označeno řadou geometrických symbolů.

Stříhací drát

Značky (černé)

Hlaveň (průhledná)

Píst stříkačky (zelený)

Hlaveň stříkačky

# 3 - HMOTNOST VZORKU, KTERÝ SE MÁ ODEBRAT

Množství vzorku by v průhledném válci mělo zaujímat prostor mezi dvěma symboly stejného tvaru, což odpovídá hmotnosti (m) 350 ± 40 mg.

**m m**

**m**

**m m**

# 4 - PRACOVNÍ POSTUP

* Vezměte injekční stříkačku se vzorkem a vytáhněte zelený píst přibližně 1 cm od jeho výchozí polohy a poté jej opět zatlačte.
* Pevně uchopte mozkový kmen do jedné ruky a použijte jednorázový obal (plastový sáček, rukavici apod.), abyste zabránili možné kontaminaci vzorku. Konec mozkového kmene by měl zůstat přístupný. V případě, že má obdržený mozkový kmen příliš dlouhou šňůru, měl by ji uživatel zkrátit. Odběratelé vzorků mají být pro tuto činnost řádně proškoleni.
* Druhou rukou umístěte otevřený konec odběrové stříkačky na pravou stranu kaudálního konce mozkového kmene.

*Poznámka: po odběru vzorku musí zůstat k dispozici kompletní profil mozkového kmene s neporušenou oblastí obexu pro případ potřeby potvrzovacích testů.*

* Zavádějte hlaveň injekční stříkačky postupně do mozkového kmene, přičemž zelený píst držte v poloze souběžné s podélnou osou materiálu (vzhledem k mozkovému kmeni).

*Poznámka: Při odběru vzorku z oblasti obexu dbejte na to, aby hlaveň stříkačky zůstala uvnitř vybrané strany mozkového kmene.*

* Tento pohyb zastavte, jakmile horní část válce stříkačky dosáhne horní hranice zóny odběru vzorků.
* Odřízněte jádro vzorku otočením válce stříkačky o jednu celou otáčku.
* Pomalu vyjměte stříkačku se vzorkem z mozkového kmene a dávejte pozor, abyste nepoškodili okolní tkáně. Zbylý mozkový kmen můžete vložit do původní nádoby na vzorky.
* Zkontrolujte, zda v odebraném vzorku jádra nejsou vzduchové mezery. V případě potřeby stlačte jádro vzorku uzavřením horní části válce stříkačky a zatlačte zelený píst, dokud se vzduchové mezery neodstraní. Současně zajistěte, aby byla zachována tkáň nejblíže otvoru hlavně stříkačky.
* Držte horní část hlavně stříkačky v klidu a přesuňte zelený píst na nejbližší symbol.
* Zkontrolujte, zda jádro vzorku pokrývá alespoň jednu zónu odpovídající "m", jak je popsáno v předchozí části tohoto dokumentu (hmotnost vzorku potřebná pro test).
* Vezměte zkumavku na rozmělňování a sejměte víčko, stříkačkou na vzorky opatrně stiskněte zelený píst na další stejný symbol, abyste zajistili, že se do zkumavky na rozmělňování dávkuje správná hmotnost tkáně ("m"). Nezapomeňte, že píst musíte posunout do odpovídající polohy dalšího symbolu, jak je uvedeno v části "Hmotnost vzorku potřebná pro zkoušku".
* Odřízněte jádro vzorku uchopením horní části injekční stříkačky proti vnitřnímu okraji brusné trubice.
* Vzorky s extrémně špatnou kvalitou by měly být označeny štítkem a komentářem o špatné kvalitě vzorku.
* Nepoužitou část jádra vzorku lze uložit vložením injekční stříkačky do původní nádoby se zbývajícím kouskem mozkového kmene.

# 5 - BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A POKYNY

Stejně jako u každého pipetovacího zařízení doporučuje společnost Bio-Rad, aby odborní pracovníci používající odběrovou stříkačku pravidelně sledovali reprezentativní statistickou populaci odebraných vzorků a zajistili tak, že hmotnost těchto vzorků bude v předepsaném hmotnostním rozmezí.

Vzorkovací stříkačka se použije pouze jednou a poté se zlikviduje. Tím se minimalizuje riziko kontaminace dalších vzorků.

Při odběru vzorku musí být dodržena veškerá bezpečnostní opatření, která vyplívají z povahy vyšetření.

Použité injekční stříkačky je třeba po dekontaminaci zlikvidovat (viz pokyny k bezpečnosti a ochraně zdraví).

Jestliže jádro vzorku i přes správné provedení postupu nenaplní celý průhledný válec stříkačky, doporučuje výrobce vzorek zvážit a určit jeho přesnou hmotnost.

# 6 - ZDRAVOTNÍ A BEZPEČNOSTNÍ POKYNY

Hygienické podmínky, opatření biologické bezpečnosti a správná laboratorní praxe musí být v souladu s místními pokyny regulačních orgánů.

Odběrová stříkačka na vzorky je určena pouze pro použití při diagnostických postupech "*in vitro".*

Při manipulaci s činidly a vzorky používejte jednorázové rukavice a po manipulaci s nimi si

důkladně umyjte ruce.

V e š k e r é vybavení, které přišlo do přímého kontaktu se vzorky, je třeba považovat za kontaminované.

Znečištěné povrchy se musí vyčistit roztokem chlornanu sodného o koncentraci 20 000 ppm. Pokud je kontaminující kapalinou kyselina, musí se kontaminované povrchy před použitím chlornanu sodného nejprve neutralizovat hydroxidem sodným. Povrchy se musí opláchnout destilovanou vodou, vysušit etanolem a otřít savým papírem. Materiál použitý k čištění musí být vyhozen do speciální nádoby na kontaminovaný odpad.

Vzorky, vybavení a kontaminované produkty musí být po dekontaminaci zlikvidovány jednou z následujících metod:

* + namáčením v roztoku hydroxidu sodného (1M) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě

(20-25 °C).

* + namáčením v roztoku chlornanu sodného o koncentraci 20 000 ppm po dobu 1 hodiny

při pokojové teplotě (20-25 °C).

* + sterilizací autoklávováním při teplotě nejméně 134 °C po dobu nejméně 18 minut při tlaku 3 bary.

*Poznámka: roztoky obsahující bělidlo nikdy nepoužívejte v autoklávu.*

Všechny operace spojené se screeningovými testy na přenosnou spongiformní encefalopatii (TSE) podléhají místním bezpečnostním pokynům a musí být prováděny v izolované laboratoři s omezeným a kontrolovaným přístupem, která je určena výhradně pro tuto činnost. Pro zajištění bezpečnosti obsluhy je povinný laboratorní plášť nebo kotníkový oblek, přezůvky, rukavice (dva páry), maska s hledím nebo jednoduchá maska s ochrannými brýlemi.

Pracovníci musí absolvovat zvláštní školení týkající se rizik spojených s původci TSE nebo priony a ověřených metod dekontaminace nekonvenčních původců. Opatření biologické bezpečnosti musí být v souladu s pokyny místních regulačních orgánů.

Uchovávejte mimo dohled a dosah dětí.

Pouze pro zvířata. Veterinární přípravek

**VÝROBCE**:

Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré

92430 Marnes-la-Coquette – Francie

Tel.: +33 (0)1 47 95 60 00

Fax: +33 (0)1 47 41 91 33

www.bio-rad.com

2020/06

**DISTRIBUTOR PRO ČR A DRŽITEL ROZHODNUTÍ O SCHVÁLENÍ:**

O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.

Bořetická 2668/1

193 00 Praha 9

info@oks.cz, +420 281 091 460

www.biopro.cz

*Níže uvedené informace garantuje držitel rozhodnutí o schválení, není předmětem posouzení v rámci řízení žádosti o změnu rozhodnutí o schválení.*

**BIO-RAD je ochranná známka** společnosti **Bio-Rad Laboratories, Inc.**

**TeSeE, PRECESS 24 a PRECESS 48 jsou ochranné známky** společnosti **Bio-Rad Europe, GmbH v** některých **jurisdikcích.**

**Všechny zde použité ochranné známky jsou majetkem** příslušného **vlastníka.**