

**Encefalopatie spongiformă bovină-Scrapie
Kit de testare pentru
detectiona antigenului, EIA**

HerdChek® BSE-Scrapie Antigen.

Test With Confidence™



06-08519-14
Versiunea #14

IDEXX

Encefalopatie spongiformă bovină-Scrapie

Kit de testare pentru detectia antigenului,

Encefalopatiei Spongiforme Bovine - Scrapie, ELISA

Versiunea în limba
română



Kit de testare a antigenului encefalopatiei spongiforme bovine-Scrapie.

Prezentare generală

Kitul de testare IDEXX HerdChek® a encefalopatiei spongiforme bovine (BSE)- Scrapie este un test imunoenzimatic (EIA) de captare a antigenului pentru detectarea conformației anormale a proteinei prionice (PrP^{Sc}) în cadrul analizei post-mortem a țesuturilor din creier (de preferat de la nivelul obexului) de la bovine, rumegătoare mici (ovine și caprine) și cervidee afectate de ESB, scrapie sau boala (sindromul) obozelii cronice (chronic wasting disease - CWD). În cazul rumegătoarelor mici, testul va detecta, de asemenea, PrP^{Sc} în țesutul ganglionilor limfatici sau al splinei; în cazul cervideelor, testul va detecta, de asemenea, PrP^{Sc} în ganglionii limfatici retrofaringieni (RPLN). Acesta este conceput pentru a identifica rapid probele care conțin PrP^{Sc} asociate bolii, cu o minimă manipulare a probelor, putând fi automatizată pentru posibilitatea de a testa un număr mare de probe.. Acest kit este destinat exclusiv uzului veterinar.

Pentru statele membre ale Uniunii Europene: Acesta este un test rapid aprobat de UE pentru depistarea in vitro a ESB și a PrP^{Sc} legate de scrapie la bovine și rumegătoare mici. De asemenea, acest test poate fi utilizat în UE pentru testarea rapidă a cervideelor în vederea depistării encefalopatiei spongiforme transmisibile (EST). Validarea acestui kit a fost efectuată utilizând probe de tonsile, gangioni limfatici retrofaringieni și trunchi cerebral de la elan (*Cervus canadensis*).

Producătorul testului rapid trebuie să dispună de un sistem de asigurare a calității aprobat de Laboratorul de Referință al Uniunii Europene (EURL), care să garanteze că performanța testului nu se modifică. Producătorul trebuie să pună la dispoziția EURL protocolul de testare. Instrumentarul de recoltare a probelor și modificările ale testului rapid sau a protocolului de testare (inclusiv prelevarea probelor) pot fi efectuate numai în urma unei notificări prealabile către EURL și cu condiția ca EURL să considere că modificarea nu reduce sensibilitatea, specificitatea sau fiabilitatea testului rapid. Această constatare se comunică Comisiei UE și laboratoarelor naționale de referință [în temeiul Regulamentului (CE) nr. 956/2010 de modificare a Regulamentului (CE) nr. 999/2001].

Descriere și principii

Acest kit utilizează o metodă brevetată sub licență Microsens Biotechnologies (Londra, Regatul Unit; în curs de brevetare) care permite detectarea prionilor anormali. Un ligand specific PrP^{Sc} este imobilizat pe suprafața plăcii de captare a antigenului. Eșantioanele de testare sunt pregătite prin omogenizarea țesuturilor și apoi diluarea probei cu diluantul plăcii de lucru. După ce proba este distribuită pe placă, proteina abnormală asociată bolii se fixează cu afinitate crescută. Plăcile sunt spălate pentru a elimina materialele nefixate, inclusiv conformația normală a proteinei PrP. În urma incubării cu tampon de tratare, antigenul fixat este apoi detectat cu ajutorul unui anticorp specific PrP care a fost conjugat cu peroxidază de hrean (HRPO). Placa este spălată pentru a elimina conjugatul nefixat și se adaugă un substrat de peroxidază. Dezvoltarea culorii este legată de cantitățile relative de PrP^{Sc} capturate de ligandul imobilizat în godeul plăcii de microfiltrare.

Interpretarea rezultatelor probelor se bazează în funcție de absorbția probelor. O probă a cărei valoare $A_{450-\text{AREF}}$ este mai mică decât valoarea limită este considerată negativă de către IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit. Probele ale căror valoare $A_{450-\text{AREF}}$ sunt mai mari sau egale cu valoarea limită (cutoff) sunt clasificate ca fiind pozitive pentru PrP^{Sc} . O analiză de confirmare, cum ar fi imunohistochimia, este necesară pentru toate rezultatele pozitive ale testelor.

Componentele kitului

Păstrați toate componentele la 2-8°C.

Reactiv		460 teste
A	Placi de captare a antigenului	5 plăci
N	Control negativ-Nereactiv cu placa de captare a antigenului; conservat cu azida de sodiu	5x 1mL
P	Control pozitiv-Neinfecțios, reactiv cu placa de captare a antigenului; conservat cu azidă de sodiu	5x 1mL

D1	Componentă 1 de diluție a plăcii; conservat cu azidă de sodiu	20 ml
D2	Componentă 2 de diluție a plăcii	5 x 200 µL
R	Diluant de reconstituire	20 ml
CB	Tampon de tratare; conservat cu azidă de sodiu	60 mL
CC	Conjugat concentrat; conservat cu Bronidox L și metilizotiazolonă	300 µL
SRB-CC	Concentrat conjugat de creier de rumegătoare mici; conservat cu Bronidox L și metilizotiazolon	300 µL
CD	Soluție tampon pentru dilutia conjugatului cu detergenți și stabilizatori de proteine; conservat cu Proclin	60 ml
W1	Soluție de spălare 1X10; conservată cu azidă de sodiu	450 ml
W2	Soluție de spălare 2X10; conservată cu gentamicină	450 ml
T	Substrat TMB	60 ml

Note: Consultați tabelul de la finalul insertului tehnic pentru o descriere a simbolurilor utilizate în prospect și pe etichetele acestui kit.
Consultați finalul acestui prospect pentru avertismentele privind pericolele și precauțiile legate de reactivi.

Materiale și echipamente necesare (nu sunt furnizate în kit)

- Pipete de precizie și pipete cu mai multe canale adecvate pentru pipetarea unui volum între 25 și 200 µL. Volumele de reactivi menționate în procedura de testare necesită o precizie a pipetei mai mică sau egală cu 5%.
- Cilindri gradați pentru soluțiile de spălare
- Capace din plastic dur sau adezive pentru plăci și tavițe pentru distribuirea reactivilor
- Instrumentar de disecție de unică folosință pentru prelevarea probelor sau dispozitiv de unică folosință pentru prelevarea probelor
- cititor pentru plăcile de 96 de godeuri (echipat cu filtre de 450 nm și 620-650 nm) și spălător
- Instrumentul FastPrep® (FP120A, FP220A), FastPrep®-24, Precess 48®, Precess 24® sau Precellys 24®.
- Pachet de accesorii - plăci de diluție, tuburi cu particule (bile/beads) pentru omogenizarea țesuturilor, vârfuri lungi de pipetă pentru transferul probei omogenizate și capace adezive pentru acoperirea plăcilor (disponibile la IDEXX).
- Echipament de protecție personală - ochelari de protecție, halate de laborator, mănuși de unică folosință, bosoși pentru încălțăminte, bonete și măști de protecție pentru față.
- Soluție de stopare 0,5-1,0 N HCl sau 1,0 N H₂SO₄.
- Hipoclorit de sodiu (înălbitor), NaOH 1N și HCl 1N, apă deionizată
- Opțional - instrument pentru procesarea automata a mostrelor cu o precizie de pipetare de ≤2,5%, conform măsurătorii analizei CV (Tecan, de exemplu)
- Opțional - agitator pentru microplăci (de exemplu, IKA MTS 2/4)
- Opțional – incubator pentru plăci care poate menține o temperatură de 32-37°C cu un flux de aer minim
- Opțional - unitate dry heat block pentru microtuburi de 1,5-2 ml (capabilă să mențină Temperatura de 70°C)
- Opțional- microtuburi conice de 1,5-2 ml cu capac înfiletat, fără margine.

Recoltarea și pregătirea țesuturilor

A. Țesut cerebral provenind de la bovine și de la rumegătoare mici

1. Recoltarea și testarea de laborator trebuie să respecte Regulamentul (CE) nr. 999/2001, anexa X, capitolul C, care se referă, în ceea ce privește recoltarea probelor, la cea mai recentă ediție a *Manualului Standardelor pentru teste de diagnostic și vaccinuri* din cadrul Oficiului Internațional de Epizootii (OIE) cu mențiunea: "Proba recomandată pentru analiza imunologică trebuie să fie din, sau cât mai aproape de obex, dar nu mai departe de 1,5 cm anterior de obex." Recoltați 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de țesut nervos din partea stângă sau dreaptă a trunchiului cerebral de la nivelul obexului (acolo unde este posibil) cu ajutorul instrumentarului de de disecție și căntăriți proba pentru a se asigura cantitatea corectă. Alternativ, dispozitivul IDEXX de recoltare a probelor poate fi utilizat pentru recoltarea din obexul de bovine, așa cum este descris în anexă. Personalul care urmează Zona de recoltare trebuie instruit în ceea ce privește metoda de recoltare.

Imaginea din dreapta indică zona corectă

de recoltare a probei.

NOTĂ: După recoltarea probei, trebuie să rămână disponibilă o hemisectiune completă a trunchiului cerebral, cu o regiune intactă a obexului și (dacă este prezent) pentru testele de confirmare.



Figura 1. Trunchiul cerebral bovin.

© British Crown Copyright (februarie 2005) reproducă cu acordul Agenției Laboratoarelor Veterinare.

2. Introduceți țesutul într-un tub pentru omogenizarea țesutului și închideți bine capacul. Tuburile sunt prevăzute cu bile ceramice și soluție tampon.
3. Patru instrumente de omogenizare a țesuturilor au fost validate pentru utilizarea cu IDEXX BSE- Scrapie EIA. Introduceți tuburile în instrument și omogenizați-le conform indicațiilor echipamentului respectiv. Dacă procesul de măruntire nu este satisfăcător, repetați un ciclu.
 - Programul instrumentului FastPrep*: Măruntiți probele timp de 40 de secunde la viteza maximă (6,5 m/s). Dacă este necesar un al doilea ciclu, instrumentul trebuie lăsat să se râcească 5-10 minute între cicluri.
 - Programul instrumentelor Precess 48*, Precess 24* și Precellys 24*: Se măruntește probele de 2 ori timp de 20-25 secunde la 6500 rpm, cu o pauză de 5 secunde între cicluri.
4. Omogenatele (proaspete sau decongelate) pot fi păstrate la 18-26°C timp de până la 4 ore înainte de începerea analizei.

Numărul de probe care trebuie pregătite într-o singură sesiune este flexibil. Omogenatele pot fi depozitate timp de până la 24 de ore la 2-8°C sau păstrate la ≤-20°C timp de până la 6 luni. Probele congelate trebuie să fie decongelate și amestecate bine prin inversare înainte de utilizare. Probele de țesut pot fi păstrate la -80°C.

B. Țesut provenit din ganglioni limfatici sau splina de rumegătoare mici

1. Se recoltează 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de țesut din ganglionii limfatici sau din splină. Pentru ganglionii limfatici, trebuie să se preleveze țesut astfel încât să maximizeze prezența celulelor centrului germinativ. Măruntiți țesuturile în 8-10 bucăți mici.
2. Continuați cu procesarea și depozitarea probei aşa cum este descris în cazul țesutului cerebral.
NOTĂ: Tesutul ganglionilor limfatici sau țesutul splinei nu poate fi utilizat în contextul recoltării și testării oficiale conform cadrului Regulamentului (CE) nr. 999/2001.

C. Țesut provenit din creierul și ganglionii limfatici ai cervideelor

1. Pregătiți tuburile de omogenizare a țesuturilor prin îndepărțarea a 0,2 ml de soluție din fiecare tub.
2. Se recoltează 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de țesut din ganglionul limfatic retrofaringian sau din creier (de preferat de la nivelul obexului). Țesuturile din creiere și cele din ganglionii limfatici trebuie testate individual. În cazul ganglionilor limfatici, trebuie prelevate probe de țesut pentru a maximiza prezența celulelor centrului germinativ. Măruntiți țesutul ganglionar în 8-10 bucăți mici.
Vă rugăm să rețineți că, în Germania, trebuie să se efectueze teste individuale atât pentru țesutul cerebral, cât și pentru țesutul ganglionar limfatic. Această decizie respectă recomandările orientărilor EURL (Orientările laboratorului de referință al UE pentru EST pentru detectarea bolii cronice a pierderilor la cervide, <https://science.vla.gov.uk/tse-lab.net/documents/cwd-guidelines.pdf> și Avizul științific privind boala cronică a pierderilor (II), Grupul științific pentru pericole biologice al EFSA (BIOHAZ), EFSA Journal 2018;16(1):5132.. 59 p.).
3. Se introduce țesutul într-un tub de omogenizare a țesutului și se închide bine capacul.
4. Se introduc tuburile în instrumentul de omogenizare a țesuturilor și se măruntește conform indicațiilor echipamentului respectiv. Dacă rezultatul procesului de măruntire este insuficient, repetați încă un ciclu.

Programul instrumentului FastPrep*: Se macină probele timp de 30 de secunde la viteza maximă (6,5 m/s). Se oprește instrumentul timp de cinci minute. Repetați măruntirea timp de încă 30 de secunde la viteza maximă. Dacă rectificarea este insuficientă în urma unei inspecții vizuale, repetați un ciclu.

Programul de instrumente Precess 48*, Precess 24* și Precellys 24*: Se macină probele timp de 30 de secunde la 6500 rpm. Se oprește instrumentul timp de cinci minute. Repetați măcinarea timp de încă 30 de secunde la 6500 rpm. Dacă măruntirea este insuficientă în urma unei inspecții vizuale, repetați încă un ciclu.

Pregătirea reactivilor

Soluții de spălare (soluție de spălare 1, soluție de spălare 2)

Soluțiile de spălare concentrate trebuie aduse la 18-26°C și amestecate pentru a asigura dizolvarea eventualelor săruri precipitate. Fiecare concentrat de spălare trebuie diluat 1:10 cu apă distilată sau deionizată înainte de utilizare (de exemplu, 40 ml de concentrat plus 360 ml de apă pentru fiecare placă ce urmează a fi analizată).

Componenta 2 de diluție a plăcii

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

Diluantul plăcii

Componenta 1 de diluție a plăcii (D1) trebuie să fie adusă la 18-26°C. Pregătiți diluantul plăcii de lucru adăugând 1 parte din componenta 2 de diluție a plăcii (D2; preparat ca mai sus) la 25 de părți din componenta 1 de diluție a plăcii (D1) și amestecați bine (de exemplu, 120 µL D2 la 3,0 ml D1 pentru fiecare placă).

Este nevoie de aproximativ 2,75 ml de diluant al plăcii de lucru pentru fiecare placă atunci când se testează probe de creier. Testarea ganglionilor limfatici sau a splinei necesită aproximativ 5 ml de diluant pentru fiecare placă. Diluantul plăcii de lucru trebuie preparat și utilizat în aceeași zi.

Controlul negativ și controlul pozitiv

Controalele negative și pozitive sunt furnizate liofilizate. Se reconstituie fiecare control prin adăugarea a 1 ml de diluant de reconstituire. Se lasă soluția să stea timp de aproximativ 1 minut și apoi se amestecă energetic. Se utilizează în termen de 2 ore de la preparare. **NU DILUAȚI MARTORII NEGATIVI SAU POZITIVI ÎN DILUANTUL PLĂCII DE LUCRU.**

Soluții de anticorpi anti-PrP conjugate cu HRPO

Soluțiile de anticorpi anti-PrP conjugate cu HRPO se prepară prin diluarea conjugatului concentrat corespunzător (a se vedea nota de mai jos) în diluant pentru conjugat (CD), conform indicațiilor de pe etichetă (de exemplu, o diluție de 1:100 ar necesita 120 µL de conjugatului concentrat la 12 ml de diluant pentru conjugat). Consultați eticheta conjugatului concentrat pentru a afla factorul de diluție corect. Soluția de conjugat concentrat trebuie preparată și utilizată în termen de 4 ore.

NOTĂ IMPORTANTĂ: Există două conjugate concentrate disponibile pentru a fi utilizate cu acest test. Selectați-l pe cel potrivit pentru țesutul care urmează să fie testat:

- **Conjugat concentrat (CC)-**Utilizați acest conjugat atunci când testați probe de creier de bovine și cervide, probe de ganglioni limfatici de rumegătoare mici și cervide și probe de splină de rumegătoare mici.
- **Conjugat concentrat pentru creier de rumegătoare mici (SRB-CC)-**Utilizați acest conjugat atunci când testați țesutul cerebral de rumegătoare mici.
- Pentru fiecare tip de conjugat testat trebuie incluse godeuri de control negativ și pozitiv.

Soluție de stopare pe bază de acid

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

Toate cele trei protocoale descrise mai jos necesită aducerea reactivilor la o temperatură de 18-26°C înainte de utilizare. Înainte de începerea testului, pregătiți soluțiile care urmează să fie utilizate în cadrul analizei. Se amestecă toți reactivii prin agitare ușoară. Controalele (negative și pozitive) trebuie amestecate energetic și testate în dublu exemplar. Trebuie să se utilizeze un capac pentru placă pentru a acoperi placă pe durata analizei.

Păstrarea reactivilor preparati

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

Păstrați eventualele cantități de plăci neutilizate într-un recipient etanș, cu desicant în interior și la întuneric.

Procedura de testare

Omogenatele probelor se prepară conform indicațiilor primite în secțiunea Recoltarea și pregătirea și pregătirea probelor. Un echipament pentru procesarea automată a probelor poate fi utilizat în locul metodei manuale din etapa 1 sau după ce probele de control și probele diluate au fost adăugate pe placă de captare a antigenului (etapa 3).

Important: Acoperiți fiecare placă de analiză cu un capac solid din plastic sau cu un capac adeziv pentru plăci pe durata tuturor incubărilor reactivilor. În cazul în care incubarea reactivilor se efectuează într-o cabină de biosecuritate, plăcile trebuie acoperite cu folii adezive.

Protocole de testare

IDEXX BSE-Scrapie EIA are două protocole aprobată pentru testarea probelor din țesutul cerebral: Scurt și ultra scurt. Protocolele oferă performanță identică, dar au cerințe diferite în ceea ce privește echipamentul pentru reducerea timpului de testare. Protocolele sunt detaliate în tabelul de pe pagina următoare.

NOTĂ: Protocolul pentru testarea probelor de splină și a ganglionilor limfatici recolțate de la rumegătoarele mici este diferit de protocolele scurt și ultra scurt și este descris în tabelul "Protocol de testare" de mai jos.

Diluția probei folosind diluantul plăcii de lucru

Se stabilește un şablon care să indice unde sunt situate pozițiile probei pe placă de captare a antigenului și pe placă de diluție. Rezervați câte două godeuri pentru controalele kitului. Diluantul plăcii de lucru poate fi adăugat pe placă de diluție înainte sau după distribuirea probei. Raportul este de 30 µL de diluant al plăcii de lucru la 120 µL de omogenat de probă (raportul pentru splina și ganglionii limfatici de rumegătoare mici este de 50 µL de diluant la 100 µL de omogenat de probă).

Se resuspendă omogenatele prin inversare și apoi se pipetează cu atenție proba prin introducerea vârfului lung al pipetei de transfer printre particule (beads) și extrăgând din tubul de omogenizare a țesutului. Se distribuie cu grijă fiecare probă în placă de diluție, evitând crearea de bule în omogenat sau evitând lăsarea de reziduuri de omogenat pe marginile godeurilor plăcii de diluție.

După ce omogenatul este diluat, se amestecă bine probele, având grijă să se evite formarea bulelor de aer. Omogenizarea se poate face cu ajutorul unei pipete sau al unui agitator pentru plăci. În cazul în care se utilizează un agitator, va fi necesar să se regleze

viteza și timpul pentru a asigura o omogenizare completă fără a împrăștia probele. Efectuați testul în termen de 2 ore.

Utilizarea agitatorului de plăci pentru incubarea probelor (protocolul scurt și ultra-scurt)

Protocolurile scurt și ultra scurt implică o rotație lentă (200 ± 100 rpm) pe un agitator de plăci doar pentru etapa de incubare a probei. Agitatorul de plăci trebuie să creeze o mișcare orizontală ușoară, circulară. Deși proba din fiecare godeu al plăcii de microtitrare se va mișca ușor, este posibil ca acest lucru să nu fie evident din punct de vedere vizual. Mișcarea nu trebuie să fie foarte energetică pentru a nu împinge proba peste marginea godeului. Timpul de incubație este redus corespunzător pentru incubarea probei și a conjugatului, așa cum se detaliază în tabelul următor. Protocolul de lucru în cazul probelor recoltate din spină/ganglionii limfatici ai rumegătoarelor mici nu necesită agitarea plăcilor.

Protocole de testare

Procedura de testare		Protocol scurt	Protocol ultra scurt	Protocolul pentru splina/ganglionii limfatici la rumegătoare mici
Etapa	Operațiune	18-26°C Toate etapele	32-37°C : Doar incubare (pași 3,5,8,10) 18-26°C: Toate celelalte etape, inclusiv etapele de spălare	18-26°C Toate etapele
1	Distribuirea probei pe placă de diluție	120 µL de probă cu 30 µL diluant al plăcii de lucru		100 µL de probă cu 50 µL de diluant al plăcii de lucru
		OMOGENIZAȚI FOARTE BINE - consultați secțiunea "Diluția probei în diluantul plăcii de lucru".		
2	Distribuirea probei pe placă de captare a antigenului	Se pipetează 100 µL de probă diluată pe placă de testare; se amestecă controalele, se adaugă 100 µL în dublu exemplar; se acoperă placă cu un capac.		
3	Incubarea plăcii de captare	45-60 min.; agitare lentă 200 ±100 rpm	20-25 min.; agitare lentă 200 ±100 rpm	2-3 ore staționare
4	Se folosind soluție de spălare 1 (1x)	Se spală godeurile de 6 ori cu ~350 µL Soluție de spălare 1 (1x).		
5	Soluție de tratare: Adăugare/incubare	Se adaugă 100 µL de soluție tampon în fiecare godeu; se acoperă placă; se incubează 10 ±1 min.		
6	Se spală cu soluție de spălare 2 (x)	Se spală godeurile de 3 ori cu ~350 µL 1X Wash 2.		
7	Adăugare de conjugate	Adăugați 100 µL de conjugat diluat (creierul de bovină și probele de cervide se utilizează CC; creierul de rumegătoare mici se utilizează SRB-CC) și acoperiți placă cu un capac de placă..		Adăugați 100 µL de conjugat CC diluat și acoperiți placă cu un capac de placă..
8	Incubarea conjugatului	45-50 min.	25-30 min.	60-75 min.
9	Se spală cu soluția de spălare 2 (x).	Se spală godeurile de 5 ori cu ~350 µL cu soluția de spălare 2 (x).		
10	Adăugarea de substrat/incubare	Se adaugă 100 µL de substrat în fiecare godeu; se acoperă placă; se incubează 15 ±1 min. departe de lumina directă a soarelui (nu se utilizează un capac adeziv).		
11	Adăugarea Solutiei stop/Citirea plăcii	Adăugați 100 µL soluție de stop pe bază de acid; placă poate fi ținută până la 30 min. în întuneric înainte de citirea densității optice. (450 nm) folosind o lungime de undă de referință de (A_{REF}) 620 nm până la 650 nm..		

1. Incubarea la 32-37°C înseamnă introducerea plăcii de testare într-un incubator preîncălzit la 32-37°C.

Prezentare generală a formatelor de testare

	Creier bovin	Creier rumegătoare mici	Ganglionul limfatic și splina la rumegătoare mici	Creier și ganglioni limfatici retro-faringieni cervidee
Pregătirea probelor:				
Prelevare de țesut cu seringă	Da	Nu	Nu	Nu
Mărunțirea țesuturilor (pre-omogenizare)	Nu	Nu	Da	Da (RPLN) Nu (creier)
Procedura de testare:				
Concentrat de conjugat	CC	SRB-CC	CC	CC
Diluant pentru placa de lucru (raport diluant pentru placa de lucru/piesă de probă)	30 µL/120 µL	30 µL/120 µL	50 µL/100 µL	30 µL/120 µL
Protocoloarele aprobată	Scurt și ultra-scurt	Scurt și ultra-scurt	Splina și ganglionii limfatici la rumegătoare mici	Scurt
Valoarea Cutoff a testului	NCx + 0,120	NCx + 0,180	NCx + 0,180	NCx + 0,200
Protocol de tratare termică aplicabil optional	Da	Nu	Nu	Nu

Interpretarea rezultatelor

Pentru ca testul să fie valid, media controlului negativ ($\bar{N}C_x$) trebuie să aibă o valoare $A_{450}-A_{REF}$ mai mică de 0,150, iar media controlului pozitiv ($\bar{P}C_x$) trebuie să aibă o valoare $A_{450}-A_{REF} \geq 0,400$.

Efectuarea calculelor

Calcularea mediei controlului negativ ($\bar{N}C_x$):

$$\bar{N}C_x = \frac{A_1 (A_{450} - A_{REF}) + B_1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Calcularea mediei controlului pozitiv ($\bar{P}C_x$):

$$\bar{P}C_x = \frac{C_1 (A_{450} - A_{REF}) + D_1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Calcularea valorii cutoff:

$$\text{Valoare cutoff bovine} = \bar{N}C_x + 0,120$$

$$\text{Valoare cutoff pentru rumegătoare mici} = \bar{N}C_x + 0,180$$

$$\text{Valoare cutoff pentru cervide} = \bar{N}C_x + 0,200$$

NOTĂ: Vezi pasul 11 din tabelul procedurii de testare pentru definiția lui A_{REF} .

Rezultate

Interpretarea rezultatelor probei se bazează pe absorbția probei. Probele cu valori $A_{450}-A_{REF}$ mai mici decât valoarea cutoff sunt considerate negative de către IDEXX HerdChek HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit. Probele cu valori $A_{450}-A_{REF}$ mai mari sau egale cu valoarea cutoff sunt clasificate ca fiind inițial reactive la PrP^{Sc} , iar omogenatul trebuie retestat în dublu exemplar cu ajutorul kitului de testare IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit.

Reexaminarea creierului bovin se poate face din omogenatul de țesut cerebral inițial sau din omogenatul preparat folosind protocolul optional de tratare termică a bovinelor, descris mai jos. În cazul în care oricare dintre valorile retestelor este egală sau mai mare decât valoarea cutoff a testului, proba este considerată pozitivă. Proba este considerată negativă atunci când ambele repetări ale testului sunt mai mici decât pragul de testare. În cadrul UE, toate

probele de bovine inițial reactive care sunt negative în urma protocolului de retestare prin tratament termic ar trebui să fie raportate ca fiind negative.

Probele de rumegătoare mici și cervidee trebuie retestate în dublu exemplar direct din omogenatul tisular original - NU tratați termic omogenatele de rumegătoare mici sau cervidee. În cazul în care oricare dintre valorile retestelor este egală sau mai mare decât valoarea cutoff a testului, proba este considerată pozitivă. Proba este considerată negativă atunci când ambele repetări ale testului sunt mai mici decât valoarea cutoff.

În statele membre ale UE, orice probă pozitivă la testul rapid trebuie trimisă la laboratorul național de referință pentru EST din țara dumneavoastră sau la laboratorul de referință al Uniunii Europene în vederea efectuării testelor de confirmare.

Protocol opțional de tratare termică pentru omogenatele bovine inițial reactive: (Protocolul de tratare termică se aplică numai la probele de bovine).

Prelevați $230 \pm 20 \mu\text{L}$ din omogenatul tisular inițial reactiv și transferați într-un tub de 1,5-2 ml, cu partea inferioara conică și prevazută cu capac cu sistem de infilătare. Așezați flaconul într-un bloc de încălzire uscat care a fost preîncălzit la $70 \pm 2^\circ\text{C}$. Se încălzește tubul timp de 10 ± 1 min. și apoi se plasează într-un suport deschis la $18-26^\circ\text{C}$ timp de minimum 20 de minute pentru a permite răcirea probei. Omogenatul trebuie retestat în termen de două ore de la tratarea termică, în dublu exemplar, cu ajutorul kitului de testare IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit.

Precauții

- Nu expuneți substratul de tetrametilbenzidină (TMB) la lumină puternică sau la agenți oxidanți. Pentru distribuirea de TMB, folosiți vase de plastic curate sau de unică folosință.
- Trebuie să se evite cu grijă contaminarea componentelor kitului. Nu utilizați componentele după data de expirare și nu amestecați componente provenind din loturi diferite.
- Unele componente ale kitului conțin azidă de sodiu ca și conservant (a se vedea descrierea componentelor trusei). Trebuie evitată contaminarea conjugatului anti-PrP-HRPO conjugat cu soluții care conțin azidă..
- Păstrați toți reactivii la $2-8^\circ\text{C}$. Aduceți reactivii la $18-26^\circ\text{C}$ înainte de utilizare și repuneți-i la temperaturile de depozitare corespunzătoare după utilizare (a se vedea Păstrarea reactivilor preparați).
- Folosiți tavițe de distribuire separate pentru fiecare reactiv utilizat în analiză. Evitați contaminarea încrucișată a substratului TMB cu soluția de conjugat diluat. Nu turnați soluția TMB neutilizată înapoi în flacon.
- Nu lăsați plăcile de microtitrare să stea mai mult de 5 minute între etapele de spălare și adăugarea de reactivi.

Informații privind siguranță

- Tot personalul trebuie să primească o instruire adecvată privind risurile legate de ESB și scrapie, precum și procedurile de decontaminare recomandate. Procedurile de biosecuritate ar trebui să fie respectate cu strictețe, conform recomandărilor reglementărilor naționale de siguranță.
- Soluția tamponată de tratare conține agenți haotropici; evitați contactul cu pielea și membranele mucoase.
- Substratul TMB poate irita pielea și ochii; evitați contactul direct.
- Diluantul 1 al plăcii conține concentrații ridicate de detergenți; evitați contactul direct.
- Evitați utilizarea recipientelor din sticlă în laborator.

Anexa

Recoltarea probelor din obexul de ovine cu dispozitivul IDEXX de colectare a probelor
IDEXX dispune de un dispozitiv de colectare a probelor ca metodă alternativă de extracție a obexului de bovine. Acest dispozitiv este o seringă de prelevare a probelor. Dispozitivul de colectare a probelor IDEXX a fost aprobat de către EUR. Orientările oferite în această secțiune de prelevare a probelor nu interzic furnizarea de informații sau instrucțiuni suplimentare care sunt în conformitate cu Regulamentul (CE) nr. 999/2001 și cu modificările ulterioare ale acestei reglementări. Atunci când nu este posibil să se identifice zona anatomică corectă pentru prelevare, utilizați instrumentarul de disecție descris în secțiunea **Prelevare și pregătirea probelor de țesut**.

1. Trunchiul cerebral ar trebui să fie recoltat la abator prin foramenul occipital, folosind un instrument adecvat sau o lingură de colectare a probelor. Identificați regiunea obexului, indicată de prezența unei adâncituri în formă de V pe suprafața superioară a trunchiului cerebral (a se vedea diagrama din secțiunea Prelevare și pregătire a țesuturilor). În cazul în care nu este posibilă identificarea zonei anatomicice corecte pentru prelevare, utilizați instrumentarul de disecție descris în secțiunea Prelevare și pregătire a țesuturilor.

2. Poziționați trunchiul cerebral cu secțiunea în formă de V a țesutului îndreptată în sus. Introduceți vârful seringii de recoltare a probei până la capătul caudal al bulbului rahidian, pe partea din care urmează să recoltați proba, la aproximativ 3 mm (suficient pentru ca vârful seringii să fie încarcat). Poate fi necesară tăierea excesului de țesut medular în cazul în care distanța dintre baza maduvei spinării și vârful secțiunii sănătoase este mai mare de 3-4 cm.
3. Țineți ferm pistonul seringii. Cu degetul arătător, împingeți cilindrul exterior al seringii în trunchiul cerebral, având grijă să nu lăsați porțiunea de piston să se deplaseze în nicio direcție. Consultați figura 2 pentru direcționarea corectă a seringii pentru a vizua locurile cheie de prelevare a țesuturilor din obex. Pe măsură ce cilindrul seringii este împins în probă, acesta trebuie să rămână în interiorul părții selectate a trunchiului cerebral pentru a preveni deteriorarea părții opuse. O hemisecțiune completă a trunchiului cerebral cu obex intact trebuie să fie disponibilă pentru testele de confirmare.
4. Cilindrul seringii se va deplasa prin trunchiul cerebral și apoi în regiunea obexului. Asigurați-vă că seringa s-a deplasat în partea superioară a zonei de prelevare (a se vedea figura 1). Cilindrul ar trebui să conțină acum proba de obex.
NOTĂ: Proba pe care o doriți (adică zona de obex) se află în vârful corpului seringii.
5. Se răsușește seringa pentru a izola proba și se scoate cu grijă seringa din țesut.
6. În cazul în care o porțiune semnificativă de țesut atârnă de capătul seringii, trageți-o în cilindru prin retragerea ușoară a pistonului. Seringa poate fi acum manipulată pentru a îndepărta aerul de la vârf și pentru a elibera orice spațiu dintre fragmentele de probă.
Notă: Interiorul seringii are mai multe spații sau santuri regulate de infranare a pistonului, care pot fi simțite pe măsură ce pistonul este deplasat în seringă. Spațiul dintre aceste limitătoare asigură o măsurare precisă a volumului probei.
7. După ce ați dobândit proba de țesut în seringă, împingeți pistonul pentru a-l alinia cu cel mai apropiat punct de declanșare. Proba nu trebuie să aibă goluri între pistonul și vârful seringii. Este posibil ca o parte din materialul de probă în exces să depășească vârful seringii.
8. Ștergeți orice resturi minore de țesut de pe suprafața exterioară. Nu apăsați pistonul în timpul acestui proces deoarece proba va fi ejectată sau comprimată; niciunul din cele două cazuri nu este de dor.
9. Țineți într-o mâna tubul de omogenizare a țesutului în poziție verticală și seringa în cealaltă, pozitionând vârful seringii chiar în interiorul găcăștuia. Distribuiți o cantitate măsurată de țesut obex în tubul de omogenizare prin împingerea pistonului de la un sănt al seringii și oprindu-vă la următorul. Volumul dintre cele două santuri este de 150 µL; se distribuie un total de 300 µL în tub (echivalentul a 0,30 g ± 0,05 g de țesut)..
10. Se înfilează capacul tubului și se continuă cu omogenizarea probei.

Personalul care recoltează probe de obex cu ajutorul dispozitivului IDEXX de colectare a probelor trebuie să fie bine instruit cu privire la utilizarea acestuia pentru a asigura colectarea din zona corectă a creierului.

Fiecare tehnician trebuie să monitorizeze acuratețea prelevărilor prin verificări periodice ale greutății probei. Trebuie instituit un program de acțiuni corrective atunci când rezultatele nu se încadrează în criteriile de acceptare definite.. Dispozitivul IDEXX de colectare a probelor IDEXX este de unică folosință și trebuie aruncat după fiecare probă pentru a preveni contaminarea încrucisată.

Limitarea responsabilității

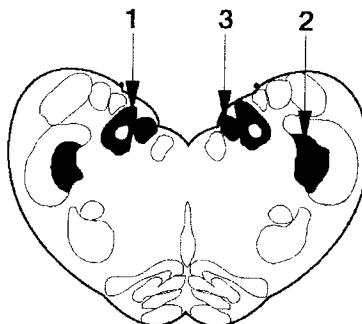


Figura 2. Secțiune transversală a trunchiului cerebral al bovinelor la nivelul obexului, identificând locurile cheie pentru prelevarea de probe de țesut:
1) tract solitar, 2) nucleu din nervul trigemen, 3) nucleul motor dorsal din nerv vag (diagramă din *Manualul OIE pentru teste de diagnostic și vaccinuri*, capitolul 2.4.6.)

În limitele maxime permise de lege, în nicio circumstanță IDEXX sau furnizorii noștri de licențe nu vor fi răspunzători față de dvs. sau față de orice altă persoană pentru pierderi de profit sau de utilizare, daune speciale, accidentale, semnificative, indirecte, exemplare, punitive sau multiple, inclusiv, dar fără a se limita la pierderi de clientelă, de date sau de echipamente sau pentru întreruperea activității, care decurg din fabricarea, vânzarea, furnizarea sau utilizarea produselor sau serviciilor noastre sau din nefurnizarea sau întârzierea furnizării acestor produse sau servicii.

Pentru asistență tehnică:

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

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

*HerdChek este o marcă comercială sau o marcă înregistrată a IDEXX Laboratories, Inc. sau a afiliatilor săi în Statele Unite ale Americii și/sau în alte țări. Toate celelalte nume și logo-uri ale companiilor și produselor sunt proprietatea deținătorilor lor.

Informații despre brevete: idexx.com/patents.

© 2023 IDEXX Laboratories, Inc. Toate drepturile rezervate.

Descrierea simbolurilor

LOT	Număr lot
SN	Număr serie
REF	Număr catalog
EC REP	Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană
	A se utiliza înainte de
	Producător
	Modificare majoră în instrucțiunile de utilizare

Pericol



Actualizare fișă tehnică– Revizuire documente online.



H302 / H312 / H314 / H318 / H335 / H400 / H410 / P264 / P273 / P280
P303+P361+P353 / P305+P351+P338 / P310 / P391

Control pozitiv - Nociv dacă este înghițit. Nociv în contact cu pielea. Provoacă arsuri grave ale pielii și leziuni oculare. Provoacă leziuni oculare grave. Poate provoca iritații respiratorii. Foarte toxic pentru viața acvatică, cu efecte de lungă durată. Spălați-vă bine după manipulare. Evitați eliberarea în mediul înconjurător. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/protecție a ochilor/protecție a feței/protecție auditivă. ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA (sau părul): Scoateți imediat toate hainele contaminate. Clătiți pielea cu apă/duș. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu precauție cu apă timp de câteva minute. Îndepărtați lentilele de contact, dacă sunt prezente. Continuați clătirea. Sunați imediat la un CENTRU ANTI-INTOXICARE/un medic. Colectați scurgerile



H318 / H412 / P273 / P280 / P305+P351+P338 / P310 / P501

Control negativ - Provoacă leziuni oculare grave. Nociv pentru viața acvatică, cu efecte de lungă durată. Evitați eliberarea în mediu. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/protecție pentru ochi/protecție pentru față. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu precauție cu apă timp de câteva minute. Îndepărtați lentilele de contact, dacă sunt prezente. Continuați clătirea. Sunați imediat la un CENTRU ANTI-INTOXICARE sau la un medic/medic. Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu reglementările locale/regionale/nationale/internationale.



H319 / P264 / P280 / P305+P351+P338

Diluant pentru plăci 1 - Provoacă iritații oculare grave. Spălați-vă bine după manipulare. Purtați protecție pentru ochi/protecție pentru față. În caz de contact cu ochii: Clătiți cu precauție cu apă timp de câteva minute. Îndepărtați lentilele de contact, dacă sunt prezente. Continuați clătirea.



H315 / H319 / H334 / H335 / P261 / P264 / P280 / P284 / P302+P352 / P304+P340 / P312
P337+P313 / P342+P311 / P362+P364

Diluant pentru plăci 2 - Provoacă iritația pielii. Provoacă iritații oculare grave. Poate provoca simptome de alergie sau astm sau dificultăți de respirație dacă este inhalat. Poate provoca iritații respiratorii. Evitați să respirați praful. Evitați să respirați vaporii. Spălați-vă bine după manipulare. Purtați protecție pentru ochi/protecție pentru față. Purtați mănuși de protecție. Purtați protecție respiratorie. ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: Spălați cu multă apă. ÎN CAZ DE INHALARE: Scoateți persoana la aer curat și mențineți-o confortabilă pentru respirație. Sunați la un centru anti-intoxicare/un medic dacă vă simțiți rău. Dacă iritația ochilor persistă: Solicitați sfatul/attenția unui medic. Dacă se manifestă simptome respiratorii: Sunați la un CENTRU anti-intoxicare/un medic. Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare



H302 / H312 / H314 / H318 / H412 / P260 / P264 / P270 / P273 / P280 /
P303+P361+P353 / P305+P351+P338 / P310

Tampon de condiționare - Nociv dacă este înghițit. Nociv în contact cu pielea. Provocă arsuri grave ale pielii și leziuni oculare. Provocă leziuni oculare grave. Nociv pentru viața acvatică cu efecte de lungă durată. Nu respirați praful/vaporii. Spălați-vă bine după manipulare. Nu mâncați, nu beți și nu fumați atunci când utilizați acest produs. Evitați eliberarea în mediul înconjurător. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/protecție pentru ochi/protecție pentru față. ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA (sau părul): Scoateți imediat toate hainele contaminate. Clătiți pielea cu apă/duș. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu precauție cu apă timp de câteva minute. Îndepărtați lentilele de contact, dacă sunt prezente și ușor de făcut. Continuați clătirea. Sunați imediat la un CENTRU ANTI-INTOXICARE sau la un medic/medic.



H317 / P261 / P272 / P280 / P333+P313 / P362+P364 / P501

Concentrat conjugat / concentrat conjugat SRB - Poate provoca o reacție alergică a pielii. Evitați să respirați ceață/vaporii. Îmbrăcămintea de lucru contaminată nu trebuie să fie permisă în afara locului de muncă. Purtați mănuși de protecție. Dacă apare iritație sau erupție cutanată: Solicitați sfatul/atenția unui medic. Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu reglementările locale/regionale-naționale/internăționale..



H317 / H412 / P261 / P273 / P280 / P302+P352 / P333+P313 / P362+P364 / P501

Diluant conjugat - Poate provoca o reacție alergică a pielii. Nociv pentru viața acvatică, cu efecte de lungă durată. Evitați să respirați ceață/vaporii. Evitați eliberarea în mediul înconjurător. Purtați mănuși de protecție. ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: Spălați cu multă apă. În cazul în care apare iritație sau erupție cutanată: Solicitați sfatul/atenția unui medic. Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. Eliminați conținutul/ recipientul în conformitate cu reglementările locale/regionale-naționale/internăționale..



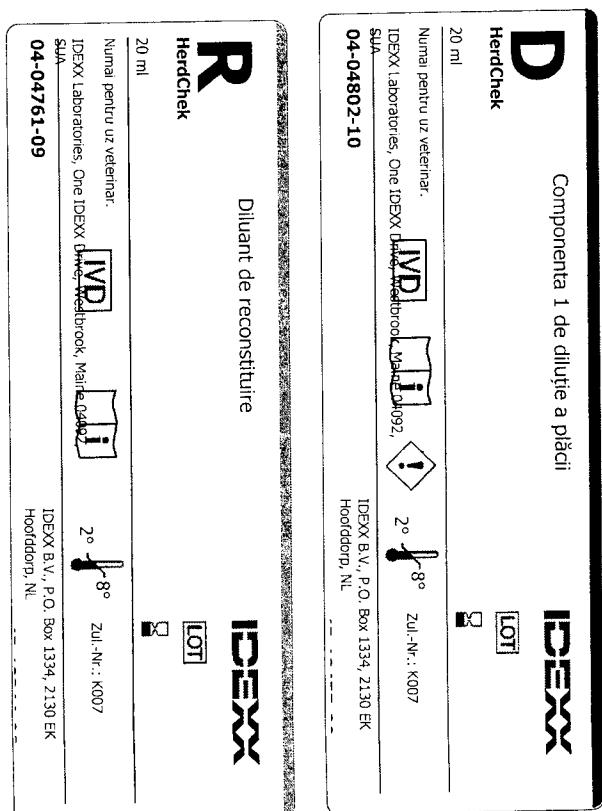
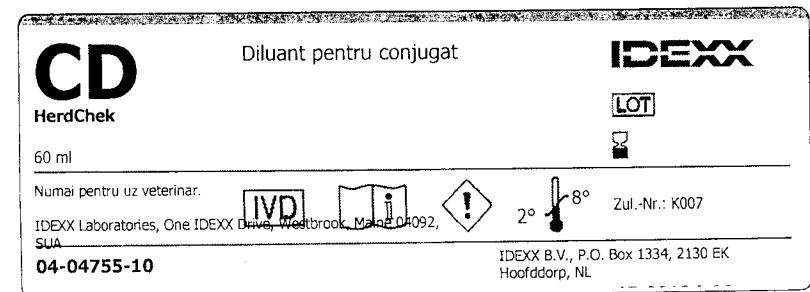
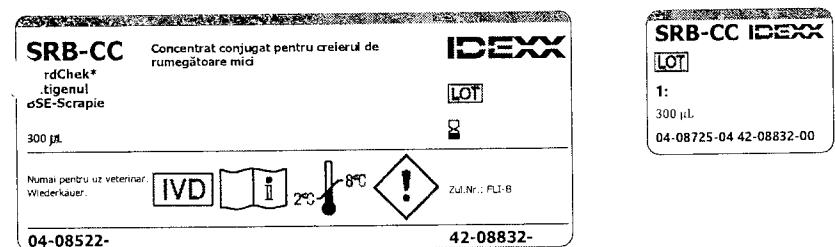
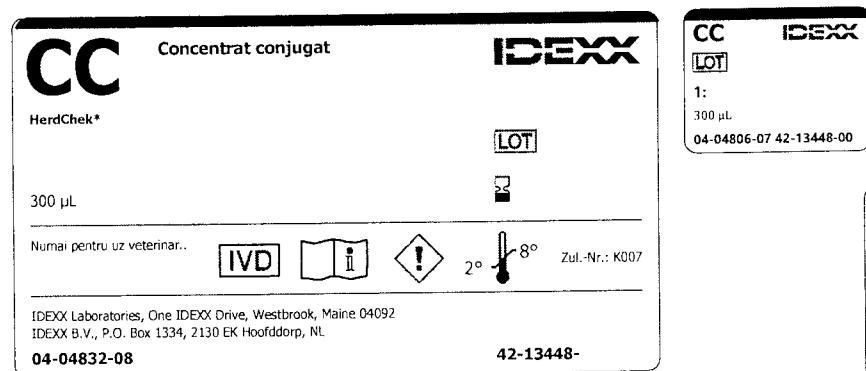
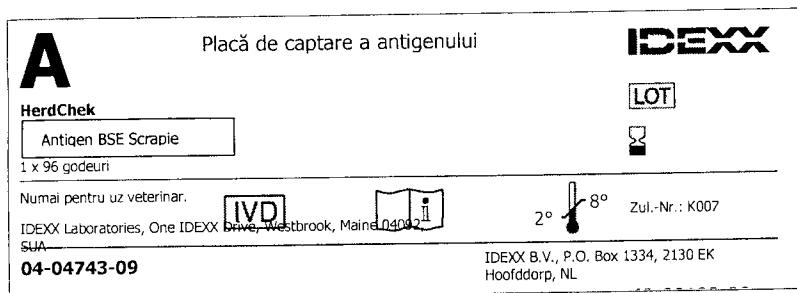
IDEXX

One IDEXX
Drive Westbrook, Maine
04092 SUA
idexx.com

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

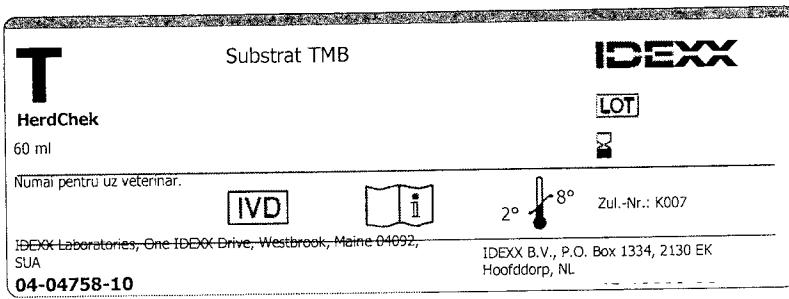
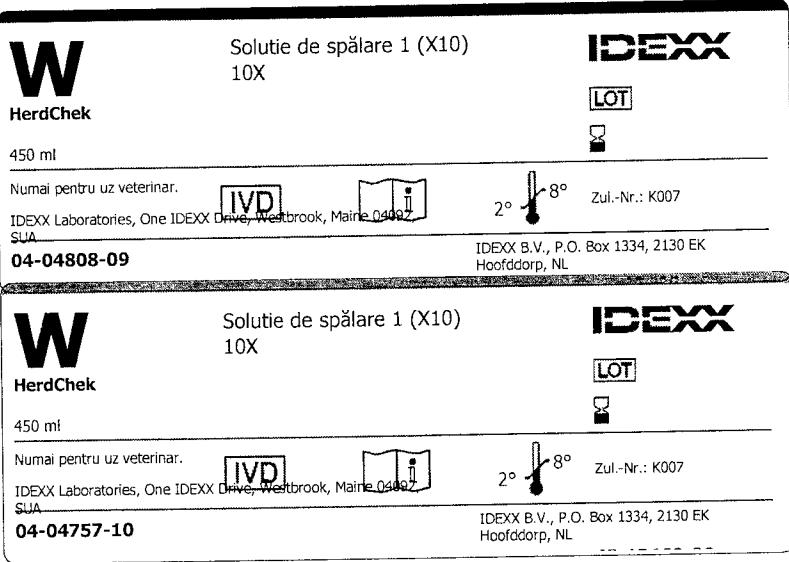
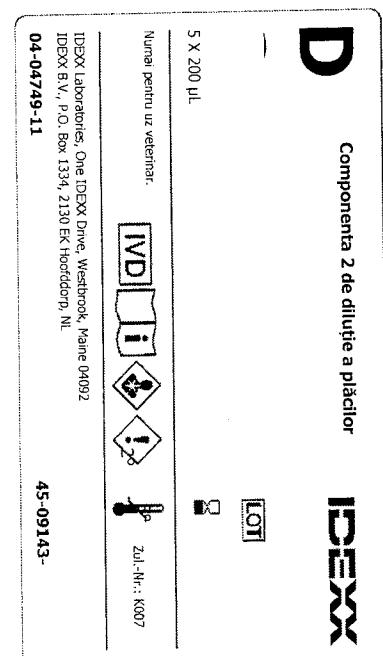
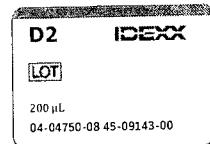
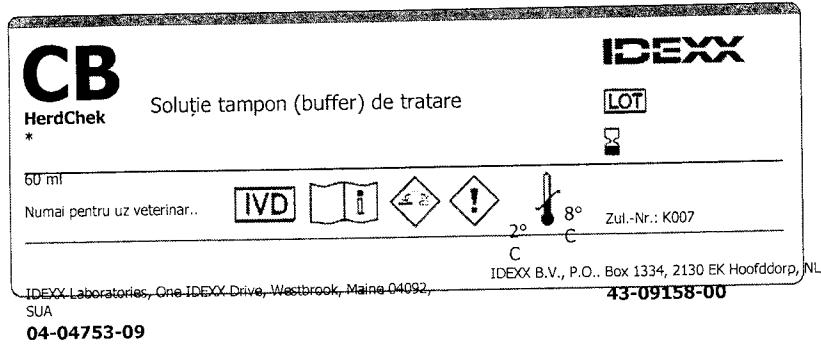
✓ 42

TRUSĂ DE TESTARE A ANTIGENULUI ENCEFALOPATIEI SPONGIFORME



L'Art

TRUSĂ DE TESTARE A ANTIGENULUI ENCEFALOPATIEI SPONGIFORME



14

HerdChek BSE-Scrapie // 99-08600

Kit de testare a antigenului bovin pentru detectarea boala boala Creutzfeld-Jakob la bovine	
Scrapie, ELISA	HerdChek
5 x 96 teste	
REF	LOT/SN
IDEXX	
<p>KIT DE TESTARE A ANTIGENULUI BOVIN PENTRU DETECTAREA BOALA CREUTZFELD-JAKOB LA BOVINE.</p> <p>Nu se numește și se referă la:</p> <p>Anticorpi Recuriți</p> <p>Blot de testare a antigenului 5 x ml.</p> <p>Control pozitiv 5 x 1 ml.</p> <p>Componență 1 de diluare plăci 1 x 20 ml.</p> <p>Componență 2 de diluare plăci 5 x 200 ml.</p> <p>Diluant și reacționare 1 x 20 ml.</p> <p>Timp de reacționare 1 x 200 ml.</p> <p>Conciliu concentrat (reacție) 1 x 200 µl.</p> <p>Obiect de spalare 1 (100) 1 x 60 ml.</p> <p>Obiect de spalare 2 (100) 1 x 60 ml.</p> <p>Timp de secare 1 x 60 min.</p>	
<p>IVD</p> <p>CE</p> <p>IBDEXX V.</p> <p><small>includes a valid commercial use permit issued by IDEXX Laboratories, Inc. in a state or territory of the United States.</small></p> <p>PERICOI</p> <p><small>H007 / H012 / H014 / H035 / H037 / H038 H003 / H035 / H036 / H035 / H042</small></p> <p>PROMO IMPORTAT UTILIZAT VETERINAR</p> <p><small>Produsul este destinat utilizarii in cadrul clinicii veterinare sau laboratorului de analize. Este destinat utilizarii in cadrul unui program de monitorizare a boala Creutzfeld-Jakob la bovine. Importator: Exportservice DUXY SRL, Strada Gheorghe Doja nr. 34, 310001 Cluj-Napoca, ROMANIA. Distribuitor: Exportservice DUXY SRL, Strada Gheorghe Doja nr. 34, 310001 Cluj-Napoca, ROMANIA. Tel: +4022 423243</small></p> <p>04-08521-08</p> <p>08-3399</p> <p>IBDEXX.COM</p>	

