

**Bovine Spongiform Encephalopathy-Scrapie
Antigen Test Kit, EIA**

**Kit Encéphalopathie Spongiforme Bovine–Tremblante
(Scrapie) Antigène, EIA**

**Kit para la detección de antígeno de la Encefalopatía
Espongiforme Bovina-Scrapie, EIA**

**Bovine Spongiforme Enzephalopathie-Scrapie
Antigen-Testkit, EIA**

Die deutsche Gebrauchsinformation ist gemäß § 11 Absatz 2 TierGesG zugelassen.

Kit per l'Encefalopatia Spongiforme Bovina-Scrapie, EIA

**Kit para detecção do antígeno da
Encefalopatia Espongiforme Bovina-Scrapie, EIA**

**Zestaw immunoenzymatyczny do wykrywania antygenu
encefalopatii gąbczastej bydła i choroby Scrapie**

HerdChek* BSE-Scrapie Antigen

Test With Confidence™



06-08519-12
Version #12

IDEXX

Bovine Spongiform Encephalopathy-Scrapie Antigen Test Kit, EIA

For veterinary use only.

English Version

Overview

The IDEXX HerdChek* Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-Scrapie Antigen Test Kit is an antigen-capture enzyme immunoassay (EIA) for detection of the abnormal conformer of the prion protein (PrP^{Sc}) in postmortem brain (obex preferred) tissues from bovines, small ruminants (sheep and goats) and cervids affected by BSE, scrapie, or chronic wasting disease (CWD). For small-ruminant applications, the test will also detect PrP^{Sc} in lymph node or spleen tissue; for cervids the test will also detect PrP^{Sc} in retropharyngeal lymph nodes (RPLN). It is designed to rapidly identify samples containing disease-associated PrP^{Sc} with minimal sample handling, and can be automated for high throughput applications. This kit is for veterinary use only.

For European Member States: This is an EU-approved rapid test for in vitro detection of BSE and scrapie-related PrP^{Sc} in cattle and small ruminants. This test can also be used in the EU for rapid testing of cervids for transmissible spongiform encephalopathy (TSE). The validation of this kit was carried out using tonsil, retropharyngeal lymphoid node and brainstem samples from elk (*Cervus canadensis*).

The producer of the rapid test must have a quality assurance system in place agreed to by the European Union Reference Laboratory (EURL), which ensures that the test performance does not change. The producer must provide the test protocol to the EURL. Sampling tools and modifications to the rapid test or to the test protocol (including sampling) may only be made following advance notification to the EURL, and provided that the EURL finds that the modification does not reduce the sensitivity, specificity or reliability of the rapid test. That finding shall be communicated to the EU Commission and to the national reference laboratories (based on Regulation (EC) No. 956/2010 amending Regulation (EC) No 999/2001).

Description and Principles

This kit uses a proprietary method licensed to Microsens Biotechnologies (London, U.K.; patent pending) that allows detection of abnormal prions. A PrP^{Sc}-specific ligand is immobilized on the surface of the antigen-capture plate. Test samples are prepared by homogenizing the tissues and then diluting the sample with working plate diluent. After the sample is applied to the plate, the disease-associated conformer binds to the immobilized ligand with high affinity. The plates are washed to remove unbound materials, including the normal conformer of the PrP protein. Following incubation with conditioning buffer, the captured antigen is then detected using a PrP-specific antibody that has been conjugated to horseradish peroxidase (HRPO). The plate is washed to remove unbound conjugate and a peroxidase substrate is added. Color development is related to the relative amounts of PrP^{Sc} captured by the ligand immobilized in the microtiter plate well.

Interpretation of sample results is based on the sample absorbance. A sample whose $A_{450} - A_{REF}$ is less than the cutoff value is considered to be negative by the IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit. Samples whose $A_{450} - A_{REF}$ is greater than or equal to the cutoff are classified as positive for PrP^{Sc}. A confirmatory assay such as immunohistochemistry is required for all positive test results.

Kit Components

Store all components at 2–8°C.

Item	460 tests
A Antigen-capture plates	5 plates
N Negative control—Nonreactive with antigen-capture plate; preserved with sodium azide	5 x 1 mL
P Positive control—Noninfectious, reactive with antigen-capture plate; preserved with sodium azide	5 x 1 mL
D1 Plate diluent component 1; preserved with sodium azide	20 mL
D2 Plate diluent component 2	5 x 200 µL
R Reconstitution diluent	20 mL
CB Conditioning buffer; preserved with sodium azide	60 mL
CC Conjugate concentrate; preserved with Bronidox L and methylisothiazolone	300 µL

SRB-CC	Small-ruminant brain conjugate concentrate; preserved with Bronidox L and methylisothiazolone	300 μ L
CD	Conjugate diluent buffer with detergents and protein stabilizers; preserved with gentamicin and Proclin	60 mL
W1	10X wash solution 1; preserved with sodium azide	450 mL
W2	10X wash solution 2; preserved with gentamicin	450 mL
T	TMB substrate	60 mL

Notes: See table at the end of the insert for a description of symbols used on the insert and labels of this kit.

See the end of this insert for reagent hazard and precaution warnings.

Materials and Equipment Required (Not Provided in Kit)

- Precision pipettes and multichannel pipettes suitable for delivering between 25 and 200 μ L. Reagent volumes listed in the Test Procedure require pipette precision less than or equal to 5%.
- Graduated cylinders for wash solutions
- Hard plastic or adhesive plate covers and reagent-dispensing trays
- Disposable sample collection dissection instruments or sample collection device
- 96-well plate reader (equipped with 450-nm and 620–650-nm filters) and washer
- FastPrep* (FP120A, FP220A), FastPrep*-24, Precess 48*, Precess 24* or Precellys 24* instrument.
- Accessory pack—dilution plates, tissue-disruption tubes with beads, extended-length homogenate transfer pipette tips and adhesive plate covers (available from IDEXX)
- Personal protective equipment—safety glasses, lab coats, disposable gloves, shoe covers, hairnets and face masks
- 0.5–1.0 N HCl or 1.0 N H₂SO₄ stop solution
- Sodium hypochlorite (bleach), 1N NaOH and 1N HCl, deionized water
- Optional—robotic sample processor with pipetting precision of \leq 2.5% as measured by CV analysis (Tecan, for example)
- Optional—microtiter plate shaker (e.g., IKA MTS 2/4)
- Optional—plate incubator that can maintain temperature of 32–37°C and has minimal air flow
- Optional—dry heat block unit for 1.5–2 mL microfuge tubes (capable of maintaining 70°C temperature)
- Optional—1.5–2 mL unskirted conical screw-cap microfuge tubes



Tissue Sampling and Preparation

A. Bovine and Small Ruminant Brain Tissue

1. Sampling and laboratory testing must follow the regulation (EC) No 999/2001, Annex X, Chapter C, which refers in terms of collection of samples to the latest edition of the *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines* of the International Office of Epizootic Diseases (OIE) stating: “The preferred sample for immunoassay should be at, or as close to the obex as possible, but no further than 1.5 cm anterior to the obex.” Collect 0.30 g (\pm 0.05 g) of nervous tissue from the left or right side of the brain stem from the level of the obex (whenever possible) with dissection instruments, and weigh the sample to ensure the correct amount. Alternatively, the IDEXX sample collection device can be used for bovine obex collection as described in the Appendix. Personnel collecting the obex must be trained in the sampling method.

The diagram to the right indicates the correct sampling area.

NOTE: After sample collection, a complete hemisection of the brain stem with an intact obex region and cerebellum (if present) must remain available for confirmatory testing.

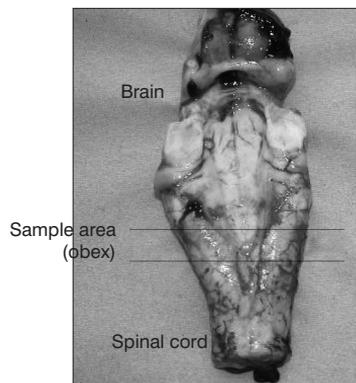


Figure 1. Bovine brain stem.

© British Crown Copyright (February 2005) reproduced with kind permission of the Veterinary Laboratories Agency.

2. Place the tissue in a tissue-disruption tube and cap tightly. Tubes are provided with ceramic beads and buffer.
3. Four tissue-disruption instruments have been validated for use with the IDEXX BSE-Scrapie EIA. Place the tubes into the instrument and disrupt as indicated for the applicable instrument. If grinding is insufficient, repeat one cycle.
 - FastPrep* instrument program: Grind the samples for 40 seconds at the maximum speed (6.5 m/s). If a second cycle is required, the instrument must be allowed to cool 5–10 minutes between cycles.
 - Precess 48*, Precess 24* and Precellys 24* instrument program: Grind the samples 2 times for 20 to 25 seconds at 6500rpm, with a 5 second delay between cycles.
4. Homogenates (fresh or thawed) can be held at 18–26°C for up to 4 hours prior to the start of the assay.

The number of samples to be prepared in a single session is flexible. Homogenates can be stored for up to 24 hours at 2–8°C or held at ≤20°C for up to 6 months. Frozen homogenates must be thawed and thoroughly mixed by inversion before use. Tissue samples can be stored at -80°C.

B. Small Ruminant Lymph Node or Spleen Tissue

1. Collect 0.30 g (± 0.05 g) of tissue from lymph node or spleen tissue. For lymph nodes, tissue should be sampled to maximize the presence of germinal center cells. Mince the tissue into 8–10 small pieces.
2. Proceed with processing and sample storage as described for brain tissue.

NOTE: Lymph node or Spleen Tissue cannot be used in the context of official sampling and testing in the framework of Regulation (EC) No 999/2001.

C. Cervid Brain and Lymph Node Tissue

1. Prepare the tissue disruption tubes by removing 0.2 ml of solution from each tube.
2. Collect 0.30 g (± 0.05 g) of tissue from retropharyngeal lymph node or brain (obex preferred). Brain and lymph node tissues should be tested individually. For lymph nodes, tissue should be sampled to maximize the presence of germinal center cells. Mince lymph node tissue into 8–10 small pieces.

Please note that in Germany individual testing of both brain and lymph node tissue must be undertaken. This decision follows the EURL guidelines (TSE EU Reference Laboratory Guidelines for the detection of Chronic Wasting disease in cervids, <https://science.vla.gov.uk/tse-lab-net/documents/cwd-guidelines.pdf> and Scientific opinion on chronic wasting disease (II), EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), EFSA Journal 2018;16(1):5132. 59 pp.).

3. Place the tissue in a tissue-disruption tube and cap tightly.
4. Place the tubes into the tissue disruption instrument and disrupt as indicated for the applicable instrument. If grinding is insufficient, repeat one cycle.

FastPrep* instrument program: Grind the samples for 30 seconds at the maximum speed (6.5 m/s). Rest the instrument for five minutes. Repeat grinding for another 30 seconds at maximum speed. If grinding is insufficient by visual inspection, repeat one cycle.

Precess 48*, Precess 24* and Precellys 24* instrument program: Grind the samples for 30 seconds at 6500rpm. Rest the instrument for five minutes. Repeat grinding for another 30 seconds at 6500rpm. If grinding is insufficient by visual inspection, repeat one cycle.

Preparation of Reagents

Wash Solutions (Wash Solution 1, Wash Solution 2)

The wash solution concentrates should be brought to 18–26°C and mixed to ensure dissolution of any precipitated salts. Each wash concentrate must be diluted 1:10 with distilled or deionized water before use (e.g., 40 mL of concentrate plus 360 mL of water per plate to be assayed).

Plate Diluent Component 2

Plate diluent component 2 (D2) is supplied as a lyophilized compound. The solution is prepared by adding 200 μL of reconstitution diluent (R), letting it stand for approximately 1 minute and then mixing gently. Use within 1 hour of preparation.

Working Plate Diluent

Plate diluent component 1 (D1) should be brought to 18–26°C. Prepare the working plate diluent by adding 1 part plate diluent component 2 (D2; prepared as above) to 25 parts plate diluent component 1 (D1) and mix thoroughly (e.g., 120 μL D2 to 3.0 mL D1 per plate). Approximately 2.75 mL of working plate diluent is required per plate when testing brain samples. Lymph node or spleen testing requires approximately 5 mL of working plate diluent per plate. Working plate diluent should be prepared and used the same day.

Negative and Positive Controls

Negative and positive controls are supplied lyophilized. Reconstitute each control by adding 1 mL of reconstitution diluent. Allow the solution to stand for approximately 1 minute and then mix vigorously. Use within 2 hours of preparation. **DO NOT DILUTE NEGATIVE OR POSITIVE CONTROLS INTO WORKING PLATE DILUENT.**

HRPO-Conjugated Anti-PrP Antibody Solutions

The HRPO-conjugated anti-PrP antibody solutions are prepared by diluting the appropriate conjugate concentrate (see note below) into the conjugate diluent (CD) as indicated on the label (for example, a 1:100 dilution would require 120 μL of conjugate concentrate to 12 mL of conjugate diluent). Refer to the conjugate concentrate label for the correct dilution factor. Diluted conjugate should be prepared and used within 4 hours.

IMPORTANT NOTE: There are two conjugate concentrates available for use with this test. Select the appropriate one for the tissue to be tested:

- **Conjugate concentrate (CC)**—Use this conjugate when testing bovine and cervid brain samples, small-ruminant and cervid lymph node samples and small ruminant spleen samples.
- **Small-ruminant brain conjugate concentrate (SRB-CC)**—Use this conjugate when testing Small ruminant brain tissue.
- Negative and positive control wells must be included for each type of conjugate tested.

Acid Stop Solution

Assay stop solution is not provided in the test kit. Stop solution (0.5–1.0 N HCl or 1.0 N H₂SO₄) can be purchased at working concentration or prepared from concentrate.

All three protocols described below require that reagents be at 18–26°C before use. Before starting the test, prepare the solutions to be used in the assay. Mix all reagents by gently swirling. Controls (negative and positive) should be mixed vigorously and tested in duplicate. A plate cover should be used to cover the plate for the duration of the assay.

Storage of Prepared Reagents

Item	Reconstitution Volume	Shelf Life
N/P Negative/Positive control	1 mL	2 hours at 18–26°C (6 months at -20°C)
D2 Plate diluent 2	200 µL	1 hour at 18–26°C (6 months at -20°C)
Working plate diluent	NA	8 hours at 18–26°C
HRPO:anti-PrP solutions	NA	4 hours at 18–26°C
Wash solution 1–1X	NA	1 week at 18–26°C
Wash solution 2–1X	NA	1 week at 18–26°C

Store any unused portion of plates in a dark, desiccated, sealed container.

Test Procedure

Sample homogenates are prepared as described in the Tissue Sampling and Preparation section. **A robotic sample processor can be used in place of the manual method from Step 1 or once the controls and diluted samples have been added to the antigen-capture plate (Step 3).**

Important: Cover each assay plate with a solid plastic or adhesive plate cover during all reagent incubations. If reagent incubations are conducted in a biosafety cabinet, plates must be covered with adhesive sheets.

Assay Protocols

The IDEXX BSE-Scrapie EIA has two approved protocols for brain tissue: Short and Ultra-Short. The protocols have equivalent performance but have varying equipment requirements for decreased assay time. The protocols are detailed in the table on the next page.

NOTE: The protocol for small-ruminant spleen and lymph node testing is different from the Short and Ultra-Short protocols and is described in the Assay Protocol table below.

Dilution of Sample in Working Plate Diluent

Set up a template indicating where the sample positions are located on the antigen-capture plate and the dilution plate. Reserve duplicate wells for the kit controls. Working plate diluent can be added to the dilution plate before or after the sample. The ratio is 30 µL of working plate diluent per 120 µL of sample homogenate (small-ruminant spleen and lymph node ratio is 50 µL diluent per 100 µL sample homogenate).

Resuspend the homogenates by inversion and then carefully pipette the sample by extending a homogenate transfer pipette tip through the beads and drawing sample from the tissue-disruption tube. Carefully dispense each sample into the dilution plate, taking care to avoid creating bubbles in the homogenate or leaving any residual homogenate on the edges of the dilution plate well.

After the homogenate is diluted, thoroughly mix samples, taking care to avoid bubbles. Mixing can be done with a pipette or on a plate shaker. If a shaker is used, it will be necessary to optimize the speed and time to ensure complete mixing without splashing of the samples. Proceed with the assay within 2 hours.

Use of Plate Shaker for Sample Incubation (Short and Ultra-Short Protocols)

The Short and Ultra-short protocols involve a slow rotation (200 ± 100 rpm) on a platform plate shaker for the sample incubation step only. The plate shaker should create a gentle horizontal, circular motion. Although the sample within each microtiter plate well will move slightly, it may not be visually apparent. The motion should not be vigorous enough to move sample up the side of the wells. Incubation times are decreased accordingly for sample and conjugate incubations as detailed in the following table. The Small Ruminant Spleen /Lymph node protocol requires that all incubations are stationary.

Assay Protocols

Test Procedure		Short Protocol	Ultra-Short Protocol	Small Ruminant Spleen/ Lymph Node Protocol
Sample Type		Bovine, small ruminant and cervid brains, cervid lymph nodes	Bovine and small ruminant brains	Small ruminant lymph nodes and spleen
Step	Activity	18–26°C All steps	32–37°C ¹ : Incubations only (steps 3,5,8,10) 18–26°C: All other steps including wash steps	18–26°C All steps
1	Sample Addition to Dilution Plate	120 µL sample with 30 µL working plate diluent		100 µL sample with 50 µL working plate diluent
		MIX WELL- see “Dilution of Sample in Working Plate Diluent” section.		
2	Sample Addition to Antigen Capture Plate	Pipette 100 µL of diluted sample onto the assay plate; mix controls, add 100 µL in duplicate; cover the plate with a plate cover.		
3	Capture Plate Incubation	45–60 min.; slow shake 200 ±100 rpm	20–25 min.; slow shake 200 ±100 rpm	2–3 hours stationary
4	Wash with 1X Wash 1	Wash the wells 6 times with ~350 µL 1X Wash 1.		
5	Conditioner: Addition/ Incubation	Add 100 µL conditioning buffer to each well; cover the plate; incubate 10 ±1 min.		
6	Wash with 1X Wash 2	Wash the wells 3 times with ~350 µL 1X Wash 2.		
7	Conjugate Addition	Add 100 µL diluted conjugate (bovine brain and cervid samples use CC; small ruminant brain use SRB-CC) and cover the plate with a plate cover.		Add 100 µL diluted CC conjugate and cover the plate with a plate cover.
8	Conjugate Incubation	45–50 min.	25–30 min.	60–75 min.
9	Wash with 1X Wash 2	Wash the wells 5 times with ~350 µL 1X Wash 2.		
10	Substrate Addition/ Incubation	Add 100 µL substrate to each well; cover the plate; incubate 15 ±1 min. away from direct sunlight (do not use adhesive cover).		
11	Stop Addition/Read Plate	Add 100 µL acid stop solution; the plate can be held up to 30 min. in the dark prior to reading the optical density (450 nm) using a reference wavelength of (A _{REF}) 620 nm to 650 nm.		

1. Incubation at 32–37°C means placing the assay plate into an incubator that is pre-heated to 32–37°C.

Overview of Test Formats

	Bovine Brain	Small-Ruminant Brain	Small-Ruminant Lymph node and Spleen	Cervid Brain & RPLN
Sample Prep:				
Syringe Tissue Sampling	Yes	No	No	No
Tissue Mincing (prehomogenization)	No	No	Yes	Yes (RPLN) No (Brain)
Assay Conditions:				
Conjugate Concentrate	CC	SRB-CC	CC	CC
Working Plate Diluent (working plate diluent/sample ratio)	30 μ L/120 μ L	30 μ L/120 μ L	50 μ L/100 μ L	30 μ L/120 μ L
Approved Protocols	Short & Ultra Short	Short & Ultra-Short	Small Ruminant Spleen & Lymph Node	Short
Test Cutoff	NC \bar{x} + 0.120	NC \bar{x} + 0.180	NC \bar{x} + 0.180	NC \bar{x} + 0.150
Optional Heat Treatment Protocol applies	Yes	No	No	No

Interpretation of Results

For the assay to be valid, the negative control mean (NC \bar{x}) must run with an $A_{450}-A_{REF}$ value less than 0.150, and the positive control mean (PC \bar{x}) must have an $A_{450}-A_{REF} \geq 0.400$.

Calculations

Calculation of negative control mean (NC \bar{x}):

$$NC\bar{x} = \frac{A1 (A_{450} - A_{REF}) + B1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Calculation of positive control mean (PC \bar{x}):

$$PC\bar{x} = \frac{C1 (A_{450} - A_{REF}) + D1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Calculation of the cutoff value:

Bovine cutoff = NC \bar{x} + 0.120

Small-ruminant cutoff = NC \bar{x} + 0.180

Cervid cutoff = NC \bar{x} + 0.150

NOTE: See Step 11 of the Test Procedure Chart for the definition of A_{REF} .

Results

Interpretation of sample results is based on absorbance for the sample. Samples with $A_{450}-A_{REF}$ values less than the cutoff value are considered negative by the IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit. Samples with $A_{450}-A_{REF}$ values greater than or equal to the cutoff are classified as initially reactive for PrP^{Sc}, and the homogenate should be retested in duplicate on the IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit.

Bovine brain retesting may be done from the original tissue homogenate or from homogenate prepared using the optional bovine heat treatment protocol, described below. If either retest value is equal to or greater than the test cutoff, the sample is considered positive. The sample is considered negative when both retest replicates are less than the test cutoff. Within the EU all initially reactive bovine samples which are negative following the retest heat treatment protocol should be reported as negative.

Small-ruminant and cervid samples should be retested in duplicate directly from the original tissue homogenate - Do NOT heat treat small-ruminant or cervid homogenates. If either retest value is equal to or greater than the test cutoff, the sample is considered positive. The sample is considered negative when both retest replicates are less than the test cutoff.

In EU member states any rapid test positive samples must be sent to your countries National Reference Laboratory for TSEs or the European Union Reference Laboratory for confirmatory testing.

Optional Heat Treatment Protocol for Initially Reactive Bovine Homogenates: (The heat treatment protocol only applies to bovine samples.)

Remove $230 \pm 20 \mu\text{L}$ of the initially reactive tissue homogenate and dispense into a 1.5–2 mL conical bottom screw-cap vial. Place the vial in a dry heating block that has been preheated to $70 \pm 2^\circ\text{C}$. Heat the tube for 10 ± 1 min. and then place the tube in an open rack at $18\text{--}26^\circ\text{C}$ for a minimum of 20 minutes to allow the sample to cool. The homogenate should be retested within two hours of heat treatment, in duplicate, on the IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit.

Precautions

- Do not expose the tetramethylbenzidine (TMB) substrate to strong light or oxidizing agents. Use clean or disposable plasticware for dispensing TMB.
- Care should be taken to avoid contamination of kit components. Do not use components past their expiration dates, and do not intermix components from different kit lots.
- Some kit components contain sodium azide as a preservative (see the description of the kit components). Care should be taken to prevent contaminating the anti-PrP-HRPO conjugate with azide-containing solutions.
- Store all reagents at $2\text{--}8^\circ\text{C}$. Bring reagents to $18\text{--}26^\circ\text{C}$ prior to use, and return to proper storage temperatures after use (see Storage of Prepared Reagents).
- Use separate dispensing trays for each reagent used in the assay. Avoid cross-contamination of the TMB substrate with the diluted conjugate solution. Do not pour unused TMB solution back into the bottle.
- Do not allow microtiter plates to sit more than 5 minutes between wash steps and the addition of reagents.

Safety Information

- All personnel must receive appropriate training concerning risks related to BSE and scrapie, and recommended decontamination procedures. Biosafety procedures should be strictly followed as recommended by national safety regulations.
- The conditioning buffer contains chaotropic agents; avoid contact with skin and mucous membranes.
- The TMB substrate may irritate skin and eyes; avoid direct contact.
- Plate diluent 1 contains high concentrations of detergents; avoid direct contact.
- Avoid the use of glass containers in the lab.

Appendix

Bovine Obex Sampling with the IDEXX Sample Collection Device

IDEXX has a sample collection device available as an alternative bovine obex extraction method. This device is a sampling syringe. The IDEXX sample collection device has been approved by the EURL. The guidance in this sampling section does not prohibit further information or instructions that are in line with regulation (EC) 999/2001 and amending regulations. When it is not possible to identify the correct anatomical area for sampling, use dissection instruments as described in the **Tissue Sampling and Preparation** section.

1. The brain stem should be collected at the abattoir via the occipital foramen using an appropriate tool or sample collection spoon. Identify the obex region of the brain as indicated by the presence of a V-shaped indentation on the upper surface of the brain stem (see the diagram in the Tissue Sampling and Preparation section). When it is not possible to identify the correct anatomical area for sampling, use dissection instruments as described in the Tissue Sampling and Preparation section.

2. Position the brain stem with the V-shaped section of the tissue facing upright. Place the tip of the sample collection syringe into the cut end of the caudal brain stem on the side that is to be sampled approximately 3 mm (enough so that it is securely lodged). It may be necessary to trim excess spinal cord tissue if the length from the base of the spinal cord to the apex of the V-shaped section is longer than 3–4 cm.

3. Hold the plunger of the syringe firmly. With your index finger, push the outer cylinder of the syringe into the brain stem, taking care not to allow the plunger portion to move in any direction. Refer to Figure 2 for proper alignment of the syringe to target the key tissue-sampling sites of the obex. As the syringe cylinder is pushed into the sample, it must stay within the selected side of the brain stem to prevent damage to the opposite side. A complete hemisection of brain stem with intact obex must be available for confirmatory testing.

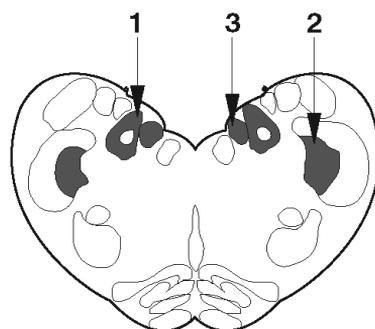


Figure 2. Cross section of the bovine brain stem at the level of the obex identifying the key target sites for tissue sampling: 1) solitary tract, 2) nucleus of the trigeminal nerve, 3) dorsal motor nucleus of the vagus nerve (diagram from *OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines*, chapter 2.4.6.)

4. The cylinder of the syringe will move through the brain stem and into the obex region. Ensure that the syringe has moved into the upper portion of the sampling area (see Figure 1). The cylinder should now contain the obex sample.

NOTE: The sample that you want (i.e., the obex area) is at the tip of the barrel.

5. Twist the cylinder to isolate the sample and carefully remove the syringe from the tissue.

6. If a significant portion of tissue is hanging from the end of the syringe, draw it into the cylinder by withdrawing the plunger slightly. The syringe can now be manipulated to remove air at the tip and close any gaps between sample portions.

Note: The inside of the syringe has several regularly spaced “detents” or grooves that can be located by feel as the plunger is moved through the syringe. The space between the detents provides an accurate measurement of sample volume.

7. When you have acquired the tissue in the syringe, push the plunger to align it with the nearest detent. The sample should be without gaps between the plunger and the tip of the syringe. Some excess sample material may extend beyond the tip of the syringe.

8. Wipe any minor residual tissue on the flat surface of the weigh boat. Do not press the plunger during this process because the sample will be ejected or compressed; both are undesirable.

9. Hold the tissue-disruption tube vertically in one hand and the syringe in the other, with the tip of the syringe just inside the mouth of the tissue-disruption tube. Dispense a measured amount of obex tissue into the disruption tube by moving the plunger through one detent and stopping on the second detent. The volume between detents is 150 μ L; a total of 300 μ L is dispensed into the tube (equivalent to 0.30 g \pm 0.05 g of tissue).

10. Cap the tube and proceed with sample homogenization.

Personnel collecting obex samples with the IDEXX sample collection device should be well-trained on the use of the device to ensure collection of the correct area of the brain stem. Each technician should monitor sampling accuracy by conducting periodic checks of sample weight. A program of corrective action should be instituted when results fall outside of defined acceptance criteria. The IDEXX sample collection device is single-use and should be discarded after each sample to prevent cross-contamination.

Limitation of Liability

To the maximum extent permitted by law, under no circumstances will IDEXX or our licensors be liable to you or any other person for loss of profit or use, special, incidental, consequential, indirect, exemplary, punitive or multiple damages, including without limitation for loss of goodwill, data or equipment or for business interruption, arising out of the manufacture, sale, supply or use of our products or services or failure or delay in delivering such products or services.

For technical assistance:
IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 or +1 207 556 4890
IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

*HerdChek is a trademark or a registered trademark of IDEXX Laboratories, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries. All other company and product names and logos are property of their respective holders.

Patent information: idexx.com/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

Kit Encéphalopathie Spongiforme Bovine–Tremblante (Scrapie) Antigène, EIA

A usage vétérinaire uniquement.

Version française

Généralités

Le kit IDEXX HerdChek* Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-Scrapie Antigen Test est un test immunoenzymatique (EIA) de capture d'antigène permettant la détection de l'isoforme pathologique de la protéine prion (PrP^{Sc}) dans des échantillons de tissus cérébraux (obex de préférence) prélevés post-mortem chez des bovins, des petits ruminants (ovins et caprins) et des cervidés affectés par l'ESB, la tremblante ou l'encéphalopathie des cervidés. Pour les applications chez les petits ruminants, le test permet également la détection de la PrP^{Sc} dans les tissus de ganglions lymphatiques ou de la rate ; pour les cervidés, le test permet aussi la détection de la PrP^{Sc} dans les ganglions lymphatiques rétropharyngiens (retropharyngeal lymph nodes, RPLN). Ce test permet la détection rapide de la PrP^{Sc} associée à la maladie avec un minimum de manipulation des échantillons. Il est également automatisable, assurant la gestion d'un flux élevé d'analyses. Ce kit est destiné à un usage vétérinaire uniquement.

Pour les Etats membres de l'Union Européenne: il s'agit d'un test rapide approuvé par l'UE pour la détection in vitro de la protéine PrP^{Sc} associée à l'ESB et à la tremblante du mouton chez les bovins et les petits ruminants. Ce test peut être également utilisé dans l'UE pour le dépistage rapide de l'encéphalopathie spongiforme transmissible (EST) chez les cervidés. La validation de ce kit a été réalisée à l'aide d'échantillons d'amygdale, de ganglion rétropharyngé et de tronc cérébral prélevés chez l'élan (*Cervus canadensis*).

Le fabricant de tests rapides de dépistage doit avoir un système d'assurance de qualité en place homologué par le Laboratoire de référence de l'Union européenne (EU-RL), qui veille à ce que le rendement du test ne change pas. Le fabricant doit fournir le protocole du test au EU-RL. Aucune modification ne peut être apportée aux outils d'échantillonnage ou au test rapide ou au protocole du test (y compris l'échantillonnage) avant d'en avoir avisé le EU-RL, et avant que ce dernier convienne que la modification ne diminue pas la sensibilité, la spécificité ou la fiabilité du test rapide. Ces conclusions doivent être communiquées à la Commission Européenne et aux laboratoires de référence nationaux conformément au Règlement européen (CE) N°956/2010, amendement au Règlement (CE) N° 999/2001.

Description et principes

Ce kit utilise une méthode exclusive, disponible sous licence accordée par Microsens Biotechnologies (Londres, R.U.; brevet en instance) qui permet la détection de prions anormaux. Un ligand spécifique de la PrP^{Sc} est immobilisé à la surface de la plaque de capture de l'antigène. Après préparation des échantillons par homogénéisation, les homogénats sont respectivement pré-dilués dans le Diluant de la plaque de dilution avant transfert dans la plaque de capture sensibilisée. Pendant la phase d'incubation des échantillons, si la PrP^{Sc} est présente dans l'échantillon à tester, celle-ci va se lier avec une forte affinité avec le ligand sensibilisé sur la phase solide. Les plaques sont ensuite lavées pour éliminer les fractions non liées, dont la protéine prion normale (PrP). Après incubation avec le Tampon de Conditionnement, l'Antigène capturé est alors détecté à l'aide d'un Anticorps spécifique de la PrP conjugué à la Peroxydase de Raifort (HRPO). Après incubation et lavage afin d'éliminer le Conjugué non lié, le Substrat est distribué. Le développement de coloration qui en résulte est proportionnel à la quantité de PrP^{Sc} capturée par le ligand sensibilisé sur la phase solide.

L'interprétation des résultats est fonction de la valeur de Densité Optique de chaque échantillon. Un échantillon dont la valeur de $A_{450} - A_{REF}$ est inférieure à la Valeur Seuil est considéré Négatif par le kit IDEXX HerdChek BSE-Scrapie. Un échantillon dont la valeur de $DO A_{450} - A_{REF}$ est supérieure ou égale à la Valeur Seuil est considéré PrP^{Sc} Positif. Un test de confirmation, tel que l'Immuno-histochimie, est exigé pour tous les échantillons initialement réactifs.

Composants du kit

Conserver tous les composants entre 2–8°C.

Réactifs	460 tests
A Plaques de capture Antigène	5 plaques
N Contrôle Négatif—non réactif avec la plaque de capture Ag. Conservateur: azoture de sodium	5 x 1 ml
P Contrôle Positif—non infectieux, réactif avec plaque de capture Ag. Conservateur: azoture de sodium	5 x 1 ml
D1 Composant 1 du Diluant de la plaque de dilution. Conservateur: azoture de sodium	20 ml
D2 Composant 2 du Diluant de la plaque de dilution	5 x 200 µl
R Diluant de Reconstitution	20 ml
CB Tampon de Conditionnement. Conservateur: azoture de sodium	60 ml
CC Conjugué concentré. Conservateurs: Bronidox L et méthylisothiazolone	300 µl
SRB-CC Conjugué concentré tissu cérébral Petits Ruminants. Conservateurs: Bronidox L et méthylisothiazolone	300 µl
CD Diluant du Conjugué avec détergents et agents protéiniques stabilisants. Conservateur: gentamicine et Proclin	60 ml
W1 Solution 1 de Lavage (x10). Conservateur: azoture de sodium	450 ml
W2 Solution 2 de Lavage (x10). Conservateur: gentamicine	450 ml
T Substrat TMB	60 ml

REMARQUE: voir le tableau à la fin du mode d'emploi pour la description des symboles utilisés dans ce mode d'emploi et sur les étiquettes de la trousse.

Voir à la fin du mode d'emploi pour les risques et mesures de prévention liés aux réactifs.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de précision capables de délivrer des volumes compris entre 25 et 200 µl ou pipettes multicanaux. Une précision inférieure ou égale à 5% est requise pour les volumes de réactifs mentionnés dans la section « Mode opératoire. »
- Eprouvettes graduées pour la préparation des solutions de lavage
- Couvercles en plastique ou adhésifs pour plaques et réservoirs à réactifs
- Matériel de dissection ou seringue à usage unique pour la prise d'essai des échantillons
- Spectrophotomètre 96 puits permettant une lecture en bichromatisme 450 nm–620 nm ou 450 nm–650 nm, laveur de plaques
- Appareil FastPrep* (FP120A, FP220A), FastPrep*-24, Precess 48*, Precess 24* ou Precellys 24*
- Kit accessoires: plaques de dilution, tubes de ribolyse avec billes, pointes de pipettes extra-longues pour le transfert des homogénats dans la Plaque de dilution et adhésifs pour microplaques (disponible auprès d'IDEXX)
- Équipement de protection: lunettes de sécurité, blouses de laboratoire, gants jetables, couvre-chaussures, écran facial
- Solution d'Arrêt HCl 0,5–1,0 N ou H₂SO₄ 1,0 N
- Hypochlorite de sodium (Eau de Javel), NaOH 1N et HCl 1N, eau déminéralisée
- Option—automate ELISA avec une précision de pipetage ≤ 2,5% comme mesurée par l'analyse C.V. (par exemple: Tecan)
- Option—agitateur de microplaques (par exemple: IKA MTS 2/4)
- Option—incubateur pour microplaques permettant une incubation à 32–37°C sous un flux d'air minimal
- Option—bains à sec chauffant pour microtubes de 1,5 à 2 ml (capable de d'atteindre et de maintenir une température de 70°C)
- Option—microtubes à bouchon vissant à fond, conique et sans jupe de 1,5 à 2,0 ml.



Prise d'Essai et Préparation des Echantillons

A. Tissu cérébral de bovins et de petits ruminants

1. L'échantillonnage et les tests de laboratoire utilisés doivent être conformes au Règlement (CE) N°999/2001, Annexe X, Chapitre C, qui fait référence à la dernière version du manuel OIE, lequel stipule en matière de prise d'essai de l'échantillon: "la prise d'essai doit être effectuée dans l'obex ou le plus près possible, et jamais à plus de 1,5 cm de l'obex". Prélever 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de tissu nerveux à partir du canal droit ou gauche du tronc cérébral (région de l'obex autant que possible) à l'aide d'instruments de dissection puis peser à l'aide d'une balance de précision afin de garantir la quantité requise. Alternativement, la seringue de collecte IDEXX peut être utilisée pour le prélèvement d'obex de Bovins comme décrit en Annexe. Cette étape est réalisée sous la responsabilité d'un personnel expérimenté.

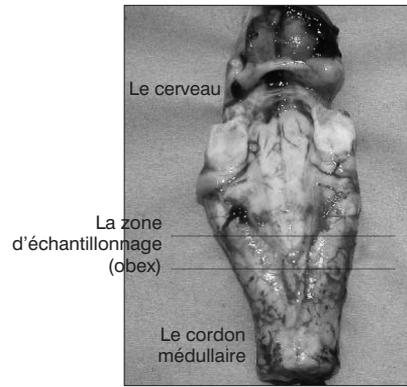


Figure 1. Tronc cérébral bovin.
© British Crown Copyright (février 2005) reproduit avec l'amiable autorisation de la Veterinary Laboratories Agency.

Le schéma de droite illustre la zone correcte d'échantillonnage.

NOTE: Après avoir prélevé l'échantillon, une complète hémisection du tronc cérébral avec une région intacte de l'obex et cerebellum (si présent) doit rester disponible pour un test de confirmation.

2. Placer le tissu cérébral dans un tube de ribolyse et fermer hermétiquement. Le tube de ribolyse contient des billes de céramique et un tampon d'homogénéisation.
3. Quatre modèles de ribolyseurs ont respectivement été validés pour une utilisation conjointe avec le kit IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Ag EIA. Placer les tubes de ribolyse dans le ribolyseur et broyer suivant les instructions spécifiques à l'instrument utilisé. Si le broyage est insuffisant, répéter pour un cycle.
 - Programme pour appareil FastPrep*: broyage de 40 secondes à vitesse maximale (6,5 m/s). Respecter une pause de 5 à 10 minutes entre deux cycles de broyage consécutifs pour permettre le refroidissement de l'instrument.
 - Programme pour appareil Precess 48*, Precess 24* et Precellys 24*: broyer les échantillons 2 fois pendant 20 à 25 secondes à 6500 rpm, avec un délai de 5 secondes entre chaque cycle.
4. Avant la mise en œuvre du test EIA, la stabilité des homogénats (fraîchement préparés ou décongelés) est de 4 heures maximum à 18–26°C.

Le nombre d'échantillons à préparer peut varier d'un lot à l'autre. La durée de conservation des homogénats est respectivement de 24 heures maximum au réfrigérateur 2–8°C et de 6 mois maximum au congélateur à $\leq -20^\circ\text{C}$. Les homogénats congelés doivent être préalablement décongelés et bien homogénéisés par inversion des tubes avant utilisation. Les échantillons de tissu cérébral peuvent être conservés au congélateur à -80°C .

B. Tissu de ganglions lymphatiques ou de rate de petits ruminants

1. Prélever 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de tissu à partir du ganglion ou de la rate. Pour les ganglions lymphatiques, le prélèvement doit être réalisé de façon à privilégier la présence de cellules-souches. Fractionner le prélèvement en 8 à 10 petits tronçons.
2. Poursuivre le test et conserver les échantillons selon les instructions édictées pour le tissu cérébral.

NOTE: les échantillons de ganglions lymphatiques et de rate ne peuvent pas être prélevés et analysés dans le contexte des tests officiels effectués dans le cadre du Règlement européen (CE) N° 999/2001.

C. Tissu cérébral et de ganglions lymphatiques de cervidés

1. Préparer les tubes de ribolyse en retirant 0,2 ml de solution dans chaque tube.
2. Prélever 0,30 g (\pm 0,05 g) de tissu à partir du ganglion lymphatique rétropharyngé ou de tissu cérébral (obex de préférence). Les échantillons de tissu cérébral et ganglions lymphatiques doivent être analysés individuellement. Pour les ganglions lymphatiques, le prélèvement doit être réalisé de façon à privilégier la présence de cellules souches. Fractionner le prélèvement en 8 à 10 petits tronçons.

Note: En Allemagne, les échantillons de tissu cérébral et de ganglions lymphatiques doivent être analysés en parallèle. Cette mesure est en conformité avec les recommandations du laboratoire européen de référence (EU-RL). (TSE EU Reference Laboratory Guidelines for the detection of Chronic Wasting disease in cervids, <https://science.vla.gov.uk/tse-lab-net/documents/cwd-guidelines.pdf> et Scientific opinion on chronic wasting disease (II), EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), EFSA Journal 2018;16(1):5132. 59 pp.).

3. Placer le tissu cérébral dans un tube de ribolyse et fermer hermétiquement.
4. Placer les tubes dans le ribolyseur et broyer en suivant les instructions spécifiques à l'instrument utilisé. Si le broyage est insuffisant, recommencer un cycle.

Programme pour appareil FastPrep* : broyer les échantillons pendant 30 secondes à la vitesse maximale (6,5 m/s). Respecter une pause de cinq minutes. Répéter le broyage pendant de nouveau 30 secondes à la vitesse maximale. Si le broyage est insuffisant au contrôle visuel, recommencer un cycle.

Programme pour appareil Precess 48*, Precess 24* et Precellys 24* : broyer les échantillons pendant 30 secondes à 6 500 rpm. Respecter une pause de cinq minutes. Répéter le broyage pendant de nouveau 30 secondes à 6 500 rpm. Si le broyage est insuffisant au contrôle visuel, recommencer un cycle.

Préparation des Réactifs

Solutions de Lavage (Solution 1 de Lavage, Solution 2 de Lavage)

Porter les flacons de Solutions 1 et 2 de Lavage (x10) à 18–26°C et bien les homogénéiser pour assurer la dissolution éventuelle de tout sel précipité. Diluer respectivement chaque concentré au 1/10 dans de l'eau distillée ou déminéralisée (ex: 40 ml de Solution de Lavage concentrée + 360 ml d'eau distillée par plaque).

Composant 2 du Diluant de la plaque de dilution (D2)

Le composant 2 du Diluant de la plaque de dilution (D2) est lyophilisé. Le reconstituer par adjonction de 200 μ l de Diluant de Reconstitution (R), laisser reposer pendant une minute environ, puis homogénéiser par agitation douce. A utiliser dans l'heure qui suit sa préparation.

Diluant de la plaque de dilution

Porter le composant 1 du Diluant de la plaque de dilution (D1) à 18–26°C. Préparer le Diluant de la plaque de dilution en ajoutant le Composant 2 du diluant de la plaque de dilution (D2, préalablement reconstitué selon les indications ci-dessus) au Composant 1 du diluant de la plaque de dilution (D1) dans la proportion de 1 pour 25 (40 μ l/ml). Ex., 120 μ l de D2 pour 3,0 ml de D1 par plaque. Bien homogénéiser. Environ 2,75 ml de Diluant de la Plaque de Dilution sont nécessaires à la réalisation d'une plaque complète pour des échantillons de tissu cérébral. Pour des échantillons de ganglion lymphatique ou de rate, il faut compter environ 5 ml de Diluant de la Plaque de Dilution par plaque. Le Diluant de la plaque de dilution doit être utilisé le jour même de sa préparation.

Contrôles Négatif et Positif

Les Contrôles Négatif et Positif sont lyophilisés. Reconstituer le contenu de chaque flacon par adjonction de 1 ml de Diluant de Reconstitution. Laisser reposer environ une minute avant homogénéisation au vortex. A utiliser dans les 2 heures qui suivent sa préparation.

NE PAS DILUER LES CONTROLES NEGATIF ET POSITIF DANS LE DILUANT DE LA PLAQUE DE DILUTION.

Solutions de Conjugué Anticorps anti-PrP: HRPO

Les Solutions de Conjugué anti-PrP: HRPO sont préparées par dilution respective du Conjugué Concentré approprié (voir ci-après) dans le Diluant du Conjugué (CD) suivant le facteur de dilution apposé sur l'étiquette du flacon de Concentré (ex.: pour une dilution au 1/100, 120 μ l de Conjugué Concentré + 12 ml de Diluant du Conjugué pour une plaque). Le facteur de dilution de la Solution de Conjugué est indiqué sur l'étiquette du flacon de Conjugué Concentré. La Solution de Conjugué doit être utilisée dans les quatre heures qui suivent sa préparation.

IMPORTANT: Deux flacons de Conjugué Concentré sont fournis dans le kit. Sélectionner le flacon de concentré à utiliser en fonction du type d'échantillon à analyser:

- **Conjugué Concentré (CC):** Utiliser ce conjugué lors du test d'échantillons de tissu cérébral de bovins et de cervidés, d'échantillons de ganglion lymphatique de petits ruminants et de cervidés et d'échantillons de rate de petits ruminants.
- **Conjugué SRB (SRB-CC):** Conjugué Concentré dédié aux échantillons de tissu cérébral de Petits Ruminants.
- Des puits Contrôles Négatif et Positif doivent être inclus pour chaque type de Conjugué testé.

Solution d'Arrêt à base d'acide

La solution d'Arrêt (HCl 0,5–1,0 N ou H₂SO₄ 1,0 N) n'est pas fournie dans le kit. On peut en faire l'acquisition directe à la dilution requise ou la préparer à partir de solution concentrée.

Il est nécessaire de porter tous les réactifs du kit à 18–26°C avant utilisation, et ce pour les trois protocoles décrits ci-dessous. Reconstituer les réactifs nécessaires préalablement à la mise en œuvre d'un essai. Homogénéiser tous les réactifs par agitation douce. Les Contrôles Positif et Négatif doivent être vigoureusement homogénéisés au vortex et testés en double sur chaque plaque. Couvrir les plaques avec des couvercles pendant toute la durée du test.

Conservation des réactifs reconstitués

Désignation	Volume de Reconstitution	Conservation
N/P Contrôles Négatif/Positif	1 ml	2 heures à 18–26°C (Six mois à -20°C)
D2 Composant 2 du diluant de la plaque de dilution	200 µl	1 heure à 18–26°C (Six mois à -20°C)
Diluant de la plaque de dilution	Sans objet	8 heures à 18–26°C
Conjugué anti-PrP: HRPO	Sans objet	4 heures à 18–26°C
Solution 1 de Lavage 1x	Sans objet	1 semaine à 18–26°C
Solution 2 de Lavage 1x	Sans objet	1 semaine à 18–26°C

Entreposer les barrettes non utilisées à l'abri de la lumière et de l'humidité dans un sachet hermétique.

Mode Opératoire

Les homogénats sont préparés comme indiqué au paragraphe « Prise d'Essai et Préparation des Echantillons ». **Un automate peut se substituer à la méthode manuelle à partir de l'étape 1 ou lorsque les contrôles et les échantillons dilués ont été ajoutés à la plaque de capture de l'antigène (étape 3).**

Important: Couvrir chaque plaque à l'aide d'un couvercle plastique ou d'un film adhésif pendant toutes les périodes d'incubation des réactifs. Si les incubations sont effectuées sous PSM, les plaques doivent être couvertes de films adhésifs.

Les protocoles du test

Le Test IDEXX BSE-Scrapie EIA est respectivement validé, à partir du tissu cérébral, sur deux protocoles: Court et Ultra-Court. Ces deux protocoles offrent un niveau de performance équivalent et requièrent un équipement spécifique. Ces protocoles sont décrits dans le tableau à la page suivante.

N.B.: Les échantillons de ganglions lymphatiques et de rate de petits ruminants doivent être testés exclusivement selon le protocole "Ganglion Lymphatique et Rate de Petits Ruminants".

Dilution de l'échantillon avec le Diluant de la plaque de dilution.

Etablir un plan de plaque pour la Plaque de dilution et la Plaque de Capture et noter la position des échantillons. Réserver les puits pour les Contrôles Positif et Négatif (testés en double). A la convenance de l'opérateur, le Diluant de la plaque de dilution est distribué dans la Plaque de dilution (dans la proportion de 30 µl de Diluant de la plaque de dilution pour 120 µl d'homogénat) avant ou après distribution des homogénats. Pour les échantillons de ganglions lymphatiques ou de rate de petits ruminants, la proportion est de 50 µl de Diluant de la plaque de dilution pour 120 µl d'homogénat.

Homogénéiser les homogénats par inversion, puis, à l'aide d'une pointe à usage unique extra-longue introduite dans le tube de ribolyse, prélever minutieusement chaque échantillon au travers des billes. Distribuer soigneusement l'échantillon dans la plaque de dilution en évitant la formation de bulles ou une éventuelle contamination des bords du puits de la plaque de dilution par l'échantillon.

Avant transfert des homogénats pré-dilués dans la Plaque de Capture, soigneusement homogénéiser Diluant/homogénat à l'aide d'une pipette ou d'un agitateur de microplaques en évitant la formation de bulles. Si un agitateur de microplaques est utilisé, il est recommandé d'optimiser la vitesse et la durée de rotation afin d'assurer une homogénéisation suffisante et de prévenir tout risque de contamination inter-puits. Poursuivre le test dans les deux heures qui suivent cette étape.

Utiliser un agitateur ou agitateur/incubateur de microplaques lors de l'étape d'incubation des échantillons (protocoles Court et Ultra-Court).

Le protocole court et le protocole ultra-court, utilisés pour les échantillons de tissu cérébral de bovins et de petits ruminants, requièrent, pour l'étape d'incubation des échantillons, une agitation douce (200 +/- 100rpm) réalisée à l'aide d'un agitateur de microplaques (protocole court) ou d'un agitateur/incubateur (protocole court et ultra-court). L'agitateur de microplaques doit créer un mouvement circulaire horizontal et doux. Bien que l'échantillon, dans chaque puits de la microplaque, soit soumis à agitation douce, celle-ci peut ne pas être visuellement perceptible. Le mouvement ne devra pas être trop vigoureux afin d'éviter toute contamination inter-puits. Il en résulte une durée d'incubation raccourcie pour les étapes respectives d'incubation des échantillons et du Conjugué comme détaillé dans le tableau suivant. Le protocole "Ganglion Lymphatique et Rate de Petits Ruminants" ne requiert aucune agitation lors des étapes d'incubation.

Les protocoles du test

Mode Opérateur		Protocole Court	Protocole Ultra-court	Ganglion Lymphatique et Rate de Petits Ruminants
Type d'échantillon		Tissu cérébral de bovins, petits ruminants et de cervidés, ganglions lymphatiques de cervidés	Tissu cérébral de bovins et de petits ruminants	Ganglions lymphatiques et rate de petits ruminants
Etape	Description	18–26°C à toutes les étapes	32–37°C: à toutes les étapes d'incubation (étapes 3, 5, 8 et 10) 18–26°C: toutes les autres étapes y compris les lavages	18–26°C à toutes les étapes
1	Distribution des homogénats dans la Plaque de dilution	Tissu cérébral: 120 µl d'homogénat + 30 µl de Diluant de la plaque de dilution.		Ganglion lymphatique et Rate de petits ruminants: 100 µl d'homogénat + 50 µl de Diluant de la plaque de dilution
BIEN HOMOGENEISER - Cf paragraphe "Dilution de l'échantillon avec le Diluant de la plaque de dilution".				
2	Transfert des échantillons dans la Plaque de capture	Transférer l'échantillon dilué dans la Plaque de Capture à raison de 100 µl/puits; homogénéiser les Contrôles, distribuer en double à raison de 100 µl/puits; couvrir la plaque à l'aide d'un couvercle.		
3	Incubation des échantillons	45–60 min.: sous agitation 200 ± 100 rpm	20–25 min.: sous agitation 200 ± 100 rpm	2–3 heures – sans agitation
4	Lavage avec la Solution 1 de lavage (1x)	Laver les puits 6 fois avec la Solution de lavage 1 à raison de 350 µl/puits.		
5	Tampon de conditionnement: Distribution / Incubation	Distribuer le Tampon de conditionnement à raison de 100 µl/puits, couvrir la plaque et incubé pendant 10 ± 1 min.		
6	Lavage avec la Solution 2 de lavage (x1)	Laver les puits 3 fois avec la Solution 2 de lavage (1x) à raison de 350 µl/puits.		
7	Conjugué	Distribuer le conjugué dilué à raison de 100 µl/puits (pour les échantillons de tissu cérébral des bovins et les échantillons de cervidés, utiliser le CC ; pour les échantillons de tissu cérébral des petits ruminants, utiliser le SRB-CC.		

8	Incubation du Conjugué	45–50 min.	25–30 min.	60–75 min.
9	Lavage avec la Solution 2 de lavage (x1)	Laver les puits 5 fois avec la Solution 2 de lavage (1x) à raison de 350 µl/puits.		
10	Substrat: Distribution / Incubation	Distribuer le Substrat à raison de 100 µl/puits, couvrir la plaque et incuber 15±1 min. à l'abri de la lumière (ne pas utiliser de film adhésif).		
11	Solution d'arrêt / Lecture	Distribuer la Solution d'arrêt à raison de 100 µl/puits; la plaque peut rester jusqu'à 30 minutes dans l'obscurité avant lecture. La lecture est faite en bichromatisme à 450/620 nm ou 450/650 nm.		

1. Incubation entre 32 et 37 °C sous-entend placer la plaque de capture dans un incubateur préalablement porté à une température comprise entre 32 et 37 °C.

Tableau récapitulatif

	Tissu Cérébral de Bovins (obex)	Tissu Cérébral de Petits Ruminants	Ganglion Lymphatique et Rate de Petits Ruminants	Tissu cérébral et RPLN de cervidés
Prise d'essai et Préparation des Echantillons:				
Prise d'essai à l'aide de la seringue IDEXX	Oui	Non	Non	Non
Fractionnement du prélèvement	Non	Non	Oui	Oui (RPLN) Non (cerveau)
Test EIA				
Conjugué Concentré	CC	SRB-CC	CC	CC
Diluant de la Plaque de Dilution (ratio Diluant/homogénat)	30 µl/120 µl	30 µl/120 µl	50 µl/100 µl	30 µl/120 µl
Protocoles validés	Protocole Court et Ultra-Court	Protocole Court et Ultra-Court	Ganglion Lymphatique et Rate de Petits Ruminants	Protocole court
Calcul de la Valeur Seuil	CN \bar{x} + 0,120	CN \bar{x} + 0,180	CN \bar{x} + 0,180	CN \bar{x} + 0,150
Protocole de traitement thermique Optionnel	Oui	Non	Non	Non

Interprétation des Résultats

Le test est validé si la valeur moyenne de DO du Contrôle Négatif (CN \bar{x}) est inférieure à 0,150 et si la valeur moyenne de DO du Contrôle Positif (CP \bar{x}) est supérieure ou égale à 0,400.

Calculs

Calcul de la valeur moyenne de DO du Contrôle Négatif (CN \bar{x}):

$$CN\bar{x} = \frac{A1 (A_{450} - A_{REF}) + B1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Calcul de la valeur moyenne de DO du Contrôle Positif (CP \bar{x}):

$$CP\bar{x} = \frac{C1 (A_{450} - A_{REF}) + D1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Calcul de la Valeur Seuil (VS):

$$\begin{aligned} VS \text{ Bovins} &= CN\bar{x} + 0,120 \\ VS \text{ Petits Ruminants} &= CN\bar{x} + 0,180 \\ \text{Valeur seuil Cervidés} &= CN\bar{x} + 0,150 \end{aligned}$$

NOTE: Se reporter à l'étape 11 du Mode Opérateur pour la définition de A_{REF}.

Résultats

L'interprétation des résultats est basée sur la valeur de DO de chaque échantillon. Les échantillons dont la valeur de DO est inférieure à la Valeur Seuil sont considérés Négatifs par le kit IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Ag. Les échantillons dont la valeur de DO est supérieure ou égale à la Valeur Seuil sont considérés comme « initialement réactifs » et doivent être retestés en double sur le kit IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Ag à partir des homogénats initiaux correspondants.

Les homogénats de tissu cérébral de Bovins peuvent être retestés tels quels ou peuvent subir un traitement thermique optionnel avant retest comme indiqué ci-après. Les échantillons de Petits Ruminants sont retestés en double directement à partir de l'homogénat initial SANS traitement thermique préalable. Si l'une ou l'autre des deux valeurs de DO obtenues est supérieure ou égale à la Valeur Seuil, l'échantillon est considéré comme Positif. L'échantillon est considéré comme Négatif si les deux valeurs des réplicats des tests sont inférieures à la Valeur Seuil. Dans les Etats Membres de l'UE, tous les échantillons Bovins initialement réactifs, classifiés négatifs après répétition du test en double selon le protocole de traitement thermique, doivent être interprétés comme négatifs.

Les échantillons de petits ruminants et de cervidés doivent être retestés en double directement à partir de l'homogénat tissulaire initial - NE PAS soumettre les homogénats de petits ruminants ou de cervidés au traitement thermique. Si l'une des deux valeurs est égale ou supérieure à la valeur seuil, l'échantillon est considéré comme positif. L'échantillon est considéré comme négatif si les valeurs des deux réplicats sont inférieures à la valeur seuil.

NOTE: en France, les échantillons initialement immunoréactifs et trouvés négatifs à l'issue d'une répétition après traitement thermique doivent être détruits (pas de transmission au LNR).

Dans les États membres de l'Union européenne, tous les échantillons ayant un résultat positif à l'aide d'un test rapide doivent être adressés aux Laboratoires Nationaux de référence en matière d'ESB de vos pays ou au Laboratoire de référence de l'Union européenne pour un test de confirmation.

Protocole de traitement thermique optionnel destiné aux homogénats de tissu de bovins initialement réactifs: (Le protocole de traitement thermique est destiné uniquement aux échantillons d'origine bovine.)

Prélever $230 \pm 20 \mu\text{l}$ d'homogénat initialement réactif et distribuer dans un microtube à bouchon vissant à fond, conique et dans jupe de 1,5 à 2,0 ml. Placer le tube dans un bain à sec chauffant préalablement porté à une température de $70^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Incuber le tube pendant 10 ± 1 min. puis placer le tube sur un portoir aéré à $18\text{--}26^\circ\text{C}$ pendant au moins 20 minutes afin de permettre le refroidissement de l'échantillon. Tester l'échantillon en double sur le kit IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Ag dans les deux heures qui suivent le traitement thermique.

NOTE: le protocole de traitement thermique est obligatoire en France sur tous les échantillons d'homogénat de tissu cérébral bovin initialement immunoréactifs.

Précautions

- Ne pas exposer le substrat TMB à une lumière forte ou à des agents oxydants. Utiliser un réservoir propre ou à usage unique en matière plastique pour ce réactif.
- Éviter la contamination des composants du kit. Ne pas utiliser de composants périmés et ne pas mélanger de composants de kits dont les numéros de lots sont différents.
- Certains composants du kit contiennent de l'azide de sodium comme conservateur (voir la description des composants du kit). Éviter la contamination du conjugué anti-PrP: HRPO avec des solutions contenant de l'azide.
- Entreposer tous les réactifs au réfrigérateur à $2\text{--}8^\circ\text{C}$. Les porter à $18\text{--}26^\circ\text{C}$ avant utilisation et les conserver après utilisation comme indiqué au paragraphe « conservation des réactifs reconstitués ».
- Utiliser un réservoir distinct pour chaque réactif. Éviter la contamination croisée du Substrat avec la Solution de Conjugué. Ne pas verser la Solution de Substrat TMB résiduelle dans le flacon d'origine.
- Les plaques ne doivent pas rester en attente plus de 5 minutes entre les étapes de lavage et la distribution des réactifs.

Règles de sécurité

- Tout le personnel doit recevoir une formation adéquate sur les risques liés à l'ESB et à la Tremblante et aux procédures de décontamination recommandées. L'observation stricte des procédures de biosécurité est essentielle, conformément aux règlements nationaux sur la sécurité.
- Le Tampon de Conditionnement contient des agents chaotropiques, éviter tout contact avec la peau et les muqueuses.
- Le Substrat tétraméthylbenzidine (TMB) peut provoquer une irritation de la peau ou des yeux.
- Le Diluant 1 de la plaque de dilution contient des concentrations élevées de détergents; éviter tout contact direct.
- Éviter l'utilisation de verrerie de laboratoire.

Annexe

Prise d'essai de l'obex bovin à l'aide de la seringue IDEXX

IDEXX propose une seringue comme méthode alternative à la prise d'essai de l'obex des Bovins. Cette dernière est homologuée par le Laboratoire de Référence Communautaire (CRL). Les directives de cette annexe ne remplacent ni n'annulent des renseignements ou directives supplémentaires en conformité au règlement (EC) 999/2001 et autres amendements. **En cas de difficulté d'identification de la zone anatomique obex, l'utilisation des instruments de dissection est à privilégier comme décrit au paragraphe « Prise d'essai et préparation des échantillons ».**

1. A l'abattoir, le prélèvement de tronc cérébral est effectué à l'aide d'une curette, cuillère spéciale, introduite au travers du trou occipital. Identifier la zone obex comme indiqué par la forme en V repérable à la surface dorsale du tronc cérébral (voir schéma paragraphe « Prise d'essai et Préparation du tissu cérébral (obex) »). En cas de difficulté d'identification de la zone anatomique obex, l'utilisation des instruments de dissection est à privilégier comme décrit au paragraphe « Prise d'essai et préparation des échantillons ».
2. Placer le tronc cérébral, la section en V du tissu orientée vers le haut. Introduire l'extrémité de la seringue à l'intérieur du canal sélectionné du corps cérébral sur une longueur de 3 mm environ (suffisamment pour qu'elle reste bien en place). Couper une fraction de moelle épinière si la longueur entre la section en V et la base de la moelle épinière excède 3 à 4 cm.
3. Tenir fermement le piston de la seringue. Avec l'index enfoncer le cylindre externe de la seringue dans le tronc cérébral en veillant à ce que le piston reste immobile. La Figure 2 illustre les principaux sites à cibler pour le diagnostic de l'ESB. Veiller à ce que le corps de la seringue reste bien positionné dans le canal sélectionné du tronc cérébral sans détériorer l'autre moitié de la zone obex réservée à d'éventuels tests de confirmation.
4. Le cylindre de la seringue va passer au travers du tronc cérébral et pénétrer dans l'obex. S'assurer que la seringue est bien située dans la portion supérieure de la zone d'échantillonnage (voir la Figure 1). Le cylindre devrait alors contenir un échantillon d'obex.
NOTE: l'échantillon souhaité (ex: zone obex) est situé à l'extrémité du corps de la seringue.
5. Isoler l'échantillon par rotation du corps de la seringue sur elle-même puis retirer la seringue avec précaution.

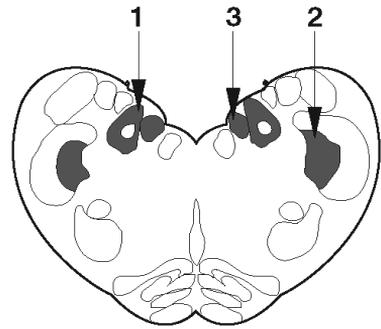


Figure 2. Coupe du tronc cérébral bovin au niveau de l'obex. Elle présente les emplacements cibles importants pour prélever des tissus. 1) canal solitaire, 2) noyau du nerf trijumeau, 3) noyau moteur dorsal du nerf vague (diagramme du Manuel de tests diagnostics et de vaccins de l'OIE, Section 2.4.6.)

6. Si une fraction significative de tissu est présente au bout de la seringue, l'introduire à l'intérieur du corps de la seringue en tirant lentement sur le piston. Chasser l'air emprisonné dans l'échantillon collecté à l'intérieur du corps de la seringue si nécessaire.
N.B.: L'intérieur du corps de la seringue renferme des crans à intervalles réguliers que l'on peut appréhender lorsqu'on actionne le piston. L'espace compris entre deux crans successifs est calibré et correspond à une prise d'essai constante.
7. Une fois l'échantillon dans le corps de la seringue, pousser et aligner le piston jusqu'au cran le plus proche. Aucun espace libre ne doit se trouver entre le piston et le bout de la seringue. Un excédent de tissu peut apparaître au bout de la seringue.
8. Éliminer tout excédent de tissu présent au bout de la seringue par une simple pression sur la surface plane de la barquette de prélèvement correspondante. Veiller à ne pas actionner le piston de la seringue au risque d'éjection ou de compression du tissu cérébral qui sont tous deux indésirables.
9. Dévisser le bouchon du tube de ribolyse. Tenir le tube de ribolyse en position verticale dans une main et la seringue dans l'autre, l'extrémité de la seringue positionnée juste au-dessus de l'ouverture du tube de ribolyse. Distribuer la quantité requise d'obex en actionnant le piston de deux crans successifs. Le volume compris entre deux crans est de 150 μ l. Le volume total requis par tube est de 300 μ l (équivalent à 0,30 g \pm 0,05 g d'obex).
10. Boucher hermétiquement le tube et broyer l'échantillon.

Le personnel en charge de la collecte des échantillons à l'aide de la seringue de prélèvement IDEXX doit recevoir une formation préalable à son utilisation afin de garantir que le prélèvement est correctement effectué dans la région de l'obex. Chaque opérateur doit périodiquement auto-contrôler la précision de la prise d'essai prélevée à la seringue en effectuant une pesée à partir d'un nombre représentatif d'échantillons. Une procédure adéquate doit être mise en place en cas de défaillance avérée. La seringue de prélèvement IDEXX est à usage unique, elle doit être éliminée afin d'éviter tout risque de contamination croisée entre échantillons.

Responsabilité

Dans les limites maximales permises par la loi, sous aucune circonstance, IDEXX ou nos concédants ne seront responsables, envers vous, ni envers aucune autre personne, en cas de perte de profits ou de jouissance, ou de dommages particuliers, accessoires, consécutifs indirects, exemplaires, punitifs ou multiples, y compris et sans limites, pour la perte d'achalandage, de données ou d'équipement ou pour des interruptions d'affaires qui découlent de la fabrication, de la vente, de la fourniture, de l'utilisation ou de la prestation de nos produits et services ou du défaut ou retard de livraison ou de prestation de tels produits ou services.

Pour l'assistance technique:

IDEXX É.-U. Tél.: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4890

IDEXX Europe Tél.: +800 727 43399

*HerdChek est une marque de fabrique ou une marque déposée d'IDEXX Laboratories, Inc. ou ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays. Les autres noms de sociétés, de produits ainsi que les logos reproduits dans ce document appartiennent à leurs détenteurs respectifs. Brevet en cours d'enregistrement.

Information sur les brevets: idexx.com/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.

Kit para la detección de antígeno de la Encefalopatía Espongiforme Bovina-Scrapie, EIA

Para uso veterinario solamente.

Versión española

Resumen

El kit para la detección de antígenos de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB)-Scrapie (tembladera) HerdChek* de IDEXX es un inmunoensayo enzimático (EIA) para la detección de la forma anormal de la proteína del prión (PrP^{Sc}) en tejido cerebral post mortem (preferentemente de óbex) de bovinos, pequeños rumiantes (oveja y cabra) y cérvidos afectados por la EEB, Scrapie o la caquexia crónica (ECC). Cuando se use en pequeños rumiantes, el kit también detecta PrP^{Sc} en tejido de los ganglios linfáticos o del bazo; en los cérvidos, también detecta PrP^{Sc} en los ganglios linfáticos retrofaríngeos (NLRF). Está diseñado para identificar con rapidez muestras que contengan el prión PrP^{Sc} asociado con la enfermedad, con una manipulación mínima de las muestras, que puede automatizarse para aplicaciones de alto rendimiento. Este kit es de uso veterinario exclusivo.

Para miembros de la Unión Europea: Esta es una prueba rápida aprobada por la UE para la detección in vitro de EEB y PrP^{Sc} relacionada con la tembladera o scrapie en bovino y pequeños rumiantes. Esta prueba también se puede usar en la UE para la detección rápida en cérvidos de encefalopatía espongiforme transmisible (EET). Este kit ha sido homologado usando muestras de amígdala, ganglio linfático retrofaríngeo y tronco encefálico de alce (*Cervus canadensis*).

El fabricante de la prueba rápida debe poseer un sistema de evaluación de calidad integrado aprobado por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EURL), que asegure que no se produce ningún cambio en el rendimiento de la prueba. El productor deberá proporcionar el protocolo de prueba al Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EURL). Las herramientas de muestreo y las modificaciones que se realicen en la prueba rápida o en el protocolo de la prueba (incluyendo el muestreo) tan sólo se podrán realizar previa notificación al EURL, y siempre que dicho laboratorio determine que la modificación no reduce la sensibilidad, especificidad o fiabilidad de la prueba rápida. Lo que determinen se deberá comunicar a la Comisión y a los laboratorios nacionales de referencia (basado en el Reglamento (CE) nº 956/2010 que modifica el Reglamento nº 999/2001).

Descripción y principios

Este kit utiliza un método patentado con licencia propiedad de Microsens Biotechnologies (Londres, Reino Unido; patente pendiente de aprobación) que permite la detección de los priones anormales. Se inmoviliza un ligando específico de PrP^{Sc} en la superficie de la placa de captura de antígeno. Las muestras se preparan homogeneizando los tejidos y después diluyéndolas con diluyente de placa de trabajo. Tras la distribución de las muestras en la placa, la configuración de la proteína asociada con la enfermedad (PrP^{Sc}) se une con gran afinidad al ligando inmovilizado en la placa. Se lavan las placas para eliminar los materiales no unidos, incluida la configuración normal de la proteína PrP. Tras la incubación con una solución tamponada (buffer) de acondicionamiento, el antígeno capturado es detectado utilizando un anticuerpo específico frente a PrP que ha sido conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRPO). Se lava la placa para eliminar el conjugado no unido, y se añade un sustrato de peroxidasa. El desarrollo de color está relacionado con las cantidades relativas de PrP^{Sc} capturadas por el ligando inmovilizado en el pocillo de la placa de microtitulación.

La interpretación de los resultados se harán según la absorbancia obtenida de la misma. Una muestra cuyo valor $A_{450} - A_{REF}$ sea menor que el valor del punto corte será considerada como negativa según el kit de detección de antígenos de EEB-Scrapie HerdChek de IDEXX. Las muestras cuyo valor $A_{450} - A_{REF}$ sea mayor o igual que el valor del punto de corte serán consideradas como positivas a PrP^{Sc}. Se requiere la realización de un análisis confirmatorio (por ejemplo una prueba de inmunohistoquímica) para todos los resultados positivos de la prueba.

Componentes del kit

Almacenar todos los componentes entre 2–8°C.

Elemento	460 Análisis
A Placas de captura de antígenos	5 placas
N Control negativo—no reactivo en la placa de captura de antígenos. Conservado con azida sódica.	5 x 1 ml
P Control positivo—no infeccioso, reactivo en la placa de captura de antígenos. Conservado con azida sódica.	5 x 1 ml
D1 Componente 1 de dilución de la placa. Conservado con azida sódica.	20 ml
D2 Componente 2 de dilución de la placa	5 x 200 µl
R Diluyente de reconstitución	20 ml
CB Solución tamponada (buffer) de acondicionamiento. Conservado con azida sódica.	60 ml
CC Solución de conjugado concentrada. Conservado con Bronidox L y metilisotiazolona.	300 µl
SRB-CC Solución de conjugado concentrada para muestras de tejido cerebral de pequeños rumiantes. Conservado con Bronidox L y metilisotiazolona.	300 µl
CD Diluyente tamponado de conjugado con detergentes y estabilizadores de proteína. Conservado con gentamicina y Proclin.	60 ml
W1 Solución 1 de lavado (x1). Conservada con azida sódica.	450 ml
W2 Solución 2 de lavado (x1). Conservada con gentamicina.	450 ml
T Sustrato TMB	60 ml

Nota: Ver tabla al final del protocolo para las explicaciones de los símbolos utilizados en este protocolo y en las etiquetas del kit.

Consultar al final de este protocolo para los peligros y medidas de prevención relacionados con los reactivos.

Materiales y equipo requeridos (no suministrados)

- Pipetas de precisión o multicanal adecuadas para dispensar entre 25 y 200 µl. Los volúmenes de los reactivos listados en el apartado de Procedimiento de la prueba requieren una pipeta de precisión inferior o igual al 5%.
- Probeta graduada para las soluciones de lavado
- Cubiertas de plástico duro o adhesivas, y cubetas para dispensar los reactivos.
- Instrumentos de recogida y disección de muestras, o dispositivos desechables.
- Lector de placas de 96 pocillos (equipado con filtros de 450-nm y 620–650-nm) y lavador
- Instrumento FastPrep* (FP120A, FP220A), FastPrep*-24, Precess 48*, Precess 24* o Precellys 24*
- Kit de accesorios: placas de dilución, tubos con perlas para la homogeneización de tejidos, puntas de pipeta de longitud extendida para la transferencia de homogeneizados y cubiertas adhesivas para placas (disponible en IDEXX)
- Equipo de protección del personal: gafas de seguridad, batas de laboratorio, guantes desechables, protectores para zapatos, redes para el cabello, mascarillas
- Solución de parada HCl 0,5–1,0 N ó 1,0 N H₂SO₄
- Hipoclorito de sodio (lejía), NaOH 1N y HCl 1N, agua desionizada
- Opcional—Robot procesador de muestras con precisión de pipeteado menor o igual que 2,5% medido por análisis de C.V. (Por ejemplo, Tecan)
- Opcional—Agitador de placas microtituladoras (Por ejemplo, IKA MTS 2/4)
- Opcional—Incubadora de placas capaz de mantener una temperatura de 32–37°C y con un flujo de aire mínimo
- Opcional—Termobloque para tubos de centrifuga microfuge de 1,5–2 ml (capaz de mantener una temperatura de 70°C)
- Opcional—Tubos de centrifuga microfuge de 1,5–2 ml con tapa de rosca, cónicos y sin faldón



Recogida y Preparación de los Tejidos de Muestra

A. Tejido cerebral de bovinos y pequeños rumiantes

1. La recogida de muestras y el análisis del laboratorio deben de seguir la regulación (EC) No. 999/2001, Anexo X, Capítulo C, que hace referencia, en términos de recogida de muestras, a la última edición del *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* de la Organización Mundial de Sanidad Animal (*International Office of Epizootic Diseases, OIE*) donde se establece: "La muestra preferida para los ensayos inmuno-enzimáticos debe de provenir del óbex o lo mas cercanamente posible, pero no más alejado de 1,5 cm anterior al óbex".

Extraer 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de tejido nervioso (siempre que sea posible del óbex) de la parte derecha o izquierda del tronco cerebral, por medio de los instrumentos de disección, y pesar la muestra para verificar que es la cantidad correcta. También existe la opción de utilizar el dispositivo de extracción de muestras IDEXX sobre tejido cerebral bovino como se describe en el apéndice. El personal a quien le sea confiada la extracción de tejido de óbex deberá estar familiarizado con el método de muestreo.

El diagrama de la derecha indica la zona correcta para la extracción de la muestra.

NOTA: Después de realizar una extracción de muestra, deberá estar disponible una hemisección completa del tronco cerebral con la región del óbex intacta y el cerebelo (si presente), para realizar la prueba de confirmación si fuera necesaria.

2. Colocar el tejido en un tubo de ruptura de tejidos y cerrarlo con fuerza. Los tubos contienen perlas de cerámica y solución tamponada.
3. Se han validado cuatro instrumentos de ruptura tisular diferentes para su empleo en la prueba EEB-Scrapie de IDEXX. Colocar los tubos en el instrumento y proceder a la ruptura tisular, siguiendo las instrucciones del instrumento correspondiente. Si la trituración es insuficiente, repetir un ciclo más.
 - Programa del Instrumento FastPrep*: triturar las muestras durante 40 segundos utilizando la velocidad máxima (6,5 m/s). Si se requiere un segundo ciclo de trituración, debe dejarse enfriar el instrumento de 5 a 10 minutos entre ciclos.
 - Programas de los instrumentos Precess 48*, Precess 24* y Precellys 24*: triturar las muestras dos veces durante 20 a 25 segundos a 6500 rpm, con un intervalo de 5 segundos entre ciclos.
4. Los homogeneizados (frescos o descongelados) pueden mantenerse a 18–26°C hasta cuatro horas antes de comenzar el análisis.

Se podrá preparar un número de muestras variable por sesión. Los homogeneizados pueden almacenarse hasta 24 horas a 2–8°C ó mantenerse a $\leq -20^\circ\text{C}$ hasta seis meses. Los tejidos homogeneizados congelados habrán de ser descongelados y mezclados a fondo por inversión antes de ser utilizados. Las muestras de tejidos pueden almacenarse a -80°C .

B. Tejido de los ganglios linfáticos o del bazo de pequeños rumiantes

1. Extraer 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de un nódulo linfático o de tejido del bazo. Para los nódulos linfáticos, se debe de recoger la muestra de manera que se maximice la presencia de células del centro germinativo. Desmenuzar el tejido en 8–10 partes pequeñas.
2. Proceder con el procesamiento y almacenamiento de las muestras tal como se ha descrito para el tejido cerebral.

NOTA: los nódulos linfáticos o el tejido del bazo no pueden usarse en el contexto de toma de muestra y análisis oficial según el marco de la Regulación (EC) No 999/2001.

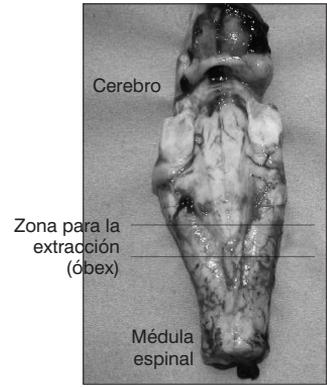


Ilustración 1. Tronco cerebral de bovino.

Copyright © Corona británica (Febrero de 2005). Reproducida con el consentimiento de la Agencia de Laboratorios Veterinarios de GB (VLA)

C. Tejido de los ganglios linfáticos y cerebral de cérvidos

1. Preparar los tubos de ruptura tisular quitando 0,2 ml de solución de cada tubo.
2. Extraer 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de tejido del nódulo linfático retrofaríngeo o cerebral (preferentemente de óbex). El tejido cerebral y el tejido de los nódulos linfáticos se deben de analizar individualmente. Para los ganglios linfáticos, se debe recoger la muestra de manera que se maximice la presencia de células centrogerminales. Desmenuzar el tejido del ganglio linfático en 8-10 trozos pequeños.
Por favor tener en cuenta que en Alemania se deben realizar pruebas individuales de tejido cerebral y tejido de los nódulos linfáticos. Esta decisión sigue las recomendaciones de la EURL. (TSE EU Reference Laboratory Guidelines for the detection of Chronic Wasting disease in cervids, <https://science.vla.gov.uk/tse-lab-net/documents/cwd-guidelines.pdf> y Scientific opinion on chronic wasting disease (II), EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), EFSA Journal 2018;16(1):5132. 59 pp.).
3. Colocar el tejido en un tubo de ruptura tisular y cerrarlo bien.
4. Colocar los tubos en el instrumento de ruptura tisular y realizar la ruptura de la manera indicada en dicho instrumento. Si es insuficiente, repetir un ciclo.

Programa del instrumento FastPrep*: Triturar las muestras durante 30 segundos a la velocidad máxima (6,5 m/s). Dejar descansar el instrumento durante cinco minutos. Repetir la trituración durante otros 30 segundos a velocidad máxima. Si, tras una inspección visual, se observa que la trituración es insuficiente, repetir un ciclo.

Programa de los instrumentos Precess 48*, Precess 24* y Precellys 24*: Triturar las muestras durante 30 segundos a 6500 rpm. Dejar descansar el instrumento durante cinco minutos. Repetir el proceso durante otros 30 segundos a 6500 rpm. Si, tras una inspección visual, se observa que la trituración es insuficiente, repetir un ciclo.

Preparación de reactivos

Soluciones de lavado (solución 1 de lavado, solución 2 de lavado)

Las soluciones de lavado concentradas deben atemperarse a 18–26°C y mezclarse bien para asegurar la disolución de sales precipitadas. Antes de su utilización, cada solución concentrada de lavado se debe diluir en una proporción de 1:10 con agua destilada o desionizada (por ej. 40 ml de solución concentrada más 360 ml de agua desionizada por placa a utilizar).

Componente 2 de dilución de placa

El componente 2 de dilución de placa (D2) se suministra en forma de compuesto liofilizado. Para la preparación de la solución, agregar 200 μ l de diluyente de reconstitución (R), dejarlo reposar durante aproximadamente un minuto y después mezclar cuidadosamente. Utilizar la solución en un tiempo máximo de 1 hora desde su preparación.

Diluyente final de placa de trabajo

El componente 1 de dilución de placa (D1) se debe llevar a 18–26°C. Preparar el diluyente de la placa de trabajo añadiendo una parte del componente 2 del diluyente de la placa (D2; preparado como se indicó anteriormente) a 25 partes del componente 1 (D1) y mezclar a fondo (por ej., 120 μ l D2 a 3,0 ml D1 por placa). Se requieren aproximadamente 2,75 ml de diluyente de la placa de trabajo por placa cuando se analizan muestras de cerebro. Para muestras de nódulo linfático o tejido del bazo, se necesitan aproximadamente 5 ml de diluyente de la placa de trabajo por placa. El diluyente de la placa de trabajo debe de ser preparado y utilizado en el mismo día.

Controles negativo y positivo

Los controles negativo y positivo se suministran en forma liofilizada. Reconstituir cada control añadiendo 1 ml de diluyente de reconstitución. Dejar reposar la solución durante aproximadamente 1 minuto y después mezclarla bien. Utilizar la solución en un tiempo máximo de 2 horas desde su preparación. **NO DILUIR LOS CONTROLES POSITIVO NI NEGATIVO EN EL DILUYENTE DE PLACA DE TRABAJO.**

Solución de anticuerpos anti-PrP conjugados con HRPO

La solución de anticuerpos anti-PrP conjugados de peroxidasa de rábano picante (HRPO) se prepara diluyendo el concentrado de conjugado (CC) en el diluyente de conjugado (CD), tal como se indica en la etiqueta (por ejemplo, para la dilución 1:100 requerida necesitaríamos 120 μ l de concentrado de conjugado en 12 ml de diluyente de conjugado). Leer la etiqueta del concentrado conjugado (CC) para corregir el factor de dilución. La solución de conjugado ha de usarse en las cuatro horas siguientes a su dilución.

NOTA IMPORTANTE: hay dos concentrados de conjugado disponibles para su uso en este kit. Seleccionar el apropiado según el tipo de muestra que se vaya a analizar:

- **Concentrado de Conjugado (CC)**—Usar este conjugado cuando se vayan a analizar muestras de tejido cerebral de bovinos y cérvidos, muestras de los ganglios linfáticos de pequeños rumiantes y cérvidos, y muestras de tejido del bazo de pequeños rumiantes.
- **Concentrado de conjugado de cerebro de pequeños rumiantes (SRB-CC)**— Usar este conjugado cuando se vaya a analizar muestras de cerebro de oveja o cabra.
- Se deben de incluir pocillos de control positivo y control negativo para cada tipo de conjugado utilizado.

Solución de frenado ácida

La solución de parada del análisis no se suministra con el kit. Esta solución (HCl 0,5–1,0 N ó H₂SO₄ 1,0 N) puede adquirirse a la concentración de trabajo o puede prepararse a partir de una solución concentrada.

Los tres protocolos descritos a continuación requieren que los reactivos se encuentren a 18–26°C antes de su uso. Antes de comenzar el análisis, preparar las soluciones que se utilizarán durante el mismo. Mezclar todos los reactivos agitándolos suavemente. Los controles (positivo y negativo) deben mezclarse a fondo y analizarse por duplicado. Se debe utilizar una tapa de placa para cubrir la placa durante el transcurso del análisis.

Conservación de reactivos preparados

Elemento	Reconstitución Volumen	Vida útil
N/P Control negativo/positivo	1 ml	2 horas a 18–26°C (Seis meses a -20°C)
D2 Componente 2 de dilución de la placa	200 µl	1 hora a 18–26°C (Seis meses a -20°C)
Diluyente final de la placa de trabajo	ND	8 horas a 18–26°C
Solución HRPO:anti-PrP	ND	4 horas a 18–26°C
Solución 1 de lavado 1X	ND	1 semana a 18–26°C
Solución 2 de lavado 1X	ND	1 semana a 18–26°C

Almacenar todas las tiras de las placas no utilizadas en un contenedor sellado, seco y oscuro.

Procedimiento de la prueba

Los homogeneizados de las muestras se preparan como se describe en la sección Recogida y Preparación de los Tejidos de Muestra. **Puede utilizarse un robot procesador de muestras en lugar del método manual, desde el paso 1 o una vez que los controles y las muestras diluidas se hayan añadido a la placa de captura de antígeno (paso 3).**

Importante: Cubrir cada placa de análisis con una tapa de plástico sólido o una cubierta de placa adhesiva durante todas las incubaciones de los reactivos. Si las incubaciones de los reactivos se llevan a cabo en una cabina de bioseguridad, las placas deberán taparse con hojas adhesivas.

Protocolos de ensayo

El kit EIA EEB-Scrapie de IDEXX dispone de dos protocolos aprobados para el tejido cerebral. Un protocolo Corto y uno Ultra-Corto. Los protocolos tienen un rendimiento equivalente. Sin embargo, presentan requisitos de equipo variables para una reducción en el tiempo de ensayo. Los protocolos se detallan en la tabla de la página siguiente.

Nota: El protocolo para el análisis de bazo y nódulo linfático de pequeños rumiantes es diferente de los protocolos Corto y Ultra-Corto y se describe a continuación en la tabla Protocolo del Ensayo.

Dilución de la muestra en el diluyente de la placa de trabajo

Utilizar una hoja de trabajo para indicar dónde se localizan las posiciones de las muestras en la placa de captura de antígeno y en la placa de dilución. Reservar pocillos en duplicado para los controles del kit. El diluyente de la placa de trabajo puede añadirse a la placa de dilución antes o después de la muestra. La proporción es de 30 µl de diluyente de la placa de trabajo por 120 µl de homogeneizado de la muestra (la proporción para el bazo y los nódulos linfáticos en los pequeños rumiantes es de 50 µl por 100 µl de homogeneizado de muestra).

Mezclar de nuevo los tejidos homogeneizados invirtiéndolos y pipetear cuidadosamente la muestra introduciendo la punta de la pipeta de transferencia para el homogeneizado a través de las cuentas del tubo de ruptura de tejidos y extraer la muestra del fondo del mismo. Distribuir cada muestra en la placa de dilución evitando que se formen burbujas en los tejidos homogeneizados o que quede un remanente de homogeneizado en los extremos del pocillo de la placa.

Después de diluir el homogeneizado, mezclar a fondo las muestras evitando la formación de burbujas. El mezclado se puede realizar con una pipeta o con un agitador de placas. Si se utiliza un agitador de placas, es necesario optimizar la velocidad y el tiempo de agitado para asegurar un mezclado completo pero sin salpicado de las muestras. Proceder a realizar el análisis en las dos horas siguientes.

Utilizar un agitador de placas para la fase de incubación de la muestra en los protocolos Corto y Ultra-Corto

Los protocolos Corto y Ultra-Corto, usados para análisis de cerebro de bovino y pequeños rumiantes, conllevan una rotación lenta (200 ± 100 rpm) en un agitador de placas para el paso de incubación de la muestra únicamente. El agitador de la placa debe crear un movimiento ligero horizontal y de forma circular. De esta manera la muestra tendrá un pequeño movimiento en cada pocillo de la placa de microtitulación, aunque no llegue a apreciarse visualmente.

El movimiento no deberá provocar que las muestras toquen las paredes del pocillo.

Los tiempos de incubación se reducen, tal y como se indica a continuación, durante las incubaciones de la muestra y del conjugado. El protocolo para el análisis de bazo y nódulo linfático de pequeños rumiantes requiere que todas las incubaciones se hagan sin movimiento.

Protocolos de ensayo

Procedimiento de la prueba		Protocolo Corto	Protocolo Ultra-Corto	Protocolo Bazo y Nódulo Linfático de Pequeños Rumiantes
Tipo de muestra		Tejido cerebral de bovinos, pequeños rumiantes y cérvidos, ganglios linfáticos de cérvidos	Tejido cerebral de bovinos y pequeños rumiantes	Tejido de los ganglios linfáticos o del bazo de pequeños rumiantes
Paso	Acción	18–26°C todos los pasos	32–37°C ¹ : Sólo incubaciones (pasos 3,5,8,10) 18–26°C: El resto de pasos, incluyendo los pasos de lavado	18–26°C todos los pasos
1	Adición de la muestra a la placa de dilución	Tejido cerebral: 120 μ l de muestra con 30 μ l de diluyente de la placa de trabajo.		Nódulo linfático y bazo de pequeños rumiantes: 100 μ l de muestra con 50 μ l de diluyente de la placa de trabajo.
MEZCLAR BIEN. Consultar la sección “Dilución de la muestra en el diluyente de la placa de trabajo.”				
2	Adición de la muestra a la placa de captura de antígeno	Pipetear 100 μ l de muestra diluida sobre la placa de ensayo, mezclar bien los controles, añadir 100 μ l por duplicado, cubrir la placa con una cubierta de placa.		
3	Incubación de la placa de captura	45–60 min; agitación lenta 200 \pm 100 rpm	20–25 min; agitación lenta 200 \pm 100 rpm	2-3 horas sin movimiento
4	Lavado con solución 1 de lavado 1X	Lavar los pocillos 6 veces con \sim 350 μ l de solución 1 de lavado 1X.		
5	Solución de acondicionamiento: Adición / Incubación	Añadir 100 μ l de la solución tamponada (buffer) de acondicionamiento a cada pocillo, cubra la placa e incúbela 10 \pm 1 min.		

6	Lavado con solución 2 de lavado 1X	Lavar los pocillos 3 veces con ~350 µl de solución 2 de lavado 1X.		
7	Adición de conjugado	Añadir 100 µl de conjugado diluido (para muestras de tejido cerebral de bovinos y cérvidos, utilizar CC; para el tejido cerebral de pequeños rumiantes, utilizar SRB-CC) y cubrir la placa con una cubierta de placa.		
8	Incubación de conjugado	45–50 min.	25–30 min.	60–75 min.
9	Lavado con solución 2 de lavado 1X	Lavar los pocillos 5 veces con ~350 µl de solución 2 de lavado 1X.		
10	Adición / Incubación de sustrato	Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo, cubrir la placa, incube 15 ± 1 min. alejado de la luz solar directa (no utilizar cubierta adhesiva).		
11	Adición de la solución de parada / Lectura de la placa	Añadir 100 µl de solución ácida de parada; la placa puede mantenerse hasta 30 min. en la oscuridad antes de leer la densidad óptica a 450 nm utilizando una longitud de onda de referencia (A_{REF}) de 620 nm ó de 650 nm.		

1. La incubación a 32–37°C implica la colocación de la placa de ensayo en una incubadora precalentada a 32–37°C.

Revisión de los formatos del kit

	Tejido Cerebral Bovino	Tejido Cerebral de Pequeños Rumiantes	Bazo y Nódulo Linfático de Pequeños Rumiantes	Tejido cerebral y de NLRF de cérvidos
Preparación de la muestra:				
Jeringa de recogida de tejido de muestra	Sí	No	No	No
Desmenuzar el tejido	No	No	Sí	Sí (NLRF) No (cerebral)
Procedimiento de la prueba				
Solución de conjugado concentrada:	CC	SRB-CC	CC	CC
Diluyente de la placa de trabajo (WPD) (proporción WPD/muestra)	30 µl/120 µl	30 µl/120 µl	50 µl/100 µl	30 µl/120 µl
Protocolos aprobados	Corto y Ultracorto	Corto y Ultracorto	Bazo y Nódulo Linfático de Pequeños Rumiantes	Corto
Punto de corte del test	$NC\bar{x} + 0,120$	$NC\bar{x} + 0,180$	$NC\bar{x} + 0,180$	$NC\bar{x} + 0,150$
Tratamiento Térmico Opcional Aplicable	Sí	No	No	No

Interpretación de los resultados

Para que el ensayo sea válido, la media del control negativo ($NC\bar{x}$) debe tener un valor de $A_{450} - A_{REF}$ menor que 0,150, y la media del control positivo ($PC\bar{x}$) debe tener un valor de $A_{450} - A_{REF}$ mayor o igual que 0,400.

Cálculos

Cálculo de la media del control negativo ($NC\bar{x}$):

$$NC\bar{x} = \frac{A1 (A_{450} - A_{REF}) + B1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Cálculo de la media del control positivo medio ($PC\bar{x}$):

$$PC\bar{x} = \frac{C1 (A_{450} - A_{REF}) + D1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Cálculo del punto de corte:

Punto de corte bovino = $NC\bar{x} + 0,120$

Punto de corte pequeños ruminates = $NC\bar{x} + 0,180$

Punto de corte de cérvidos = $NC\bar{x} + 0,150$

Nota: Consultar el paso 11 del procedimiento de la prueba para la definición de A_{REF} .

Resultados

La interpretación de los resultados de las muestras se basa en la absorbancia de las mismas. Las muestras con un valor $A_{450} - A_{REF}$ menor que el valor del punto de corte se consideran como negativas según el Kit para la detección de antígenos de EEB-Scrapie HerdChek de IDEXX. Las muestras cuyo valor $A_{450} - A_{REF}$ es mayor o igual que el valor del punto de corte se clasifican como inicialmente reactivas para PrP^{Sc}, y el homogeneizado debe ser analizado de nuevo por duplicado con el Kit para la detección de antígenos de EEB-Scrapie HerdChek de IDEXX.

La repetición del análisis sobre cerebro bovino puede llevarse a cabo a partir del homogeneizado tisular original, o a partir del homogeneizado preparado utilizando el protocolo de tratamiento térmico opcional para especie bovina, descrito a continuación. Si cualquiera de los valores obtenidos en la repetición del ensayo es mayor o igual al valor del punto de corte, la muestra se considera positiva. La muestra se considera negativa cuando los duplicados que se han vuelto a analizar son menores que el valor del punto de corte. Dentro de la UE, todas las muestras inicialmente reactivas que resulten negativas con el protocolo de tratamiento térmico deben considerarse negativas.

Las muestras de pequeños rumiantes y cérvidos deben volver a analizarse por duplicado, utilizando directamente el homogeneizado tisular original. NO utilizar el tratamiento térmico en los homogeneizados de pequeños rumiantes o cérvidos. Si cualquiera de los valores obtenidos en la repetición del ensayo es mayor o igual al valor del punto de corte, la muestra se considera positiva. La muestra se considera negativa cuando los duplicados que se han vuelto a analizar son menores que el valor del punto de corte.

En los estados miembro de la UE, todas las muestras positivas en la prueba rápida deben enviarse al Laboratorio Nacional de Referencia para la detección de EET o al Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para realizar análisis confirmatorios.

Tratamiento térmico opcional del protocolo de ensayo en homogeneizados bovinos inicialmente reactivos: (El protocolo de tratamiento térmico sólo es aplicable a las muestras bovinas.)

Retirar $230 \pm 20 \mu\text{l}$ del homogeneizado tisular inicialmente reactivo e introducirlo en un vial de 1,5–2,0 ml con tapón de rosca y fondo cónico. Colocar el vial en un termobloque que se ha precalentado hasta una temperatura de $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Calentar el tubo durante 10 ± 1 min. y, a continuación, colocar el tubo en una gradilla abierta a $18\text{--}26^{\circ}\text{C}$ durante un mínimo de 20 minutos para que la muestra se enfríe. El homogeneizado debe ser analizado de nuevo en un tiempo máximo de dos horas desde el tratamiento térmico, por duplicado, utilizando el kit de detección de antígenos de EEB-Scrapie HerdChek de IDEXX.

Precauciones

- No exponer el sustrato TMB a luz fuerte ni a agentes oxidantes. Utilizar recipientes de plástico limpios o desechables para dispensar el TMB.
- Evitar la contaminación de los componentes del kit. No utilizar componentes con posterioridad a su fecha de caducidad, y no mezclar componentes de kits de lotes distintos.
- Algunos componentes del kit contienen azida sódica como conservante (consultar la descripción de los componentes del kit). Se deben extremar las precauciones para evitar la contaminación del conjugado anti-PrP-HRPO con soluciones que contengan azida sódica.
- Almacenar todos los reactivos entre $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$. Los reactivos deben estar a $18\text{--}26^{\circ}\text{C}$ antes de su utilización y deben volver a almacenarse a la temperatura adecuada después de su uso (consulte la sección de Conservación de reactivos preparados).
- Usar dispositivos dispensadores diferentes para cada reactivo que utilice en el análisis. Evitar la contaminación cruzada de sustrato TMB con la solución de conjugado diluida. No devolver la solución TMB no utilizada a su recipiente original.
- No permitir que las placas de microtitulación permanezcan más de 5 minutos entre los pasos de lavado y la adición de reactivos.

Información de seguridad

- Todo el personal debe de recibir la formación apropiada relativa a los riesgos asociados con EBB y Scrapie, y a los procesos de descontaminación recomendados. Los procedimientos de bioseguridad se deben respetar estrictamente, tal como recomiendan las normas nacionales de seguridad.
- La solución tamponada (buffer) de acondicionamiento contiene agentes caotrópicos; evite su contacto con la piel y con las membranas mucosas.
- El substrato TMB puede irritar piel y ojos, evitar el contacto directo.
- El diluyente 1 de la placa contiene altas concentraciones de detergentes, evitar el contacto directo.
- Evitar el uso de envases de cristal en el laboratorio.

Anexo

El muestreo y las pruebas de laboratorio deben respetar la reglamentación Nº 999/2001 Anexo X, Capítulo C de la CE, que se retrotrae en lo que se refiere a la recogida de muestras a la última edición del *Manual de Normas para Pruebas Diagnósticas y Vacunas* de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) que declara: “La muestra preferente para el inmunoensayo deberá estar en el óbex, o tan cerca como sea posible de éste, pero no deberá estar en una posición anterior alejada más de 1,5 cm del óbex”.

Las muestras de óbex bovino con el dispositivo de extracción de muestras de IDEXX

IDEXX ofrece un dispositivo de extracción de muestras como método alternativo de extracción de óbex bovino. Este dispositivo es una jeringuilla de muestreo. El dispositivo de extracción de muestras de IDEXX ha sido presentado al LCR que le dio su aprobación. Las pautas que damos a continuación no excluyen otra información o instrucciones conformes a la normativa (EC) 999/2001 y a las modificaciones de dicha normativa. Cuando no sea posible identificar el área anatómica correcta para la extracción de la muestra, usar los instrumentos de disección como se describe en la sección

Recogida y Preparación de las Muestras.

1. La muestra de tronco cerebral debe ser tomada en el matadero a través del conducto occipital empleando un instrumento adecuado o una cuchara de toma de muestras. Identificar la región del óbex en el cerebro tomando como referencia la sección en forma de uve en el tejido al final del tronco cerebral (véase diagrama en la sección “Extracción y Preparación de la muestra”). Cuando no sea posible identificar el área anatómica correcta para la extracción de la muestra, usar los instrumentos de disección como se describe en la sección Recogida y Preparación de las Muestras.
2. Colocar el tronco cerebral con la sección en forma de V del tejido en posición vertical. Colocar la extremidad de la jeringuilla de extracción de muestreo en la base del tronco cerebral a 3 mm aproximadamente (lo suficiente para que esté alojada de forma segura). Puede que sea necesario recortar el sobrante del tejido de médula espinal si la distancia entre la base de la médula espinal y el vértice de la sección en forma de V supera los 3 ó 4 cm.
3. Agarrar el émbolo de la jeringuilla con firmeza. Con el dedo índice, empujar el cilindro exterior de la jeringuilla dentro del tronco cerebral, evitando que la porción del émbolo se mueva en cualquier dirección. Consultar la Ilustración 2 para colocar correctamente la jeringuilla de modo que alcance los puntos fundamentales de la toma de muestras del tejido del óbex. Mientras se empuja el cilindro de la jeringuilla dentro de la muestra, debe permanecer en el lado seleccionado del tronco cerebral para prevenir daños en el lado contrario. Debe disponerse de una hemisección del tronco cerebral entera con el óbex intacto para la prueba de confirmación.

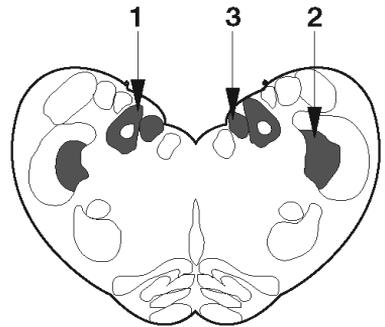


Ilustración 2. Sección transversal del tronco cerebral del bovino a la altura del óbex que identifica los puntos fundamentales de los que tomar la muestra del tejido. 1) tracto solitario, 2) núcleo trigémino espinal, 3) núcleo motor dorsal del nervio vago. (Gráfico procedente del *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* de la OIE, capítulo 2.4.6.)

4. El cilindro de la jeringuilla se moverá a través del tronco cerebral y a través de la región del óbex. Asegurarse de que la jeringuilla se ha colocado en la parte superior del área de muestreo (véase Ilustración 1). De este modo, el cilindro tendrá ya la muestra de óbex.
NOTA: La muestra requerida (por ej., área de óbex) se encuentra en el extremo del cilindro.
5. Girar el cilindro para aislar la muestra y retirar cuidadosamente la jeringuilla del tejido.
6. Si una porción significativa de tejido queda suspendida en el extremo de la jeringuilla, introducirla en el cilindro tirando del émbolo cuidadosamente. Expulsar el aire del extremo de la jeringuilla y suprimir los espacios entre las porciones de muestra.
Nota: Nótese que en el interior de la jeringuilla hay varias estrías o muescas a espacios regulares que se pueden sentir al mover el émbolo a través de la jeringuilla. El espacio entre ellas facilita la precisión en la medición del volumen de la muestra.
7. Una vez obtenido el tejido en la jeringuilla, empujar el émbolo hasta que quede alineado con la muesca siguiente. En la muestra no deberían existir espacios entre el émbolo y el extremo de la jeringuilla. Puede que se extienda fuera de la jeringuilla parte de la materia sobrante de la muestra.
8. Eliminar cualquier residuo que pudiera quedar en la superficie exterior. No presionar el émbolo durante este proceso, ya que la muestra podría expulsarse o comprimirse; ambas situaciones son desaconsejables.
9. Sujetar el tubo de ruptura tisular verticalmente en una mano y la jeringuilla horizontalmente en la otra, con la punta de la jeringuilla justo en la boca del tubo de ruptura tisular. Introducir una cantidad medida de tejido de óbex en el tubo de ruptura desplazando el émbolo hasta la segunda muesca. El volumen entre muesca y muesca es de 150 μ l; se introducirá un total de 300 μ l en el tubo (el equivalente a 0,30 g \pm 0,05 g de tejido).
10. Cerrar el tubo y proceder a la homogeneización de la muestra.

El personal encargado de la recogida de muestras con el dispositivo de recogida de muestras IDEXX deberá poseer una formación adecuada sobre el uso del dispositivo, para asegurar la recogida de la zona correcta de la médula oblonga y puente del cerebro. Cada técnico debería supervisar la precisión de las tomas de muestras mediante controles periódicos del peso de las muestras. Cuando los resultados no se ajusten a los criterios de aceptación establecidos, deberá establecerse un programa de acción correctiva. El dispositivo IDEXX de toma de muestras es de un sólo uso y debe ser desechado después de cada muestra para evitar la contaminación cruzada.

Limitación de responsabilidad

Hasta donde lo permita la ley, bajo ninguna circunstancia ni IDEXX ni nuestros cedentes de licencia serán responsables ante usted o ante cualquier otra persona por la pérdida de beneficios o uso, o por daños imprevistos, indirectos, ejemplares, punitivos o múltiples, incluyendo sin que esto constituya una limitación la pérdida de fondo de comercio, datos o equipos o la interrupción de las actividades empresariales originada por la fabricación, venta, suministro o uso de nuestros productos o servicios o por la no entrega o retraso en la entrega de dichos productos o servicios.

Para asistencia técnica:

IDEXX EE.UU. Tel: +1 800 548 9997 o +1 207 556 4890

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Número de Registro: 0610-RD

*HerdChek es una marca o una marca registrada de IDEXX Laboratories, Inc. o sus filiales en los Estados Unidos de América y/o en otros países. El resto de los nombres de compañías y productos así como logotipos son propiedad de las entidades correspondientes. Patente pendiente de concesión.

Información sobre la patente: idexx.com/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

Bovine Spongiforme Enzephalopathie-Scrapie Antigen-Testkit, EIA

Gebrauchsinformation. In-vitro-Diagnostikum. Nur zum tierärztlichen Gebrauch.

Deutsche Version

Bovine Spongiforme Enzephalopathie-Scrapie Antigen-Testkit, EIA

Überblick

Das IDEXX HerdChek* Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)-Scrapie Antigen-Testkit ist ein antigenbindender Enzymimmunoassay (EIA) zum Nachweis des anormalen Konformers des Prion-Proteins (PrP^{Sc}) in postmortem entnommenem Hirngewebe (Obexregion bevorzugt) von Rindern, kleinen Wiederkäuern (Schafen und Ziegen) oder Hirschartigen, die von BSE, der Traberkrankheit oder der chronischen Schwundkrankheit (Chronic Wasting Disease, CWD) betroffen sind. Bei der Anwendung für kleine Wiederkäuer kann der Nachweis von PrP^{Sc} auch in Lymphknoten oder Milzgewebe erfolgen; für Hirschartige erlaubt der Test auch den Nachweis von PrP^{Sc} in retropharyngealen Lymphknoten (RPLN). Mit diesem Schnelltest kann der Nachweis von PrP^{Sc} mit minimalem Proben Handling erfolgen. Für hohe Probendurchsätze kann der Test automatisiert werden.

Für Mitgliedsstaaten der Europäischen Union: Dies ist ein in der EU zugelassener Schnelltest für den in-vitro-Nachweis von BSE und Scrapie-bezogenem PrP^{Sc} bei Rindern und kleinen Wiederkäuern. Dieser Test kann in der EU bei Hirschartigen als Schnelltest zum Nachweis von TSE (Transmissible Spongiforme Enzephalopathie) verwendet werden. Die Validierung dieses Kits erfolgte mittels Proben aus den Tonsillen und den RPLN sowie Hirnstammproben von Wapitis (*Cervus Canadensis*).

Der Hersteller des Schnelltests muss ein vom European Union Reference Laboratory (EURL) genehmigtes Qualitätssicherungssystem vorzuweisen haben, um eine gleichbleibende Testqualität gewährleisten zu können. Der Hersteller muss dem EURL das Testprotokoll zur Verfügung stellen. Modifikationen der Probenentnahmegäräte oder des Testprotokolls des Schnelltests (einschließlich Probenentnahme) sind nur nach vorheriger Mitteilung an das EURL zulässig, und auch nur unter der Voraussetzung, dass die Modifikation nach Ansicht des EURL keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit, Genauigkeit oder Zuverlässigkeit des Schnelltests hat. Das Ergebnis ist der EU-Kommission sowie den zuständigen nationalen Referenzlaboratorien mitzuteilen (aufgrund der europäischen Verordnung (EG) Nr. 956/2010 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 999/2001).

Beschreibung und Testprinzip

Dieses Kit verwendet ein von Microsens Biotechnologies (London, GB; Patent angemeldet) lizenziertes und geschütztes Verfahren zum Nachweis anormaler Prionen. Ein PrP^{Sc}-spezifischer Ligand ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte zur Bindung des Antigens immobilisiert. Proben für den Test werden hergestellt, indem das Gewebe homogenisiert und die Proben dann mit der Probenverdünnerarbeitslösung verdünnt werden. Nach dem Auftragen der Probe auf die Mikrotiterplatte bindet der krankheitsassoziierte Konformer mit hoher Affinität an den immobilisierten Liganden. Die Mikrotiterplatten werden gewaschen, um ungebundene Probenbestandteile einschließlich des normalen Konformers des PrP-Proteins zu entfernen. Nach Inkubation mit dem Konditionierungspuffer wird das gebundene Antigen dann mit einem PrP-spezifischen Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRPO) konjugiert ist, nachgewiesen. Die Mikrotiterplatte wird gewaschen, um ungebundenes Konjugat zu entfernen, und es wird ein Peroxidasesubstrat zugegeben. Die Farbentwicklung ist abhängig von der relativen Menge des an den immobilisierten Liganden gebundenen PrP^{Sc}.

Die Interpretation der Ergebnisse basiert auf der Absorption der Probe. Eine Probe mit einem $A_{450} - A_{REF}$ -Wert unter dem Cut-off-Wert, gilt im IDEXX HerdChek BSE-Scrapie-Antigen-Testkit als negativ. Proben, deren $A_{450} - A_{REF}$ -Wert mindestens so hoch wie der Cutoff-Wert oder höher ist, gelten als positiv für PrP^{Sc}. Bei allen positiven Testergebnissen ist die Durchführung eines Bestätigungstests, wie z.B. ein immunhistochemisches Verfahren erforderlich.

Bestandteile des Kits

Alle Testkitbestandteile bei 2–8°C lagern.

Bestandteil	460 Tests
A Antigen-Bindungsplatten	5 Platten
N Negative Kontrolle – Nicht reaktiv mit der BSE-Antigen-Bindungsplatte. Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.	5 x 1 ml

P	Positive Kontrolle – Nicht infektiös, reaktiv mit der BSE-Antigen-Bindungsplatte. Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.	5 x 1 ml
D1	Probenverdünner 1. Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.	20 ml
D2	Probenverdünner 2	5 x 200 μ l
R	Rekonstitutions-Verdünnungspuffer	20 ml
CB	Konditionierungspuffer. Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.	60 ml
CC	Konjugatkonzentrat. Enthält Bronidox L und Methylisothiazolon als Konservierungsmittel.	300 μ l
SRB-CC	Konjugatkonzentrat für Gehirnproben kleiner Wiederkäuer. Enthält Bronidox L und Methylisothiazolon als Konservierungsmittel.	300 μ l
CD	Konjugatverdünnungspuffer mit Detergenzien und Proteinstabilisatoren. Enthält Gentamycin und Proclin als Konservierungsmittel.	60 ml
W1	10x-Waschlösung 1. Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.	450 ml
W2	10x-Waschlösung 2. Enthält Gentamycin als Konservierungsmittel.	450 ml
T	TMB-Substrat	60 ml

Hinweis: Am Ende dieser Gebrauchsinformation befindet sich eine Tabelle, welche die im Text und auf den Etiketten verwendeten Symbole erläutert.

Nähere Informationen zur Reagenziensicherheit und Vorsichtsmaßnahmen befinden sich am Ende der Gebrauchsinformation.

Erforderliche Materialien und Ausrüstung (nicht im Lieferumfang enthalten)

- Präzisionspipetten oder Multikanalpipetten, geeignet zum Pipettieren von Volumina zwischen 25 und 200 μ l. Die im Abschnitt „Testverfahren“ aufgeführten Reagenzienvolumina erfordern eine Präzision der Pipetten von kleiner oder gleich 5%.
- Messzylinder für Waschlösungen
- Abdeckungen aus Hartplastik oder Klebefolien für Mikrotiterplatten und Reagenzienreservoir
- Probenentnahmesystem: Präparierinstrumente oder Einweg-Probenentnahmegesäß
- 96 Vertiefungen Photometer (ausgestattet mit 450 nm und 620–650 nm Messfiltern) und Mikrotiterplatten-Waschgerät
- FastPrep* (FP120A, FP220A), FastPrep*-24, Precess 48*, Precess 24* oder Precellys 24* Instrument
- Zubehöropaket: Mikrotiterplatten zur Probenverdünnung, Röhrchen mit Kügelchen zur Gewebezerkleinerung, verlängerte Pipettenspitzen zum Überführen des Homogenats und Klebefolien für Mikrotiterplatten (bei IDEXX erhältlich)
- Arbeitsschutzausrüstung: Schutzbrille, Laborkittel, Einweghandschuhe, Überschuhe, Haarnetze, Gesichtsmasken
- 0,5–1,0 N HCl- oder 1,0 N H₂SO₄-Stopplösung.
- Natriumhypochlorit (Bleiche), 1 N NaOH und 1 N HCl, demineralisiertes Wasser
- Optional-Probenroboter mit einer Pipettiergenauigkeit von $\leq 2,5\%$, gemessen durch C.V.-Analyse (z.B. Tecan)
- Optional-Mikrotiterplattenschüttler (z. B. IKA MTS 2/4)
- Optional-Platteninkubator, der eine Temperatur von 32°C–37°C aufrechterhalten kann und eine minimale Luftströmung aufweist.
- Optional-Inkubator für 1,5–2 ml Mikrozentrifugenröhrchen (der eine Temperatur von 70°C aufrechterhalten kann)
- Optional-1,5–2 ml randlose, konische Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss



Probenentnahme und-zubereitung

A. Hirngewebe (Rinder und kleine Wiederkäuer)

1. Probenentnahme und Untersuchung im Labor muss nach der Verordnung (EC) Nr. 999/2001, Anhang X, Kapitel C erfolgen, welche sich hinsichtlich der Probenentnahme auf die neueste Ausgabe des *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines* des International Office of Epizootic Diseases (OIE) bezieht: "Die Probe für den Immunoassay sollte bevorzugt am, oder so nahe wie möglich am Obex, jedoch nicht mehr als 1,5 cm über dem Obex entnommen werden". Mit Präparierinstrumenten 0,30 g ($\pm 0,05$ g) Gewebe von der rechten oder linken Seite des Hirnstamms entnehmen. Die Probe wiegen, um sicherzustellen, dass die richtige Probenmenge entnommen wurde. Alternativ kann das im Anhang beschriebene IDEXX-Probenentnahmegesetz, bei bovinem Gehirngewebe allein verwendet werden. Laborpersonal, das Gewebe aus dem Obex entnimmt, muss Erfahrung im Umgang mit der Entnahmemethode haben.

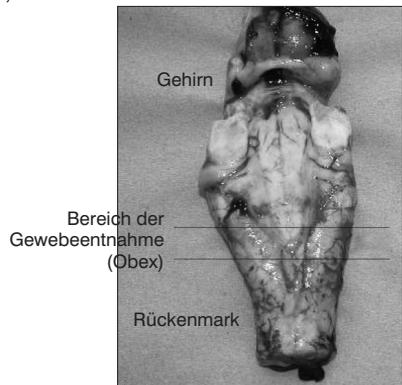


Abbildung 1. Rinder-Stammhirn.
© British Crown Copyright (Februar 2005) Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung des Veterinary Laboratories Agency.

Abbildung 1 zeigt den Bereich für die korrekte Gewebeprobenentnahme.

HINWEIS: Nach Entnahme des Gewebestücks muss eine komplette Hälfte des vollständigen Querschnitts des Hirnstamms mit intakter Obex-Region und Cerebellum (soweit vorhanden) für Bestätigungstests übriggelassen werden.

2. Das Gewebestück in ein Gewebezerkleinerungsröhrchen geben und es gut verschließen. Gewebezerkleinerungsröhrchen sind mit mit Keramikkügelchen und Puffer versehen.
3. Die vier unten genannten Geräte zur Gewebezerkleinerung wurden für die Verwendung mit dem IDEXX BSE-Scrapie EIA validiert. Die Röhrchen zur Gewebezerkleinerung in das Gerät geben und den Inhalt entsprechend der jeweiligen Gebrauchsinformation homogenisieren. Bei ungenügender Homogenisierung den Zyklus einmal wiederholen.
 - Programm für das FastPrep* Instrument: Die Proben mit maximaler Geschwindigkeit (6,5 m/s) 40 Sekunden homogenisieren. Wenn ein zweiter Durchgang notwendig ist, sollte das Gerät 5–10 Minuten zwischen den Durchgängen abkühlen.
 - Precess 48*, Precess 24* und Precellys 24* Instrumente: Die Proben 2-mal 20 bis 25 Sekunden bei 6500 U/min. mit 5 Sekunden Verzögerung zwischen den Zyklen homogenisieren.
4. Frisch hergestellte oder aufgetaute Homogenate können vor Testbeginn bis zu vier Stunden bei 18–26°C gelagert werden.

Die Anzahl der in einem einzigen Vorgang zu präparierenden Proben ist flexibel. Homogenate können bis maximal 24 Stunden bei 2–8°C oder bis zu sechs Monate bei $\leq -20^\circ\text{C}$ gelagert werden. Tiefgefrorene Homogenate müssen vor der Verwendung zunächst aufgetaut und durch Schwenken sorgfältig gemischt werden. Gewebeproben können bei -80°C gelagert werden.

B. Lymphknoten oder Milzgewebe (kleine Wiederkäuer)

1. 0,30 g ($\pm 0,05$ g) Gewebe der Lymphknoten oder der Milz entnehmen. Bei Lymphknoten dient die Gewebeentnahme dazu, die maximale Ausbeute an Keimzentrumszellen zu erreichen. Das Gewebe in 8–10 kleine Stücke zerkleinern.
2. Mit der Durchführung und der Probenlagerung wie für Gehirngewebe beschrieben, verfahren.

HINWEIS: Lymphknoten oder Milzgewebe können im Rahmen der Verordnung (EC) Nr. 999/2001 nicht für die offiziellen Gewebeentnahmen und -untersuchungen verwendet werden.

C. Hirn- und Lymphknotengewebe (Hirschartigen)

1. Bereiten Sie die Gewebezerkleinerungsröhrchen vor, indem Sie 0,2 ml Lösung aus jedem Röhrchen entfernen.
2. Entnehmen Sie 0,30 g ($\pm 0,05$ g) Gewebe aus dem retropharyngealen Lymphknoten oder Gehirn (Obex bevorzugt). Hirn- und Lymphknotengewebe sind einzeln zu untersuchen. Im Fall von Lymphknotengewebe sollte darauf geachtet werden, dass der Gehalt an Zellen aus den Keimzentren maximiert wird. Das Lymphknotengewebe wird dabei in 8–10 kleine Stücke zerkleinert.

Es ist zu beachten, dass in Deutschland beide Gewebe - Gehirn und Lymphknoten - einzeln untersucht werden müssen. Dieser Beschluss orientiert sich an den EURL Guidelines (TSE EU Reference Laboratory Guidelines for the detection of Chronic Wasting disease in cervids, <https://science.vla.gov.uk/tse-lab-net/documents/cwd-guidelines.pdf> und Scientific opinion on chronic wasting disease (II), EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), EFSA Journal 2018;16(1):5132. 59 pp.).

3. Legen Sie das Gewebe in ein Gewebezerkleinerungsröhrchen und verschließen Sie es fest.
4. Legen Sie die Röhrchen in das Gewebezerkleinerungsinstrument und führen Sie die Homogenisierung nach den Angaben für das entsprechende Instrument durch. Wenn die Homogenisierung nicht ausreicht, führen Sie einen weiteren Zyklus durch.

FastPrep* Instrumentenprogramm: Homogenisieren Sie die Proben 30 Sekunden lang mit maximaler Geschwindigkeit (6,5 m/s). Lassen Sie das Instrument fünf Minuten ruhen. Wiederholen Sie den Vorgang weitere 30 Sekunden lang mit maximaler Geschwindigkeit. Bei ungenügender Homogenisierung (nach Sichtprobe) den Zyklus einmal wiederholen.

Instrumentenprogramme Precess 48*, Precess 24* und Precellys 24*: Homogenisieren Sie die Proben 30 Sekunden lang bei 6500 U/Min. Lassen Sie das Instrument fünf Minuten ruhen. Wiederholen Sie den Vorgang weitere 30 Sekunden lang mit 6500 U/Min. Bei ungenügender Homogenisierung (nach Sichtprobe) den Zyklus einmal wiederholen.

Herstellung der Reagenzien

Waschlösungen (Waschlösung 1, Waschlösung 2)

Die Waschlösungskonzentrate vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur 18–26°C bringen und mischen, damit sich evtl. ausgefallene Salzkristalle auflösen können. Jedes Waschkonzentrat muss vor Gebrauch auf 1:10 mit destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnt werden (z.B. 40 ml Konzentrat plus 360 ml Wasser je zu testender Mikrotiterplatte).

Probenverdünner 2

Der Probenverdünner 2 (D2) liegt in lyophilisiertem Zustand vor. Die Lösung wird hergestellt, indem 200 μ l Rekonstitutions-Verdünnungspuffer (R) zugegeben, die resultierende Lösung etwa eine Minute lang stehen gelassen und dann vorsichtig gemischt wird. Die Lösung innerhalb einer Stunde nach der Herstellung verwenden.

Arbeitslösung des Probenverdünners

Den Probenverdünner 1 (D1) zunächst auf 18–26°C bringen. Die Probenverdünnerarbeitslösung durch Zugabe von einem Teil Probenverdünner 2 (D2, Herstellung wie oben beschrieben) auf 25 Teile Probenverdünner 1 (D1) herstellen und gründlich mischen (z. B.: 120 μ l D2 auf 3,0 ml D1 für eine Platte). Etwa 2,75 ml der Arbeitslösung des Probenverdünners werden für die Untersuchung einer Platte mit Gehirngewebe benötigt. Für Lymphknoten- oder Milzuntersuchungen werden ca. 5 ml Arbeitslösung des Probenverdünners gebraucht. Die Probenverdünnerarbeitslösung noch am Herstellungstag verwenden.

Negative und positive Kontrolle

Die negativen und positiven Kontrollen liegen in lyophilisiertem Zustand vor. Jede Kontrolle wird durch Zugabe von 1 ml Rekonstitutions-Verdünnungspuffer (R) hergestellt. Die resultierende Lösung etwa eine Minute lang stehen lassen und dann sorgfältig mischen. Die Lösung innerhalb von 2 Stunden nach der Herstellung verwenden.

DIE NEGATIVE ODER POSITIVE KONTROLLE NICHT MIT DER ARBEITSLÖSUNG DES PROBENVERDÜNNERS VERDÜNNEN.

Anti-PrP-HRPO-Konjugat

Das Konjugat wird durch Lösen des Konjugatkonzentrats (CC) in Konjugatverdünnungspuffer (CD) entsprechend den Angaben auf dem Etikett des Konjugatkonzentrats hergestellt (beispielsweise würde eine 1:100 Verdünnung 120 μ l Konjugatkonzentrat auf 12 ml Konjugatverdünnung erfordern). Für das richtige Verdünnungsverhältnis das Etikett des Konjugatkonzentrats beachten. Verdünnte Konjugate innerhalb von vier Stunden nach der Herstellung verwenden.

Wichtig: In diesem Test sind zwei Konjugatkonzentrate enthalten. Entsprechend dem zu untersuchendem Gewebe wie folgt vorgehen:

- **Konjugatkonzentrat (CC)**—Dieses Konjugat verwenden zur Untersuchung von Gehirnproben von Rindern und Hirschartigen, Lymphknotenproben von kleinen Wiederkäuern und Hirschartigen sowie Milzproben von kleinen Wiederkäuern.
- **Konjugatkonzentrat für kleine Wiederkäuer (SRB-CC)**—Dieses Konjugat verwenden zur Untersuchung von Hirngewebe von Schaf oder Ziege.
- Negative und positive Kontrolle müssen für jedes verwendete Konjugat angesetzt werden.

Säure-Stopplösung

Die Stopplösung für den Test ist im Testkit nicht enthalten. Die Stopplösung (0,5–1,0 N HCl oder 1,0 N H₂SO₄) ist in der Gebrauchskonzentration kommerziell erhältlich oder kann aus Konzentrat hergestellt werden.

Alle drei unten beschriebenen Protokolle erfordern, dass Reagenzien vor der Verwendung eine Temperatur von 18–26°C haben sollen. Vor Beginn des Tests müssen die für den Test benötigten Lösungen hergestellt werden. Alle Reagenzien durch vorsichtiges Schwenken mischen. Positive und negative Kontrollen müssen gründlich gemischt werden. Sie sind im Doppelansatz zu testen. Die Mikrotiterplatte muss während des Tests mit einem Deckel abgedeckt werden.

Aufbewahrung fertig hergestellter Reagenzien

Reagenz	Rekonstitutionsvolumen	Haltbarkeitsdauer
N/P Negative/positive Kontrolle	1 ml	2 Stunden bei 18–26°C (6 Monate bei -20°C)
D2 Probenverdünner 2	200 µl	1 Stunde bei 18–26°C (6 Monate bei -20°C)
Arbeitslösung des Probenverdünners	-	8 Stunden bei 18–26°C
Anti-PrP-HRPO-Konjugat	-	4 Stunden bei 18–26°C
Waschlösung 1-1x	-	1 Woche bei 18–26°C
Waschlösung 2-1x	-	1 Woche bei 18–26°C

Alle unbenutzten Teile der Mikrotiterplatten dunkel in einem verschlossenen mit Trocknungsmittel versehenen Behälter aufbewahren.

Testverfahren

Die Probenhomogenate werden wie in Probenentnahme und –zubereitung beschrieben, vorbereitet. **Ein Probenroboter kann anstatt der manuellen Methode von Schritt 1 verwendet werden, oder nachdem die Kontrollen und verdünnten Proben zur Antigen-Bindungsplatte hinzugefügt worden sind (3. Schritt).**

Wichtig: Jede Testplatte muss bei allen Inkubationsschritten mit einem Hartplastikdeckel oder einer Klebefolie abgedeckt werden. Bei Inkubation der Reagenzien in einem Biosicherheitsschrank müssen die Platten mit Klebefolien abgedeckt werden.

Testprotokolle

Für den IDEXX BSE Scrapie EIA sind zwei Protokolle für Hirngewebe validiert: Kurz- und Ultrakurz-Protokoll. Die Protokolle führen zum selben Ergebnis, haben aber unterschiedliche Ausrüstungsanforderungen für eine reduzierte Testzeit. Die Protokolle werden umseitig in der Tabelle beschrieben.

Hinweis: Das Protokoll für Untersuchungen an Milz und Lymphknoten unterscheidet sich vom Kurz- und Ultrakurz-Protokoll und ist in der Tabelle für Testprotokolle (siehe unten) beschrieben.

Verdünnung der Probe mit der Arbeitslösung des Probenverdünners

Ein Protokoll erstellen, das die Positionen der Proben auf der Antigen-Bindungsplatte und der Mikrotiterplatte zur Probenverdünnung anzeigt. Für diese Kontrollen jeweils 2 Vertiefungen reservieren. Die Probenverdünnerarbeitslösung kann vor oder nach den Proben in die Mikrotiterplatte zur Probenverdünnung gegeben werden. Das Verhältnis ist 30 µl Arbeitslösung des Probenverdünners pro 120 µl Probenhomogenat (Milz- und Lymphknotenverhältnis von kleinen Wiederkäuern ist 50 µl Verdünner pro 100 µl Probenhomogenat).

Die Homogenate wieder durch Schwenken mischen und die Probe sorgfältig mit Hilfe einer Transferpipette pipettieren. Dazu mit der Pipettenspitze durch die Kügelchen hindurch die Probe aus dem Röhrchen entnehmen. Jede Probe sorgfältig in die Mitte der Vertiefungen der unbeschichteten Verdünnungsplatte pipettieren. Blasenbildung im Homogenat vermeiden und darauf achten, dass keine Homogenatreste an den Wänden der Plattenvertiefungen hängen bleiben.

Nachdem die Homogenate verdünnt wurden, sind die Proben gründlich unter Vermeidung von Blasenbildung zu mischen. Das Mischen kann mit einer Pipette oder mit einem Plattenschüttler durchgeführt werden. Bei Verwendung eines Plattenschüttlers ist es notwendig, die Zeit und die Geschwindigkeit zu optimieren, um eine vollständige Durchmischung ohne Herausspritzen der Probe sicherzustellen. Mit der Testdurchführung binnen 2 Stunden fortfahren.

Den Plattenschüttler für die Probeninkubation (Kurz- und Ultra-Kurz-Protokoll) verwenden.

Für das Kurz- und Ultrakurzprotokoll, welches bei Untersuchungen am Gehirn von Rindern und kleinen Wiederkäuern Anwendung findet, einen Platten-Schüttler mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 200 ± 100 U/min zur Probeninkubation verwenden. Dieser Plattenschüttler sollte eine sanfte horizontale, kreisförmige Bewegung durchführen. Obwohl sich die Proben in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte leicht bewegen, darf das visuell nicht zu sehen sein. Die Bewegung darf nicht so stark sein, dass eine Probe an der Wand der Vertiefung aufsteigt. Die Inkubationszeiten für die Proben- und die Konjugat-Inkubationen sind dementsprechend kürzer, wie in der folgenden Tabelle aufgeführt. Das Protokoll für Milz und Lymphknoten von kleinen Wiederkäuern verlangt eine stationäre Inkubation.

Testprotokolle

Testverfahren		Kurz-Protokoll	Ultra-Kurz-Protokoll	Lymphknoten und Milzgewebe kleine Wiederkäuer
Probenart		Gehirn von Rindern, kleinen Wiederkäuern und Hirschartigen, Lymphknoten von Hirschartigen	Gehirn von Rindern und kleinen Wiederkäuern	Lymphknoten und Milz von kleinen Wiederkäuern
Schritt	Aktivität	Alle Schritte bei 18–26°C	32–37°C ¹ : Nur Inkubationen (Schritte 3,5,8,10) 18–26°C: Alle anderen Schritte einschließlich der Waschvorgänge	Alle Schritte bei 18–26°C
1	Probenzugabe in unbeschichtete Mikrotiterplatte zur Probenverdünnung	Gehirngewebe: 120 µl Probe mit 30 µl Arbeitslösung des Probenverdünners		Lymphknoten und Milz: 100 µl Probe mit 50 µl Arbeitslösung des Probenverdünners
		GUT MISCHEN -(Siehe Abschnitt "Verdünnung der Probe mit der Arbeitslösung des Probenverdünners") Abschnitt.		
2	Probenzugabe in Antigenbindungsplatte	100 µl der verdünnten Probe auf die Antigenbindungsplatte pipettieren; Kontrolllösung mischen und 100 µl im Doppelsatz auf Antigenbindungsplatte pipettieren; Mikrotiterplatte abdecken.		
3	Capture-Platten-Inkubation	45–60 Min., langsam schütteln, 200 ± 100 U/min	20–25 Min., langsam schütteln, 200 ± 100 U/min	2–3 Stunden (stillstehend)
4	Mit 1x-Waschlösung 1 waschen	Die Vertiefungen sechsmal mit ~350 µl 1x-Waschlösung 1 waschen.		
5	Zugabe /Inkubation Konditionierungspuffer	100 µl Konditionierungspuffer in jede Vertiefung hinzugeben, die Mikrotiterplatte abdecken und 10 ± 1 Min. inkubieren.		
6	Mit 1x-Waschlösung 2 waschen	Die Vertiefungen dreimal mit ~350 µl 1x-Waschlösung 2 waschen.		

7	Konjugatzugabe	100 µl verdünntes Konjugat (für Gehirn von Rindern und Proben von Hirschartigen CC verwenden; für Gehirn von kleinen Wiederkäuern SRB-CC verwenden) und Mikrotiterplatte abdecken.		100 µl verdünntes CC Konjugat zugeben und Mikrotiterplatte abdecken.
8	Konjugatinkubation	45–50 Min.	25–30 Min.	60–75 Min.
9	Mit 1x-Waschlösung 2 waschen	Die Vertiefungen fünfmal mit ~350 µl 1x-Waschlösung 2 waschen.		
10	Substratzugabe / -inkubation	100 µl Substrat in jede Vertiefung hinzugeben, Mikrotiterplatte abdecken, 15 ± 1 Min. lang inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden (keine Klebeabdeckung verwenden).		
11	Zugabe Stopplösung/ Mikrotiterplatte lesen	100 µl Säurestopplösung hinzugeben, die Mikrotiterplatte kann bis zu 30 Min. im Dunkeln aufbewahrt werden, bevor die optische Dichte (450 nm) abgelesen wird, mit einer Referenzwellenlänge von (A_{REF}) 620 nm bis 650 nm.		

1. Inkubation bei 32–37°C bedeutet, dass die Testplatte in den bereits auf 32–37°C vorgeheizten Inkubator eingelegt wird.

Übersicht der Testformate

	Gehirngewebe Rinder	Gehirngewebe Kleine Wiederkäuer	Lymphknoten und Milzgewebe Kleine Wiederkäuer	Gehirn und RPLN von Hirschartigen
Probenentnahme und -zubereitung:				
Anwendung des Probenentnahmeegerätes	Ja	Nein	Nein	Nein
Vorzerkleinerung der Gewebe (Prähomogenisierung)	Nein	Nein	Ja	Ja (RPLN) Nein (Gehirn)
Testverfahren:				
Konjugatkonzentrat	CC	SRB-CC	CC	CC
Arbeitslösung des Probenverdünners (Verdünnungsverhältnis zu Proben-Homogenat)	30 µl/120 µl	30 µl/120 µl	50 µl/100 µl	30 µl/120 µl
Zugelassene Protokolle	Kurz und Ultrakurz	Kurz und Ultrakurz	Lymphknoten und Milzgewebe kleine Wiederkäuer	Kurz
Cut-off-Werte	$NC\bar{x} + 0,120$	$NC\bar{x} + 0,180$	$NC\bar{x} + 0,180$	$NC\bar{x} + 0,150$
Fakultative Hitzebehandlung	Ja	Nein	Nein	Nein

Interpretation der Ergebnisse

Damit der Test gültig ist, muss der Mittelwert der negativen Kontrolle ($NC\bar{x}$) einen $A_{450} - A_{REF}$ -Wert von unter 0,150 haben; der Mittelwert der positiven Kontrolle ($PC\bar{x}$) muss einen $A_{450} - A_{REF}$ -Wert von $\geq 0,400$ haben.

Berechnungen

Berechnung des Mittelwerts der negativen Kontrolle ($NC\bar{x}$):

$$NC\bar{x} = \frac{A1 (A_{450} - A_{REF}) + B1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Berechnung des Mittelwerts der positiven Kontrolle ($PC\bar{x}$):

$$PC\bar{x} = \frac{C1 (A_{450} - A_{REF}) + D1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Berechnung des Cut-off-Wertes:

Boviner Cut-off = $NC\bar{x} + 0,120$

Kleiner Wiederkäuer Cut-off = $NC\bar{x} + 0,180$

Hirschartige Cut-off = $NC\bar{x} + 0,150$

HINWEIS: Siehe Punkt 11 im Abschnitt „Testverfahren“ für die Definition von A_{REF} .

Ergebnisse

Die Interpretation der Probenergebnisse beruht auf der Absorption der Probe. Proben, deren $A_{450} - A_{REF}$ -Wert unter dem Cut-off liegt, gelten im IDEXX HerdChek BSE-Scrapie-Antigen-Testkit als negativ. Proben, deren $A_{450} - A_{REF}$ -Wert mindestens so hoch wie der Cut-off-Wert oder höher ist, werden zunächst als reaktiv für PrP^{Sc} klassifiziert, die Homogenate sollten aber noch einmal im Doppelansatz mit dem HerdChek BSE-Scrapie-Antigen-Testkit von IDEXX getestet werden.

Zur Nachtestung der bovinen Gehirnprobe kann entweder das Original-Gewebehomogenat oder das nach dem unten beschriebenen optionalen Wärmebehandlungsprotokoll aufbereitete Homogenat verwendet werden. Wenn dann einer dieser Probenwerte größer oder gleich dem Cut-off ist, gilt die Probe als positiv. Die Probe gilt als negativ, wenn beide Wiederholungsergebnisse kleiner als der Cut-off für den Test sind. Innerhalb der EU sollen alle initial reaktiven Rinderproben, die in der Kontrolltestung gemäss Wärmebehandlungsprotokoll negativ sind, als negativ gemeldet werden.

Proben von kleinen Wiederkäuern und Hirschartigen sollten im Doppelansatz direkt unter Verwendung des Original-Gewebehomogenates nachgetestet werden – Homogenate von kleinen Wiederkäuern oder Hirschartigen NICHT wärmebehandeln. Wenn einer der Werte der Nachtestung größer oder gleich dem Cut-off ist, wird die Probe als positiv gewertet. Die Probe wird als negativ gewertet, wenn beide Wiederholungsergebnisse kleiner als der Cut-off sind.

In den EU-Mitgliedsstaaten müssen alle positiven Schnelltestproben für Bestätigungstests an Ihr nationales Referenzlabor für TSE oder das Referenzlabor der Europäischen Union geschickt werden.

Optionales Wärmebehandlungsprotokoll für initial reaktive bovine Gehirnhomogenate (Das Wärmebehandlungsprotokoll ist nur anwendbar auf bovine Proben.)

230 ± 20 µl des initial reaktiven Gewebehomogenates entfernen und in ein konisches 1,5-2,0 ml Gefäß mit Schraubverschluss dispensieren. Das Gefäß in einen auf 70°C ± 2°C vorgeheizten Inkubator stellen. Das Probengefäß für 10 ± 1min inkubieren und es dann für mindestens 20 Minuten bei 18–26°C in einem Reagenzglashalter abkühlen lassen. Das Homogenat innerhalb der nächsten zwei Stunden im Doppelansatz mit dem IDEXX HerdChek BSE-Scrapie AntigenTest Kit nachtesten.

Vorsichtsmaßnahmen

- Das TMB-Substrat keinem starken Licht oder Oxidationsmitteln aussetzen. Für TMB saubere Einwegreagenzienreservoirs verwenden.
- Kontamination der Bestandteile des Kits vermeiden. Die Bestandteile nur bis zum angezeigten Verfalldatum verwenden und nicht mit Bestandteilen aus Kits anderer Chargen mischen.
- Einige Bestandteile des Kits enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel (siehe Abschnitt Bestandteile des Kits). Das Anti-PrP-HRPO-Konjugat darf nicht mit azidhaltigen Lösungen kontaminiert werden.
- Alle Reagenzien bei 2–8°C aufbewahren. Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur 18–26°C bringen und nach Gebrauch wieder bei Lagertemperatur aufbewahren (siehe auch: Aufbewahrung fertig hergestellter Reagenzien).
- Für jedes im Test verwendete Reagenz ist ein gesondertes Reagenzienreservoir zu verwenden. Kreuzkontamination des TMB-Substrates mit der verdünnten Konjugatlösung vermeiden. Unbenutzte TMB-Lösung nicht wieder zurück in die Flasche geben.
- Zwischen den Waschgängen und der Zugabe von Reagenzien dürfen nicht mehr als 5 Minuten vergehen.

Sicherheitsinformation

- Das gesamte Personal muss eine entsprechende Schulung hinsichtlich der BSE- und Scrapie-Risiken und der empfohlenen Dekontaminationsverfahren erhalten. Die biologischen Sicherheitsverfahren müssen den nationalen Sicherheitsvorschriften entsprechen und streng eingehalten werden.
- Der Konditionierungspuffer enthält chaotrope Substanzen; Haut- und Schleimhautkontakt vermeiden.

- Das TMB-Substrat kann Haut- und Augenirritationen verursachen. Direkten Kontakt vermeiden.
- Probenverdünner 1 enthält hohe Lösungsmittelkonzentrationen; direkten Kontakt vermeiden.
- Die Verwendung von Glasbehältern im Labor vermeiden.

Anhang

Probenentnahme und Test müssen entsprechend der EU-Verordnung (EC) Nr. 999/2001 Anhang X, Kapitel C durchgeführt werden, die sich hinsichtlich der Probenentnahme auf die neueste Ausgabe des "Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines of the International Office of Epizootic Diseases (OIE)" bezieht und feststellt: Die Probenentnahme für einen Immuntest sollte bevorzugterweise im oder so nahe wie möglich am Obex, aber nicht weiter als 1,5 cm vor dem Obex erfolgen.

Probenentnahme aus dem bovinen Obex mit dem IDEXX-Probenentnahmesystem

IDEXX stellt ein Probenentnahmegesetz zur Verfügung. Bei diesem Gerät handelt es sich um eine Probenspritze. Das IDEXX-Probenentnahmesystem wurde vom CRL für bovine Obex-Proben zugelassen. Die in diesem Abschnitt beschriebene Anleitung setzt anderweitige Informationen oder Anweisungen in Übereinstimmung mit der Verordnung (EC) 999/2001 und ergänzende Verordnungen nicht außer Kraft.

1. Das Stammhirn sollte im Schlachthof mithilfe eines geeigneten Instruments oder eines Probenlöffels durch das okzipitale Foramen entnommen werden. Die durch eine V-förmige Vertiefung in der Oberfläche des Hirnstamms gekennzeichnete Region (siehe Abbildung 1 im Abschnitt Probenentnahme und Herstellung von Gehirnproben) identifizieren. Wenn der korrekte anatomische Bereich für die Probenentnahme nicht eindeutig ermittelt werden kann, sind Präparierinstrumente zu verwenden, und die Entnahme muss auf die in der vorliegenden Gebrauchsinformation im Abschnitt „Probenentnahme (Obex) und Herstellung von Gehirnproben“ beschriebenen Weise erfolgen.

2. Das Stammhirn so positionieren, dass der V-förmige Gewebeabschnitt nach oben zeigt. Die Spitze der Spritze an der kaudalen Schnittfläche der Hirnstammprobe auf der zu beprobenden Seite ca. 3 mm tief im Gewebe (bis die Spritze fest sitzt) platzieren. Unter Umständen ist es erforderlich, überschüssiges Rückenmarksgewebe zu entfernen, falls die Entfernung vom Ansatz des Rückenmarks bis zum Scheitelpunkt des V-förmigen Abschnitts größer als 3–4 cm ist.

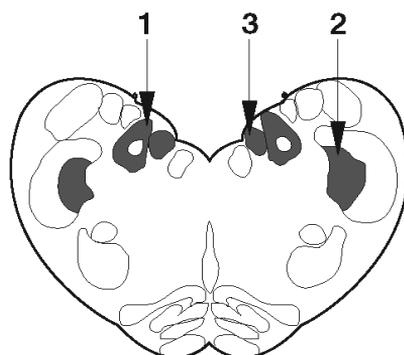


Abbildung 2. Querschnitt des Rinder-Stammhirns auf der Höhe des Obex, sodass die wichtigen Zielbereiche für die Gewebeentnahme zu erkennen sind. 1) Tractus solitarius, 2) Kern des Trigeminalnervs, 3) dorsaler motorischer Kern des Vagus-Nervs. (Abbildung aus „OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines“, Kapitel 2.4.6.)

3. Den Kolben der Spritze sicher festhalten. Mit dem Zeigefinger den äußeren Zylinder der Spritze in den Hirnstamm schieben. Dabei darauf achten, dass der Kolben sich nicht in irgendeine Richtung bewegt. Abbildung 2 für eine passende Ausrichtung der Spritze beachten, um die Stellen der Zielbereiche des Obex zu treffen. Wenn der Zylinder der Spritze in die Probe geschoben wird, muss er auf der ausgewählten Seite des Hirnstamms bleiben, um eine Beschädigung der Gegenseite zu verhindern. Eine komplette Hälfte des Hirnstamms mit intaktem Obex muss für Bestätigungstests erhalten bleiben.
4. Der Zylinder der Spritze durchdringt den Hirnstamm bis in die Obex-Region. Sicherstellen, dass die Spritze den oberen Abschnitt des Probenbereichs erreicht (siehe Abbildung 1). Der Zylinder sollte nun die Obex-Probe enthalten.

HINWEIS: Die gewünschte Probe (Obexregion) befindet sich im vorderen Bereich des Spritzenzylinders.

5. Den Zylinder drehen, um die Probe zu isolieren, und sodann die Spritze vorsichtig aus dem Gewebe herausziehen.
6. Wenn noch ein Teil der Gewebeprobe aus der Spritzenöffnung herausragt, kann diese durch Zurückziehen des Spritzenkolbens in den Zylinder gezogen werden. Luft und etwaige Lücken in der Gehirnprobe in der Probenspritze entfernen.
HINWEIS: Die Spritze besitzt im Innern mehrere „Raster“ oder Rillen in regelmäßigen Abständen. Diese sind fühlbar, wenn der Kolben durch die Spritze bewegt wird. Der Raum zwischen den Rastern ermöglicht es, das Probenvolumen exakt zu bestimmen.
7. Wenn sich die Gewebeprobe in der Spitze befindet, den Kolben schieben, bis er im nächsten Raster einrastet. Die Probe sollte zwischen dem Kolben und der Spitze der Spritze keine Leerräume aufweisen. Eine geringe Menge überschüssigen Probenmaterials kann über die Spitze der Spritze hinausreichen.
8. Gewebereste an der Außenseite der Spritze abwischen. Darauf achten, dass hierbei der Kolben nicht betätigt wird, da die Probe ansonsten unerwünschterweise entweder herausgedrückt oder zusammengepresst wird.
9. Das Röhrchen zur Gewebezerkleinerung vertikal in einer Hand halten und die Spritze in der anderen, wobei die Spitze innerhalb der Öffnung des Röhrchens liegen muss. Eine genau abgemessene Menge des Obex-Gewebes in das Röhrchen zur Gewebezerkleinerung übertragen, indem der Kolben über einen Raster hinweg bis zum zweiten Raster geschoben wird. Das Volumen zwischen den Rastern entspricht 150 μl ; insgesamt werden also 300 μl in ein Röhrchen übertragen (dies entspricht 0,30 g \pm 0,05 g Gewebe).
10. Das Röhrchen verschließen und mit der Homogenisierung der Probe fortfahren.

Die mit der Entnahme von Obexproben mit Hilfe des IDEXX-Probentnahmegeräts beauftragten Personen sollten hinsichtlich der Verwendung des Geräts gut geschult sein, um sicherzustellen, dass die Probenentnahme im vorgeschriebenen Bereich des Hirnstamms erfolgt. Alle Laborangestellten sollten das Probengewicht regelmäßig überprüfen, um die Genauigkeit der Probenentnahme zu überwachen. Falls die Ergebnisse außerhalb der definierten Zulässigkeitskriterien liegen, sollten korrigierende Maßnahmen ergriffen werden. Die IDEXX-Probentnahmespritze ist für den einmaligen Gebrauch bestimmt und sollte nach der Verwendung entsorgt werden, um Kreuzkontaminationen zu verhindern.

Haftungsausschlüsse

Soweit rechtlich zulässig schließen IDEXX und jeder seiner Lizenznehmer Ihnen und jedem Dritten gegenüber jeden Anspruch auf Schadensersatz für entgangenen Gewinn oder für den Entzug von Gebrauchsvorteilen aus, sowie ferner jeden Schadensersatz für konkrete, beiläufig entstandene, nachfolgende oder indirekte Schäden, einschließlich aller Entschädigungen mit Strafcharakter oder Mehrfachentschädigungen, insbesondere Imageschäden, Schäden an Daten oder Ausrüstung oder für betriebliche Ausfälle, die aus Herstellung, Verkauf, Lieferung oder Verwendung unserer Produkte oder Dienstleistungen oder durch Fehler oder Verzögerungen bei der Lieferung dieser Produkte oder Dienstleistungen entstehen.

Technische Unterstützung:

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

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Zul.-Nr: FLI-B 409

*HerdChek ist eine Schutzmarke oder eine eingetragene Schutzmarke von IDEXX Laboratories, Inc. oder eines Tochterunternehmens von IDEXX in den Vereinigten Staaten und/oder in anderen Ländern. Alle anderen Firmen- und Produktbezeichnungen sowie Firmen- und Produktlogos sind Eigentum der jeweiligen Inhaber. Patent angemeldet.

Patentinformation: idexx.com/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Introduzione

Il test IDEXX HerdChek* Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-Scrapie Antigen Test Kit è un saggio immunoenzimatico (EIA) a cattura di antigene per l'individuazione dell'isomero conformazionale anomalo della proteina prionica (PrP^{Sc}) nei tessuti cerebrali (preferibilmente l'obex) postmortem di bovini, piccoli ruminanti (pecore o capre) e cervidi affetti da encefalopatia spongiforme bovina (BSE), scrapie o malattia da deperimento cronico (CWD). Per l'utilizzo nei piccoli ruminanti il test rileverà la PrP^{Sc} anche nei tessuti linfonodali o della milza; per i cervidi il test rileverà la PrP^{Sc} anche nei linfonodi retrofaringei (RPLN). Questo test è stato sviluppato per identificare rapidamente campioni contenenti PrP^{Sc} associati alla malattia con una ridotta gestione del campione e può essere automatizzato per processare un elevato numero di campioni nell'unità di tempo. Questo kit è solo per uso veterinario.

Per gli Stati membri dell'Unione Europea: Il test in questione è un test rapido approvato nell'UE per la rilevazione in-vitro della BSE e Scrapie relativa a PrP^{Sc} nei bovini e piccoli ruminanti. Questo test può essere utilizzato nell'UE anche per il test rapido dell'encefalopatia spongiforme trasmissibile (Transmissible Spongiform Encephalopathy, TSE) sui cervidi. La validazione di questo kit è stata effettuata utilizzando campioni di tonsilla, linfonodo retrofaringeo e tronco encefalico di alce (*Cervus canadensis*).

Il produttore del test rapido deve avere in funzione un sistema di garanzia della qualità approvato dall'European Union Reference Laboratory (EURL), che assicura l'immutabilità della performance del test. Il produttore deve fornire il protocollo del test al EURL. Gli strumenti di campionamento, il test rapido o il protocollo del test (compreso il campionamento) possono essere cambiati solo dopo avvenuta notifica al EURL e la conferma da parte di questi che la modifica non riduce la sensibilità, la specificità o l'affidabilità del test rapido. Detta conferma deve essere comunicata ai laboratori comunitari e ai laboratori nazionali di riferimento. (In base al Regolamento (EC) No 956/2010 in aggiunta al Regolamento (EC) No 999/2001).

Descrizione e principi del metodo

Questo kit utilizza un metodo esclusivo concesso in licenza da Microsens Biotechnologies (Londra, Regno Unito; brevetto in corso di registrazione) che consente l'identificazione dei prioni anomali. Un legante specifico per la PrP^{Sc} viene fissato sulla superficie della piastra di cattura dell'antigene. I campioni da analizzare vengono preparati omogeneizzando i tessuti e quindi diluendo il campione con diluente per piastra di lavoro. Una volta applicato il campione sulla piastra, il conformero associato alla malattia sviluppa un legame ad alta affinità con il legante immobilizzato sulla superficie della piastra. Le piastre vengono lavate per rimuovere i materiali non legati, incluso il conformero normale della proteina PrP. Dopo l'incubazione con tampone di condizionamento, l'antigene catturato viene successivamente identificato utilizzando un anticorpo specifico per la PrP coniugato con perossidasi di rafano (HRPO). La piastra viene lavata per rimuovere il coniugato non legato e si aggiunge un substrato di perossidasi. Lo sviluppo della colorazione è correlato alle quantità relative di PrP^{Sc} catturate dal legante immobilizzato nel pozzetto della piastra per microtitolazione.

L'interpretazione dei risultati si basa sull'assorbanza del campione. Un campione la cui $A_{450} - A_{REF}$ è inferiore al valore limite è considerato negativo dal test IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit. I campioni il cui valore $A_{450} - A_{REF}$ è superiore o uguale al valore limite vengono classificati positivi per PrP^{Sc}. Per tutti i risultati di analisi positivi è richiesto di eseguire un'analisi di conferma come ad esempio un'analisi immunostochimica.

Componenti del kit

Conservare tutti i componenti a 2-8°C.

Articolo	460 test
A Piastre di cattura antigene	5 piastre
N Controllo negativo—Non reattivo con piastra di cattura dell'antigene. Conservato con azoturo di sodio.	5 x 1 ml

P	Controllo positivo—Non infettivo, reattivo con piastra di cattura dell'antigene. Conservato con azoturo di sodio.	5 x 1 ml
D1	Componente 1 diluente per piastra. Conservato con azoturo di sodio.	20 ml
D2	Componente 2 diluente per piastra	5 x 200 μ l
R	Diluente di ricostituzione	20 ml
CB	Tampone di condizionamento. Conservato con azoturo di sodio.	60 ml
CC	Coniugato concentrato. Conservato con Bronidox L e metilisotiazolone.	300 μ l
SRB-CC	Coniugato concentrato per piccoli ruminanti. Conservato con Bronidox L e methylisothiazolone	300 μ l
CD	Tampone diluente per coniugato con detergenti e stabilizzanti delle proteine. Conservato con gentamicina e Proclin.	60 ml
W1	Soluzione 1 di lavaggio 10X. Conservato con azoturo di sodio.	450 ml
W2	Soluzione 2 di lavaggio 10X. Conservato con gentamicina.	450 ml
T	Substrato TMB	60 ml

NOTA: vedere la tabella alla fine dell'inserto tecnico per la descrizione dei simboli usati nell'inserto e nelle etichette.

Vedere la fine dell'inserto tecnico per le indicazioni di pericolo e i consigli sulla prudenza.

Materiali ed apparecchiature necessari (non forniti)

- Micropipette di precisione e micropipette multicanale adatte alla distribuzione di volumi compresi tra 25 e 200 μ l. I volumi dei reagenti elencati nella sezione "Procedura del Test" richiedono micropipette con una precisione inferiore o uguale al 5%.
- Cilindri graduati per soluzioni di lavaggio
- Coperchi in plastica rigida o coperchi adesivi per piastre, piastre di diluizione e vassoi dove distribuire i reagenti da pipettare
- Strumenti di dissezione per il campionamento o strumento monouso per la raccolta del campione
- Lettore e lavatore di piastra a 96 pozzetti (dotato di filtri da 450-nm e 620–650-nm)
- Strumento FastPrep* (FP120A, FP220A), FastPrep*-24, Precess 48*, Precess 24* o Precellys 24*
- Kit di accessori: piastre di diluizione, provette per il disgregamento dei tessuti con sferette, puntali extra lunghi per il trasferimento dell'omogenato e coperchi adesivi per piastre (reperibili presso IDEXX)
- Protezioni adeguate: occhiali di sicurezza, camice, guanti monouso, copriscarpe, retine per capelli, mascherine
- Soluzione di arresto 0,5–1,0 N HCl o 1,0 N H₂SO₄ per l'analisi
- Ipoclorito di sodio (candeggina), NaOH 1N e HCl 1N, acqua deionizzata
- Opzionale—sistema robotico di analisi dei campioni con precisione di pipettatura \leq 2,5% misurata mediante analisi C.V. (per esempio, Tecan)
- Opzionale—agitatore per micropiastre (es.: IKA MTS 2/4)
- Opzionale—incubatore per piastre in grado di mantenere una temperatura di 32–37°C ed un flusso di aria minimo
- Opzionale—unità di riscaldamento a secco per provette per microcentrifuga da 1,5–2 ml (capacità di mantenimento di una temperatura di 70 °C)
- Opzionale—provette coniche per microcentrifuga senza bordo con tappo a vite da 1,5–2 ml

Campionamento e preparazione del tessuto

A. Tessuti cerebrali (bovini e piccoli ruminanti)

1. Il campionamento e le procedure di test di laboratorio devono seguire il regolamento (CE) n. 999/2001 Annex X, Capitolo C, che si riferisce, per la raccolta dei campioni, all'ultima edizione del *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines* of the International Office of Epizootic Diseases (OIE), nel quale si legge che: "Il campione ideale per l'analisi immunologica deve essere prelevato dall'obex, o quanto più vicino ad esso possibile, ma non più distante di 1,5 cm dalla parte anteriore dell'obex". Raccogliere 0,30 g ($\pm 0,05$ g) di tessuto nervoso dal lato sinistro o destro del tronco encefalico (ogni qualvolta è possibile all'altezza dell'obex) con strumenti di dissezione e pesare il campione in modo da essere sicuri di avere la quantità corretta. In alternativa, il dispositivo di raccolta del campione IDEXX può essere usato con tessuti cerebrali bovini come descritto nell'Appendice. Il personale che raccoglie l'obex deve essere esperto nel metodo di campionamento.

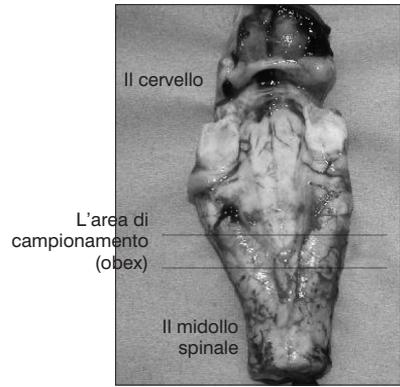


Figura 1. Tronco cerebrale bovino.

© Copyright British Crown (Febbraio 2005) riprodotto grazie al cortese permesso rilasciato dal Veterinary Laboratories Agency.

Il diagramma sulla destra indica l'area corretta di campionamento.

NOTA: Dopo la raccolta del campione, deve restare a disposizione un'emissione completa del tronco cerebrale con una regione intatta dell'obex e del cervelletto (se presente) per l'esecuzione del test di conferma.

2. Posizionare il tessuto in una provetta di disgregazione dei tessuti e chiudere saldamente. Le provette sono provviste del tampone e di palline di ceramica
3. Per l'uso di IDEXX BSE-Scrapie EIA sono stati convalidati quattro diversi strumenti di disgregazione del tessuto. Posizionare le provette nello strumento e digregare come indicato in dettaglio per lo strumento appropriato. Se la disgregazione è insufficiente, ripetere un ciclo
 - Programma dello strumento FastPrep*: Processare i campioni per 40 secondi a velocità massima (6,5 m/s). Se dovesse essere necessario un secondo ciclo, allo strumento deve essere permesso di raffreddarsi per 5–10 minuti tra i due cicli.
 - Programma dello strumento Precess 48*, Precess 24* e Precellys 24*: Processare i campioni a 2 x 20-25 secondi alla velocità di 6500 giri al minuto, con un intervallo di 5 secondi fra un ciclo e l'altro.
4. L'omogenato (preparato fresco o scongelato) può essere conservato a 18–26°C per un periodo non superiore a quattro ore prima dell'inizio dell'esame.

Il numero di campioni da preparare in un'unica sessione è flessibile. L'omogenato può essere conservato per un massimo di 24 ore a 2–8°C oppure conservato a $\leq -20^\circ\text{C}$ per un massimo di sei mesi. Gli omogeneizzati freschi devono essere scongelati e miscelati per bene tramite inversione prima dell'uso. I campioni di tessuto possono essere conservati a -80°C .

B. Tessuti linfonodali o di milza (piccoli ruminanti)

1. Raccogliere 0,30 g ($\pm 0,05$ g) di tessuto dal linfonodo o dalla milza. Per i linfonodi, il tessuto deve essere campionato per massimizzare la presenza di cellule del centro germinale. Triturare il tessuto in 8–10 piccoli pezzi.
2. Procedere all'elaborazione e alla conservazione del campione come descritto per i tessuti cerebrali.

NOTA: Tessuti linfonodali o di milza non possono essere utilizzati per campionamenti e analisi ufficiali all'interno del regolamento (CE) n. 999/2001.

C. Tessuti linfonodali o cerebrali (cervidi)

1. Preparare le provette per il disgregamento dei tessuti rimuovendo 0,2 ml di soluzione da ciascuna provetta.
2. Raccogliere 0,30 g ($\pm 0,05$ g) di tessuto dal linfonodo retrofaringeo o dal cervello (preferibilmente l'obex). I tessuti cerebrali e linfonodali dovrebbero essere testate individualmente. Per i linfonodi, il tessuto deve essere campionato per massimizzare la presenza di cellule del centro germinale. Triturare il tessuto in 8–10 piccoli pezzi.
Si prega di notare che in Germania i test su tessuto cerebrale e linfonodale devono essere effettuati individualmente. Questa decisione segue le linee guida EURL. (TSE EU Reference Laboratory Guidelines for the detection of Chronic Wasting disease in cervids, <https://science.via.gov.uk/tse-lab-net/documents/cwd-guidelines.pdf> e Scientific opinion on chronic wasting disease (II), EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), EFSA Journal 2018;16(1):5132. 59 pp.).
3. Posizionare il tessuto in una provetta di disgregazione dei tessuti e chiudere saldamente.
4. Posizionare le provette nello strumento e disgregare come indicato in dettaglio per lo strumento appropriato. Se la disgregazione è insufficiente, ripetere un ciclo.

Programma dello strumento FastPrep*: Processare i campioni per 30 secondi a velocità massima (6,5 m/s). Interrompere l'utilizzo dello strumento per 5 minuti. Ripetere la disgregazione per altri 30 secondi alla massima velocità. Se la disgregazione è insufficiente mediante ispezione visiva, ripetere un ciclo.

Programma dello strumento Precess 48*, Precess 24* e Precellys 24*: Processare i campioni per 30 secondi alla velocità di 6500 giri/min. Interrompere l'utilizzo dello strumento per 5 minuti. Ripetere la disgregazione per altri 30 secondi a 6500 giri/min. Se la disgregazione è insufficiente mediante ispezione visiva, ripetere un ciclo.

Preparazione dei reattivi

Soluzioni di lavaggio (Soluzione di lavaggio 1, Soluzione di lavaggio 2)

I concentrati delle soluzioni di lavaggio devono essere portati a 18–26°C e miscelati per dissolvere eventuali sali precipitati. Prima dell'uso, ciascun concentrato di lavaggio deve essere diluito in proporzione 1:10 con acqua distillata o deionizzata (es. 30 ml di concentrato più 270 ml di acqua per piastra da analizzare).

Componente del diluente per piastra 2

Il componente del diluente per piastra 2 (D2) viene fornito sotto forma di composto liofilizzato. La soluzione si prepara aggiungendo 200 μ l di Diluente di ricostituzione (R), lasciandola riposare per un minuto circa e quindi miscelandola con delicatezza. Usare entro un'ora dalla preparazione.

Diluente per piastra di lavoro

Il diluente per piastra di lavoro 1 (D1) deve essere portato a 18–26°C. Preparare il diluente per la piastra di lavoro attraverso l'aggiunta di una parte di componente del diluente 2 (D2) a 25 parti di componente 1 (D1) miscelare con cura (e.g.: 120 μ l di D2 a 3,0 ml di D1 per piastra). Quando si testano campioni di cervello per ogni piastra si utilizzano circa 2,75 ml di diluente per piastra di lavoro. Quando si testano linfonodi o milza si utilizzano circa 5 ml di diluente per piastra di lavoro. Il diluente per piastra di lavoro deve essere preparato ed utilizzato nello stesso giorno.

Controlli negativo e positivo

I controlli negativo e positivo vengono forniti liofilizzati. Ricostituirli aggiungendo 1 ml di Diluente di ricostituzione. Assicurarsi che la soluzione riposi per almeno un minuto e poi miscelare vigorosamente. Usare entro due ore dalla preparazione. **NON DILUIRE I CONTROLLI NEGATIVO O POSITIVO NEL DILUENTE PER PIASTRA DI LAVORO.**

Soluzione anticorpale contenente anticorpi anti PrP coniugata con HRPO

La soluzione per anticorpi anti-PrP coniugata con perossidasi (HRPO) viene preparata diluendo l'appropriato coniugato concentrato (vedi la nota sotto) nel diluente del coniugato (CD) come indicato nell'etichetta (per esempio, una diluizione 1:100 richiede 120 μ l di concentrato coniugato per 12 ml di diluente coniugato). Consultare l'etichetta del concentrato coniugato per il fattore di diluizione corretto. Il coniugato diluito deve essere preparato e usato entro quattro ore.

NOTA IMPORTANTE: sono disponibili due coniugati concentrati da utilizzare per il test. Selezionate quello corretto per il tipo di tessuto che dovete testare:

- **Coniugato concentrato (CC)**—Utilizzate questo coniugato quando testate campioni di cervello di bovini e cervidi, campioni di linfonodi di piccoli ruminanti e cervidi e campioni di milza di piccoli ruminanti.

- **Coniugato concentrato per cervello di piccoli ruminanti (SRB-CC)**—Utilizzate questo coniugato quando testate tessuti cerebrali di pecora o capra.
- I pozzetti del siero di controllo negativo e positivo devono essere inclusi per ogni tipo di coniugato testato.

Soluzione di arresto acido

Il kit non contiene la soluzione di arresto necessaria per l'esecuzione dell'analisi. La soluzione di arresto (0,5–1,0 N HCl o 1,0 N H₂SO₄) può essere acquistata alle concentrazioni di lavoro o preparata utilizzando il concentrato.

Tutti i tre protocolli descritti di seguito richiedono che i reagenti siano a 18–26°C prima dell'uso. Prima di iniziare l'analisi, preparare le soluzioni da utilizzare nel dosaggio. Miscelare i reattivi agitando con delicatezza in senso circolare. Miscelare vigorosamente i controlli. I controlli (negativo e positivo) sono analizzati in duplicato. Utilizzare l'apposito coperchio per coprire la piastra per tutta la durata dell'analisi.

Conservazione dei reattivi preparati

Articolo	Volume di ricostituzione	Conservazione
N/P Controllo negativo/positivo	1 ml	2 ore a 18–26°C (6 mesi a -20°C)
D2 Diluente per piastra 2	200 µl	1 ora a 18–26°C (6 mesi a -20°C)
Diluente per piastra di lavoro	Non pert.	8 ore a 18–26°C
HRPO:soluzione anti-PrP	Non pert.	4 ore a 18–26°C
Soluzione di lavaggio 1–1X	Non pert.	1 settimana a 18–26°C
Soluzione di lavaggio 2–1X	Non pert.	1 settimana a 18–26°C

Conservare eventuali porzioni inutilizzate di piastre in un contenitore sigillato, contenente una sostanza igroscopica e al buio.

Procedura del test

Gli omogenati del campione sono preparati come descritto nel paragrafo riguardante il campionamento e la preparazione dei tessuti. **E' possibile utilizzare un processore robotico per campioni al posto del metodo manuale dal Passaggio 1 oppure dopo avere aggiunto i controlli e i campioni diluiti alla piastra di cattura dell'antigene (Passaggio 3).**

Importante: Durante l'incubazione dei reagenti coprire tutte le piastre di analisi con un coperchio adesivo o in plastica. Se le incubazioni del reagente vengono condotte in una cabina a biosicurezza, le piastre devono essere coperte con fogli adesivi

Protocolli per l'esame

Il test IDEXX BSE-scrapie EIA ha due protocolli approvati e convalidati per il tessuto cerebrale: Breve ed Ultra-Breve. I protocolli offrono una performance equivalente ma richiedono strumenti diversi per un minore tempo di esame. I protocolli sono descritti in dettaglio nella tabella a Pagina 46.

Nota: L'esame della milza e dei linfonodi di piccoli ruminanti è diverso dal protocollo Breve e Ultra-Breve ed è descritto nella tabella "Protocolli per l'esame" nella pagina seguente.

Diluizione di un campione in un diluente per piastra da lavoro

Preparare uno schema scritto della micropiastra di cattura e dell'antigene e della micropiastra di diluizione dove sono indicate le posizioni dei campioni. Riservare doppi pozzetti per i controlli negativo e positivo. Il diluente per piastra di lavoro può essere aggiunto alla piastra di diluizione prima o dopo il campione. Il rapporto è 30 µl di diluente per piastra di lavoro per 120 µl di campione omogeneato (per la milza e i linfonodi di piccoli ruminanti il rapporto è 50 µl di diluente per 100 µl di campione omogenato).

Sospendere nuovamente gli omogeneizzati tramite inversione e quindi pipettare attentamente il campione inserendo il puntale per il trasferimento dell'omogenato attraverso le sferette ed estraendo il campione dal fondo del tubo di disgregazione dei tessuti. Distribuire attentamente ciascun campione nella piastra di diluizione, avendo cura di evitare di creare bolle nell'omogeneizzato o di lasciare un eventuale residuo di omogenato sui margini del pozzetto della piastra di diluizione.

Dopo aver diluito l'omogenato, miscelare per bene i campioni avendo cura di evitare di creare bolle nell'omogenato. Il mescolamento può essere effettuato o con la micropipetta o con un agitatore per micropiastre. Se viene utilizzato l'agitatore sarà necessario ottimizzare la velocità ed il tempo di agitazione per assicurare un completo mescolamento, evitando lo spandimento del campione. Procedere con l'esame entro 2 ore.

Utilizzo dell'agitatore per micropiastre per protocolli di incubazione dei campioni (Breve ed Ultra-Breve)

Il protocollo Breve ed Ultra-Breve, utilizzato per l'analisi del tessuto cerebrale di bovino e piccoli ruminanti, prevede una rotazione bassa (200 100rpm) in un agitatore per micropiastre solo per l'incubazione del campione. L'agitatore per micropiastre dovrà creare un delicato movimento orizzontale e circolare. Sebbene il campione, all'interno di ogni pozzetto della micropiastro, si muoverà leggermente, questo potrebbe non essere apparentemente visibile. Il movimento non dovrà essere così vigoroso da far trascinare il campione dal bordo del pozzetto. I tempi di incubazione verranno ridotti in relazione all'incubazione del campione e del coniugato, come specificato nelle seguenti procedure. Il protocollo per la milza e i linfonodi di piccoli ruminanti richiede che tutte le incubazioni siano stazionarie.

Protocolli per l'esame

Procedura del test		Protocollo Breve	Protocollo Ultra-Breve	Protocollo milza/ linfonodi di piccoli ruminanti
Tipo di campione		Campioni di cervello di bovini, piccoli ruminanti e cervidi, e campioni di linfonodi di cervidi	Campioni di cervello di bovini e piccoli ruminanti	Campioni di linfonodi e di milza di piccoli ruminanti
Passaggio	Attività	18–26°C Tutti i passaggi	32–37°C ¹ : Solo per l'incubazione (passaggi 3, 5, 8, 10) 18–26°C: Tutti gli altri passaggi, inclusi i passaggi di lavaggio	18–26°C Tutti i passaggi
1	Aggiunta del campione alla piastra di diluizione	Tessuto cerebrale: 120 µl di campione con 30 µl di diluente per piastra da lavoro.		Linfonodi e milza: 100 µl di campione con 50 µl di diluente per piastra da lavoro.
		MESCOLARE BENE: consultare il capitolo "Diluizione di un campione in un diluente per piastra da lavoro".		
2	Aggiunta del campione alla piastra di cattura dell'antigene	Pipettare 100 µl di campione diluito sulla piastra per l'esame; mescolare i controlli, aggiungere 100 µl in duplicato; coprire la piastra con un coperchio per piastre.		
3	Incubazione della piastra di cattura	45–60 minuti; agitare lentamente a 200 ± 100 rpm	20–25 minuti; agitare lentamente a 200 ± 100 rpm	2–3 ore fermo
4	Lavare con soluzione 1 di lavaggio 1X	Lavare i pozzetti 6 volte con ~350 µl di soluzione 1 di lavaggio 1X		
5	Conditioner: Aggiunta/ Incubazione	Aggiungere 100 µl di tampone di condizionamento a ciascun pozzetto; coprire la piastra; incubare per 10 ± 1 minuti.		
6	Lavare con soluzione 2 di lavaggio 1X	Lavare i pozzetti 3 volte con ~350 µl di soluzione 2 di lavaggio 1X.		
7	Aggiunta del coniugato	Aggiungere 100 µl di coniugato diluito (per campioni di tessuto cerebrale di bovini e cervidi usare CC; per tessuto cerebrale di piccoli ruminanti usare SRBCC) e coprire la piastra con l'apposito coperchio.		
8	Incubazione del coniugato	45–50 minuti	25–30 minuti	60–75 minuti
9	Lavare con soluzione 2 di lavaggio 1X	Lavare i pozzetti 5 volte con ~350 µl di soluzione 2 di lavaggio 1X		
10	Aggiunta/ Incubazione del substrato	Aggiungere 100 µl di substrato a ciascun pozzetto; coprire la piastra; incubare per 15 ± 1 minuti. Evitare l'esposizione diretta alla luce. (non usare coperture adesive)		
11	Aggiunta della soluzione di arresto/ Lettura della piastra	Aggiungere 100 µl di soluzione di arresto acido; la piastra può essere tenuta fino ad un massimo di 30 minuti al buio prima della lettura della densità ottica (450 nm) con una lunghezza d'onda di riferimento di (A _{REF}) 620 nm–650 nm.		

1. L'incubazione a 32–37 °C viene eseguita posizionando la piastra di analisi in un incubatore preriscaldato a 32–37°C

Sommario delle procedure del test

	Tessuti cerebrali di bovino	Tessuto cerebrale di piccoli ruminanti	Tessuto linfonodale o di milza di piccoli ruminanti	Cervello e RPLN di cervidi
Campionamento e preparazione del tessuto:				
Siringua di raccolta dei campioni	Si	No	No	No
Tritare il tessuto	No	No	Si	Si (RPLN) No (cervello)
Procedura del test:				
Coniugato concentrato	CC	SRB-CC	CC	CC
Diluente per piastra di lavoro (Rapporto di diluizione con il campione)	30 µl/120 µl	30 µl/120 µl	50 µl/100 µl	30 µl/120 µl
Protocolli approvati	Breve & Ultra-Breve	Breve & Ultra-Breve	Milza & linfonodi di piccoli ruminanti	Breve
Valore limite (cutoff)	NC \bar{x} + 0,120	NC \bar{x} + 0,180	NC \bar{x} + 0,180	NC \bar{x} + 0,150
Protocollo opzionale di calore	Si	No	No	No

Interpretazione dei risultati

Affinché l'analisi possa essere considerata valida, la media del controllo negativo (NC \bar{x}) deve corrispondere ad un valore $A_{450} - A_{REF}$ inferiore a 0,150 e la media del controllo positivo (PC \bar{x}) deve avere un valore $A_{450} - A_{REF} \geq 0,400$.

Calcoli

Calcolo della media del controllo negativo (NC \bar{x}):

$$NC\bar{x} = \frac{A1 (A_{450} - A_{REF}) + B1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Calcolo della media del controllo positivo (PC \bar{x}):

$$PC\bar{x} = \frac{C1 (A_{450} - A_{REF}) + D1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Calcolo del valore limite:

Cutoff per bovini = NC \bar{x} + 0,120

Cutoff per piccoli ruminanti = NC \bar{x} + 0,180

Cutoff per cervidi = NC \bar{x} + 0,150

Nota: Vedere il passaggio 11 del protocollo di analisi per la definizione di A_{REF}

Risultati

L'interpretazione dei risultati si basa sull'assorbanza del campione. I campioni i cui valori $A_{450} - A_{REF}$ sono inferiori al valore limite sono considerati negativi dal test IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit. I campioni i cui valori $A_{450} - A_{REF}$ sono superiori o uguali al valore limite vengono classificati come inizialmente reattivi per PrP^{Sc} e l'omogenato devono essere rianalizzati in duplicato con il test IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit.

È possibile ripetere il test sul tessuto cerebrale bovino utilizzando l'iniziale omogenato tissutale o un omogenato preparato utilizzando il protocollo opzionale di calore per i bovini descritto di seguito. Se il campione analizzato in duplicato presenta valori ancora superiori o uguali al livello di cut off, allora il campione è da considerare positivo. Il campione è considerato negativo quando entrambi i valori dei replicati sono inferiori al valore limite del test. Nell'ambito della Unione Europea, tutti i 48 campioni inizialmente reattivi risultanti negativi con l'utilizzo del protocollo con trattamento termico possono essere considerati come negativi.

I campioni di cervello di piccoli ruminanti devono essere analizzati in duplicato utilizzando direttamente l'omogenato originale di tessuto cerebrale. NON trattare con calore gli omogenati di piccoli ruminanti o cervidi. Se il campione analizzato in duplicato presenta valori ancora superiori o uguali al livello di cut off, allora il campione è da considerare positivo. Il campione è considerato negativo quando entrambi i valori dei replicati sono inferiori al valore limite del test.

Negli stati membri dell'Unione Europea, tutti i campioni che diano risultati del test positivi devono essere inviati al Laboratorio di riferimento nazionale del proprio Paese per le encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) o al Laboratorio di riferimento dell'Unione Europea per la conferma.

Protocollo opzionale per il trattamento di calore per omogenati bovino inizialmente reattivi: (Il protocollo con il trattamento termico si applica solo su campioni bovini.)

Prelevare $230 \pm 20 \mu\text{l}$ dell'omogenato di tessuto inizialmente reattivo ed erogarlo in una provetta a fondo conico con tappo a vite da 1,5–2,0 ml. Collocare la provetta in un'unità di riscaldamento a secco preriscaldato a $70 \pm 2^\circ\text{C}$. Riscaldare la provetta per 10 ± 1 minuti e quindi inserire la provetta in un supporto aperto a $18\text{--}26^\circ\text{C}$ per almeno 20 minuti, per consentire il raffreddamento del campione. Il test dell'omogenato deve essere ripetuto entro due ore dal trattamento con calore, in duplicato, con il IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit.

Precauzioni

- Non esporre il substrato TMB a luce intensa o ad agenti ossidanti. Per versare il substrato TMB usare esclusivamente strumenti di plastica puliti oppure monouso.
- Usare cautela per evitare di contaminare i componenti del kit. Non usare i componenti oltre la data di scadenza e non interscambiare componenti appartenenti a lotti di kit diversi.
- Alcuni componenti del kit contengono azoturo di sodio come conservante (vedere la descrizione dei componenti del kit). Usare cautela per evitare di contaminare il coniugato anti-PrP-HRPO con le soluzioni contenenti azoturo di sodio.
- Conservare tutti i reattivi a $2\text{--}8^\circ\text{C}$. Portare i reattivi a $18\text{--}26^\circ\text{C}$ prima dell'uso e conservarli alle corrette temperature dopo l'uso (vedere la sezione Conservazione dei reagenti preparati).
- Usare vassoi separati per ciascun reattivo usato nell'analisi. Evitare la contaminazione crociata del substrato TMB con la soluzione di coniugato diluita. Non versare nuovamente nel flacone la soluzione TMB non utilizzata.
- Aggiungere i reagenti nelle piastre microtiter al massimo entro 5 minuti dal termine delle operazioni di lavaggio.

Informazioni relative alla sicurezza

- Tutto il personale deve ricevere le informazioni necessarie sui rischi connessi alla BSE e alla scrapie e deve conoscere le procedure di decontaminazione raccomandate. Le procedure di biosicurezza devono essere scrupolosamente seguite come previsto dalle norme nazionali sulla sicurezza.
- Il buffer di condizionamento contiene agenti caotropici; evitare il contatto con la pelle e le membrane mucose.
- Il substrato TMB può irritare la pelle e gli occhi. Evitare il contatto diretto.
- Il diluente 1 della piastra contiene detergenti in concentrazioni elevate; evitare il contatto diretto.
- Evitare l'uso di contenitori di vetro in laboratorio.

Appendice

Il campionamento e le procedure di test di laboratorio devono seguire il regolamento (CE) n. 999/2001 Annex X, Capitolo C, che si riferisce, per la raccolta dei campioni, all'ultima edizione del *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines* of the International Office of Epizootic Diseases (OIE), nel quale si legge che: "Il campione ideale per l'analisi immunologica deve essere prelevato dall'obex, o quanto più vicino ad esso possibile, ma non più distante di 1,5 cm dalla parte anteriore dell'obex."

Campionamento dell'obex nei bovini con il dispositivo di raccolta dei campioni IDEXX

IDEXX offre un dispositivo di raccolta dei campioni come metodo alternativo di estrazione dell'obex nei bovini. Questo dispositivo è una siringa di campionamento. Lo strumento per la raccolta del campione dell'IDEXX è stato approvato dal CRL. La guida in questa sezione riguardante il campionamento non vieta ulteriori informazioni o istruzioni che rispettino il regolamento (EC) 999/2001 e sue correzioni. Quando non è possibile identificare l'esatta area anatomica nella quale effettuare il campionamento, si consiglia di utilizzare la strumentazione come descritto nella sezione **Campionatura e preparazione dell'encefalo (Obex) di questo inserto**.

1. Il tronco cerebrale deve essere prelevato direttamente presso il mattatoio nel quale l'animale viene abbattuto, estratto attraverso il foro occipitale utilizzando uno strumento appropriato o l'apposito cucchiaio. Identificare la regione dell'obex del cervello indicata dalla presenza di una concavità a forma di V sulla superficie superiore del tronco encefalico (vedere il diagramma nel capitolo Campionamento e Preparazione). Quando non è possibile identificare l'esatta area anatomica nella quale effettuare il campionamento, si consiglia di utilizzare la strumentazione come descritto nel capitolo Campionatura e preparazione dell'encefalo (Obex) di questo inserto.
2. Posizionare il tronco cerebrale in modo tale che la sezione a V del tessuto sia rivolta verso l'alto. Introdurre l'apice della siringa per il prelevamento del campione nella parte finale del tronco encefalico, sul lato dove deve essere effettuato il campionamento, per circa 3 mm (abbastanza affinché sia posizionato in maniera sicura). Potrebbe essere necessario recidere il tessuto del midollo spinale in eccesso qualora la sua lunghezza dalla base del midollo spinale all'apice della sezione a V superi i 3-4 cm.
3. Tenere saldamente lo stantuffo della siringa. Con il dito indice, premere il cilindro esterno della siringa nel tronco cerebrale, facendo attenzione a non permettere alla parte dello stantuffo di spostarsi in nessuna direzione. Fare riferimento alla Figura 2 per eseguire il corretto allineamento della siringa e centrare esattamente i siti di campionamento dell'obex. Mentre il cilindro della siringa viene spinto all'interno del campione, esso deve rimanere all'interno del lato selezionato del tronco cerebrale, al fine di prevenire eventuali danni al lato opposto. Per eseguire i test diagnostici di conferma è necessario disporre di una emisezione del tronco cerebrale completa con l'obex intatto.
4. Il cilindro della siringa si sposterà attraverso il tronco cerebrale e dentro la regione dell'obex. È necessario assicurarsi che la siringa abbia raggiunto la porzione superiore dell'area di campionamento (vedi Figura 1). Il cilindro dovrebbe ora contenere il campione dell'obex.

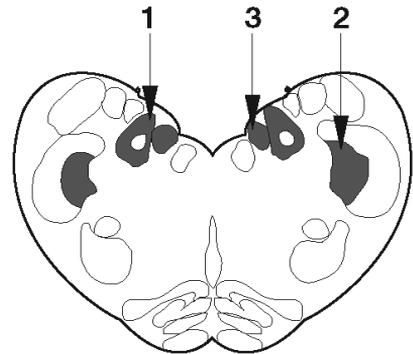


Figura 2. Sezione trasversale del tronco encefalico bovino a livello dell'obex, nel quale si riconoscono i punti di prelievo dei campioni. 1) tratto solitario, 2) nucleo del nervo trigemino, 3) nucleo motore dorsale del nervo vago. (Diagramma estratto dal Manuale OIE sui Test Diagnostici e i Vaccini, Capitolo 2.4.6.)

NOTA: Il campione che si desidera acquisire (es.: l'area dell'obex) è sulla punta del cilindro.

5. Eseguire una torsione del cilindro per isolare il campione ed estrarre molto attentamente la siringa dal tessuto.
6. Se una porzione significativa del tessuto sta cadendo dalla fine della siringa trascinarla nel cilindro estraendo il pistone con delicatezza. La siringa può ora essere manipolata per rimuovere l'aria al puntale e chiudere eventuali spazi vuoti tra le parti di campione.

Nota: Si noti che all'interno della siringa sono presenti una serie di "tacche" o scanalature distanziate tra loro in modo regolare, rilevabili al tatto man mano che lo stantuffo scorre all'interno della siringa. Lo spazio compreso tra le tacche permette di misurare con accuratezza il volume del campione prelevato.

7. Quando il tessuto è stato acquisito all'interno della siringa, è necessario premere lo stantuffo per allinearli con la tacca più vicina. Il campione di tessuto non deve presentare interstizi vuoti tra lo stantuffo e la punta della siringa. A questo scopo, una piccola quantità di tessuto prelevato può essere fatto fuoriuscire dalla punta della siringa.
8. Pulite ogni residuo più piccolo di tessuto dalla superficie piatta della navicella per la pesata. Evitare di premere lo stantuffo durante il processo in quanto il campione potrebbe essere espulso oppure eccessivamente compresso; entrambe le manovre sono errate.
9. Mantenere verticale il tubo di disaggregazione in una mano e la siringa nell'altra, con il puntale della siringa introdotto leggermente all'interno del tubo di disaggregazione. Iniettare un quantitativo misurato di tessuto obex all'interno della provetta, facendo scorrere lo stantuffo di una tacca e fermandovi al raggiungimento della tacca successiva. Il volume tra le due tacche corrisponde a 150 μ l; all'interno della provetta devono essere iniettati, in totale, 300 μ l (ossia un volume equivalente a 0,30 g \pm 0,05 g di tessuto).
10. Coprire il tubo e procedere alla fase di omogenizzazione del campione.

Il personale che esegue campionamento di obex usando lo strumento di prelievo IDEXX deve essere addestrato molto bene al suo utilizzo al fine di garantire il prelievo nell'area di tronco cerebrale più adeguata. Ogni tecnico deve inoltre monitorare l'accuratezza del campione prelevato, eseguendo dei controlli periodici sul peso del campione stesso. Deve esistere un programma di azioni correttive da attuare qualora i risultati riscontrati non rientrino nei criteri di accettabilità preventivamente definiti. La siringa di prelievo di IDEXX è una siringa monouso, e pertanto deve essere eliminata al termine di ogni prelievo al fine di evitare eventuali contaminazioni trasversali.

Limitazione di responsabilità

Nei limiti massimi consentiti dalla legge, in nessuna circostanza la IDEXX, o i suoi concessionari di licenza, saranno responsabili nei vostri confronti o verso altre persone, per la perdita di profitto o d'uso, per danni speciali, casuali, extracontrattuali, indiretti, punitivi, risarcimenti esemplari o multipli, compresi, a solo titolo d'esempio, la perdita di avviamento, dati o attrezzature, o l'interruzione dell'attività di affari, derivanti dalla produzione, vendita, fornitura o uso dei nostri prodotti o servizi, o dalla loro mancata o ritardata consegna.

Assistenza tecnica:

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

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

*HerdChek è un marchio di proprietà di, e/o registrato da, IDEXX Laboratories, Inc. o di suoi associate e protetto negli Stati Uniti e/o in altri paesi. Tutti gli altri nomi e marchi di aziende e prodotti appartengono ai rispettivi proprietari. Domanda di brevetto pendente.

Informazioni sui brevetti: idexx.com/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Tutti i diritti sono riservati.

Kit para Detecção do Antígeno da Encefalopatia Espongiforme Bovina–Scrapie, EIA

Para uso exclusivamente veterinário.

Versão Português

Descrição Geral

O kit HerdChek® BSE-Scrapie para detecção de antígeno da encefalopatia espongiforme bovina (EEB) da IDEXX é um imunoenensaio enzimático (enzyme immunoassay, EIA) de captura de antígeno para a detecção da proteína priônica de conformação anormal (prion protein, PrP^{Sc}) nos tecidos cerebrais pós-morte (preferencialmente do óbex) de bovinos, pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) e cervídeos afetados pela EEB, scrapie ou doença emaciante crônica (chronic wasting disease, CWD). Para aplicações em pequenos ruminantes, o teste também detectará a PrP^{Sc} em nódulos linfáticos ou tecidos esplênicos; para cervídeos, o teste também detectará PrP^{Sc} nos nódulos linfáticos retrofaríngeos (retropharyngeal lymph nodes, RPLN). O teste foi concebido para identificar rapidamente amostras que contenham PrP^{Sc} associados a doença com manipulação mínima da amostra, e pode ser automatizado para aplicações de alto rendimento. Este kit é de uso exclusivamente veterinário.

Para os Estados Membros Europeus: Este é um teste rápido aprovado pela UE para detecção *in vitro* de PrP^{Sc} relacionada a EEB e paraplexia enzoótica em bovinos e pequenos ruminantes. Esse teste também pode ser usado na UE para teste rápido de cervídeos para encefalopatia espongiforme transmissível (EET). A validação deste kit foi realizada utilizando amostras de amígdala, nódulo linfático retrofaríngeo e tronco cerebral de cervídeos (*Cervus canadensis*).

O fabricante do teste rápido deve ter implementado um sistema de garantia de qualidade, de acordo com o Laboratório de Referência União Europeia (EURL), de forma a assegurar que o desempenho do teste não seja alterado. O fabricante tem de fornecer o protocolo de teste ao EURL. As ferramentas de amostragem e as modificações ao teste rápido ou ao protocolo de teste (incluindo a amostragem) apenas podem ser efetuadas mediante notificação prévia ao EURL, e desde que o EURL considere que a modificação não reduza a sensibilidade, especificidade ou confiabilidade do teste rápido. Essa conclusão deve ser comunicada à Comissão e aos laboratórios nacionais de referência (Com Base no Regulamento (EC) Nº 956/2010, Regulamento modificado (EC) No 999/2001).

Descrição e Princípios

Este kit emprega um método exclusivo, propriedade da Microsens Biotechnologies (Londres, Reino Unido; patente pendente), que permite a detecção de príons anormais. Um ligante específico de PrP^{Sc} é imobilizado na superfície da placa de captura de antígeno. As amostras de teste são preparadas homogenizando os tecidos e diluindo a amostra com diluente para placa de trabalho. Depois da adição da amostra à placa, a proteína com alteração da forma tridimensional une-se, com grande afinidade, ao ligante imobilizado. As placas são lavadas para remover materiais não ligados, incluindo a proteína PrP de conformação anormal. Após a incubação com solução tampão de condicionamento, o antígeno capturado é, então, detectado, utilizando um anticorpo específico para PrP, que foi conjugado para peroxidase (HRPO). A placa é lavada para remover o conjugado não ligado e é adicionado um substrato de peroxidase. O desenvolvimento da cor está relacionado com as quantidades relativas de PrP^{Sc} capturada pelo ligante imobilizado na cavidade da placa de micro titulação.

A interpretação dos resultados é baseada na absorbância da amostra. Uma amostra cujo $A_{450} - A_{REF}$ seja inferior ao valor “cutoff” é considerada negativa pelo Kit HerdChek BSE-Scrapie da IDEXX. As amostras cujo $A_{450} - A_{REF}$ seja igual ou superior ao valor “cutoff”, são classificadas como positivas para a PrP^{Sc}. Um ensaio de confirmação, como de imunohistoquímica, é necessário para todos os resultados positivos do teste.

Componentes do Kit

Conservar todos os componentes a 2–8°C.

Item		460 testes
A	Placas de captura de antígeno	5 placas
N	Controle negativo—Não-reativo a placa de captura de antígeno; conservado com azida de sódio	5 x 1 ml
P	Controle positivo—Não infeccioso, reativo a	5 x 1 ml

Kit de teste para detecção do antígeno da encefalopatia espongiforme bovina–scrapie, EIA

	placa de captura de antígeno; conservado com azida de sódio	
D1	Componente 1 de diluição para placas; conservado com azida de sódio	20 ml
D2	Componente 2 de diluição para placas	5 x 200 µl
R	Diluyente de reconstituição	20 ml
CB	Solução Tampão (buffer) de condicionamento; conservada com azida de sódio	60 ml
CC	Solução concentrada de conjugado; conservada com Bronidox L e metilisotiazolona	300 µl
SRB-CC	Solução concentrada de conjugado para cérebro de pequeno ruminante; conservada com Bronidox L e metilisotiazolona	300 µl
CD	Diluyente tampão de conjugado com detergentes e estabilizadores de proteínas; conservado com gentamicina e Proclin	60 ml
W1	Solução 1 de lavagem (concentrada 10x); conservada em azida de sódio	450 ml
W2	Solução 2 de lavagem (concentrada 10x); conservada com gentamicina	450 ml
T	Substrato TMB (Tetrametilbenzideno)	60 ml

NOTA: Ver a tabela no final do inserte para uma descrição dos símbolos utilizados no inserte e nos rótulos deste kit.

Ver no final do protocolo para os perigos e medidas de prevenção relacionados com os reagentes.

Materiais e Equipamentos Necessários (Não Fornecido)

- Pipetas de precisão ou pipetas multicanaís adequadas para conter de 25 a 200 µl. Os volumes de reagentes indicados no Procedimento de Teste requerem uma precisão inferior ou igual a 5%.
- Provetas graduadas para soluções de lavagem
- Coberturas para placas em plástico rígido ou adesivas, e bandejas para manusear os reagentes
- Instrumentos descartáveis de recolha e dissecação de amostras, ou dispositivo de colheita de amostras
- Leitora de placas para 96 cavidades (equipado com filtros 450 nm e 620–650 nm) e lavadora
- Instrumento FastPrep* (FP120A, FP220A), FastPrep*-24, Precess 48*, Precess 24* ou Precellys 24*
- Kit de acessórios-placas de diluição, tubos de disrupção de tecidos com grânulos, pontas de pipeta de transferência de homogeneizado de comprimento alargado e tampas de placas adesivas (disponível na IDEXX)
- Equipamento de proteção pessoal: luvas de segurança, batas, luvas descartáveis, coberturas para sapatos, redes para cabelo, máscaras faciais
- Solução de paragem 0,5–1,0 N HCl ou 1,0 N H₂SO₄
- Hipoclorito de sódio (lixívia comercial), 1N NaOH e 1N HCl, água desionizada
- Opcional—processador robótico de amostras—opcional, com precisão de pipetagem de ≤2,5%, conforme medido por análise CV (Tecan, por exemplo)
- Opcional—agitador de placas de micro titulação—opcional (por ex., IKA MTS 2/4)
- Opcional—incubador de placas com capacidade para manter uma temperatura de 32–37°C e um fluxo de ar mínimo
- Opcional—bloco de aquecimento seco para tubos de microcentrífuga (tipo “*ependorf*”) de 1,5–2 ml (capaz de manter a temperatura de 70°C)
- Opcional—tubos cônicos de 1,5–2 ml sem borda e com tampa de rosca

Amostragem de Tecidos e Preparação

A. Tecido cerebral de bovinos e pequenos ruminantes

1. Amostragem e testes de laboratório devem seguir o regulamento (CE) n.º 999/2001, anexo X, capítulo C, que se refere em termos de coleta de amostras para a última edição do Manual de Normas para Testes de Diagnóstico e Vacinas do Instituto Internacional de doenças e Epizootias (OIE) afirmando: “A amostra preferida para imunoensaio deverá ser o óbex, ou mais próximo possível do óbex, mas não mais do que 1,5 cm anterior ao óbex”. Recolher 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de tecido nervoso do lado esquerdo ou direito do tronco cerebral ao nível do óbex (sempre que possível) com instrumentos de dissecação, e pesando a amostra em balança de precisão para garantir a quantidade correta. Em alternativa, o dispositivo de colheita de amostras IDEXX pode ser utilizado para colheita de óbex de bovinos, conforme descrito no Apêndice. O pessoal que realiza a colheita do óbex deve ter formação sobre o método de amostragem.

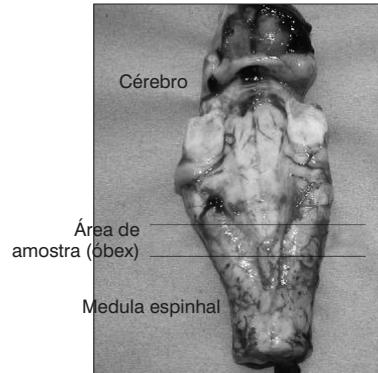


Figura 1. Tronco cerebral bovino.

© British Crown Copyright (Fevereiro 2005), reproduzido com a autorização e cortesia da Agência de Laboratórios Veterinários.

A figura à direita indica a área correta de amostragem.

NOTA: Após a colheita de amostras, uma hemisseção completa do tronco cerebral com uma região intacta do óbex e cerebelo (se incluído) deve continuar disponível para testes de confirmação.

2. Colocar o tecido num tubo de ruptura de tecidos e fechar bem. Os tubos são fornecidos com rebordos de cerâmica e tampão.
3. Quatro dispositivos de ruptura de tecidos foram validados para utilizar com o Kit HerdChek BSE-Scrapie da IDEXX. Disponha os tubos no instrumento e proceda à disrupção, conforme indicado para o instrumento aplicável. Se a trituração for insuficiente, repita um ciclo.
 - Programa do instrumento FastPrep*: Triturar as amostras durante 40 segundos à velocidade máxima (6,5 m/s). Se for necessário um segundo ciclo, o instrumento deve arrefecer durante 5 a 10 minutos entre ciclos.
 - Programa para os instrumentos Precess 48*, Precess 24* and Precellys 24*: Triture as amostras 2 vezes por 20 a 25 segundos a 650nm, com 5 segundos de intervalo entre os ciclos.
4. Os homogeneizados (frescos ou descongelados) podem ser conservados à 18–26°C até 4 horas antes de iniciar o ensaio.

O número de amostras a serem preparadas numa única sessão é flexível. Os homogeneizados podem ser conservados até 24 horas a 2–8°C ou mantidos a $\leq -20^\circ\text{C}$ até 6 meses. Os homogeneizados congelados devem ser descongelados e completamente misturados por inversão antes da utilização. As amostras de tecidos podem ser conservadas a -80°C .

B. Nódulos linfáticos ou tecido esplênico de pequenos ruminantes

1. Recolher 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de tecido do nódulo linfático ou tecido esplênico. No caso dos nódulos linfáticos, o tecido deve ser preparado para amostra de forma a maximizar a presença de células centro germinais. Cortar o tecido em 8–10 pequenas partes.
2. Proceder com o processamento e armazenamento da amostra, conforme descrito para o tecido cerebral.

NOTA: Linfonodo ou tecido do baço não podem ser utilizados no contexto da amostragem oficial e testes no âmbito do Regulamento (CE) n.º 999/2001.

C. Tecido cerebral e do nódulo linfático de cervídeos

1. Prepare os tubos de ruptura de tecidos retirando 0,2 ml de solução de cada tubo.
2. Colete 0,30 g ($\pm 0,05$ g) de tecido do nódulo linfático retrofaríngeo ou do cérebro (preferencialmente do óbex). Tecidos de cérebro e linfonodos devem ser testados individualmente. Para os nódulos linfáticos, o tecido deve ser amostrado para maximizar a presença de células centrais germinativas. Corte o tecido do nódulo linfático em 8-10 pedaços pequenos.

Por favor, note que na Alemanha ambos os testes individuais de cérebro e linfonodos devem ser realizados. Esta decisão segue as diretrizes europeias. (TSE EU Reference Laboratory Guidelines for the detection of Chronic Wasting disease in cervids, <https://science.via.gov.uk/tse-lab-net/documents/cwd-guidelines.pdf> e Scientific opinion on chronic wasting disease (II), EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), EFSA Journal 2018;16(1):5132. 59 pp.).

3. Coloque o tecido em um tubo de ruptura de tecidos e tampe firmemente.
4. Coloque os tubos no instrumento de ruptura de tecidos e desfaça conforme indicado para o instrumento aplicável. Se a trituração não for suficiente, repita um ciclo.

Programa do instrumento Precess 48*, Precess 24* e Precellys 24*: Triture as amostras por 30 segundos a 6500 rpm. Deixe o instrumento repousar por cinco minutos. Repita a trituração por mais 30 segundos a 6500 rpm. Se a trituração não for suficiente por inspeção visual, repita um ciclo.

Programa do instrumento FastPrep*: Triture as amostras por 30 segundos na velocidade máxima (6,5 m/s). Deixe o instrumento repousar por cinco minutos. Repita a trituração por mais 30 segundos na velocidade máxima. Se a trituração não for suficiente por inspeção visual, repita um ciclo.

Preparação de Reagentes

Soluções de Lavagem (Solução 1 de Lavagem, Solução 2 de Lavagem)

Os concentrados de solução de lavagem devem ser conservados à 18–26°C e devem ser misturados para dissolver completamente quaisquer sais precipitados. Cada concentrado de lavagem deve ser diluído na proporção de 1:10 em água destilada ou deionizada antes da utilização (por ex., 40 ml de concentrado mais 360 ml de água por placa a ser avaliada).

Componente 2 de Diluição para Placas

O componente 2 de diluição para placas (D2) é fornecido como um composto liofilizado. A solução é preparada adicionando 200 μ l de Diluente de reconstituição (R), deixando repousar durante aproximadamente 1 minuto e misturando suavemente. Utilizar no prazo de 1 hora após preparação.

Diluente de Placa de Trabalho

O componente 1 de diluição para placas (D1) deve ser mantido à 18–26°C. Preparar a placa de trabalho adicionando uma parte de componente 2 de diluição para placas (D2, preparado como indicado acima) a 25 partes de componente 1 de diluição para placas (D1) e misturar bem (por exemplo 120 μ l D2 a 3,0 ml D1 por placa). É necessário aproximadamente 2,75 ml de diluente para placa de trabalho, por placa, ao testar amostras de tecido cerebral. Os testes com nódulos linfáticos ou tecidos esplênicos requerem aproximadamente 5 ml de diluente de placa de trabalho por placa. O diluente para placa de trabalho deve ser preparado e usado no mesmo dia.

Controles Negativos e Positivos

Os controles negativos e positivos são fornecidos liofilizados. Reconstituir cada controle, adicionando 1 ml de tampão de reconstituição. Deixar a solução repousar durante aproximadamente 1 minuto e depois misturar vigorosamente. Utilizar no prazo de 2 horas após preparação. **NÃO DILUIR OS CONTROLES NEGATIVOS OU POSITIVOS EM DILUENTE DE PLACA DE TRABALHO.**

Soluções de Anticorpos Anti-PrP Conjugado com HRPO

As soluções de anticorpos anti-PrP conjugado com HRPO são preparadas diluindo a solução concentrada de conjugado adequada (ver nota abaixo) no diluente tampão de conjugado (CD), conforme indicado na etiqueta (por exemplo, uma diluição de 1:100 requer 120 μ l de solução concentrada de conjugado para 12 ml de diluente tampão de conjugado). Consultar a etiqueta da solução concentrada de conjugado para obter o fator de diluição correto. A solução de conjugado diluída deve ser preparada e utilizada dentro de 4 horas.

NOTA IMPORTANTE: Existem duas soluções concentradas de conjugado disponíveis para utilizar com este teste. Selecionar a adequada para o tecido a ser testado:

- **Solução concentrada de conjugado (CC)**—Use este conjugado ao testar amostras cerebrais de bovinos e cervídeos, amostras de nódulos linfáticos de pequenos ruminantes e de cervídeos e amostras de baço de pequenos ruminantes.

- **Solução concentrada de conjugado para pequenos ruminantes (SRB-CC)**— Utilizar esta solução de conjugado ao testar tecidos cerebrais de ovinos ou caprinos.
- As cavidades dos controles negativos e positivos devem ser incluídas para cada tipo de conjugado testado.

Solução ácida de Interrupção

A solução de Interrupção de teste não é fornecida com o kit de teste. A solução de interrupção (0,5–1,0 N HCl ou 1,0 N H₂SO₄) pode ser adquirida numa concentração de trabalho ou preparada a partir de uma solução concentrada.

Os três protocolos abaixo descritos requerem que os reagentes se encontrem à 18–26°C antes da utilização. Antes de iniciar o teste, preparar as soluções a serem utilizadas no ensaio. Misturar todos os reagentes suavemente. Os controles (negativo e positivo) devem misturar-se vigorosamente e devem ser testados em duplicata. Deve ser utilizada uma cobertura na placa, durante todo o ensaio.

Armazenamento dos Reagentes Preparados

Item	Volume de Reconstituição	Tempo de Armazenamento
N/P Controle Negativo/Positivo	1 ml	2 horas a 18–26°C (6 meses a -20°C)
D2 Componente 2 de diluição para placas	200 µl	1 hora a 18–26°C (6 meses a -20°C)
Diluinte de placa de trabalho	NA*	8 horas a 18–26°C
HRPO: soluções anti-PrP	NA*	4 horas a 18–26°C
Solução 1 de lavagem x1	NA*	1 semana a 18–26°C
Solução 2 de lavagem x1	NA*	1 semana a 18–26°C

Conservar qualquer porção não utilizada de placas num recipiente hermético, isento de humidade e ao abrigo da luz.

Procedimento de Ensaio

Os homogeneizados das amostras são preparados conforme descrito na seção de Amostragem e Preparação de Tecidos. **É possível utilizar um processador de amostras automatizado em vez do método manual desde o Passo 1 ou assim que os controles e as amostras diluídas tenham sido adicionados à placa de captura do antígeno (Passo 3).**

Importante: Cobrir cada placa de ensaio com uma cobertura de plástico rígido ou adesiva durante todas as incubações de reagentes. Se as incubações de reagentes forem conduzidas num gabinete de biossegurança, as placas devem ser cobertas por folhas adesivas.

Protocolos do Ensaio

O kit HerdChek BSE-Scrapie dispõe de dois protocolos aprovados para tecido cerebral: Curto e Ultra-curto. Os protocolos apresentam um desempenho equivalente, mas têm requisitos de equipamentos diferentes para um menor tempo de ensaio. Os protocolos encontram-se descritos detalhadamente abaixo.

Nota: O protocolo para teste de baço e linfonodo de pequenos ruminantes é diferente dependendo se for protocolo Curto ou Ultra-curto e está descrito na tabela de Protocolo de Ensaio abaixo.

Diluição da amostra em Diluinte de Placa de Trabalho

Utilizar uma folha de trabalho para indicar as posições das amostras na placa de captura de antígeno e na placa de diluição. Reservar cavidades em duplicata para os controles do kit. O diluinte da placa de trabalho pode adicionar-se antes ou depois da amostra. A razão é de 30 µl de diluinte da placa de trabalho para cada 120 µl de homogeneizado da amostra (a razão para o baço e nódulos linfáticos de pequenos ruminantes é de 50 µl de diluinte para cada 100 µl de homogeneizado da amostra).

Suspender novamente os homogeneizados por inversão e pipetar cuidadosamente a amostra, introduzindo uma ponta de pipeta de transferência de homogeneizados através dos rebordos e extraíndo a amostra a partir do tubo de ruptura de tecidos. Dispensar cuidadosamente cada amostra na placa de diluição, evitando que se formem bolhas no homogeneizados ou deixar qualquer resíduo de homogeneizado nas extremidades da cavidade da placa de diluição.

* NA = Não aplicável

Após homogeneizado estar diluído, misturar bem as amostras, tendo o cuidado de evitar a formação de bolhas. A mistura pode ser feita numa pipeta ou num agitador de placas. Se for utilizado um agitador, é necessário otimizar a velocidade e o tempo para garantir uma mistura completa sem respingar as amostras. Prosseguir com o ensaio durante as duas horas seguintes.

Utilização do agitador de placas para incubação da amostra (protocolos Curto e Ultra-curto)

O protocolo Curto e Ultra-curto, usado para teste de cérebro de bovinos e pequenos ruminantes, envolve uma rotação lenta (200+-100rpm) em plataforma de agitador de placa somente para o passo de incubação de amostra. O agitador de placa deve estar em movimento circular levemente horizontal. Apesar da amostra se mover suavemente em cada orifício da placa, isso poderá não ser visualmente aparente. O movimento não pode ser forte ao ponto de mover a amostra para os lados dos orifícios. Os tempos de incubação diminuam de acordo com as incubações de amostra e conjugado, conforme descrição na tabela seguinte. O protocolo de baço/linfonodo de pequenos ruminantes requer que todas as incubações sejam fixas.

Protocolos do Ensaio

Procedimento de Teste		Protocolo Curto	Protocolo Ultra-curto	Protocolo baço / nódulos linfáticos de pequenos ruminantes
Tipo de amostra		Cérebros de bovinos, pequenos ruminantes e cervídeos, nódulos linfáticos de cervídeos	Cérebros de bovinos e pequenos ruminantes	Nódulos linfáticos e baço de pequenos ruminantes
Passo	Atividade	18–26°C Todos os procedimentos	32–37°C ¹ : Apenas incubações (passos 3,5,8,10) 18–26°C: Todos os demais procedimentos incluindo procedimentos de lavagem	18–26°C Todos os procedimentos
1	Adição de amostra à placa de diluição	Tecido cerebral – 120 µl de amostra com 30 µl de diluente da placa de trabalho.		Linfonodo e baço – 100 µl de amostra com 50µl de diluente da placa de trabalho.
		Homogeneize bem – veja “Diluição da amostra no Diluente da Placa de Trabalho”.		
2	Adição de amostra na placa de recolha de antigénio	Pipetar 100 µl de amostra diluída na placa de ensaio; misturar os controlos, adicionar 100 µl em duplicado; cobrir a placa com uma cobertura de placa.		
3	Incubação da placa de captura	45–60 min.; agitação lenta 200 ±100 rpm	20–25 min.; agitação lenta 200 ±100 rpm	2–3 horas imóvel
4	Lavagem com solução de lavagem 1 (dil)	Lavar os poços 6 vezes Utilizando ~350 µl por poço, em cada lavagem, com solução de lavagem 1 (dil)		
5	Condicionador: Adição/Incubação	Adicionar 100 µl de solução tampão de condicionamento em cada poço; tapar a placa; incubar 10 ± 1 min.		
6	Lavagem com solução de lavagem 2 (dil)	Lavar os poços 3 vezes Utilizando ~350 µl por poço, em cada lavagem, com solução de lavagem 2 (dil).		
7	Adição de Conjugado	Adicionar 100 µl de solução de conjugado diluída (cérebro de bovino e amostras de cervídeos utilizam CC, cérebro de pequenos ruminantes utiliza SRB-CC) e a placa com a respectiva cobertura.		

8	Incubação de Conjugado	45–50 min.	25–30 min.	60–75 min.
9	Lavagem com solução de lavagem 2 (dil).	Lavar os poços 5 vezes Utilizando ~350 µl por poço, em cada lavagem, com solução de lavagem 2 (dil).		
10	Adição/Incubação de Substrato	Adicionar 100 µl de substrato em cada poço; tapar a placa; incubar 15 ± 1 min. ao abrigo da luz solar direta (não utilizar cobertura adesiva).		
11	Parar adição/Ler placa	Adicionar 100 µl de solução de interrupção ácida; a placa pode ser mantida no escuro até 30 min. antes da leitura da densidade óptica (450 nm), utilizando um comprimento de onda de referência de (A_{REF}) 620 nm a 650 nm.		

1. A incubação a 32–37°C significa inserir a placa de ensaio num incubador pré-aquecido a 32–37°C

Revisão do formato dos testes

	Cérebro bovino	Cérebro de pequenos ruminantes	Nódulos linfáticos ou tecido esplênico pequenos ruminantes	Cérebro e RPLN de cervídeos
Prep. da amostra:				
Seringa de Amostras de tecido	Sim	Não	Não	Não
Pré-homogeneizado do tecido (pré-homogeneização)	Não	Não	Sim	Sim (RPLN) Não (Cérebro)
Condições do teste:				
Concentrado de Conjugado	CC	SRB-CC	CC	CC
Dilúente da placa de trabalho (Proporção Dilúente/Homogeneizado)	30 µl/120 µl	30 µl/120 µl	50 µl/100 µl	30 µl/120 µl
Protocolos aprovados	Curto e Ultra-curto	Curto e Ultra-curto	baço & nódulos linfáticos de pequenos ruminantes	Curto
Ponto de corte (cut-off) do Teste	$NC\bar{x} + 0,120$	$NC\bar{x} + 0,180$	$NC\bar{x} + 0,180$	$NC\bar{x} + 0,150$
tratamento térmico opcional	Sim	Não	Não	Não

Interpretação de Resultados

Para que um ensaio seja válido, a média de controle negativo ($NC\bar{x}$) deve funcionar com um valor de $A_{450} - A_{REF}$ inferior a 0,150, e a média de controle positivo ($PC\bar{x}$) deve ter um valor maior ou igual a $A_{450} - A_{REF} \geq 0,400$.

Cálculos

Cálculo da média de controle negativo ($NC\bar{x}$):

$$NC\bar{x} = \frac{A1 (A_{450} - A_{REF}) + B1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Cálculo da média de controle positivo ($PC\bar{x}$):

$$PC\bar{x} = \frac{C1 (A_{450} - A_{REF}) + D1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Cálculo do valor “cutoff”:

Ponto de corte (“cutoff”) bovino = $NC\bar{x} + 0,120$

Ponto de corte (“cutoff”) pequenos ruminantes = $NC\bar{x} + 0,180$

Corte de cervídeos = $NC\bar{x} + 0,150$

NOTA: Consultar o passo 11 do procedimento de teste, em Protocolos do Ensaio, para a definição de A_{REF}

Resultados

A interpretação dos resultados baseia-se na absorbância da amostra. As amostras cujos valores de $A_{450} - A_{REF}$ são inferiores ao valor "cutoff" são consideradas negativas pelo Kit de Teste de Antígeno para o kit HerdChek BSE-Scrapie. As amostras cujos valores $A_{450} - A_{REF}$ são iguais ou superiores ao valor "cutoff" são classificadas como inicialmente reativas para PrP^{Sc}, e o homogeneizado deve ser novamente testado em duplicata com o Kit de Teste de Antígeno para EEB-Scrapie IDEXX HerdChek.

A repetição dos testes em cérebros de bovinos pode ser feita a partir do homogeneizado de tecido original, ou a partir do homogeneizado preparado usando o protocolo de tratamento térmico opcional para bovinos, descrito a seguir. Se algum dos valores repetidos for igual ou superior ao valor "cutoff" do teste, a amostra é considerada positiva. A amostra é considerada negativa quando ambas as repetições do novo teste forem inferiores ao valor "cutoff" do teste. Dentro da UE, todas as amostras inicialmente reativas que se apresentarem negativas após o protocolo de tratamento térmico devem ser reportadas como negativas.

As amostras de pequenos ruminantes e cervídeos devem ser testadas novamente em duplicado diretamente do homogeneizado de tecido original - NÃO realize o tratamento térmico de homogeneizados de pequenos ruminantes ou de cervídeos. Se algum dos valores repetidos for igual ou superior ao valor "cutoff" do teste, a amostra é considerada positiva. A amostra é considerada negativa quando ambas as repetições do novo teste forem inferiores ao valor "cutoff" do teste.

Nos Estados-Membros da UE, todas as amostras positivas do teste rápido devem ser enviadas ao Laboratório de Referência Nacional de seus países para EETs ou ao Laboratório de Referência da União Européia para testes de confirmação.

Protocolo de tratamento térmico opcional para homogeneizados de bovinos inicialmente reativos: (O protocolo de tratamento térmico aplica-se apenas para amostras de bovinos.)

Remover $230 \pm 20 \mu\text{l}$ do homogeneizado de tecido inicialmente reativo e colocar num frasco de fundo cônico de 1,5-2,0 ml com tampa de rosca. Colocar o frasco num bloco de aquecimento seco pré-aquecido a $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Aquecer o tubo durante 10 ± 1 min e depois transferir o tubo para um suporte aberto à $18-26^{\circ}\text{C}$ e aguardar um mínimo 20 minutos para permitir o arrefecimento da amostra. O homogeneizado deve ser novamente testado dentro de um período máximo de duas horas após o tratamento térmico, em duplicata, no Kit HerdChek BSE-Scrapie da IDEXX.

Precauções

- Não exponha o substrato Tetrametilbenzideno (TMB) à luz forte ou agentes oxidantes. Use um recipiente limpo ou descartável de plástico para eliminar o TMB.
- Deve ser tomado cuidado para evitar a contaminação dos componentes do kit. Não use componentes que já tenham passado o prazo de validade e não misture componentes de lotes de kits diferentes.
- Alguns componentes de kits contêm azida de sódio como conservante (ver a descrição dos componentes do kit). Deve ser tomado cuidado para evitar a contaminação do conjugado anti-PrP-HRPO com soluções que contenham azida.
- Armazenar todos os reagentes a $2-8^{\circ}\text{C}$. Colocar os reagentes à $18-26^{\circ}\text{C}$ antes da utilização e voltar a armazenar correctamente à temperatura de armazenamento após a utilização (ver Armazenamento dos Reagentes Preparados).
- Usar dispositivos diferentes para distribuir cada reagente utilizado no ensaio. Evitar a contaminação cruzada do substrato TMB com a solução de conjugado diluída. Não voltar a colocar no frasco original, solução de TMB não utilizada.
- Não deixar as placas de micro-titulação repousarem por mais de 5 minutos entre os passos de lavagem e a adição de reagentes.

Informação de Segurança

- Todo o pessoal deve receber formação adequada sobre os riscos relacionados com a BSE e o scrapie, e sobre os procedimentos recomendados de descontaminação. Os procedimentos de biossegurança devem ser estritamente seguidos, conforme recomendado pelas normas de segurança nacional.
- A solução tampão de condicionamento contém agentes caotrópicos; evitar o contato com a pele e as mucosas.
- O substrato TMB pode irritar a pele e os olhos; evitar o contacto direto.
- O componente 1 de diluição para placas contém altas concentrações de detergentes; evitar o contato direto.
- Evitar a utilização de recipientes de vidro no laboratório.

Apêndice

Os testes de amostragem no laboratório devem seguir o regulamento (CE) Nº 999/2001, Anexo X, Capítulo C, referente à recolha de amostra da última edição do *Manual de Normas para Testes de Diagnóstico e Vacinas* do Gabinete Internacional de Doenças Epizoóticas (OIE), que declara: “A amostra preferencial para o imunoensaio deve ser extraída do óbex ou o mais perto possível deste, mas não mais de 1,5 cm anterior ao óbex.”

Amostragem do Óbex Bovino com o Dispositivo de Recolha de Amostra IDEXX

A IDEXX tem um dispositivo de recolha de amostras disponível, como método de extração alternativa do óbex bovino. Este dispositivo é uma seringa de amostragem. O dispositivo de recolha de amostras IDEXX foi aprovado pelo LCR. As orientações desta secção de amostragem não excluem outras informações ou instruções que estejam de acordo com o regulamento (CE) 999/2001 e os regulamentos modificados. Quando não for possível identificar a área anatómica correta para amostragem, use os instrumentos de dissecação, conforme descrito na secção de **Amostragem de Tecidos e Preparação**.

1. O tronco cerebral deve ser recolhido no matadouro, através do foramen occipital, utilizando uma colher para colheita de amostras. Identificar a região do óbex cerebral, conforme indicado pela presença de um sulco em forma de V na superfície superior do tronco cerebral (ver a figura 1 na secção de Amostragem de Tecidos e Preparação). Quando não for possível identificar a área anatómica correta para amostragem, use os instrumentos de dissecação, conforme descrito na secção de Amostragem de Tecidos e Preparação.
2. Posicionar o tronco cerebral com a seção em forma de V do tecido para cima. Colocar a extremidade da seringa de recolha de amostra na extremidade de corte do tronco cerebral caudal do lado de onde será retirada a amostra, aproximadamente a 3 mm (o suficiente para ficar seguramente alojado). Pode ser necessário desbastar o excesso de tecido da medula espinhal, se o comprimento a partir da base da medula espinhal até à extremidade da secção em forma de V for superior a 3–4 cm.
3. Segure firmemente o êmbolo da seringa. Com o seu dedo indicador, empurre o cilindro externo da seringa de encontro ao tronco cerebral, tendo cuidado para não permitir que a porção do êmbolo se mova para qualquer direção. Consulte a Figura 2 para conhecer o alinhamento apropriado da seringa para visar os locais principais de amostragem de tecidos do óbex. À medida que o cilindro da seringa é empurrado para o interior da amostra, deve permanecer nos limites do lado selecionado do tronco cerebral, para evitar causar danos no lado oposto. Deve estar disponível uma hemissecção do tronco cerebral inteira com óbex intacto, para testes de confirmação.

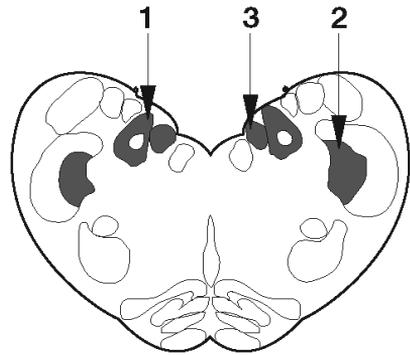


Figura 2. Corte transversal do tronco cerebral bovino ao nível do óbex identificando os principais locais para recolha de amostragem de tecidos: 1) tracto solitário, 2) núcleo do nervo trigêmeo, 3) núcleo motor dorsal do nervo vago (diagrama extraído do OIE Manual para Testes Auxiliares de Diagnóstico e Vacinas, capítulo 2.4.6.)

4. O cilindro da seringa mover-se-á através do tronco cerebral e até à região do óbex. Certifique-se de que a seringa se moveu para o interior da porção superior da área de amostragem (consulte a Figura 1). O cilindro deverá agora conter a amostra do óbex.
NOTA: A amostra pretendida (por exemplo, a zona do óbex) está na extremidade do cilindro.
5. Rode o cilindro para isolar a amostra e para remover cuidadosamente a seringa do tecido.
6. Se uma porção significativa de tecido estiver pendente na extremidade da seringa, leve-o para o interior do cilindro recolhendo ligeiramente o êmbolo. A seringa pode agora ser manipulada para ser removido o ar na ponta e eliminar todos os espaços existentes entre as porções da amostra.
Nota: O interior da seringa tem diversas ranhuras regularmente espaçadas que podem ser localizadas pelo tato à medida que o êmbolo é movido através da seringa. O espaço entre as ranhuras propicia uma medição adequada do volume da amostra.
7. Quando tiver o tecido no interior da seringa, empurre o êmbolo para alinhá-lo com a ranhura mais próxima. A amostra deverá apresentar-se sem espaços livres entre o êmbolo e a extremidade da seringa. Algum material de amostra em excesso pode estender-se para além da extremidade da seringa.
8. Remova qualquer tecido residual que possa ficar na superfície externa. Não pressione o êmbolo durante este processo porque a amostra será expelida ou comprimida; ambas estas situações são indesejáveis.
9. Segure com uma mão na vertical o tubo de ruptura de tecidos e a seringa na outra, com a extremidade da seringa colocada mesmo no interior do tubo de ruptura de tecidos. Coloque uma quantidade medida de tecido do óbex no interior do tubo de ruptura movendo o êmbolo passando uma ranhura e parando na segunda ranhura. O volume existente entre as ranhuras é de 150 µl; é colocado um total de 300 µl no tubo (equivalente a 0,30 g ±0,05 g de tecido).
10. Tape o tubo e faça a homogeneização da amostra.

O pessoal que recolhe as amostras de óbex com o dispositivo de recolha de amostras da IDEXX deve possuir formação adequada sobre a utilização do dispositivo para garantir uma recolha de amostra da zona correta do tronco cerebral. Cada um dos técnicos deverá monitorizar a precisão da amostragem realizando verificações periódicas do peso da amostra. Deverá ser instituído um programa de atuação corretiva quando os resultados fiquem fora dos critérios de aceitação definidos. O dispositivo de recolha de amostras da IDEXX deve ser utilizado uma única vez e deverá ser eliminado após a recolha de cada uma das amostras para evitar contaminações cruzadas.

Limitação de Responsabilidade

Até a extensão máxima permitida por lei, em nenhuma circunstância a IDEXX ou os seus licenciados poderão ser responsabilizados por si ou qualquer outra pessoa por perdas de lucros ou de utilização, especiais, acidentais, consequenciais, indiretos, exemplares, danos punitivos ou múltiplos, incluindo sem limitar a perda de clientela, dados ou equipamento ou até mesmo a interrupção de negócios provocada pela fabricação, venda, fornecimento ou utilização dos nossos produtos ou serviços ou por falha ou atraso na entrega desses mesmos produtos ou serviços.

Para assistência técnica:

IDEXX EUA Tel: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4890

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

PRODUTO IMPORTADO. USO VETERINÁRIO.

Licenciado no MAPA sob nº10.217/2019
 REPRESENTANTE EXCLUSIVO NO BRASIL
 IDEXX BRASIL LABORATÓRIOS LTDA. Cotia-SP
 R. Santa Clara, nº236, Parque Ind. San José
 CEP: 06715-867, CNPJ: 00.377.455/0001-20
 Resp.Tec.: Andrea Leão Carneiro CRMV-SP: 30.632

*HerdChek é uma marca ou uma marca registada de IDEXX Laboratories, Inc. ou seus afiliados nos Estados Unidos e/ou em outros países. Todos os outros nomes de produtos, empresas e logotipos são propriedade das entidades respectivas. Patente Requerida.

Informações sobre patentes: idexx.com/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Todos os direitos reservados.

Zestaw immunoenzymatyczny do wykrywania antygenu encefalopatii gąbczastej bydła i choroby Scrapie

Wyłącznie do użytku weterynaryjnego.

Instrukcja wykonania

Wprowadzenie

Zestaw diagnostyczny IDEXX HerdChek* Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-Scrapie Antigen Test Kit jest testem immunoenzymatycznym (EIA) wykrywającym patologiczną formę białka prionowego (PrP^{Sc}) w próbkach tkanki nerwowej mózgowia (preferowany rejon zasuwki): bydła, małych przeżuwaczy (owce i kozy) oraz jeleniowatych badanych pośmiertnie w kierunku gąbczastej encefalopatii bydła (BSE) lub trzęsawki. W przypadku małych przeżuwaczy istnieje dodatkowo możliwość wykrycia PrP^{Sc} w próbkach węzłów chłonnych lub śledziony, zaś w przypadku jeleniowatych możliwość wykrycia PrP^{Sc} w próbkach węzłów chłonnych zagardłowych (RPLN). Test ten jest przeznaczony do szybkiej identyfikacji próbek zawierających marker chorób prionowych-białko PrP^{Sc}, przy minimalnej pracochłonności, a wykonanie badania może zostać zautomatyzowane, co pozwala wykonywać badania na skalę masową. Zestaw ten przeznaczony jest wyłącznie do użytku weterynaryjnego.

Przeznaczenie w Krajach Członkowskich Unii Europejskiej: jest to zatwierdzony przez UE szybki test in vitro do wykrywania białka PrP^{Sc}, z przypadków BSE oraz trzęsawki, u bydła i małych przeżuwaczy. Test ten może być używany w UE również do szybkiego badania jeleniowatych w kierunku pasażowalnej encefalopatii gąbczastej (TSE). Walidacja zestawu została przeprowadzona w oparciu o próbki migdałków, węzłów chłonnych zagardłowych oraz pnia mózgu łosia (*Cervus canadensis*).

Producent szybkiego testu musi posiadać system zapewnienia jakości zaakceptowany przez Wspólnotowe Laboratorium Referencyjne (EURL), który gwarantuje, że charakterystyka testu nie ulegnie zmianie. Producent ma obowiązek dostarczenia do EURL opisu wykonania badania. Wszelkie modyfikacje i zmiany przyrządów do pobierania próbek jak również zmiany sposobu wykonania testu mogą być dokonane wyłącznie po wcześniejszym powiadomieniu EURL, które musi potwierdzić, że zmiany te nie obniżają czułości, specyficzności lub wiarygodności szybkiego testu. Informacje dotyczące wszelkich zmian muszą być przedstawione Komisji Europejskiej oraz krajowym laboratoriom referencyjnym (na podstawie Rozporządzenia (EC) Nr 956/2010 modyfikującego Rozporządzenie (EC) Nr 999/2001).

Opis wykonania i zasada działania

W zestawie wykorzystano opatentowaną metodę firmy Microsens Biotechnologies (London, U.K.) umożliwiającą wykrywanie patologicznego białka prionowego. Powierzchnia dołków płytki wychwytyjącej antygen, opłaszczona jest ligandem wiążącym specyficznie PrP^{Sc}. Badana próbka poddawana jest homogenizacji, a następnie rozcieńczeniu za pomocą rozcieńczalnika do płytki. Po jej naniesieniu do dołka płytki, dochodzi do wysoce specyficznego wiązania białka chorobotwórczego z opłaszczonym na płytce ligandem. W trakcie płukania usuwane jest normalne, niezwiązane z powierzchnią płytki białko PrP. Po inkubacji z buforem przygotowującym, wykrycie związanego z płytką antygenu umożliwia specyficzne dla PrP przeciwciała skonjugowane z peroksydazą chrzanową (HRPO). Po kolejnym płukaniu usuwającym niezwiązany koniugat, dodawany jest substrat dla peroksydazy. Nasilenie barwy powstającej w wyniku reakcji enzymatycznej enzymu z substratem zależne jest od względnej zawartości w dołku płytki białka PrP^{Sc} połączonego z ligandem opłaszczającym dołek płytki.

Interpretacja wyników badania oparta jest na odczycie wartości absorbancji analizowanej próbki. Próbka, dla której wartość $A_{450} - A_{REF}$ jest poniżej wartości odcięcia, traktowana jest jako ujemna w badaniu testem IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit. Próbka, dla której wartość $A_{450} - A_{REF}$ jest równa lub wyższa od wartości odcięcia, klasyfikowana jest jako dodatnia na obecność PrP^{Sc}. Dla każdego wyniku dodatniego wymagane jest badanie potwierdzające np. immunohistochemiczne.

Skład Zestawu

Wszystkie odczynniki przechowywać w temp. 2–8°C.

Symbol	460 badań
A Płytki do wychwytu antygeny	5 płytek
N Kontrola ujemna—brak reakcji na płytce do wychwytu antygeny; konserwowana azydkiem sodu	5 x 1 ml
P Kontrola dodatnia—niezakaźna, reakcja na płytce do wychwytu antygeny; konserwowana azydkiem sodu	5 x 1 ml
D1 Rozcieńczalnik do płytki - składnik 1; konserwowany azydkiem sodu	20 ml
D2 Rozcieńczalnik do płytki - składnik 2	5 x 200 µl
R Bufor do rekonstrukcji	20 ml
CB Bufor przygotowujący; konserwowany azydkiem sodu	60 ml
CC Stężony koniugat; konserwowany - Bronidox L oraz methylisothiazolone	300 µl
SRB-CC Stężony koniugat dla małych przeżuwaczy; konserwowany - Bronidox L oraz methylisothiazolone	300 µl
CD Bufor do rozcieńczania koniugatu z dodatkiem detergentów oraz stabilizatorów białek; konserwany gentamycyną i Proclin	60 ml
W1 10X stężony roztwór 1 do płukań; konserwowany azydkiem sodu	450 ml
W2 10X stężony roztwór 2 do płukań; konserwowany gentamycyną	450 ml
T substrat TMB	60 ml

UWAGA: W tabeli podanej w końcowej części instrukcji podano opisy symboli międzynarodowych użytych w instrukcji oraz na etykiecie testu.

Informacje o szkodliwym działaniu odczynników zestawu oraz ostrzeżenia znajdują się na końcu instrukcji.

Wymagany sprzęt i materiały (niedostarczone w zestawie)

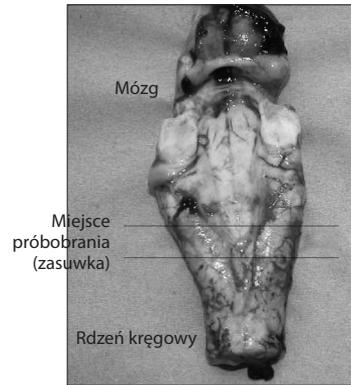
- Precyzyjne pipety i pipety wielokanałowe do pipetowania objętości w zakresie 25-200 µl. Dla objętości odczynników podanych w opisie sposobu wykonania oznaczenia, dokładność pipet powinna być w zakresie ±5%.
- Skalowane cylindry do przygotowania roztworów do płukań
- Przykrywki do płytek - plastikowe lub z folii samoprzylepnej oraz naczynia do dozowania odczynników
- Jednorazowe narzędzia do pobierania próbek
- Czytnik do płytek 96-dołkowych (wyposażony w filtry 450nm oraz 620–650nm) oraz płuczka
- FastPrep* (FP120A, FP220A), FastPrep*-24, Precess 48*, Precess 24* or Precellys 24* instrument.
- Zestaw akcesoriów – płytki do rozcieńczeń, probówki do rozdrabniania tkanki z ceramicznymi kuleczkami, końcówki do pipet o zwiększonej długości do pobierania homogenatu oraz folia samoprzylepna do przykrywania płytek (dostępny w firmie IDEXX)
- Osobisty sprzęt ochronny: okulary ochronne, fartuchy laboratoryjne, rękawice jednorazowe, osłony na obuwiu, siatki na włosy i maski ochronne na twarz
- 0,5–1,0 N HCl lub 1,0 N H₂SO₄ jako roztwór stopujący używany w trakcie badania
- Podchloryn sodu, 1N NaOH oraz 1N HCl, woda dejonizowana
- Opcjonalnie – stacja robocza do obróbki próbek o precyzji pipetowania ≤2,5% obliczonej na podstawie analizy współczynnika wariancji CV (np. Tecan)
- Opcjonalnie – wytrząsarka do płytek (np. IKA MTS 2/4)
- Opcjonalnie – inkubator do płytek zapewniający temp. 32-37°C z minimalnym przepływem powietrza
- Opcjonalnie – suchy blok grzejny na probówki o pojemności 1,5-2,0ml (zapewniający temp. 70°C)
- Opcjonalnie – probówki stożkowe o pojemności 1,5-2,0ml z nakrętkami



Pobieranie i Przygotowanie Próbek

A. Tkanka mózgowa bydła i małych przeżuwaczy

1. Pobieranie próbek oraz wykonywanie badań powinno być zgodne z rozporządzeniem (EC) nr 999/2001, Aneks X, Rozdział C, które w temacie pobierania próbek odnosi się do ostatniego wydania Podręcznika Standardów dla Testów Diagnostycznych oraz Szczepionek, wydanego przez Międzynarodowy Urząd Epizootii (OIE), gdzie zapisano: "Próbka preferowana do badań immunoenzymatycznych powinna być pobierana bezpośrednio z rejonu zasuwki, lub jak najbliższej tego miejsca, ale nie dalej niż 1,5 cm od zasuwki". Pobierz 0,30 g ($\pm 0,05$ g) tkanki nerwowej z lewej lub z prawej strony pnia mózgu na poziomie zasuwki (gdy jest to możliwe) stosując narzędzia sekcyjne, a następnie zważ próbkę celem weryfikacji właściwej masy. Alternatywnie, dla próbek pnia mózgu od bydła, można zastosować przyrząd do pobierania próbek firmy IDEXX zgodnie z opisem zawartym w sekcji "Dodatek". Osoby pobierające próbkę muszą być przeszkolone w zakresie metody pobierania.



Ryc. 1. Próbka pnia mózgu bydła

© British Crown Copyright (February 2005) reproduced with kind permission of the Veterinary Laboratories Agency.

Poniższy schemat (ryc. 1) przedstawia właściwe miejsce pobrania próbki do badania.

UWAGA: Po pobraniu próbki, należy pozostawić połowę pnia mózgu w stanie nienaruszonym z nieuszkodzonym rejonem zasuwki oraz mózdzek (jeśli jest obecny) do ewentualnego badania potwierdzającego.

2. Włóż próbkę do probówki do homogenizacji i szczelnie zakręć nakrętkę. Probówki dostarczane są z ceramicznymi kuleczkami i buforem.
3. Cztery modele homogenizatorów zostały zwalidowane i mogą być stosowane w badaniu zestawem IDEXX BSE-Scrapie EIA. Włóż probówki do homogenizatora i poddaj je homogenizacji zgodnie z zaleceniami dla danego urządzenia. Jeżeli stopień rozdrobnienia jest niewystarczający, proces homogenizacji należy powtórzyć.
 - program w homogenizatorze FastPrep*: próbki homogenizować przez 40 sekund przy maksymalnej prędkości (6.5 m/s). Jeżeli konieczna jest ponowna homogenizacja, należy wyłączyć homogenizator na 5-10 minut pomiędzy cyklami homogenizacji, celem schłodzenia.
 - program w homogenizatorach: Precess 48*, Precess 24* oraz Precellys 24*: próbki homogenizować stosując program: 2 x po 20 - 25 sekund przy 6500 obrotach (rpm), z 5-sekundową przerwą pomiędzy cyklami homogenizacji.
4. Przed rozpoczęciem badania próbki poddane homogenizacji (przygotowane na świeżo lub rozmrożone) można trzymać w temperaturze pokojowej (18–26°C) do czterech godzin.

Liczba próbek przygotowanych jednorazowo może być różna. Gotowe homogenaty można przechowywać do 24 godz. w temp. 2–8°C lub do 6 miesięcy w temp. <-20°C. Zamrożone homogenaty należy przed badaniem rozmrozić i dokładnie wymieszać odwracając probówkę. Probki tkanek można przechowywać w temp. -80°C.

B. Probki węzłów chłonnych lub śledziony małych przeżuwaczy

1. Pobierz 0,3 g ($\pm 0,05$ g) materiału z węzła chłonnego lub ze śledziony. Pobierając próbkę z węzła chłonnego należy starać się pobrać jak najwięcej komórek z ośrodka rozmnażania. Rozdrobnij tkankę na 8–10 małych kawałków.
2. Dalsza obróbka i przechowywanie próbki powinny być takie same jak w przypadku próbek mózgowia. **UWAGA:** w świetle Rozporządzenia (EC) nr 999/2001 próbki tkanek z węzłów chłonnych lub ze śledziony nie mogą być używane do badania urzędowego.

C. Tkanka mózgowa i węzły chłonne jeleniowatych

1. Przygotuj próbówki do homogenizacji poprzez usunięcie z każdej z nich po 0,2 ml płynu.
2. Pobierz 0,3 g ($\pm 0,05$ g) materiału z węzła chłonnego zagardłowego lub tkanki nerwowej pnia mózgu (preferowany rejon zasuwki). Pobierając próbkę z węzła chłonnego należy starać się pobrać jak najwięcej komórek z ośrodka rozmnażania. Tkanke węzła chłonnego rozdrobnij na 8–10 małych kawałków.
3. Włóż próbkę do próbówki do homogenizacji i szczelnie zakręć nakrętkę.
4. Włóż próbówki do homogenizatora i poddaj je homogenizacji zgodnie z zaleceniami dla danego urządzenia. Jeżeli stopień rozdrobnienia jest niewystarczający, proces homogenizacji należy powtórzyć.

Program w homogenizatorze FastPrep*: próbki homogenizować przez 30 sekund przy maksymalnej prędkości (6,5 m/s), następnie pozostawić próbówki w urządzeniu na 5 minut. Ponownie homogenizować przez 30 sekund przy maksymalnej prędkości (6,5 m/s). Jeżeli przy ocenie wzrokowej homogenizacja próbek uznana zostanie za niewystarczającą należy powtórzyć jeden cykl homogenizacji.

Program w homogenizatorach: Precess 48*, Precess 24* oraz Precellys 24*: próbki homogenizować przez 30 sekund przy 6500 obrotach (rpm), następnie pozostawić próbówki w urządzeniu na 5 minut. Ponownie homogenizować przez 30 sekund przy 6500 obrotach (rpm). Jeżeli przy ocenie wzrokowej homogenizacja próbek uznana zostanie za niewystarczającą należy powtórzyć jeden cykl homogenizacji.

Przygotowanie Odczynników

Roztwory do płukań (Roztwór 1 do płukań, Roztwór 2 do płukań)

Stężone roztwory do płukań należy doprowadzić do temperatury 18–26°C i dobrze wymieszać, celem rozpuszczenia ewentualnych strąków soli. Przed użyciem, każdy koncentrat należy rozcieńczyć 1:10 w wodzie destylowanej lub dejonizowanej (dla jednej płytki przygotować roztwór dodając 40 ml koncentratu do 360 ml wody).

Rozcieńczalnik do płytki - składnik 2

Składnik 2 rozcieńczalnika do płytki (D2) dostarczany jest w postaci liofilizowanej. Przygotowanie roztworu roboczego wymaga dodania do liofilizatu 200 μ l buforu do rekonstrukcji (R), pozostawienia na czas ok. 1 min., a następnie łagodnego wymieszania. Gotowy roztwór należy użyć w ciągu 1 godz. od momentu przygotowania.

Rozcieńczalnik do płytki - roztwór roboczy

Składnik 1 rozcieńczalnika do płytki (D1) należy doprowadzić do temperatury 18–26°C. Przygotować roztwór roboczy dodając do 25 części składnika 1 (D1), jedną część składnika 2 rozcieńczalnika do płytki (D2; przygotowanego wg schematu opisanego powyżej) i dokładnie wymieszać (np. do 120 μ l D2 dodać 3ml D1 – proporcja na 1 płytkę). Na jedną płytkę potrzeba około 2,75 ml roztworu roboczego rozcieńczalnika do płytki, gdy badane są próbki mózgowia. Ilość ta zwiększa się do ok. 5 ml na płytkę w przypadku badania próbek węzłów chłonnych lub śledziony. Roztwór roboczy rozcieńczalnika do płytki należy zużyć w dniu jego przygotowania.

Kontrola Dodatnia i Kontrola Ujemna

Kontrola dodatnia oraz kontrola ujemna dostarczane są w postaci liofilizatu. Do każdej fiołki dodać po 1 ml buforu do rekonstrukcji. Pozostawić na czas ok. 1 min., a następnie silnie wymieszać. Użyć w ciągu 2 godz. od przygotowania. **NIE ROZCIEŃCZAĆ KONTROLI DODATNIEJ ANI KONTROLI UJEMNEJ W ROZTWORZE ROBOCZYM ROZCIEŃCZALNIKA DO PŁYTKI.**

Roztwór przeciwciała anti-PrP skoniugowanego z HRPO

Roztwór przeciwciała anti-PrP skoniugowanego z HRPO przygotowuje się rozcieńczając odpowiedni koncentrat koniugatu (patrz uwaga poniżej) przy pomocy buforu do rozcieńczania koniugatu (CD), zgodnie z opisem z etykiety koniugatu (np. aby uzyskać rozcieńczenie 1:100 należy rozcieńczyć 120 μ l koncentratu koniugatu w 12 ml buforu do rozcieńczania koniugatu). Odpowiedni współczynnik rozcieńczenia podany jest na etykiecie koncentratu koniugatu. Rozcieńczony koniugat należy użyć w ciągu 4 godz. od momentu przygotowania.

ISTOTNA UWAGA: W zestawie dostępne są dwa rodzaje stężonego koniugatu. Należy wybrać odpowiedni koniugat do rodzaju badanej próbki:

- **stężony koniugat (CC)**—używać przy badaniu próbek mózgowia bydła i jeleniowatych, próbek węzłów chłonnych małych przeżuwaczy i jeleniowatych oraz śledziony małych przeżuwaczy.
- **stężony koniugat do badania próbek mózgowia małych przeżuwaczy (SRB-CC)**—używać przy badaniu próbek mózgowia małych przeżuwaczy.
- Bez względu na to, który z koniugatów jest używany, w badaniu muszą zostać nałożone na płytkę: kontrola ujemna i kontrola dodatnia.

Kwaśny Roztwór Stopujący

Roztwór Stopujący nie jest dostarczany z zestawem diagnostycznym. Roztwór ten (0,5–1,0 N HCl lub 1,0 N H₂SO₄) można kupić w stężeniu roboczym lub przygotować z koncentratu.

Przed rozpoczęciem badania z wykorzystaniem każdego z trzech protokołów wykonania oznaczenia, wszystkie odczynniki z zestawu należy doprowadzić do temperatury 18–26°C. Roztwory używane w trakcie wykonywania testu należy przygotować przed rozpoczęciem badania. Przed użyciem, każdy odczynnik należy łagodnie wymieszać. Kontrole testu (dodatnią oraz ujemną) należy przed badaniem silnie wymieszać i każdą z nich nanosić na płytkę testową podwójnie (w duplikacie). W trakcie wykonywania badania płytkę testową należy przykrywać pokrywką.

Przechowywanie Gotowych Odczynników

Odczynnik	Objętość po rekonstrukcji	Czas przechowywania
N/P Kontrola Ujemna / Dodatnia	1 ml	2 godz. w temp. 18–26°C (6 m-cy w temp. -20°C)
D2 Rozcieńczalnik do płytki - składnik 2	200 µl	1 godz. w temp. 18–26°C (6 m-cy w temp. -20°C)
Roztwór roboczy rozcieńczalnika do płytki	nie dotyczy	8 godz. w temp. 18–26°C
Koniugat HRPO anty PrP	nie dotyczy	4 godz. w temp. 18–26°C
Roztwór 1 do płukań–1X	nie dotyczy	1 tydz. w temp. 18–26°C
Roztwór 2 do płukań–1X	nie dotyczy	1 tydz. w temp. 18–26°C

Niewykorzystane baretki płytki testowej przechowywać w ciemności w suchym i szczelnym pojemniku.

Wykonanie testu

Homogenaty próbek przygotowuje się zgodnie z opisem zawartym w rozdziale “Pobieranie i Przygotowanie Próbek”. **Od etapu 1 lub po naniesieniu kontroli oraz rozcieńczonych próbek na płytkę do wychwytu antygeny (etap 3 – patrz tabela „Protokoły wykonania oznaczenia”), metodę manualną można zastąpić metodą automatyczną, stosując stację roboczą do obróbki próbek.**

Istotna Uwaga: W trakcie każdej inkubacji należy zakryć płytkę przykrywką plastikową lub folią samoprzylepną. Jeżeli inkubacje prowadzone są w komorze laminarnej, płytki muszą być zakryte folią samoprzylepną.

Sposoby wykonania oznaczenia

Do badania próbek mózgowia testem IDEXX BSE-scrapie EIA dopuszczone są dwa protokoły: Krótki oraz Ultra-krótki. Wyniki uzyskiwane z wykorzystaniem tych protokołów są równoważne, natomiast odmienne są wymagania sprzętowe w związku ze skróceniem czasu badania. Szczegółowy opis tych protokołów przedstawia tabela przedstawiona na kolejnej stronie.

UWAGA: Protokół badania próbek śledziony oraz węzłów chłonnych małych przeżuwaczy różni się od protokołów badania próbek mózgowia: Krótkiego i Ultra-krótkiego - różnice opisano w tabeli “Protokoły wykonania oznaczenia” podanej poniżej.

Rozcieńczanie badanej próbki w roztworze roboczym rozcieńczalnika do płytki

Przygotuj schemat płytki z zaznaczonymi miejscami nanoszenia próbek na płytce do wychwytu antygeny oraz na płytce do rozcieńczeń. Pozostaw podwójne dołki do naniesienia obydwu kontroli testu: dodatniej i ujemnej. Roztwór roboczy rozcieńczalnika można nanosić na płytkę do rozcieńczeń zarówno przed jak i po dodaniu próbek badanych. Należy zachować proporcję 30 μ l rozcieńczalnika na 120 μ l homogenatu próbki (dla próbek śledziona lub węzłów chłonnych małych przeżuwaczy proporcja wynosi 50 μ l rozcieńczalnika na 100 μ l homogenatu próbki).

Przed naniesieniem wymieszaj homogenat odwracając probówkę do homogenizacji, a następnie ostrożnie pobierz próbkę wprowadzając końcówkę pipety przez ceramiczne kuleczki na dno probówki. Nanieś badane próbki do dołków płytki do rozcieńczeń, starając się nie tworzyć pęcherzyków powietrza w homogenacie oraz unikając pozostawiania resztek homogenatu na brzegach dołka.

Po rozcieńczeniu homogenatu, dokładnie wymieszaj próbki, unikając tworzenia pęcherzyków powietrza. Mieszanie można wykonać za pomocą pipety lub na wytrząsarce do płytek. W przypadku stosowania wytrząsarki, konieczne jest zoptymalizowanie szybkości oraz czasu wytrząsania, tak aby dokładnie wymieszać próbkę bez jej rozchlapywania. Wykonaj dalsze etapy badania w ciągu 2 godzin.

Użycie wytrząsarki płytek do inkubacji próbek (protokół krótki oraz ultra-krótki)

W protokołach badania: Krótkim i Ultra-krótkim wykorzystuje się (wyłącznie na etapie inkubacji próbki) wolne wytrząsanie (200 \pm 100 obr./min.) z użyciem poziomej wytrząsarki do płytek. Urządzenie powinno zapewniać łagodny, horyzontalny ruch okrężny. Probka w dołku płytki porusza się nieznacznie, choć może to być niewidoczne gołym okiem. Rotacja płytki nie powinna być zbyt duża, aby nie dochodziło do podnoszenia się poziomu płynu na ściankach dołka. Czasy badania są odpowiednio skrócone na etapie inkubacji próbek oraz inkubacji z koniugatem zgodnie z poniższym schematem. Protokół badania próbek śledziona oraz węzłów chłonnych małych przeżuwaczy wymaga przeprowadzenia wszystkich inkubacji stacjonarnie (płytką pozostaje nieruchoma).

Protokoły wykonania oznaczenia

Etap badania		Protokół krótki	Protokół ultra-krótki	Protokół badania próbek śledziona oraz węzłów chłonnych małych przeżuwaczy
Rodzaj próbki		Próbki mózgowia bydła, małych przeżuwaczy i jeleniowatych; próbki węzłów chłonnych jeleniowatych	Próbki mózgowia bydła i małych przeżuwaczy	Węzły chłonne i śledziona małych przeżuwaczy
Etap	Czynność	18–26°C wszystkie etapy	32–37°C 1: dotyczy wyłącznie etapów inkubacji (3, 5, 8, 10); wszystkie pozostałe etapy badania (włącznie z etapami płukania) wykonywane są w temperaturze 18–26°C	18–26°C wszystkie etapy
1	Nanoszenie próbek na płytkę do rozcieńczeń	do 120 μ l homogenatu próbki dodaj 30 μ l rozcieńczalnika dla płytki roboczej		do 100 μ l homogenatu próbki dodaj 50 μ l rozcieńczalnika dla płytki roboczej
		DOBRE WYMIESZAJ - patrz opis w sekcji „Rozcieńczanie badanej próbki w roztworze roboczym rozcieńczalnika do płytki”.		
2	Nanoszenie próbki na płytkę do wychwytu antygeny	Nanieś po 100 μ l rozcieńczonych próbek do odpowiednich dołków płytki do wychwytu antygeny; wymieszaj kontrole (ujemną i dodatnią) i nanieś po 100 μ l w duplikacie (do dwóch dołków); zakryj płytkę przykrywką.		
3	Inkubacja płytki do wychwytu antygeny	45–60 min. przy wolnym wytrząsaniu 200 \pm 100 obr./min.	20–25 min. przy wolnym wytrząsaniu 200 \pm 100 obr./min.	2–3 godziny bez wytrząsania

4	Płukanie roztworem 1 (Wash 1)	Wypłucz dołki płytki 6 razy stosując każdorazowo ~350 μ l roztworu 1 do płukania – w stężeniu 1x		
5	Bufor przygotowujący: Naniesienie/Inkubacja	Dodaj po 100 μ l buforu przygotowującego do każdego dołka; zakryj płytkę; inkubuj 10minut \pm 1min.		
6	Płukanie roztworem 2 (Wash 2)	Wypłucz dołki płytki 3 razy stosując każdorazowo ~350 μ l roztworu 2 do płukania – w stężeniu 1x		
7	Nanoszenie koniugatu	do każdego dołka dodaj po 100 μ l rozcieńzonego koniugatu (dla próbek mózgowia bydła oraz próbek od jeleniowatych użyj koniugatu CC; dla próbek mózgowia małych przeżuwaczy użyj koniugatu SRB-CC) i zakryj płytkę przykrywką		do każdego dołka dodaj po 100 μ l rozcieńzonego koniugatu CC i zakryj płytkę przykrywką
8	Inkubacja z koniugatem	45–50 min.	25–30 min.	60–75 min.
9	Płukanie roztworem 2 (Wash 2)	Wypłucz dołki płytki 5 razy stosując każdorazowo ~350 μ l roztworu 2 do płukania – w stężeniu 1x		
10	Substrat: Naniesienie/ Inkubacja	Dodaj po 100 μ l substratu do każdego dołka; zakryj płytkę przykrywką; inkubuj 15 minut \pm 1 min. w miejscu pozbawionym bezpośredniego oddziaływania promieni słonecznych (podczas tej inkubacji nie używaj folii samoprzylepnej jako przykrywki na płytkę)		
11	Nanoszenie roztworu stopującego/ Odczyt płytki	Dodaj po 100 μ l kwaśnego roztworu stopującego do każdego dołka; przed odczytem płytka może być trzymana do 30 min. w ciemności; Odczytaj wartości gęstości optycznej (450 nm) z użyciem referencyjnej długości fali (A_{REF}) od 620 nm do 650 nm.		

1. inkubacja w temperaturze 32-37°C oznacza umieszczenie badanej płytki w inkubatorze do płytek uprzednio podgrzanych do temperatury 32-37°C.

Różnice w protokołach w zależności od rodzaju badanej próbki

	Mózgowie bydła	Mózgowie małych przeżuwaczy	Węzły chłonne i śledziona małych przeżuwaczy	Mózgowie i węzły chłonne zagardłowe jeleniowatych
Przygotowanie próbki:				
Próbobranie strzykawką	Tak	Nie	Nie	Nie
Rozdrabnianie próbki (przed homogenizacją)	Nie	Nie	Tak	Tak (węzły chłonne) Nie (mózgowie)
Warunki wykonania testu:				
Stężony koniugat	CC	SRB-CC	CC	CC
Roztwór roboczy rozcieńczalnika płytki (objętość rozcieńczalnika / objętość próbki)	30 μ l/120 μ l	30 μ l/120 μ l	50 μ l/100 μ l	30 μ l/120 μ l
Dopuszczone protokoły wykonania oznaczenia	Krótki i Ultra-krótki	Krótki i Ultra-krótki	Protokół badania próbek śledziony oraz węzłów chłonnych małych przeżuwaczy	Krótki
Wartość odcięcia testu	$NC\bar{x} + 0,120$	$NC\bar{x} + 0,180$	$NC\bar{x} + 0,180$	$NCx + 0,150$
Opcjonalna inkubacja termiczna homogenatów próbek dodatnich	Tak	Nie	Nie	Nie

Interpretacja Wyników Badania

Walidacja testu oparta jest o dwie wartości: aby test uznać za ważny średnia wartość kontroli ujemnej ($NC\bar{x}$) musi uzyskać wartość $A_{450} - A_{REF}$ poniżej 0,150, zaś średnia wartość kontroli dodatniej ($PC\bar{x}$) musi uzyskać wartość $A_{450} - A_{REF} \geq 0,400$.

Obliczenia

Obliczenie średniej wartości kontroli ujemnej ($NC\bar{x}$):

$$NC\bar{x} = \frac{A1 (A_{450} - A_{REF}) + B1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Obliczenie średniej wartości kontroli dodatniej ($PC\bar{x}$):

$$PC\bar{x} = \frac{C1 (A_{450} - A_{REF}) + D1 (A_{450} - A_{REF})}{2}$$

Obliczanie wartości progu odcięcia:

wartość odcięcia dla próbek od bydła = $NC\bar{x} + 0,120$

wartość odcięcia dla próbek od małych przeżuwaczy = $NC\bar{x} + 0,180$

wartość odcięcia dla próbek od jeleniowatych = $NC\bar{x} + 0,150$

UWAGA: Termin A_{REF} zdefiniowano w tabeli „Protokoły wykonania oznaczenia” (etap 11).

Wyniki

Interpretacja uzyskanych wyników opiera się na wartości absorbancji dla danej próbki. Próbki dla których wartość $A_{450} - A_{REF}$ jest poniżej wartości odcięcia traktowane są jako ujemne w teście IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit. Próbki, dla których wartość $A_{450} - A_{REF}$ jest równa lub wyższa od wartości odcięcia traktowane są jako wstępnie reaktywne w kierunku obecności białka PrP^{Sc}, a badanie należy powtórzyć testem IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit w duplikacie rozpoczynając od homogenatu próbki.

Do badania powtórnego próbek pochodzących od bydła można użyć bezpośrednio homogenatu próbki przygotowanego wcześniej lub homogenatu przygotowanego według opisanej poniżej metody alternatywnej inkubacji termicznej homogenatów próbek mózgowia bydła. W przypadku, gdy chociaż jedno z powtórzeń będzie miało wartość równą lub powyżej wartości progu odcięcia, próbka klasyfikowana jest jako dodatnia. Próbka uważana jest za ujemną, gdy obydwie wartości w badaniu powtórnym są poniżej progu odcięcia. W krajach członkowskich Unii Europejskiej, próbki dodatnie w pierwszym badaniu, dla których uzyskano wyniki ujemne po inkubacji termicznej opisanej poniżej, można klasyfikować jako ujemne.

Badanie powtórne próbek pochodzących od małych przeżuwaczy i jeleniowatych należy przeprowadzać bezpośrednio z homogenatu próbki –NIE STOSOWAĆ metody alternatywnej inkubacji termicznej homogenatów. W przypadku, gdy chociaż jedno z powtórzeń będzie miało wartość równą lub powyżej wartości progu odcięcia, próbka klasyfikowana jest jako dodatnia. Próbka uważana jest za ujemną, gdy obydwie wartości w badaniu powtórnym są poniżej progu odcięcia.

W krajach członkowskich Unii Europejskiej, w przypadku uzyskania wyniku dodatniego w szybkim teście, należy zarówno próbki jak i materiał, z którego je pobrano przesłać do badania potwierdzającego do Krajowego Laboratorium Referencyjnego lub Europejskiego Laboratorium Referencyjnego.

Alternatywna inkubacja termiczna homogenatów próbek dodatnich w pierwszym badaniu (dotyczy wyłącznie próbek pnia mózgu bydła).

Pobierz 230 μ l +20 μ l homogenatu próbki dodatniej w pierwszym badaniu i przenieś do stożkowej probówki z zakręcanym korkiem o pojemności 1,5–2,0 ml. Wstaw do suchego bloku grzejnego uprzednio ogrzanego do temperatury 70° \pm 2°C. Badaną próbkę inkubuj przez 10 \pm 1 min., a następnie wstaw do statywu i pozostaw na co najmniej 20 minut w temperaturze 18–26°C w celu schłodzenia. Tak przygotowany homogenat należy użyć do ponownego badania w czasie 2 godzin od zakończenia inkubacji, badając próbkę w duplikacie za pomocą testu IDEXX BSE-Scrapie Antigen Test Kit.

Środki Ostrożności

- Nie należy wystawiać substratu TMB na działanie silnego światła lub substancji utleniających. Dla substratu TMB należy używać wyłącznie czystych szklanych lub plastikowych naczyń.
- Należy zachować ostrożność, aby nie doprowadzić do kontaminacji poszczególnych składników zestawu diagnostycznego. Nie używać odczynników po upływie daty ich ważności, ani nie mieszać odczynników z różnych serii zestawu.
- Niektóre składniki zestawu zawierają azydek sodu jako konserwant (patrz opis zawartości zestawu). Należy unikać ewentualnej kontaminacji koniugatu anty-PrP-HRPO odczynnikami zawierającymi azydek sodu.
- Wszystkie odczynniki zestawu należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Przed użyciem odczynniki należy doprowadzić do temperatury 18–26°C, a po skończonym badaniu ponownie umieścić w zalecanych warunkach przechowywania (patrz „Przechowywanie Gotowych Odczynników”).
- Dla każdego odczynnika wykorzystywanego w badaniu używać oddzielnych naczyń do jego rozlewania. Unikać ewentualnej kontaminacji krzyżowej substratu TMB z gotowym roztworem koniugatu. Nie wlewać niewykorzystanego roztworu TMB z powrotem do dedykowanego pojemnika.
- Nie dopuszczać, aby płytki wysychały między etapem płukania a dodawaniem kolejnych odczynników - przerwy powinny być nie dłuższe niż 5 minut.

Bezpieczeństwo Pracy

- Cały personel musi być przeszkolony w zakresie ryzyka związanego z BSE i trzęsawką oraz znać zalecane sposoby dekontaminacji. Należy bezwzględnie przestrzegać procedur bezpieczeństwa biologicznego zgodnie z krajowymi regulacjami prawnymi dotyczącymi bezpieczeństwa.
- Bufor przygotowujący zawiera czynniki chaotropowe; unikać kontaktu ze skórą i błonami śluzowymi.
- Substrat TMB może podrażniać skórę i oczy. Unikać kontaktu bezpośredniego.
- Rozcieńczalnik do płytki - składnik 1 zawiera wysokie stężenie detergentów. Unikać kontaktu bezpośredniego.
- W pracy laboratoryjnej unikać używania naczyń szklanych.

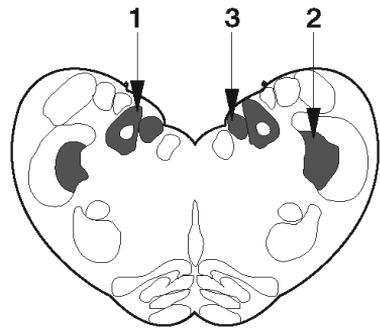
Dodatek

Pobieranie próbki pnia mózgu od bydła przy pomocy przyrządu do pobierania próbek firmy IDEXX

Firma IDEXX posiada przyrząd pozwalający na alternatywne pobieranie próbek do badań. Jest to strzykawka do pobierania próbki pnia mózgu. Przyrząd ten uzyskał akceptację Wspólnotowego Laboratorium Referencyjnego. Wskazówki zawarte w tym Dodatku nie wykluczają korzystania z innych informacji lub sposobów próbobrania pod warunkiem, że odpowiadają one wytycznym zawartym w Rozporządzeniu (EC) 999/2001 z późniejszymi poprawkami. Gdy właściwa identyfikacja anatomiczna rejonu pobierania próbki nie jest możliwa, należy użyć narzędzi sekcyjnych, zgodnie z opisem zawartym w punkcie „Pobieranie i Przygotowanie Próbek”.

1. Pień mózgu powinien zostać pobrany w rzeźni przez otwór potyliczny przy pomocy łyżeczki do pobierania próbek lub innego odpowiedniego do tego celu narzędzia. Należy odnaleźć rejon zasuwki z charakterystycznym wcięciem w kształcie litery „V” na górnej powierzchni pnia mózgu (patrz rysunek w podpunkcie Pobieranie i Przygotowywanie Próbek). Gdy identyfikacja rejonu pobierania próbki nie jest możliwa, należy użyć narzędzi sekcyjnych zgodnie z opisem zawartym w punkcie „Pobieranie i Przygotowanie Próbek”.

2. Położyć próbkę pnia mózgu tak, aby rejon z wcięciem w kształcie litery „V” znajdował się na wierzchu. Wsunąć koniec strzykawki po jednej stronie pnia mózgu od strony doogonowej na głębokość ok. 3 mm (tak, aby nie wypadła). Może zaistnieć potrzeba usunięcia nadmiaru pobranej próbki pnia mózgu, jeżeli długość odcinka od podstawy rdzenia przedłużonego do wierzchołka odcinka zawierającego wcięcie w kształcie litery „V” przekracza 3-4 cm.



Ryc. 2. Przekrój poprzeczny przez próbkę pnia mózgu bydła na wysokości zasuwki z zaznaczonymi miejscami predylekcyjnymi dla pobierania próbek do badań: 1) jądro szlaku samotnego, 2) jądro nerwu trójdzielnego, 3) część grzbietowa jądra nerwu błędnego (ryc. pochodzi z Podręcznika OIE dla Zestawów Diagnostycznych oraz Szczepionek, rozdz. 2.3.13)

3. Mocno przytrzymać tłok strzykawki. Z pomocą palca wskazującego wsunąć strzykawkę w pień mózgu. Ryc. 2 przedstawia miejsca predylekcyjne pobierania materiału do badań z rejonu zasuwki. Od momentu wprowadzenia strzykawki w badaną próbkę należy kierować nią tak, aby nie uszkodzić sąsiedniej strony pnia mózgu. Druga połowa pnia mózgu, z nienaruszoną zasuwką musi być dostępna do ewentualnego badania potwierdzającego.
4. Gdy cylinder strzykawki przesuwają się w stronę okolicy zasuwki, należy tak nim kierować, aby strzykawka przesunęła się w górną część rejonu próbobrania. (patrz Ryc. 1). Teraz w strzykawce powinna znajdować się tkanka nerwowa z okolicy zasuwki.

UWAGA: Próbka potrzebna do badania (tzn. rejon zasuwki) znajduje się na początku cylindra strzykawki.

5. Obrócić strzykawkę w lewo i w prawo, aby oddzielić pobraną próbkę od pnia mózgu. Ostrożnie wysunąć strzykawkę na zewnątrz.
6. Jeżeli z końca strzykawki wystaje duży fragment pobranej tkanki, należy cofnąć lekko tłok, aby próbka znalazła się wewnątrz cylindra. Manipulując strzykawką można usunąć pęcherzyki powietrza znajdujące się w górnej części oraz zagęścić pobraną próbkę, aby nie było pustych miejsc.

UWAGA: Wewnątrz strzykawki znajdują się regularne nacięcia, które można wyczuć podczas przesuwania tłoka. Odległość między dwoma nacięciami stanowi dokładną miarę objętości próbki.

7. Gdy tkanka została już pobrana do strzykawki, należy nacisnąć tłok, aby doszedł do najbliższego nacięcia. W obrębie pobranej próbki, między tłokiem a końcem strzykawki nie powinny występować puste miejsca. Nieznaczna ilość pobranej próbki, może wystawać z końca strzykawki.
8. Wytrzeć ewentualne pozostałości pobranej tkanki z powierzchni strzykawki. W trakcie tej operacji nie naciskać na tłok strzykawki, aby nie doszło do wyciśnięcia lub zagęszczenia próbki; obydwie efekty są niepożądane..
9. Trzymając pionowo probówkę do homogenizacji w jednej ręce, drugą ręką wprowadzić koniec strzykawki do górnej części probówki. Wycisnąć odpowiednią ilość tkanki nerwowej do probówki przesuwając tłok przez jedno nacięcie i zatrzymując go na drugim. Objętość między nacięciami wynosi 150 μ l; łącznie do probówki wyciska się 300 μ l próbki (odpowiednik 0,3 g \pm 0,05 g tkanki).
10. Zakręcić nakrętkę na probówce i rozpocząć homogenizację.

Pracownicy pobierający próbki do badania przy pomocy strzykawki firmy IDEXX powinni zostać odpowiednio przeszkoleni, aby pobierać próbkę z właściwego rejonu pnia mózgu. Każdy pracownik powinien okresowo sprawdzać dokładność pobrania, ważąc pobierane próbki. Gdy uzyskiwane wyniki odbiegają od przyjętych kryteriów, należy podjąć działania korygujące. Strzykawka firmy IDEXX jest przyrządem jednorazowym i należy pozbyć się jej po jednokrotnym pobraniu próbki, aby zapobiec możliwości kontaminacji krzyżowej.

Ograniczenia Odpowiedzialności

W maksymalnym dopuszczonym przez prawo obszarze, pod żadnym pozorem firma IDEXX lub jej przedstawiciele nie będą ponosić odpowiedzialności względem osób trzecich z powodu utraty zysku, czy też szkód specjalnych, przypadkowych, wynikłych, pośrednich, przykładowych, karnych lub wielokrotnych włączając w to bez ograniczeń utratę wartości przedsiębiorstwa, danych lub wyposażenia, czy też z powodu wstrzymania działalności wynikającej z wykonania, sprzedaży, dostawy lub użytkowania naszych produktów lub usług, niedotrzymania terminów dostaw lub opóźnień w dostawach tych produktów lub usług.

Pomoc techniczna:

IDEXX USA, tel.: +1 800 548 9997 lub +1 207 556 4890

IDEXX Europe, tel.: +800 727 43399

Skontaktuj się z regionalnym przedstawicielem IDEXX, dystrybutorem firmy IDEXX bądź odwiedź stronę internetową: idexx.com/contactlpd

*HerdChek jest znakiem towarowym lub zastrzeżonym znakiem towarowym IDEXX Laboratories, Inc. lub jej podmiotów stowarzyszonych w Stanach Zjednoczonych lub innych krajach.

Informacje o patentach: idexx.com/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

**Symbol Descriptions / Descriptions des symboles / Descripciones de los símbolos
Symbol-Beschreibungen / Descrizione dei simboli / Descrições do símbolos**

	<p>Batch Code (Lot) Numéro de lot Código de lote (Lote) Chargenbezeichnung (Ch.-B.) Codice del lotto (partita) Número de Partida (Lote) Numer partii</p>
	<p>Serial Number Numéro de série Número de serie Seriennummer Numero di serie Número de série Numer seryjny</p>
	<p>Catalog Number Numéro de catalogue Número de catálogo Katalognummer Numero di catalogo Número de catálogo Numer katalogowy</p>
	<p>Authorized Representative in the European Community Représentant agréé pour la Communauté européenne Representante autorizado en la Comunidad Europea Autorisierte EG-Vertretung Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea Representante autorizado na Comunidade Europeia Autoryzowany przedstawiciel w UE</p>
	<p>Use by date À utiliser avant la date Usar antes de Verwendbar bis Usare entro Data de Vencimento Data przydatności</p>
	<p>Manufacturer Fabricant Fabricante Hersteller Ditta produttrice Fabricante Producent</p>
	<p>Major change in the user instructions Modification majeure du mode d'emploi Modificações importantes nas instruções de uso Modificación importante en el manual de instrucciones Wesentliche Änderung der Gebrauchsinformation Modifica importante nell'inserto tecnico Większe zmiany w instrukcji wykonania testu</p>

Danger / Danger / Perigo / Peligro / Gefahr / Pericolo / Ostrzeżenie



H302 / H314 / H410 / P303+P361+P353 / P501

Positive control – Harmful if swallowed. Causes severe skin burns and eye damage. Very toxic to aquatic life with long lasting effects. IF ON SKIN (or hair): Remove immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower. Dispose of in accordance with local/regional/national/international regulations.

Contrôle positif – Nocif en cas d'ingestion. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher. Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

Controle Positivo – Nocivo por ingestão. Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche. Eliminar o conteúdo/recipiente em conformidade com os regulamentos locais/regionais/nacionais/internacionais.

Control Positivo – Nocivo en caso de ingestión. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse. Eliminar el contenido/recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional.

Positive Kontrolle – Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung. BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. Inhalt/Behälter gemäß lokalen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften zuführen.

Controllo positivo – Nocivo se ingerito. Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia. Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alla regolamentazione locale/regionale/nazionale/internazionale.

Kontrola Dodatnia – Działa szkodliwie w przypadku połknięcia. Wywołuje poważne oparzenia skóry i uszkodzenia oczu. Wysoka toksyczność dla organizmów wodnych z długotrwałym efektem. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ NA SKÓRĘ (lub włosy): zdjąć natychmiast skażone ubranie. Spłukać skórę pod strumieniem wody/ prysznicem. Usuwać zgodnie z lokalnymi / krajowymi / międzynarodowymi przepisami.

H315 / H318 / P280 / P332+P313 / P305+P351+P338 / P310

Negative Control – Causes skin irritation. Causes serious eye damage. Wear protective gloves/ eye protection/face protection. If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Immediately call a POISON Center of doctor/physician.

Contrôle négatif – Provoque une irritation cutanée. Provoque des lésions oculaires graves. Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

Controle Negativo – Provoca irritação cutânea. Provoca lesões oculares graves. Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

Control Negativo – Provoca irritación cutánea. Provoca lesiones oculares graves. Llevar guantes/gafas/máscara de protección. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico.

Negative Kontrolle – Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenschäden. Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

Controllo negativo – Provoca irritazione cutanea. Provoca gravi lesioni oculari. Indossare guanti/Proteggere gli occhi/il viso. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Kontrola Ujemna – Wywołuje podrażnienia skóry. Wywołuje poważne uszkodzenia oczu. Stosować rękawiczki ochronne/ochrony oczu/ochrony twarzy. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: Zasięgnąć porady / pomocy lekarskiej. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.

H315 / H319 / P280 / P332+P313 / P337+P313

Plate Diluent 1 – Causes skin irritation. Causes serious eye irritation. Wear protective gloves/eye protection/face protection. If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

Composant 1 du diluant de la plaque de dilution – Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

Componente 1 de diluição para placas – Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

Componente 1 de dilución de la placa – Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Llevar guantes/gafas/máscara de protección. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

Probenverdünner 1 – Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Componente 1 diluente per piastra – Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Indossare guanti/Proteggere gli occhi/il viso. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

Rozcińczalnik do płytki - składnik 1 – Wywołuje podrażnienia skóry. Wywołuje poważne podrażnienia oczu. Stosować rękawiczki ochronne/ochrony oczu/ochrony twarzy. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: Zasięgnąć porady / pomocy lekarskiej. Jeśli podrażnienie oczu utrzymuje się: Zasięgnąć porady / pomocy lekarskiej.

H316 / H334 / P304+P340 / P332+P313

Plate Diluent 2 – Causes mild skin irritation. May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled. IF INHALED: If breathing is difficult, remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing. If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

Composant 2 du diluant de la plaque de dilution – Provoque une légère irritation cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. EN CAS D'INHALATION: transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.

Componente 2 de diluição para placas – Causa uma irritação suave da pele. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Componente 2 de dilución de la placa – Provoca una leve irritación cutánea. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

Probenverdünner 2 – Verursacht milde Hautreizungen. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Componente 2 diluente per piastra – Provoca delicato irritazione della pelle. Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.

Rozcińczalnik do płytki - składnik 2 – Wywołuje łagodne podrażnienia skóry. W następstwie wdychania może wywołać objawy alergiczne, astmatyczne lub trudności w oddychaniu. W przypadku dostania się do dróg oddechowych: Jeśli występują trudności w oddychaniu wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: Zasięgnąć porady / pomocy lekarskiej.

EUH208

Conjugate Diluent – Contains Proclin. May produce an allergic reaction.

Diluant du conjugué – Contient Proclin. Peut produire une réaction allergique.

Diluyente tampão de conjugado – Contém Proclin. Pode provocar uma reação alérgica.

Diluyente tamponado de conjugado – Contiene Proclin. Puede provocar una reacción alérgica.

Konjugatverdünnungspuffer – Enthält Proclin. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Tampone diluente per coniugato – Contiene Proclin. Può provocare una reazione allergica.

Rozcieńczalnik koniugatu – Zawiera Proclin. Może wywoływać reakcję alergiczną.

H302 / H412 / P501

Conditioning buffer – Harmful if swallowed. Harmful to aquatic life with long lasting effects. Dispose of in accordance with Local/regional/national/international regulations.

Tampon de conditionnement – Nocif en cas d'ingestion. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Éliminer le contenu/réceptacle conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

Solução tampão (buffer) de condicionamento – Nocivo por ingestão. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Eliminar o conteúdo/recipiente em conformidade com os regulamentos locais/regionais/nacionais/internacionais.

Solución tamponada (buffer) de acondicionamiento – Nocivo en caso de ingestión. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. Eliminar el contenido/recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional.

Konditionierungspuffer – Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. Inhalt/Behälter gemäß lokalen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften zuführen.

Tampone di condizionamento – Nocivo se ingerito. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alla regolamentazione locale/regionale/nazionale/internazionale.

Bufor przygotowujący – Działa szkodliwie w przypadku połknięcia. Szkodliwy dla organizmów wodnych z długotrwałym efektem. Usuwać zgodnie z lokalnymi / krajowymi / międzynarodowymi przepisami.

H316 / P332+P313

Wash solution 1 – Causes mild skin irritation. If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

Solution 1 de lavage – Provoque une légère irritation cutanée. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.

Solução 1 de lavagem – Causa uma irritação suave da pele. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Solución 1 de lavado – Provoca una leve irritación cutánea. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

Waschlösung 1 – Verursacht milde Hautreizungen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Soluzione 1 di lavaggio – Provoca delicato irritazione della pelle. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.

Roztwór 1 do płukania – Wywołuje łagodne podrażnienia skóry. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: Zasięgnąć porady / pomocy lekarskiej.



One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092 USA
idexx.com

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