



Trusa TeSeE™

Protocolul Scurt

384 Teste

768 Teste

Cod: 355-1192

Cod: 355-1191

REACTIVI PENTRU PURIFICAREA ȘI DETECȚIA *IN VITRO* A PrP^{Sc}

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

Manual de utilizare



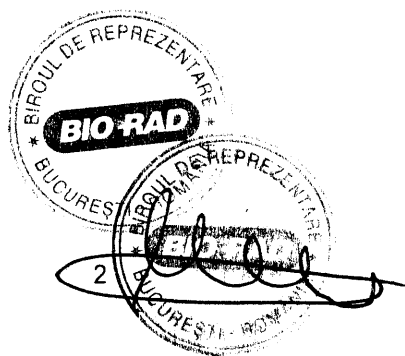
BIO-RAD





CUPRINS

- 1 - GENERALITĂȚI**
- 2 - TRUSA TeSeE™**
 - 2 - 1 Principiul
 - 2 - 2 Prelevatele
 - 2 - 3 Componentele trusei TeSeE™
 - 2 - 4 Reconstituirea reactivilor
 - 2 - 5 Conservare și valabilitate
 - 2 - 6 Modul de lucru
 - 2 - 7 Limitele testului
- 3 - MATERIALE NECESARE NEINCLUSE ÎN TRUSE**
- 4 - PRECAUȚII**
- 5 - MĂSURI DE IGIENĂ ȘI PROTECȚIA MUNCII**
- 6 - BIBLIOGRAFIE**





1 GENERALITĂȚI

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

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

Și specia umană este sensibilă la anumite forme de EST. Elemente convingătoare susțin trecerea ESB de la bovine la om, probabil prin consumul de carne contaminată.

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

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

Principalele trăsături ale acestor maladii sunt următoarele:

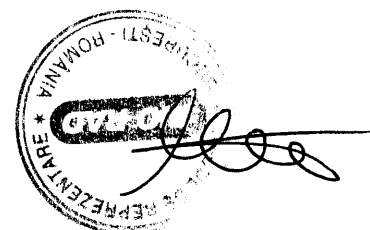
- evoluția progresivă lentă, însă întotdeauna fatală,
- absența agenților infecțioși clasici,
- acumularea progresivă, în sistemul nervos central, a unei izoforme anormale a proteinei prionice naturale (PrP), denumită PrP^{Sc}. Această izoformă se caracterizează prin proprietăți biochimice particulare,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

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

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

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

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



Testarea se realizeaza cu reactivii si materialele accesorii urmatoare

| | |
|---|----------------|
| - Trusa TeSeE™ (384 testări) | cod: 355-1119 |
| - Trusa TeSeE™ (768 testări) | cod: 355-1119 |
| - Tuburi de omogenizare (768 tuburi) | cod: 355-1137 |
| - Seringi și ace de calibrare (x 200) sau Plăci filtrante (x 50) | cod: 355-1174 |
| - Microplăci cu godeuri adânci (x 50) | cod: 355-1179 |
| - Sfere medii (x 2000) | cod: 359-0132 |
| | cod: 355-1171* |

*Doar pentru tesut periferic

2 – Trusa TeSeE™

2-1 PRINCIPIUL

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

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

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

2-2 PRELEVATELE (PROBELE BIOLOGICE)

Bovine : Purificarea PrP^{Sc} se efectuează din eşantioane de țesut nervos din SNC. Prelevarea trunchiului cerebral se realizează cu trusa de prelevare BSE extraction tool (cod : 355-1130).

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

Seringa de prelevare (cod: 355-1175) permite prelevarea rapidă și facilă, de o manieră sigură, a obexului. Instrucțiuni detaliate referitoare la prelevare se găsesc în protocolul aferent, pe care vă rugăm să-l consultați.

Rumegătoare mici și cervide : Purificarea PrP^{Sc} se efectuează din eşantioane de țesut nervos din SNC sau din țesuturi periferice (ganglioni limfatici, splină,...). Trusa de extracție pentru rumegătoare mici (cod : 355-1184) poate fi folosită atât la prelevarea trunchiului cerebral cât și a cerebelului.

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

Probele se detașează și se cântăresc individual.

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

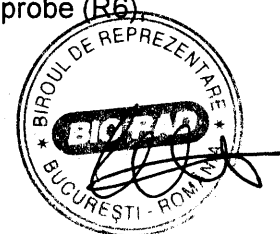
Dacă purificarea se face în următoarele 24 de ore, eşantioanele vor fi păstrate între +2°C și +8°C, sau se vor congela dacă se dorește păstrarea lor pe durata a câteva luni. Eşantioanele nu se vor congela/decongela mai mult de 3 ori. În caz de necesitate de transport, eşantioanele trebuie ambalate în conformitate cu reglementările naționale în vigoare.



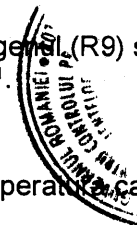
2-3 COMPOZIȚIA TRUSEI TeSeE™

| ETICHETĂ | TIPUL REACTIVULUI | PREZENTARE | | PĂSTRARE |
|-----------|---|------------------------|------------------------|------------|
| | | 355-1192 | 355-1191 | |
| Reactiv A | Soluție denaturantă | 1 flacon (120 ml) | 1 flacon (240 ml) | +2°C/+8°C |
| Reactiv B | Soluție de clarificare Colorant: albastru de bromfenol | 1 flacon (120 ml) | 2 flacoane (120 ml) | +2°C/+8°C |
| Reactiv C | Tampon de resolubilizare Colorant: verde de malachit | 1 flacon (14 ml) | 1 flacon (28 ml) | +2°C/+8°C |
| PK | Proteinază K Colorant: roșu de fenol | 2 flacoane (0.5 ml) | 4 flacoane (0.5 ml) | +2°C/+8°C |
| R1 | Microplaca: 12 barete de cate 8 godeuri sensibilzate cu un anticorp monoclonal anti-PrP | 4 placi | 8 placi | +2°C/+8°C |
| R2 | Soluție de spălare: Concentrat 10x de tampon Tris-NaCl pH 7,4. Conservant: ProClin™ 300 (0,1%) | 2 flacoane (250 ml) | 4 flacoane (250 ml) | +2°C/+25°C |
| R3 | Control (martor) negativ: Tampon TFS pH 7,2 suplimentat cu albumină serica bovină (ASB). Conservant: ProClin™ 300 (0,1%) | 2 flacoane (4 ml) | 4 flacoane (4 ml) | +2°C/+8°C |
| R4 | Control (martor) pozitiv: Tampon TFS pH 7,4 suplimentat cu peptide de sinteză neinfecioase, liofilizat. Conservant: ProClin™ 300 (0,1%) | 2 flacoane | 4 flacoane | +2°C/+8°C |
| R6 | Diluant de probe: Tampon TFS pH 7,2 suplimentat cu ASB și roșu de fenol. Conservant: ProClin™ 300 (0,1%) | 1 flacon (70 ml) | 2 flacoane (140 ml) | +2°C/+8°C |
| R7 | Conjugat: Solutie concentrată 10x de anticorpi monoclonali anti-PrP marcați cu peroxidază, în tampon TFS, pH 7,1 suplimentat cu proteine bovine și colorată cu roșu de fenol. Conservant: ProClin™ 300 (0,1%) | 2 flacoane (2.8 ml) | 4 flacoane (2.8 ml) | +2°C/+8°C |
| R8 | Tampon substrat pentru peroxidază: Soluție de acid citric și acetat de sodiu pH 4,0 ce conține 0,015% H ₂ O ₂ și 4% dimetil sulfoxid (DMSO) | 1 flacon (120 ml) | 2 flacoane (240 ml) | +2°C/+8°C |
| R9 | Cromogen: Soluție de tetrametil benzidina (TMB) | 1 flacon (10 ml) | 1 flacon (10 ml) | +2°C/+8°C |
| R10 | Soluție de stopare: Acid sulfuric 1 N | 1 flacon (56 ml) | 2 flacoane (112 ml) | +2°C/+8°C |
| | Folii adezive | 16 | 12 | |

Urmatorii reactivi sunt componente generice: Reactivul A, reactivul B, diluantul de probe (R6)



soluția de spălare (R2), tamponul substrat pentru peroxidaza (R8), cromogenul (R9) și soluția de stopare (R10). Ele se pot folosi cu orice lot de truse de purificare TeSeE™.



2-4 PREPARAREA REACTIVILOR

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

1 - Reactivi gata de utilizare

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

Microplacile (R1):

Înainte de deschiderea ambalajului vidat ce conține o substanță de deshidratare, lăsați microplaca să ajungă la temperatura ambiantă (+18°C/+30°C) în ambalajul original, în scopul preîntâmpinării condensării apei în godeuri. Deschideți la punctul de sudură, scoateți atâtea barete câte aveți nevoie, și reintroduceți imediat baretele nefolosite în ambalaj. Închideți ermetic ambalajul, eliminând aerul din interior. Păstrați la +2°C +8°C.

2 - Reactivi de preparat

Proteinaza K:

Reactivul A este tamponul de diluare a proteinazei K.

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

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

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

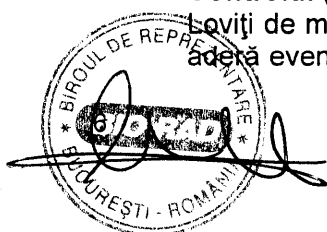
După reconstituire, omogenizați soluția prin răsturnarea de câteva ori a flaconului, până la obținerea unei soluții de culoare roșie, uniformă.

Soluția de spălare (R2):

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

Controlul (martorul) pozitiv (R4):

Leviți de masă cu blândețe flaconul cu controlul pozitiv (R4) în scopul desprinderii substanței ce aderă eventual la dopul de cauciuc. Deschideți flaconul și dizolvați conținutul acestuia în 4 ml de



diluare R6. Astupați la loc flaconul și lăsați-l în așteptare timp de 1 minut, amestecând delicat din când în când pentru a favoriza dizolvarea.

Conjugatul (R7):

Diluțați reactivul R7 în proporție de 1/10 cu soluția de spălare proaspăt preparată (de exemplu: 0,1 ml de reactiv R7 în 0,9 ml de soluție de spălare reconstituită), ținând seama că 1 ml de conjugat de lucru este suficient pentru 1 baretă. Omogenizați ușor. Nu folosiți vortexul pentru omogenizare.

Soluția de dezvoltare enzimatică (R8 + R9):

Diluțați reactivul R9 în proporție de 1/11 cu reactivul R8 (de exemplu: 0,1 ml de reactiv R9 cu 1 ml de reactiv R8), ținând cont ca 1,1 ml de soluție de revelare enzimatică este suficient pentru 1 baretă. Omogenizați delicat. Nu vortexați.

2-5 CONSERVARE ȘI VALABILITATE

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

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

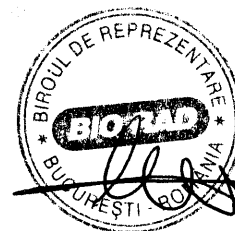
Valabilitatea reactivilor după reconstituire este următoarea:

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

2-6 MODUL DE LUCRU

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

Procedeeul de lucru manual :





1. Prelevarea probelor:

Pentru țesuturi periferice (ganglioni limfatici, splină,...), înainte să introduce proba în tubul de omogenizare, introduceți o sferă medie (cod : 355-1171).

Prelevați o cantitate de 350 ± 40 mg de țesut nervos din trunchiul cerebral, de preferat de la nivelul obexului, sau $200 \text{ mg} \pm 20 \text{ mg}$ de țesut periferic.

Introduceți probele de țesut nervos în tuburile de omogenizare, închideți bine capacele acestora și treceți la etapa de omogenizare în omogenizator (sistemul Ribolyser[®], TeSeE[™] PRECESS 24[™] sau TeSeE[™] PRECESS 48[™]).

2. Omogenizarea probelor:

Plasați tuburile pe suportul circular al omogenizatorului (sistemul Ribolyser[®], TeSeE[™] PRECESS 24[™] sau TeSeE[™] PRECESS 48[™]). Efectuați un ciclu de agitare la parametrii următori:

| | Ribolyser [®] | | TeSeE [™] PRECESS 24 [™] sau 48 [™] | |
|-------------|------------------------|-----------------|--|-----------------|
| | Țesut nervos | Țesut periferic | Țesut nervos | Țesut periferic |
| Timp (sec.) | 45 | 2 x 45* | - | - |
| Viteză | 6.5 | 6.5 | - | - |
| Program | - | - | Program 1 | Program 2 |

*Lăsați 5 minute pauză între 2 cicluri de agitare.

Dacă omogenizarea este insuficientă, mai puteți efectua alte 1-2 cicluri suplimentare de agitare, având grijă ca temperatura tubului să revină la temperatura ambiantă (+18°C la +30°C) între fiecare ciclu (de ex. prin menținerea pe gheață pisată).

3. Transferul probelor:

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

Transferați omogenatul prin una din următoarele metode:

- **Metoda seringii de calibrare**

Prelevați 250 μl cu ajutorul seringii de calibrare (cod : 355-1174), având grijă să scufundați acul seringii dedesubtul stratului de sfere ceramice, pentru a preîntâmpina aspirarea fragmentelor de țesut omogenizate necorespunzător.

Transferați fiecare porție de 250 μl într-o eprubeta Eppendorf de 2 ml sau într-o microplacă cu godeuri adânci (cod : 359-0132).

- **Metoda plăcii filtrante**

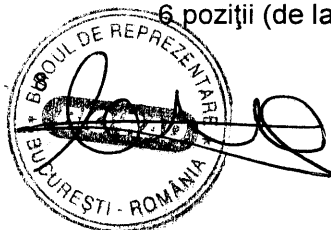
Transferul și filtrarea se fac separat utilizând o placă filtrantă (cod : 355-1179) și o placă cu godeuri adânci (cod : 359-0132), utilizând una din următoarele tehnici de filtrare.

- Tehnica de vid :

Potrivii placa cu godeuri adânci (cod : 359-0132) (placa principală) în partea de jos a dispozitivului de vid, așezați ghidajul dispozitivului și apoi placa filtrantă (cod : 355-1179). Prelevați cel puțin 400μl ($\leq 1000\mu\text{l}$) cu un vârf de 1000μl. Transferați fiecare 400μl într-un godeu al plăcii filtrante (cod : 355-1179), excludeți primele 6 poziții (de la A1 la F1). Lipiți placa cu ajutorul unei folii. Setați manometrul de vid al pompei (cod : 359-0350) la 25,4 cm Hg ($\pm 2,5\%$). Comutați mecanismul pe pompă și verificați manometrul pentru un vid corect, apoi deschideți valva dispozitivului pentru 1 min \pm 6 secunde. Închideți valva, dezactivați pompa și realizați vidul de la dispozitiv.

- Tehnica de centrifugare :

Transferați cel puțin 400 μl ($\leq 1000\mu\text{l}$) cu un vârf de 1000 μl în fiecare godeu al plăcii filtrante (cod 355-1179), întâi montate pe o placă cu godeuri adânci (cod 359-0132), excludeți primele 6 poziții (de la A1 la F1). Lipiți placa cu o folie adezivă.





Centrifugați ansamblul (placa filtrantă și placa cu godeuri adânci) pentru 1 min la 500g. Aveți grijă să țineți placa filtrantă în siguranță, pe poziție, pe placa cu godeuri adânci.

Notă :

Centrifuga trebuie să fie echipată cu rotor pentru microplaci cu godeuri adanci (cod : 359 - 0136) corespunzătoare centrifugii Eppendorf 5804R (code: 359-1396).

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

Notă :

În aceasta etapa, atât omogenatele rămase în tuburile de omogenizare cât și cele transferate după calibrare se pot păstra bine închise:

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

*Eșantioanele pot fi supuse la cel mult de 3 cicluri de congelare/decongelare. Înainte de repunerea în lucru, omogenizați întotdeauna prin răsturnare conținutul decongelat.

4. Tratamentul cu proteinază K (PK):

Repartizați 250 μ l (\pm 10%) de soluție de PK diluată (paragraful 2.4) în fiecare microtub sau placa de purificare. Să nu se depășească intervalul de 5 minute de la pipetarea proteinazei K reconstituite în primul microtub și până la ultimul. Eprubetele închise sau placile cu godeuri înalte sigilate cu folie de aluminiu se agita imediat după adăugarea proteinazei K prin rasturnare de 10 ori. Nu depășiți 2 minute între omogenizare cu proteinaza K și introducerea microtuburilor în termobloc pentru incubarea la 37°C. Incubați la 37 \pm 2°C într-o baie uscată termostată (termobloc), timp de 10 \pm 1 minute.

Notă :

Dacă utilizați placă cu godeuri adânci, baia uscată termostată (termoblocul) trebuie să fie echipată cu suport adaptat pentru astfel de plăci (cod : 359-0134).

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

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

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

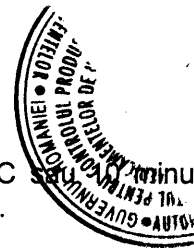
În cel mult 30 minute după distribuirea și amestecarea reactivului B, centrifugați microtuburile sau placa de purificare după cum urmează :

| Centrifugare | Micro tuburi | | Placă cu godeuri adânci |
|------------------|--------------|--------|-------------------------|
| Viteză (g) | 20 000 | 15 000 | 2 000 |
| Timp (mm) | 5 | 7 | 10 |
| Temperatură (°C) | 18 – 25 | 20 | 4 |



Notă :

Pentru plăcile cu godeuri adânci alocăți 5 minute în plus la 37°C și 5 minute în plus la temperatura camerei (între +18°C și +30°C) înainte de centrifugare.



7. Clarificarea probelor:

După centrifugare, eliminați supernatantul prin răsturnare deasupra unui recipient de deșeurile biologice. Scurgeți bine microtuburile răsturnându-le pe o hârtie de filtru absorbantă și lăsați-le 5 minute la scurs.

Sau încărcăți placa cu godeuri adânci pe unitatea DW40 (cod : 359-0137). Selectați programul «TSE DW » și selectați numărul de barete care vor fi folosite. Placa cu godeuri adânci trebuie să fie uscată la sfârșitul procesului DW40, prin răsturnarea plăcii pe hârtie absorbantă pentru 5 minute.

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

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

Incubați imediat timp de 5 ± 1 minute la $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Nu depășiți 2 minute între adăugarea reactivului C și începutul incubării. Microplaca cu godeuri adânci nu trebuie sigilată în timpul incubării.

Notă :

Dacă utilizați placă cu godeuri adânci baia uscată termostată (termoblocul) trebuie să fie echipată cu suport adaptat pentru astfel de plăci (cod : 359-0134).

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

Probele pot fi conservate 5 ore la $+2^{\circ}\text{C}$ $+8^{\circ}\text{C}$ sau congelate 72 de ore la -20°C în micro tuburi sau placa cu godeuri adânci. Probele congelate trebuie dezghețate la temperatura camerei ($+18^{\circ}\text{C}$ la $+30^{\circ}\text{C}$), și omogenizate prin vortexare (5 ± 2 secunde) înainte de utilizare.

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

1. Scoateți cadrul suport și numărul de barete (R1) necesare din ambalajul protector. Reintroduceți în ambalaj baretele nefolosite împreună cu materialul deshidratant și închideți ambalajul ermetic.
2. Preparați controlul (martorul) pozitiv R4 conform indicațiilor din capitolul 3.4.2.
3. Pentru fiecare serie de lucru și fiecare microplacă pipetați 100 μ l (\pm 10%) de martor/probe în godeuri în ordinea de mai jos.
 - Godeurile A1, B1, C1, D1: control negativ (R3)
 - Godeurile E1, F1: control pozitiv (R4)
 - Godeurile G1, H1, etc.: probe diluate cu reactivul R6.

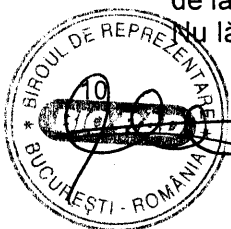
Probele se lucrează în singlet.

4. Acoperiți placa cu folie adezivă și incubați timp de 75 min \pm 15 min la $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
5. Preparați soluția de spălare (R2).
6. Preparați soluția de conjugat (R7).

7. Îndepărtați folia adezivă și efectuați 3 cicluri de spălare.

Condițiile optime de spălare se realizează cu spălătoarele de microplăci PW40, PW41 sau 1575 de la Bio-Rad, programul TSE 3.

Nu lăsați microplaca goală mai mult de 5 min după ultimul ciclu de spălare (deoarece se usucă).



Înainte de a trece mai departe, scurgeți bine baretele prin răsturnare și tapotare deasupra unei hârtii de filtru absorbantă.

Adăugați 100 μ l (\pm 10%) de soluție de conjugat (R7) în fiecare godeu.

9. Acoperiți cu folie adezivă și incubați 30 min \pm 2 min la +2°C +8°C (la frigider).

10. Preparați soluția de revelare enzimatică (R8 + R9).

11. Îndepărtați folia adezivă și efectuați 5 cicluri de spălare.

Condițiile optime de spălare se realizează prin folosirea spălătoarelor de microplăci PW40, PW41 sau 1575 de la Bio-Rad, programul TSE 5.

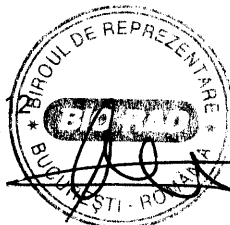
Nu lăsați microplaca goală mai mult de 5 min după ultimul ciclu de spălare (deoarece se usucă). Înainte de a trece la etapa următoare, scurgeți bine baretele prin răsturnare și tapotare deasupra unei hârtii de filtru absorbante.

12. Adăugați 100 μ l (\pm 10%) de soluție de revelare (R8 + R9) în fiecare godeu și lăsați microplaca timp de 30 min \pm 5 min la întuneric și la temperatura ambiantă (+18°C la +30°C). Nu acoperiți cu folie adezivă pe durata acestei incubări.

13. Adăugați 100 μ l (\pm 10%) de soluție de stopare (R10) în fiecare godeu, în aceeași secvență și în același ritm de pipetare cu cele realizate în etapa de pipetare a soluției de revelare.

14. Stergeți de umezeală și eventuale amprente fundul godeurilor și citiți densitățile optice în mod bicromatic (la două lungimi de undă, una de referință), la 450 nm - 620 nm, în maxim 30 minute de la stoparea reacției enzimaticе (baretele NU trebuie expuse la lumină înainte de citire).

Parametrii de spalare a microplacilor



NAME: TSE 3

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

NAME: TSE 5

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

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

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



2-7. CALCULUL ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

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

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

2) Calculul valorii cut-off (prag) _____

Valoarea prag este egala cu: $DO R3 + 0,210$

Exemplu :

DO R3 = 0,020

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

3) Condițiile de validare a testului

• **Controlul negativ (R3):**

a) *Validarea valorilor individuale ale controlului negativ:*

Absorbția (densitatea optică, DO) fiecărui godeu negativ trebuie să fie mai mica de 0,150.

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

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

b) *Omogenitatea (reproductibilitatea) valorilor controlului negativ:*

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

Valoarea individuală ce depășește media controalelor negative cu + 40% ($DO R3 + 40\%$) trebuie eliminată.

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

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

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

• **Controlul pozitiv (R4):**

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

Dacă media DO R4 este mai mică decât 1,000, testarea trebuie repetată.

4) Interpretarea rezultatelor:

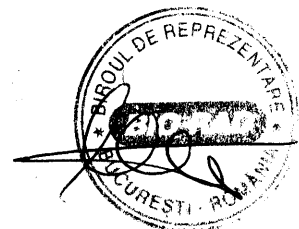
Probele ale căror densități optice sunt mai mici decât valoarea prag (cut-off) se consideră negative conform testării cu trusa TeSeE™.

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

Eșantioanele ale caror densități optice sunt mai mari sau egale cu valoarea prag sunt considerate ca inițial reactive la testarea cu trusa TeSeE™ și trebuie retestate în duplicat pornind de la omogenatul original, înainte de interpretarea definitivă.

După repetarea testării, eșantionul se clasifică ca pozitiv în conformitate cu testarea cu trusa TeSeE™ dacă cel puțin una din dozări este pozitivă la repetare ($DO \geq$ valoarea prag). Un eșantion se va clasifica ca negativ în conformitate cu testarea cu trusa TeSeE™ dacă cele două dozări la repetare sunt mai mici decât valoarea prag.

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



2-8 LIMITELE TESTULUI

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

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

Orice eșantion care generează un rezultat pozitiv reproductibil în conformitate cu criteriile de interpretare ale testului, trebuie confirmat în acord cu reglementările naționale (laborator național de referință) în vigoare sau cu cele comunitare în circumstanțe excepționale.

3 - MATERIALE NECESARE NEINCLUSE ÎN TRUSĂ

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

Etapa de purificare:

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

Pentru purificarea semiautomata a probelor: sistemul TeSeE™ NSP

Etapa de detecție:

- Pipete fixe/reglabile, automate sau semiautomate, pentru pipetare 50, 100, 200, 1000 μl
- Eprubete gradate de 10 ml, 20 ml și 100 ml.
- Containere pentru deșeuri contaminate
- Incubator pentru microplaci termostatat la 37°C ± 2°C.
- Camera rece de +2°C +8°C (frigider).
- Spălător* de microplăci, automat sau semiautomat.
- Cititor de microplăci* (echipat cu filtre de 450 nm și 620 nm).
- Cititor de microplăci* pentru automatizarea etapelor protocolului de lucru. Performanțele sistemului trebuie să răspundă cerințelor protocolului de testare

* Contactați Bio-Rad pentru lista instrumentelor disponibile.

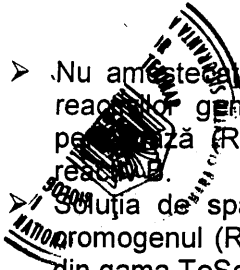
4 - PRECAUȚII

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

Reactivii trebuie păstrați la +2°C/+8°C.

- Nu folosiți reactivi expirați.
- Nu folosiți soluție de proteinază K reconstituită și păstrată la temperatura ambiantă (+18°C + 30°C) după mai mult de 6 ore.

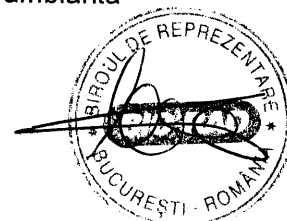


- 
- Nu amestecați în aceeași serie de lucru reactivi din truse TeSeE™ cu loturi diferite, cu excepția reactivilor generici: soluție de spălare (R2), diluant de probe (R6), substrat tamponat pentru peroxidază (R8), cromogen (R9), soluție de stopare (R10), tuburi de omogenizare, reactiv A și reactiv B.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

5 - MĂSURI DE IGIENĂ ȘI PROTECȚIA MUNCII

În general, măsurile de igienă și de biosecuritate, ca și bunele practici de laborator se stabilesc în conformitate cu recomandările autorității legislative a fiecărei țări.

- Toți reactivii trusei sunt destinați exclusiv diagnosticului *in vitro*.
- Purtați mănuși de unică folosință la manipularea reactivilor și a probelor și spălați-vă mâinile cu grijă după încetarea lucrului.
- Nu pipetați niciodată cu gura.
- Utilizați recipiente de polipropilenă pentru evitarea rănirii cu sticlărie spartă.
- Orice material ce vine în contact cu eșantioanele și soluția de spălare trebuie tratate ca materiale contaminate.
- Evitați stropirea cu probe sau cu soluții ce conțin probe de testat.
- Suprafețele contaminate trebuie curățate cu hipoclorit de sodiu 20000 ppm (clor). Dacă lichidul de contaminare este un acid, suprafețele contaminate trebuie mai întâi neutralizate cu sodă și apoi aplicați clorul. Suprafețele vor fi clătite cu apă distilată, uscate cu etanol și șterse cu hârtie absorbantă. Materialele folosite la curățenie trebuie aruncate într-un recipient special pentru deșeuri contaminate.
- Eșantioanele, materialele și produsele contaminate trebuie eliminate după decontaminare:
 - fie prin scufundare în hidroxid de sodiu 1M (concentrație finală) timp de 1 oră la temperatura ambiantă (+18°C + 30°C).
 - fie prin scufundare în hipoclorit de sodiu 20000 ppm timp de 1 oră la temperatura ambiantă

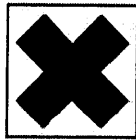


(+18°C + 30°C).

- sau prin autoclavare la minim 134°C cel puțin 18 minute, la presiune 3

Observație: NU SE SUPUN AUTOCLAVĂRII soluțiile ce conțin hipoclorit de sodiu sau reactiv B !

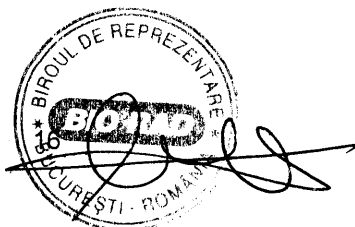
- Orice operație legată de realizarea testului de depistare a unei encefalopatii spongiforme transmisibile (EST) face obiectul unor reglementări stricte și trebuie efectuată într-un laborator izolat, destinat în exclusivitate acestui scop și în care accesul este limitat și controlat. Operatorul trebuie să poarte echipament de protecție (combinezon), încălțăminte suplimentară de protecție (botoși de plastic), mănuși și o mască cu vizieră sau una simplă și ochelari de protecție.
- Operatorii trebuie să fie instruiți în mod special în ceea ce privește riscul lucrului cu agenții EST sau prioni, modalitățile de decontaminare validate (aprobate) pentru agenții infecțioși "neconvenționali". Măsurile de biosecuritate trebuie să fie conforme cu recomandările autorității responsabilă cu reglementările la nivel național.
- Evitați orice contact al pielii sau mucoaselor cu tamponul substrat, cromogenul și soluția de stopare.
- Înainte de eliminare, neutralizați și/sau autoclavați orice soluție de spălare sau lichidele de spălare folosite, ca și orice lichid ce conține probele biologice.
- Reactivul B este o substanță periculoasă și se clasifică ca substanță nocivă (> 25% alcool) în sensul reglementărilor europene.
- Reactivii ce conțin ProClin™ 300 0,1% se clasifică ca preparate iritante în sensul aceluiași reglementări.



Xn
(Alcool > 25%)
(0,1% ProClin™ 300)

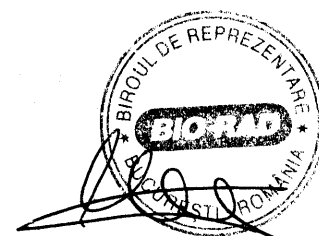
R : 10-22-37 / 38-41-43-67 Inflamabil. Nociv în cazul ingerării. Iritant pentru sistemul respirator și pielea. Risc de leziuni serioase în eventualitatea contactului cu ochii. Poate cauza sensibilizare în contact cu pielea. Inhalarea vaporilor poate provoca somnolență și amețeli.

S : 7 / 9-13-26-28-37 / 39-46 A se păstra în recipient bine închis și într-un loc bine ventilat. Păstrați ferit de contactul cu alimente și băuturi, inclusiv cele destinate animalelor. În caz de contact cu ochii, spălați de îndată și în mod abundent cu apă și consultați un medic specialist. După contactul cu pielea, spălați-vă imediat cu multă apă. Purtați echipament de protecție adecvat, mănuși și un dispozitiv de protecție a ochilor/feței. În cazul ingestiei accidentale, consultați neîntârziat un medic și arătați-i ambalajul sau eticheta.



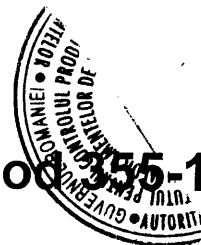
6 – BIBLIOGRAFIE

1. J. GRASSI, E. COMOY, S. SIMON, C. CREMINON, Y. FROBERT, S. TRAPMANN, H. SCHIMMEL, S.A.C. HAWKINS, J. MOYNAGH, JP DESLYS, G.A.H. WELLS (2001) Rapid Test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. The Veterinary Record (149) 577-582.
2. JP. DESLYS, E. COMOY, S. HAWKINS, S. SIMON, H. SCHIMMEL, G. WELLS, J. GRASSI, J. MOYNAGH (2001) Screening slaughtered cattle for BSE - Nature (409) 476-477.
3. E. COMOY (2000) Contribution au développement d'un test de diagnostic post mortem des bovins atteints d'Encephalopathie Spongiforme Bovine. Thèse de doctorat vétérinaire (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort).
4. EUROPEAN COMMISSION Directorate General DG XXIV (1999). Preliminary Report : The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible Spongiform Encephalopathy in bovines.
5. JP. DESLYS (1999) Prevention du risque d'Encephalopathie Spongiforme Subaiguë Transmissible. La Revue du Praticien (49) 966-970.
6. R. KNIGHT (1999) The relationship between new variant Creutzfeldt-Jakob Disease and Bovine Spongiform Encephalopathy - Vox sanguinis (76) 203-208.
7. D. DORMONT (1997) Les Agents Transmissibles Non Conventionnels ou prions - Virologie (1) 11-22
8. F. HILLA, M. 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.
9. CI. LASMEZAS, JP. DESLYS, O. ROBAIN, D. DORMONT (1997) L'agent secret des maladies à prions - La Recherche 46-53.
10. AM. HAYWOOD (1997) Transmissible Spongiform Encephalopathies. The New England Journal of Medecine (337-25) 1821-1828.
11. 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.
12. 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.
13. SB. PRUSINER & AL (1993) Immunologic and molecular biologic studies of prion protein in Bovine Spongiform Encephalopathy. The Journal of Infectious Diseases (167) 602-613



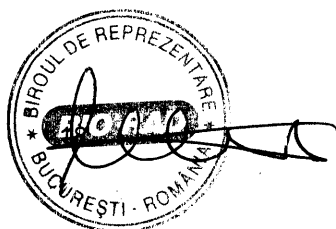
Seringa de prelevare

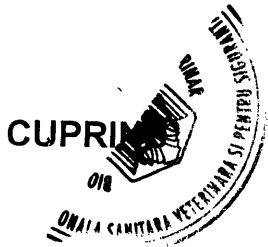
cod 355-1175



METODA DE PRELEVARE A PROBELOR PENTRU TESTELE BIO-RAD DE SCREENING EST (PLATELIA SI TeSeE™)

BIO-RAD





1 – GENERALITĂȚI

1-1 PRELEVAREA PROBELOR LA ABATOR

1-2 PRLEVAREA EȘANTIOANELOR DE TESTAT ÎN LABORATOR

2 – SERINGA DE PRELEVARE BIO-RAD

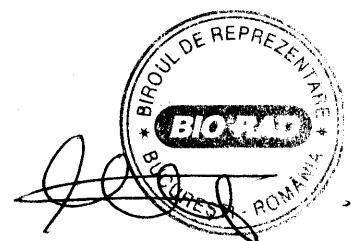
3 – CANTITATEA DE PROBĂ NECESARĂ TESTĂRII

4 – MODUL DE LUCRU

5 – PRECAUȚII/SFATURI UTILE

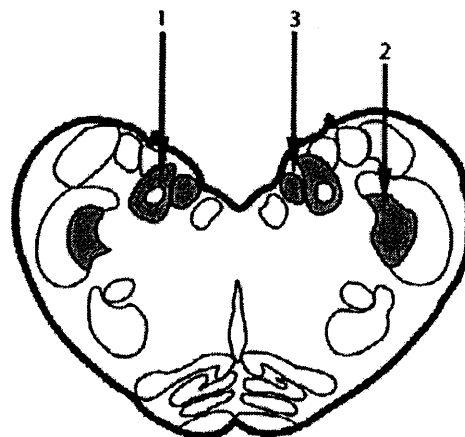
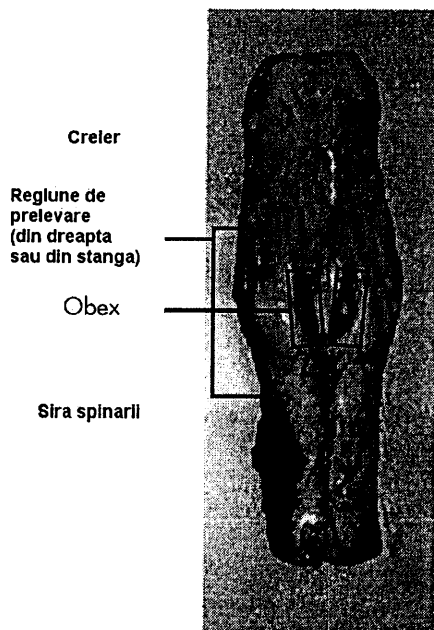
6 – MĂSURI DE IGIENĂ ȘI PROTECȚIA MUNCII

1 – GENERALITĂȚI





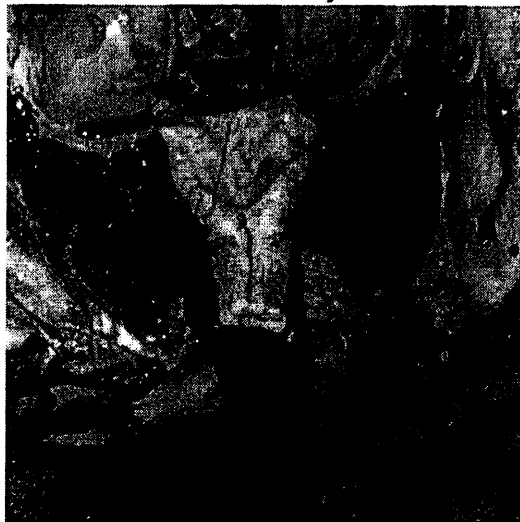
Testele Bio-Rad TSE de screening se execută din prelevate de 350 ± 40 mg de țesut nervos central (SNC). Regiunea anatomică specifică destinată detecției PrP^{Sc} la animalele infectate este trunchiul cerebral, mai exact aria nucleului nervului vag, în regiunea obexului. Această regiune este aria trunchiului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



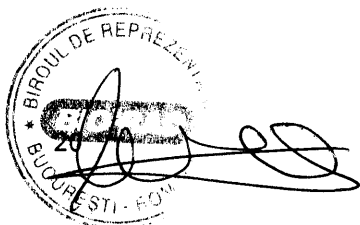
Secțiune a trunchiului cerebral la nivelul obexului reprezentând situsurile țintă pentru diagnosticul histopatologic și imunohistochimic în ESB (nucleul tractului solitar [1] și nucleul tractului V trigeminal [2]) și în scrapie (nucleul dorsal al nervului vag [3]). (Sursă: OIE - Manual of Diagnostic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

1 - 1 Prelevarea probelor la abator

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



Prelevarea probelor folosind lingura de prelevare Bio-Rad





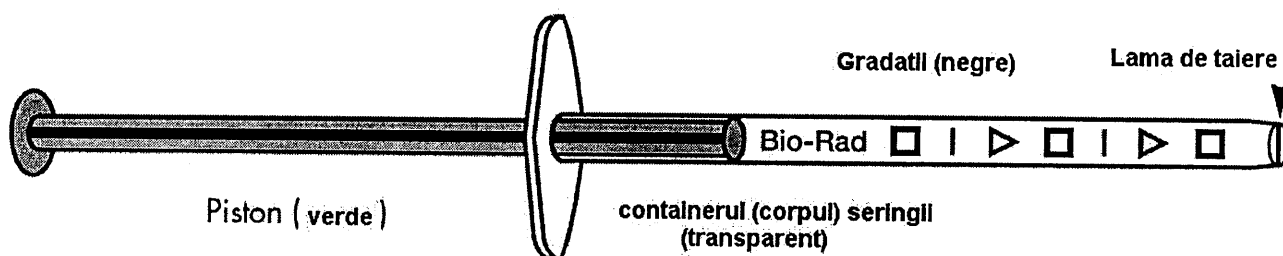
1 - 2 Prelevarea eșantioanelor de testat în laborator

Întregul trunchi cerebral se trimite la laborator pentru testare, asigurându-se respectarea măsurilor de biosecuritate recomandate de autoritatea de reglementare din fiecare țară. În laborator se va tăia cantitatea adecvată de material cerebral (cu un bisturiu,...) din regiunea obexului, folosind pentru prelevare seringă specială de prelevare **Bio-Rad sample syringe (cod: 355-1175)** ce asigură recoltarea rapidă și sigură a cantității necesare de material din aria recomandată, fără risc de rănire.

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

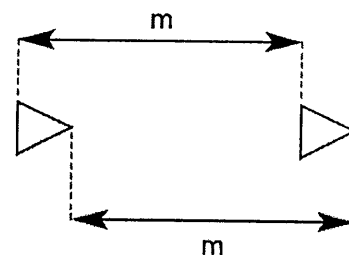
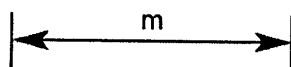
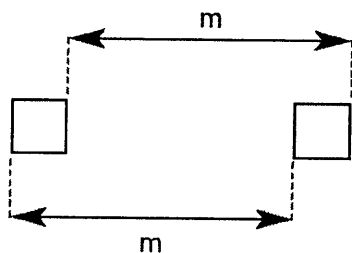
2 – SERINGA BIO-RAD DE PRELEVARE PROBE

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



3 - CANTITATEA DE PROBĂ NECESARĂ TESTĂRII

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

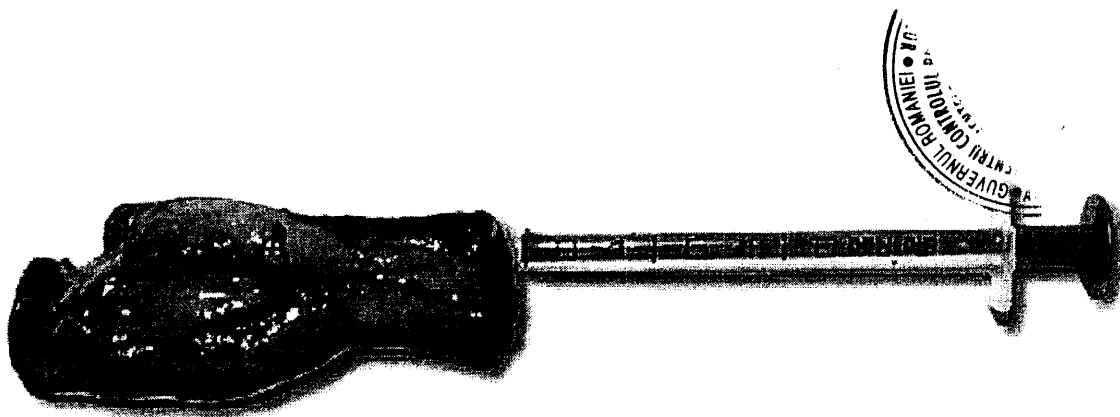


4 – MODUL DE LUCRU

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

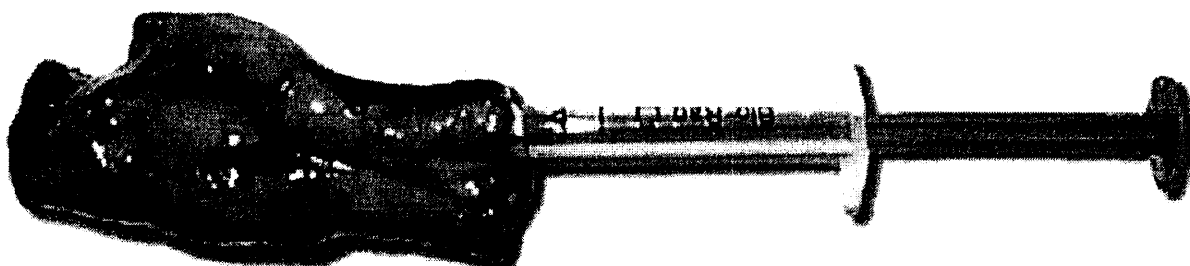
Notă: după recoltarea probei, o semisecțiune completă a trunchiului cerebral cu o regiune intactă de obex trebuie să rămână disponibilă pentru testarea de confirmare.





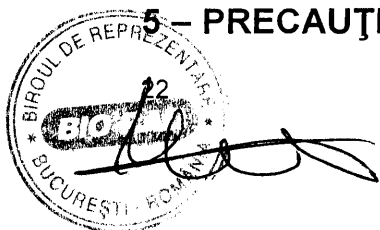
- Introduceți treptat corpul seringii în trunchiul cerebral în timp ce țineți nemișcat pistonul verde (relativ la trunchiul cerebral).

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



- Oprți mișcarea atunci când capătul corpului seringii a atins limita superioară a zonei de prelevare.
- Tăiați miezul probei prin răsucirea corpului seringii cu o tură completă.
- Scoateți încet seringă de prelevare din trunchiul cerebral, având grijă să nu deteriorați țesuturile din jur. Trunchiul cerebral rămas poate fi reintrodus în containerul său original.
- Verificați dacă s-au prins bule de aer în porțiunea de probă recoltată. La nevoie comprimați proba închizând capătul corpului seringii și presând cu pistonul verde până la eliminarea buleor de aer. În același timp, asigurați-vă că nu se pierde țesut de lângă capătul (deschiderea) corpului seringii.
- **Ținând astupat capătul corpului seringii, deplasați pistonul verde până la cel mai apropiat simbol marcat pe corpul seringii.**
- Verificați că proba prelevată acoperă cel puțin o zonă "m" corespunzătoare, așa cum este definită în capitolul anterior al acestui document (reprezentând masa de probă necesară testării).
- Luați o eprubetă de omogenizare și scoateți-i capacul, iar cu seringă de prelevare împingeți cu grijă pistonul verde până la următorul simbol identic pentru a realiza depunerea unei cantități corecte de țesut ("m") în eprubeta de omogenizare. Reamintiți-vă că mișcarea pistonului trebuie să atingă poziția corespunzătoare următorului simbol, întocmai ca în "3 - Cantitatea de probă necesară testării".
- Tăiați proba prin presarea capătului seringii de prelevare contra marginii interioare a eprubetei de omogenizare.
- Probele de calitate proastă (degradate) trebuie fie secționare sau, dacă prezintă grad avansat de autoliză, trebuie pipetate în eprubetă.
- Porțiunea nefolosită de probă din seringă de prelevare se poate păstra prin introducerea seringii de prelevare cu totul în containerul original în care rămâne și restul de trunchi cerebral.

5 – PRECAUȚII / SFATURI UTILE





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

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

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

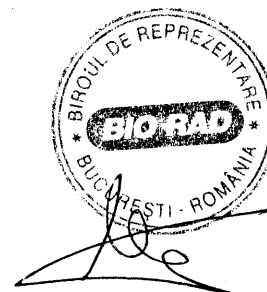
Seringile folosite se aruncă după decontaminare (consultați 6 – MĂSURI DE IGIENĂ ȘI PROTECȚIA MUNCII).

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

6 – MĂSURI DE IGIENĂ ȘI PROTECȚIA MUNCII

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

- Seringa de prelevare este destinată în exclusivitate procedurilor de diagnostic "in vitro".
- Purtați mănuși de unică folosință la manipularea reactivilor și a probelor, și spălați-vă temeinic mâinile după terminarea lucrului.
- Orice echipament ce a venit în contact direct cu probele biologice trebuie considerat contaminat.
- Suprafețele contaminate trebuie curățate cu soluție de hipoclorit de sodiu la concentrație finală de 20000 ppm (părți per milion). Dacă lichidul de contaminare este un acid, suprafețele contaminate trebuie mai întâi neutralizate cu hidroxid de sodiu (sodă caustică) ÎNAINTE de a le decontamina cu hipoclorit de sodiu. Suprafețele trebuie clătite cu apă distilată, uscate cu etanol (alcool) și șterse cu șervețele absorbante. Materialele folosite la curățenie trebuie aruncate în containerul special de deșeuri contaminate.
- Probele, echipamentele și produsele contaminate trebuie aruncate DUPĂ decontaminarea printr-una din următoarele metode:
 - prin scufundare în hidroxid de sodiu 1 M (concentrație finală) timp de 1 oră la temperatura camerei (+18°C la +30°C).
 - prin scufundare în soluție de hipoclorit de sodiu 20000 ppm timp de 1 oră la temperatura camerei (+18°C la +30°C).
 - prin autoclavare la o temperatură de cel puțin 134°C timp de minim 18 minute, la presiune de 3 bari.
- **Notă: Soluțiile ce conțin clor NU se autoclavează !**
- Toți operatorii ce participă la testările de screening pentru encefalopatiile spongiforme transmisibile (EST) se supun măsurilor de securitate locale în vigoare, conform cărora testările trebuie efectuate în laboratoare cu acces controlat și limitat, dedicate în exclusivitate acestui tip de activitate. Protecția muncii pentru acești operatori se asigură prin purtarea halatului de laborator sau a costumelor speciale, a botoșilor peste încălțăminte, a două perechi de mănuși și a măștii cu vizieră sau a măștii simple și a ochelarilor de protecție.
- Operatorii trebuie să fie special instruiți în ceea ce privește riscul asociat cu agenții EST sau prionii, ca și cu metodele de decontaminare validate pentru agenți infecțioși neconvenționali. Măsurile de biosecuritate trebuie să respecte indicațiile autorității de reglementare din țara vizată.



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL
INTERIORULUI

BIROUL DE REPREZENTARE
BUCUREȘTI - ROMANIA

L. Fata



TRUSA TeSeE - tub de omogenizare 355-1137

Tub de omogenizare 1.3 ml X 768

Pentru testarea *in vitro*

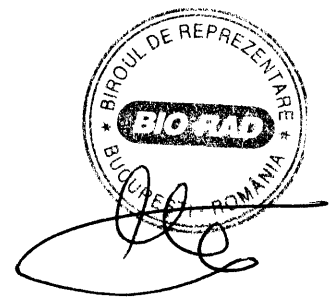


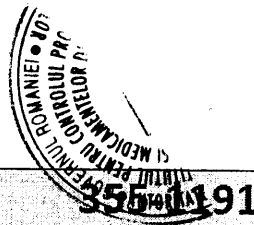
KI
R43
628-37



355-1137
326-1101

BIO-RAD F.5014 Nomenclature Logotype





Trusă TeSeE

Testare *in vitro* Kit de reactivi pentru purificarea *in vitro* și detecția PrP^{Sc} 768 Teste

| | |
|---|--|
| A 1 x 240 ml Soluție denaturantă | R3 4 x 4 ml Control (martor) negativ |
| B 2 x 120 ml Soluție de clarificare | R4 1 x 4 ml Control (martor) pozitiv |
| C 1 x 28 ml Tampon de resolubilizare | R6 1 x 120 ml Diluant de probe |
| PK 4 x 0.5 ml Proteinază K | R7 4 x 2.8 ml Conjugat (10x) |
| R1 8 x 1 Microplăci tratate cu anti-PrP MAb (Șoarece) | R8 2 x 120 ml Tampon substrat pentru peroxidază (0.015% H ₂ O ₂ , 4% DMSO) |
| R2 4 x 250 ml Soluție de spălare (10x) | R9 1 x 20 ml Cromogen (TMB) |
| | R10 1 x 112 ml Soluție de stopare (H ₂ SO ₄ 1N) |

Yn
R: 10-22-37/38-41-43-87
S: 7/8-23-24-36-38/37-39-80
Alcohol * 25%
* 1.5% ProClon™ 30U



Zul. Nr. RFAV/BSE/1/2001



TeSeE™ Kit

355-1191

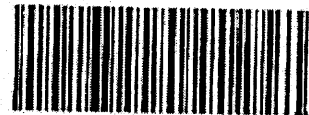
LOT 0C0000



0C0000



2000-01-15



2000-01-15

| LOT | Hourglass | LOT | Hourglass |
|-----------|------------|------------|------------|
| A 0C0000 | 2000-01-15 | R3 0C0000 | 2000-01-15 |
| B 0C0000 | 2000-01-15 | R4 0C0000 | 2000-01-15 |
| C 0C0000 | 2000-01-15 | R6 0C0000 | 2000-01-15 |
| PK 0C0000 | 2000-01-15 | R7 0C0000 | 2000-01-15 |
| R1 0C0000 | 2000-01-15 | R8 0C0000 | 2000-01-15 |
| R2 0C0000 | 2000-01-15 | R9 0C0000 | 2000-01-15 |
| | | R10 0C0000 | 2000-01-15 |

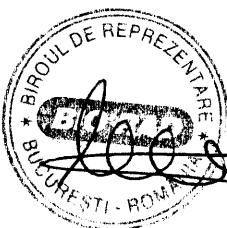


P511911T0C0000



01006064451144100C0000175

652175





TRUSĂ TeSeE A

SOLUȚIE DE DENATURARE 240 ml

IN VITRO TEST 5191A

+2°C → +8°C

BIO-RAD Bio-Rad
F-92430 Marnes-la-Coquette

000000 2000-01-15

529801000011500

TRUSĂ TeSeE B

Soluție de clarificare 120 ml

IN VITRO TEST 5192B

+2°C → +8°C

BIO-RAD Bio-Rad
F-92430 Marnes-la-Coquette

000000 2000-01-15

529801000011500

TRUSĂ TeSeE C

Tampon de resolubilizare 28 ml

IN VITRO TEST 5191C

+2°C → +8°C

BIO-RAD Bio-Rad
F-92430 Marnes-la-Coquette

000000 2000-01-15

529801000011500

TRUSĂ DE DETECȚIE TeSeE R1

Barete de câte 8 godeuri sensibilizate
cu un anticorp monoclonal anti-PrP x12

IN VITRO TEST 5194A

+2°C → +8°C

Bio-Rad - F 92430-Marnes la Coquette

8F0000 2008-02-28

27001000280206

00000

TRUSA DE PURIFICARE TeSeE PK

Proteinază K 0.5 ml

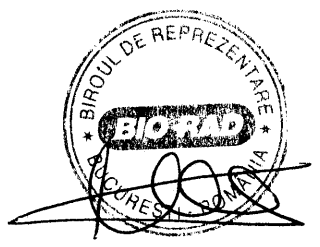
IN VITRO TEST 5194E

+2°C → +8°C

BIO-RAD Bio-Rad
F-92430 Marnes-la-Coquette

000000 2000-01-15

529801000011500





TRUSĂ DE DETECTIE TeSeE R2

Soluție de spălare (10X) 250 ml

IN VITRO TEST +25°C 7364R

+2°C **BIO-RAD** BIO-RAD F. 33431 Alcatraz - La Corgne Fr

LOT 0C0000 2000-01-15

25203000150100

TRUSĂ DE DETECTIE TeSeE R3

Control (martor) negativ 4ml

IN VITRO TEST +3°C 5145R

+3°C **BIO-RAD** BIO-RAD F. 33431 Alcatraz - La Corgne Fr

LOT 0C0000 2000-01-15

25203000150100

TRUSA DE DETECTIE TeSeE R4

Control (martor) pozitiv, liofilizat / 4 ml

IN VITRO TEST +3°C 5145R

+3°C **BIO-RAD** BIO-RAD F. 33431 Alcatraz - La Corgne Fr

LOT 0C0000 2000-01-15

25203000150100

TRUSĂ TeSeE R6

Diluant de probe 140 ml

IN VITRO TEST +8°C 51910

+8°C **BIO-RAD** BIO-RAD F. 33431 Alcatraz - La Corgne Fr

LOT 0C0000 2000-01-15

25203000150100

BIO-RAD
BUCUREȘTI - ROMANIA




TRUSĂ DE DETECTIE TeSeE R7

Conjugat (10x) 2.8 ml

IN VITRO TEST
+2°C +8°C
BIO-RAD Bio-Rad
7-2426 Marne-la-Coquette

OC0000 2000-01-15
LOT




25201000150100

TRUSĂ TeSeE R8

Tampon substrat pentru peroxidază
120 ml (0.015% H₂O₂, DMSO)

IN VITRO TEST
+2°C +8°C
BIO-RAD Bio-Rad
7-2426 Marne-la-Coquette

OC0000 2000-01-15
LOT




25201000150100

TRUSĂ TeSeE R9

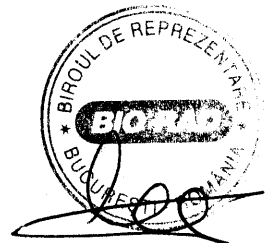
Cromogen TMB 20 ml

BIO-RAD Bio-Rad
7-2426 Marne-la-Coquette

OC0000 2000-01-15
LOT



25201000150100



TRUSĂ TeSeE R10

Soluție de stopare 112 ml
(H2SO4 1N)

IN VITRO TEST 5187G


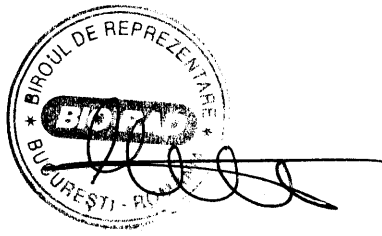
+2°C / +3°C

BIO-RAD Bio-Rad
FACILE Diagnostic Center

2000-01-15

LOT 000000

REF: 112000 TEST: 10

TRUSĂ TeSeE - tub de omogenizare 355-1137

Tub de omogenizare 1.3 ml X 768

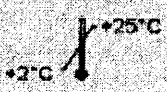
Pentru testarea *in vitro*



XI
R43
S28-37

355-1192
355-1191

Das. Prod. F. 304/4E Marcat la Cochetie



LOT 080010
2014-02-28



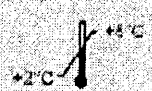
Trusă TeSeE

355-1192

Testare *in vitro* Kit de reactivi pentru purificarea *in vitro* și detectia PrP^{Sc} 384 Teste

| | | | |
|----|--|-----|---|
| A | 1 x 120 ml Soluție denaturantă | R3 | 2 x 4 ml Control (martor) negativ |
| B | 1 x 120 ml Soluție de clarificare | R4 | 2 x 1 ml Control (martor) pozitiv |
| C | 1 x 14 ml Tampon de resolubilizare | R6 | 1 x 70 ml Diluent probe |
| PK | 2 x 0.5 ml Proteinază K | R7 | 2 x 2.8 ml Conjugat (10x) |
| R1 | 4 x 1 Microplăci tratate cu anti-PrP MAb (Șoarece) | R8 | 1 x 120 ml Tampon substrat (0.015% H2O2, 4% DMSO) |
| R2 | 2 x 250 ml Soluție de spălare (10x) | R9 | 1 x 10 ml Cromagen (TMB) |
| | | R10 | 1 x 56 ml Soluție de stopare (H2SO4 1N) |

X
Xi
R : 10-23-37/10-41-41-67
S : 7/9 23 24 26 30/37/39 63
Alcoolul = 20%
+ 1.5% Proc. In M 200



Zul. Nr. BFAV/RSE/1/2001



TeSeE™ Kit

355-1192

LOT 0C0000



2000-01-15



| LOT | Icon | Icon | LOT | Icon |
|-----|--------|------------|-----|-------------------|
| A | 0C0000 | 2000-01-15 | R3 | 0C0000 2000-01-15 |
| B | 0C0000 | 2000-01-15 | R4 | 0C0000 2000-01-15 |
| C | 0C0000 | 2000-01-15 | R6 | 0C0000 2000-01-15 |
| PK | 0C0000 | 2000-01-15 | R7 | 0C0000 2000-01-15 |
| R1 | 0C0000 | 2000-01-15 | R8 | 0C0000 2000-01-15 |
| R2 | 0C0000 | 2000-01-15 | R9 | 0C0000 2000-01-15 |
| | | | R10 | 0C0000 2000-01-15 |




TRUSĂ TeSeE A

SOLUȚIE DE DENATURARE 120 ml


IN VITRO TEST 5192A

+2°C → +8°C



Bio-Rad
F-32430 Marnes-la-Coquette

LOT 000000
2000-01-15




5256010000011500

TRUSĂ TeSeE B

Soluție de clarificare 120 ml

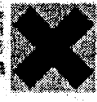
IN VITRO TEST 5192B

+2°C → +8°C




Bio-Rad
F-32430 Marnes-la-Coquette

Lot: 206
F. ID: 21-313441-ET
S. 16-03-03335-8
Xn



LOT 000000
2000-01-15




5256010000011500

TRUSĂ TeSeE C

Tampon de resolubilizare 14 ml

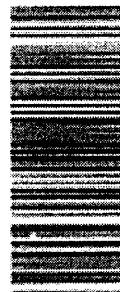
IN VITRO TEST 5192C

+2°C → +8°C



Bio-Rad
F-32430 Marnes-la-Coquette

LOT 000000
2000-01-15




5256010000011500

TRUSĂ DE DETECȚIE TeSeE R1

Barete de câte 8 godeuri sensibilizate
cu un anticorp monoclonal anti-PrP x12


IN VITRO TEST 5194A

+2°C → +8°C

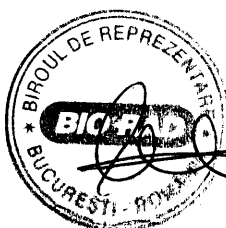


Bio-Rad - F-32430 Marnes-la-Coquette

LOT 8F0000
2008-02-28

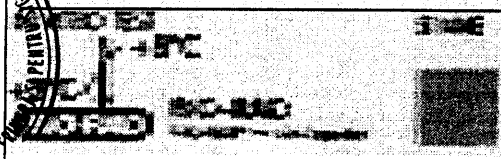


27001000280208



TRUSA DE PURIFICARE TeSeE PK

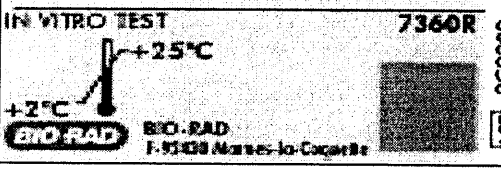
Proteinază K 0.5 ml



LOT 0C0000 2000-01-15
25203000150100

TRUSĂ DE DETECTIE TeSeE R2

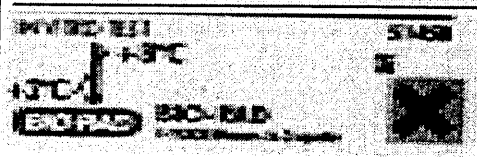
Soluție de spălare (10X) 250 ml



LOT 0C0000 2000-01-15
25203000150100

TRUSĂ DE DETECTIE TeSeE R3

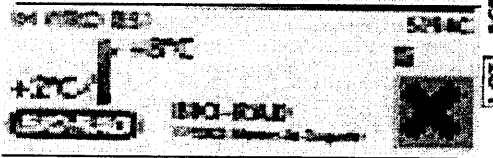
Control (martor) negativ 4ml



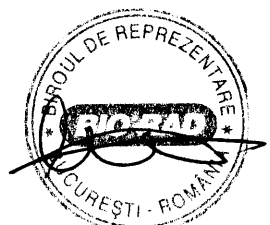
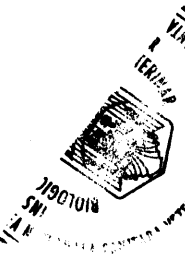
LOT 0C0000 2000-01-15
25203000150100

TRUSA DE DETECTIE TeSeE R4

Control (martor) pozitiv, liofilizat / 4 ml



LOT 0C0000 2000-01-15
27004000150100





TRUSĂ TeSeE R6

Diluent de probe 140 ml

IN VITRO TEST
+2°C +8°C

5191D

LOT 000000

2000-01-15

25208000150100

BIO-RAD Bio-Rad F-3000 Marne-la-Coquette

TRUSĂ DE DETECȚIE TeSeE R7

Conjugat (10x) 2.8 ml

IN VITRO TEST
+2°C +8°C

LOT 000000

2000-01-15

27007000150100

BIO-RAD Bio-Rad F-3000 Marne-la-Coquette

TRUSĂ TeSeE R8

Tampon substrat pentru peroxidază
120 ml (0.015% H₂O₂, DMSO)

IN VITRO TEST
+2°C +8°C

5192E

LOT 000000

2000-01-15

25208000150100

BIO-RAD Bio-Rad F-3000 Marne-la-Coquette

TRUSĂ TeSeE R9

Cromogen TMB 10 ml

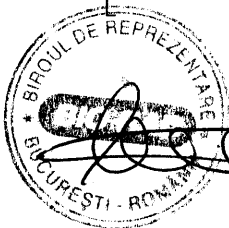
IN VITRO TEST
+2°C +8°C

LOT 000000

2000-01-15

25208000150100

BIO-RAD Bio-Rad F-3000 Marne-la-Coquette



[Handwritten signature]



TRUSA TeSeE R10

Solutie de stopare 56 ml
(H₂SO₄ 1N)

IN VITRO TEST 5192G

+2°C

+3°C

BIO-RAD Bio-Rad
R-2400 Inhibitor Control

2009-01-15

LOT

