

Bovine Spongiform Encephalopathy-Scrapie Antigen Test Kit, EIA

Samo za veterinarska upotrebu

Pregled

IDEXX HerdChek* komplet za testiranje goveđe spongiformne encefalopatije (BSE)-Scrapie antigen je imunoenzimski antigen-vezujući (EIA) test za otkrivanje abnormalnog konformera prionskog proteina (PrPSc) u postmortem moždanim tkivima (poželjno obex) goveda, malih preživača (ovce i koze) i jelena zahvaćenih BSE-om, scrapieom ili bolešću hronične iscrpljenosti (CWD). Za primjenu kod malih preživača, test će također otkriti PrPSc u limfnim čvorovima ili tkivu slezene; kod cervida, test će takođe otkriti PrPSc u retrofaringealnim limfnim čvorovima (RPLN). Dizajniran je da brzo identificira uzorke koji sadrže PrPSc povezan sa bolešću sa minimalnim rukovanjem uzorkom i može se automatizovati kod velikog broja uzoraka. Ovaj komplet je samo za veterinarsku upotrebu.

Za evropske države članice: Ovo je brzi test koji je odobrila EU za in vitro detekciju BSE i PrPSc povezan sa scrapie-om kod goveda i malih preživara. Ovaj test se također može koristiti u EU za brzo testiranje cervida na transmisivnu spongiformnu encefalopatiju (TSE).

Validacija ovog kompleta je provedena korištenjem krajnika, retrofaringealnog limfoidnog čvora i uzorka moždanog stabla losa (*Cervus canadensis*). Proizvođač brzog testa mora imati uspostavljen sistem osiguranja kvaliteta odobren od strane Referentne laboratorije Evropske unije (EURL), koja osigurava da se performanse testa ne mijenjaju. Proizvođač mora dostaviti protokol testiranja EURL-u. Alati za uzorkovanje i modifikacije brzog testa ili protokola testiranja (uključujući uzorkovanje) mogu biti učinjeni samo nakon prethodnog obavljanja EURL-u, i pod uslovom da EURL utvrdi da modifikacija ne smanjuje osjetljivost, specifičnost ili pouzdanost brzog testa. Taj nalaz se dostavljaju Komisiji EU i nacionalnim referentnim laboratorijama (na bazi Uredbe(EZ) br. 956/2010 o izmjeni Uredbe (EZ) br. 999/2001).

Opis i principi

Ovaj komplet koristi vlasnički metod licenciran od strane Microsens Biotechnologies (London, UK.; patent na čekanju) koji omogućava otkrivanje abnormalnih priona. PrPSc-specifičan ligand je imobiliziran na površini ploče za hvatanje antiga. Ispitni uzorci pripremaju se homogeniziranjem tkiva i zatim razrjeđivanjem uzorka razrjeđivačem radne ploče. Nakon nanošenja uzorka na ploču, konformer povezan sa bolešću se vezuje za imobilizovane ligande sa visokim afinitetom. Ploče se peru kako bi se uklonili nevezani materijali, uključujući normalni konformer PrP proteina. Nakon inkubacije sa puferom za kondicioniranje, zarobljeni antigen se zatim detektuje korišćenjem PrP-specifičnog antitijela koje je konjugirano sa peroksidaza hrena (HRPO). Ploča se ispere kako bi se uklonio nevezani konjugat a dodaje se supstrat peroksidaze. Razvoj boje je povezan sa relativnim količinama PrPSc uhvaćen ligandom imobiliziranim u mikrotatarskoj jažici.

Interpretacija rezultata uzorka zasniva se na apsorpciji uzorka. Uzorak čiji $A_{450}-A_{REF}$ je manji od granične vrijednosti smatra se negativnom prilikom testiranja sa IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen Test Kit. Uzorci čiji je $A_{450}-A_{REF}$ veći ili jednak graničnoj vrijednosti klasifikovani su kao pozitivni za PrPSc. Potvrđni test kao što je imunohistohemija je potreban za sve pozitivne rezultate testova.

Komponente kita

Čuvati sve komponente na 2–8°C.

| | |
|--|-------------|
| Stavka | 460 testova |
| A Ploče za ezivanje antigena | 5 ploča |
| N Negativna kontrola—Nereaktivna sa pločom za vezivanje antigena; konzerviran natrijum azidom | 5 x 1 mL |
| P Pozitivna kontrola—neinfektivna, reaktivna sa pločom za vezivanje antigena; konzervirana natrijum azidom | 5 x 1 mL |
| D1 Razređivač ploča komponenta 1; konzerviran sa natrijum azidom | 20 ml |
| D2 Komponenta razblaživača ploče 2 | 5 x 200 µL |
| R Razblaživač za rekonstituciju | 20 mL |
| CB Kondicioni pufer; konzerviran sa natrijum azidom | 60 mL |
| CC Koncentrat konjugata; konzerviran sa Bronidox L i metilizotiazolonom | 300 µL |
| SRB-CC Koncentrat konjugata mozga malih preživara; konzerviran sa Bronidox L i metilizotiazolonom | 300 uL |
| CD Konjugatni diluent pufer sa deterdžentima stabilizatorima proteina; konzerviran sa gentamicinom i proklinom | 60 mL |
| W1 10X otopina za pranje 1; konzerviran sa natrijum azidom | 450 mL |
| W2 10X otopina za pranje 2; konzervirano sa gentamicinom | 450 mL |
| T TMB supstrat | 60 mL |

Napomene: Pogledajte tabelu na kraju uputstva za opis simbola koji se koriste na uputstvu i etikete ovog kompleta. Pogledajte kraj ovog uputstva za opasnost od reagensa i upozorenja o mjerama opreza.

Potrebni materijali i oprema (nije u kompletu)

- Precizne pipete i višekanalne pipete pogodne za pipetiranje između 25 i 200 µL. Zapremine reagensa navedene u Proceduri testiranja zahtijevaju preciznost pipete manje ili jednako 5%.
- Graduirani cilindri za rastvore za pranje
- Poklopci od tvrde plastike ili ljepljive ploče i posude za doziranje reagensa
- Instrumenti za disekciju za prikupljanje uzoraka za jednokratnu upotrebu ili uređaj za sakupljanje uzoraka
- Čitač ploča sa 96 polja (opremljen filterima od 450-nm i 620-650-nm) i ispirač
- FastPrep® (FP120A, FP220A), FastPrep®-24, Precess 48®, Precess 24® ili Precellys 24® instrument.
- Paket pribora—ploče za razrjeđivanje, cijevi za razbijanje tkiva sa perlicama, produženi nastavci za pipete za prijenos homogenata i adhezivni poklopci ploča (dostupno od IDEXX-a)
- Lična zaštitna oprema—zaštitne naočare, laboratorijski mantili, rukavice za jednokratnu upotrebu, navlake za cipele, mreže za kosu i maske za lice
- 0,5–1,0 N HCl ili 1,0 N H₂SO₄ stop rastvor
- Natrijum hipohlorit (izbjeljivač), 1N NaOH i 1N HCl, deionizirana voda
- Opciono—robotski procesor uzoraka sa preciznošću pipetiranja od ≤2,5% mjereno CV analizom (Tecan, na primjer)
- Opciono—mikrotatarski šejker za ploče (npr. IKA MTS 2/4)
- Opciono—inkubator za ploče koji može održavati temperaturu od 32–37°C i ima minimalan protok vazduha

- Opciono—suhu topotni blok za epruvete za mikrofuge od 1,5–2 mL (sposobna za održavanje temperature od 70°C)
- Opciono—1,5–2 mL konusne epruvete za mikrofuge sa poklopcom

Uzorkovanje i priprema tkiva

A. Moždano tkivo goveda i malih preživara

1. Uzorkovanje i laboratorijska ispitivanja moraju biti u skladu sa Uredbom (EZ) br. 999/2001, Aneks X, Poglavlje C, koje se u smislu prikupljanja uzoraka odnosi na najnovije izdanje Priručnika standarda za dijagnostičke testove i vakcine Međunarodnog ureda za epizootije (OIE) navodeći: „Poželjno je da uzorak za imunotest bude na, ili što je moguće bliže obeksu, ali ne dalje od 1,5 cm ispred obeksa.” Sakupiti 0,30 g ($\pm 0,05$ g) nervnog tkiva sa lijeve ili desne strane moždanog stabla od nivoa obeksa (kad god je moguće) sa instrumentima za disekciju, i izmjerite uzorak kako biste bili sigurni o količini. Alternativno, može se koristit IDEXX set za prikupljanje goveđeg obeksa kao što je opisano u Dodatku. Osoblje koje prikuplja obeks mora biti obučeno za metodu uzorkovanja.

Dijagram dole pokazuje ispravno područje uzorkovanja.

NAPOMENA: Nakon uzimanja uzorka, cjelokupna hemisekcija moždanog stabla sa intaktnom regijom obeksa i mali mozak (ako postoji) moraju ostati dostupni za potvrđeno testiranje.

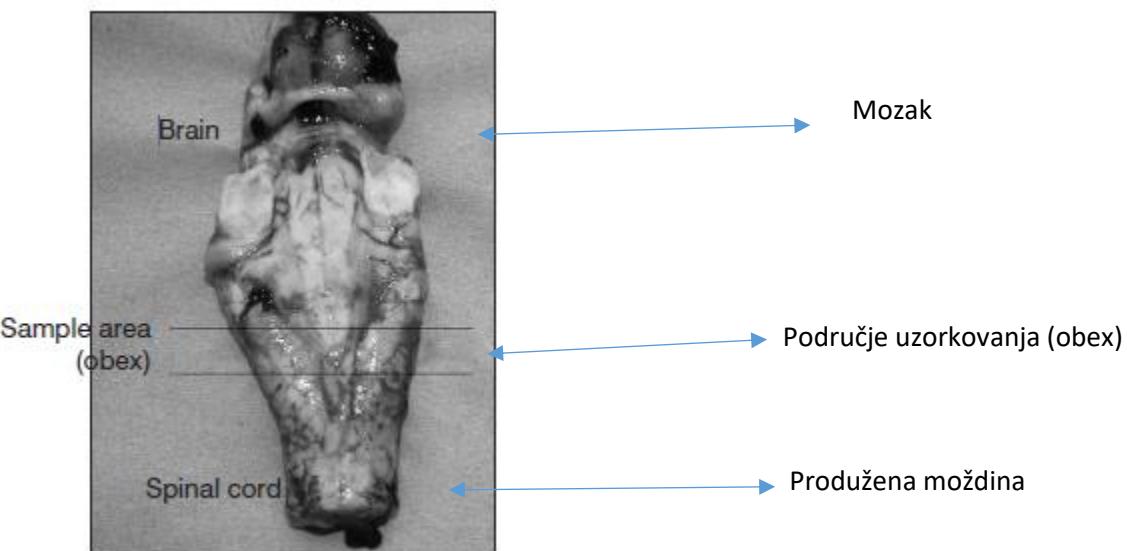


Figure 1. Bovine brain stem.

Slika 1:Moždano stablo goveda

2. Stavite tkivo u epruvetu za razbijanje tkiva i dobro zatvorite. Epruvete su opremljene sa keramičkim perlama i puferom.

3. Četiri instrumenta za razbijanje tkiva su validirana za upotrebu sa IDEXX BSEScrapie EIA. Stavite epruvete u instrument i homogenizirajte kako je naznačeno za primjenjiv instrument. Ako mljevenje nije dovoljno, ponovite jedan ciklus.

- Program za instrumente FastPrep*: Meljite uzorke 40 sekundi na maksimalnoj brzini (6,5 m/s). Ako je potreban drugi ciklus, instrument se mora ohladiti 5-10 minuta između ciklusa.
- Precess 48*, Precess 24* i Precellys 24* program instrumenta: samljeti uzorke 2 puta po 20 do 25 sekundi pri 6500 o/min, sa odgodom od 5 sekundi između ciklusa.

4. Homogenati (svježi ili odmrznuti) se mogu držati na 18-26°C do 4 sata prije početka testa.

Broj uzoraka koji se pripremaju u jednoj seriji je fleksibilan. Homogenati može se čuvati do 24 sata na 2-8°C ili držati na ≤-20°C do 6 mjeseci. Zamrznuti homogenati se prije upotrebe moraju odmrznuti i dobro promiješati inverzijom. Uzorci tkiva se mogu čuvati na -80°C.

B. Limfni čvor malih preživara ili tkivo slezine

1. Sakupite 0,30 g ($\pm 0,05$ g) tkiva limfnih čvorova ili slezine. Za limfne čvorove, tkivo treba uzeti na način kako bi se maksimiziralo prisustvo ćelija germinalnog centra. Isjeckajte uzorak na 8-10 malih komada.
2. Nastavite sa obradom i skladištenjem uzorka kao što je opisano za moždano tkivo.

NAPOMENA: Limfni čvor ili tkivo slezene ne mogu se koristiti u kontekstu službenog uzorkovanja i testiranja u okviru Uredbe (EZ) br. 999/2001.

C. Mozak cervida i tkivo limfnih čvorova

1. Pripremite epruvete za razbijanje tkiva uklanjanjem 0,2 ml rastvora iz svake epruvete.
2. Sakupiti 0,30 g ($\pm 0,05$ g) tkiva iz retrofaringealnog limfnog čvora ili mozga (poželjno obeksa). Tkiva mozga i limfnih čvorova treba testirati pojedinačno. Za limfne čvorove, tkivo treba uzeti na način kako bi se maksimiziralo prisustvo ćelija germinalnog centra. Isjeckajte uzorak na 8-10 malih komada.

Imajte na umu da se u Njemačkoj mora poduzeti individualno testiranje tkiva mozga i limfnih čvorova. Ova odluka slijedi smjernice EUR-a (TSE EU referentne laboratorijske smjernice za otkrivanje bolesti hronične iscrpljenosti, <https://science.vla.gov.uk/tse-lab-net/documents/cwd-guidelines.pdf> i Naučno mišljenje o bolesti hronične iscrpljenosti (II), EFSA Panel o biološkim opasnostima (BIOHAZ), EFSA Journal 2018;16(1):5132. 59 str.).

3. Stavite tkivo u epruvetu za razbijanje tkiva i dobro zatvorite..

4. Stavite epruvete u instrument i homogenizirajte kako je naznačeno za primjenjiv instrument. Ako mljevenje nije dovoljno, ponovite jedan ciklus.

Program za instrumente FastPrep*: Meljite uzorce 30 sekundi pri maksimalnoj brzini (6,5 m/s). Odmarajte instrument pet minuta. Ponovite mljevenje još 30 sekundi na maksimalnoj brzini. Ako vizualnim pregledom mljevenje nije dovoljno, ponovite jedan ciklus.

Program za instrumente Precess 48*, Precess 24* i Precellys 24*: Samljite uzorce za 30 sekundi na 6500 o/min. Odmarajte instrument pet minuta. Ponovite mljevenje još 30 sekundi na 6500 o/min. Ako vizualnim pregledom mljevenje nije dovoljno, ponovite jedan ciklus.

Priprema reagensa

Rastvor za pranje (rastvor za pranje 1, rastvor za pranje 2)

Koncentrate rastvora za pranje treba dovesti na 18-26°C i promiješati da bi se osiguralo otapanje bilo koje precipitirane soli. Svaki koncentrat za pranje mora se razrijediti 1:10 sa destilovanom ili dejonizovanom vodom prije upotrebe (npr. 40 mL koncentrata plus 360 mL vode po ploči za analizu).

Komponenta za razrjeđivanje ploče 2

Komponenta za razrjeđivanje ploče 2 (D2) se isporučuje kao liofilizat. Solucija se priprema dodavanjem 200 μ L razrjeđivača za rekonstituciju (R), ostavljajući da odstoji približno 1 minut, a zatim lagano miješajte. Iskoristite u roku od 1 sata od pripreme.

Razblaživač za radnu ploču

Komponentu razblaživača ploče 1 (D1) treba podići na 18–26°C. Pripremite razrjeđivač radne ploče dodavanjem 1 dijela komponente za razrjeđivanje ploče 2 (D2; pripremljeno kao gore) na 25 dijelova komponentu za razrjeđivanje ploče 1 (D1) i dobro promiješajte (npr. 120 μ L D2 do 3,0 mL D1 po ploči). Približno 2,75 mL razrjeđivača radne ploče je potrebno po ploči prilikom testiranja uzorka mozga. Testiranje limfnih čvorova ili slezene zahtijeva približno 5 mL razblaživača radne ploče po ploči. Razblaživač za radnu ploču treba pripremiti i upotrijebiti istog dana.

Negativne i pozitivne kontrole

Negativne i pozitivne kontrole se isporučuju liofilizirane. Rekonstruišite svaku kontrolu dodavanjem 1 mL razblaživača za rekonstituciju. Ostavite rastvor da odstoji oko 1 minut a zatim energično promiješati.

Iskoristite u roku od 2 sata od pripreme. **NEMOJTE RAZRIJEĐIVATI NEGATIVNE ILI POZITIVNE KONTROLE U RAZRJEĐIVAČU RADNE PLOČE.**

HRPO-konjugirane solucija anti-PrP antitijela

Rastvori anti-PrP antitijela konjugiranih s HRPO pripremaju se razrjeđivanjem odgovarajućeg koncentrata konjugata (vidi napomenu ispod) u razblaživač konjugata (CD) kako je naznačeno na etiketi (na primjer, za razrjeđivanje 1:100 bilo bi potrebno 120 µL koncentrata konjugata na 12 mL razblaživača konjugata). Za tačan faktor razrjeđivanja pogledajte naljepnicu koncentrata konjugata. Razblaženi konjugat treba pripremiti i iskoristiti u roku od 4 sata.

VAŽNA NAPOMENA: Postoje dva koncentrata konjugata za upotrebu sa ovim testom. Odaberite odgovarajući od njih za tkivo koje će biti testirano:

- **Koncentrat konjugata (CC)**—koristite ovaj konjugat kada testirate uzorce mozga goveda i cervida, uzorce limfnih čvorova malih preživara i cervida i uzorce slezene malih preživara
- **Koncentrat konjugata mozga malog preživača (SRB-CC)**—Upotrebite ovaj konjugat prilikom testiranja moždanog tkiva malih preživara.
- Negativne i pozitivne kontrolne jažice moraju biti uključene za svaki tip testiranog konjugata.

Acid Stop Solution

Solucija za zaustavljanje testa nije obezbijeđena u kompletu za testiranje. Stop rastvor (0,5–1,0 N HCl ili 1,0 N H₂SO₄) može se kupiti u radnoj koncentraciji ili pripremiti iz koncentrata.

Sva tri dolje opisana protokola zahtijevaju da reagensi budu na 18–26°C prije upotrebe. Prije početka testa pripremite otopine koje će se koristiti u testu. Pomiješajte sve reagense lagano kovitlajući. Kontrole (negativne i pozitivne) treba snažno miješati i testirati u duplikatu. Poklopac ploče treba koristiti za pokrivanje ploče za vrijeme trajanja testa.

Čuvanje pripremljenih reagensa

| Artikl | Rekonstitucijski volumen | Rok trajanja |
|----------------------------------|--------------------------|---|
| N/P negativna/pozitivna kontrola | 1 mL | 2 sata na 18–26°C (6 mjeseci na -20°C) |
| D2 Razrjeđivač ploče 2 | 200 µL | 1 sat na 18–26°C (6 mjeseci na -20°C) |
| Razblaživač radne ploče | N/A | 8 sati na 18–26°C |
| HRPO: anti-PrP solucija | N/A | 4 sata na 18–26°C |
| Rastvor za pranje 1–1X | N/A | 1 sedmicu na 18–26°C |
| Rastvor za pranje 2–1X | N/A | 1 sedmicu na 18–26°C |

Čuvajte sve neiskorištene dijelove ploča u tamnoj, isušenoj, zatvorenoj posudi.

Procedura testiranja

Homogenati uzorka se pripremaju kako je opisano u odjeljku Uzorkovanje i priprema tkiva. Robotski procesor uzorka može se koristiti umjesto ručne metode od koraka 1 ili kada se kontrole i razrijeđeni uzorci dodaju pločama (korak 3).

Važno: Pokrijte svaku ploču za analizu čvrstim plastičnim ili adhezivnim poklopcem ploče tokom svake inkubacije reagenasa. Ako se inkubacije reagenasa provode u biološkom kabinetu, ploče moraju biti prekrivene adhezivnim prevlakama.

Test protokol

IDEXX BSE-Scrapie EIA ima dva odobrena protokola za moždano tkivo: kratki i ultra-kratki. Protokoli imaju ekvivalentne performanse, ali imaju različite zahtjeve za opremom za skraćeno vrijeme analize. Protokoli su detaljno opisani u tabeli na sljedećoj stranici.

NAPOMENA: Protokol za testiranje slezine i limfnih čvorova malih preživara razlikuje se od kratkog i ultra-kratkog protokola i opisan je u tabeli testnog protokola ispod.

Razblaživanje uzorka u razblaživaču za radnu ploču

Postavite šablon koji pokazuje gdje se nalaze uzorci na ploči i ploči za razrjeđivanje. Rezervirajte duple jažice za kontrole. Razrjeđivač radna ploče se može dodati na ploču za razrjeđivanje prije ili poslije uzorka. Odnos je 30 µL razrjeđivača radne ploče na 120 µL homogenata uzorka (slezena i limfni čvorovi malih preživara - omjer je 50 µL razblaživača na 100 µL homogenata uzorka).

Resuspendirajte homogenat inverzijom, a zatim pažljivo pipetirajte uzorak provlačenjem vrha pipete za prijenos homogenata kroz kuglice i uzmite uzorak iz epruvete za disruptciju tkiva. Pažljivo nanesite svaki uzorak u ploču za razrjeđivanje, vodeći računa da izbjegnete stvaranje mjehurića u homogenatu ili bilo kakav ostatak homogenata na rubovima jažica ploča za razrjeđivanje.

Nakon što se homogenat razrijedi, temeljito promiješajte uzorke, vodeći računa da izbjegnete mjehuriće. Miješanje obaviti pipetom ili šejkerom. Ako se koristi šejker, bit će potrebno optimizirati brzinu i vrijeme kako bi se osiguralo potpuno miješanje bez raspršivanja uzorka. Nastavite sa testiranjem u roku od 2 sata.

Upotreba šejkera za ploče za inkubaciju uzorka (kratki i ultrakratki protokoli)

Kratki i Ultra-kratki protokoli uključuju sporu rotaciju (200 ± 100 o/min) na platformi šejkera samo za korak inkubacije uzorka. Šejker ploča treba da stvori blago horizontalno, kružno kretanje. Iako će se uzorak unutar svake jažice mikrotitarske ploče lagano pomjeriti, možda neće biti vizuelno vidljiv. Pokret ne bi trebao biti dovoljno snažan da se uzorak pomjeri preko strane jažice. Vremena inkubacije smanjuju u skladu sa inkubacijom uzorka i konjugata kao što je opisano u sljedećoj tabeli. Protokol slezine malih preživara/limfnih čvorova zahtijeva da su sve inkubacije su stacionarne.

| Procedura testiranja | | Kratki protokol | Ultra-kratki protokol | Protokol za slezenu/limfne čvorove malih preživara |
|----------------------|---------------------------------------|--|--|--|
| Tip uzorka | | Mozak goveda, malih preživara i cervida, limfni čvorovi cervida | Mozak goveda i malih preživara | slezena/limfni čvorovi malih preživara |
| Korak | Radnja | 18–26°C svi koraci | 32–37°C: samo inkubacija (koraci 3,5,8,10) 18–26°C: svi ostali koraci uključujući ispiranje | 18–26°C svi koraci |
| 1 | Dodatak uzorka na dilucionu ploču | 120 µL uzorka sa 30 µL diluentu radne ploče | | 100 µL uzorka sa 50 µL diluenta radne ploče |
| | | MIX WELL- pogledati u odjeljku "Razr. uzorka u diluentu radne ploče" | | |
| 2 | Dodavanje uzorka na ploču | pipetirajte 100 µL razrjeđenog uzorka na testnu ploču; pomiješajte kontrole, dodajte 100 µL u duplikatu; pokrijte ploču sa poklopcom za ploče. | | |
| 3 | Inkubacija ploče | 45–60 min.; sporo miješanje 200 ± 100 rpm | 20–25 min.; sporo miješanje 200 ± 100 rpm | 2–3 sata stacionarno |
| 4 | Isprati sa 1X Otopinom za ispiranje 1 | Isprati jažice 6 puta sa ~350 µL 1X Otopinom za ispiranje 1. | | |

| | | | | |
|----|---|---|------------|--|
| 5 | Kondicioner: Dodavanje/ Inkubacija | Dodati 100 µL kondicionog pufera u svaku jažicu; poklopiti ploču; inkubirati 10 ±1 min. | | |
| 6 | Isprati sa 1X Otopinom za ispiranje 2 | Isprati jažice 3 puta sa ~350 µL 1X Otopine za ispiranje 2. | | |
| 7 | Dodatak konjugata | Dodati 100 µL razrijeđenog konjugata (za mozak goveda i cervida koristiti CC; mozak malih preživara SRB-CC) i poklopiti ploču poklopcem. | | Dodati 100 µL razrijeđenog CC konjugata i poklopiti ploču poklopcem. |
| 8 | Inkubacija konjugata | 45–50 min. | 25–30 min. | 60–75 min. |
| 9 | Ispiranje sa 1X Otopinom za ispiranje 2 | Isprati jažice 5 puta sa ~350 µL 1X Otopinom za ispiranje 2. | | |
| 10 | Dodatak supstrata/ Inkubacija | Dodati 100 µL supstrata u svaku jažicu; prekriti ploču; inkubirati 15 ±1 min. dalje od direktnog sunčevog svjetla (ne koristiti adhezivni pokrivač). | | |
| 11 | Dodavanje Stop solucije/Očitavanje ploče | Dodati 100 µL kisele stop solucije; ploča može biti čuvana do 30 min. na tamnom prije očitanja optičke gustoće (450 nm) koristeći referentnu talasnu dužinu (A_{REF}) 620 nm do 650 nm. | | |

1. Inkubacija na 32–37°C znači stavljanje ploče za analizu u inkubator koji je prethodno zagrijan na 32–37°C.

Pregled formata testa

| | Mozak goveda | Mozak malih preživara | Limfni čvorovi i slezena malih preživara | Mozak i limfni čvorovi cervida |
|--|-----------------------|-----------------------|--|--------------------------------|
| Priprema uzorka: | | | | |
| Uzorkovanje špricom | Da | Ne | Ne | Ne |
| Mljevenje tkiva (prehomogenizacija) | Ne | Ne | Da | Da (RPLN) Ne (Mozak) |
| Uslovi testiranja: | | | | |
| Koncentrat konjugata | CC | SRB-CC | CC | CC |
| Diluent radne ploče (omjer diluent radne ploče/uzorak) | 30 µL/120 µL | 30 µL/120 µL | 50 µL/100 µL | 30 µL/120 µL |
| Odobreni protokoli | Kratki i Ultra-kratki | Kratki i Ultra-kratki | Slezena i limfni čvorovi malih preživara | Kratki |
| Test Cutoff | NCx + 0.120 | NCx + 0.180 | NCx + 0.180 | NCx + 0.150 |
| Primjena opcionog tretmana toplotom | Da | Ne | Ne | Ne |

Interpretacija rezultata

Da bi test bio validan, negativna kontrolna sredina (NCx) mora se izvoditi s vrijednošću $A_{450} - A_{REF}$ manji od 0.150, a srednja vrijednost pozitivne kontrole (PCx) mora imati $A_{450} - A_{REF} \geq 0.400$

Kalkulacije

Izračun srednje negativne kontrole (NCx):

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

Izračunavanje srednje pozitivne kontrole (PCx):

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

Izračun granične vrijednosti:

Granica za goveda = NCx + 0,120

Granica za male preživare = NCx + 0,180

Cervid cutoff = NCx + 0,150

NAPOMENA: Za definiciju AREF-a pogledajte 11. korak dijagrama testnih procedura.

Rezultati

Interpretacija rezultata uzorka zasniva se na apsorpciji uzorka. Uzorci sa $A_{450} - A_{REF}$ vrijednosti manje od granične vrijednosti IDEXX HerdChek BSE-Scrapie kits smatraju se negativnim. Uzorci sa vrijednostima $A_{450} - A_{REF}$ većim ili jednakim graničnoj vrijednosti klasificiraju se kao inicijalno reaktivni za PrPSc, a homogenat treba ponovo testirati u duplikatu na IDEXX HerdChek BSE-Scrapie antigen test kompletu.

Ponovno testiranje goveđeg mozga može se obaviti iz originalnog homogenata tkiva ili iz homogenata pripremljenog korištenjem opcionog protokola toplinske obrade, opisanog u nastavku. Ako je kod bilo kojeg ponovnog testiranja vrijednost jednaka ili veća od granične vrijednosti, uzorak se smatra pozitivnim. Uzorak se smatra negativnim kada su oba ponovljena testiranja manja od granične vrijednosti. Unutar EU svi inicijalno reaktivni uzorci goveda koji su negativni nakon ponovnog testiranja uz primjenu protokola toplinske obrade treba prijaviti kao negativane.

Uzorke malih preživača i cervida treba ponovo testirati u duplikatu direktno iz originalnog homogenta tkiva - NEMOJTE termički tretirati homogenate malih preživara ili cervida. Ako je kod bilo kojeg ponovnog testiranja vrijednost jednaka ili veća od granične vrijednosti, uzorak se smatra pozitivnim. Uzorak se smatra negativnim kada su oba ponovljena testiranja manja od granične vrijednosti.

U zemljama članicama EU, svi pozitivni uzorci brzih testova moraju se poslati u Referentnu laboratoriju za TSE zemlje u kojoj se provodi testiranje ili Referentna laboratorija Evropske unije za potvrđno testiranje.

Opcioni protokol toplinske obrade za inicijalno reaktivne goveđe homogenate:

(Protokol toplinske obrade primjenjuje se samo na uzorce od goveda.)

Uzmite $230 \pm 20 \mu\text{L}$ inicijalno reaktivnog homogenata tkiva i dozirajte u $1,5\text{-}2 \text{ mL}$ bočicu sa konusnim dnom sa zatvaračem. Stavite bočicu u suhi blok za grijanje koji je prethodno zagrijan na $70 \pm 2^\circ\text{C}$. Grijte epruvetu 10 ± 1 min. a zatim stavite epruvetu u otvoreni stalak na $18\text{-}26^\circ\text{C}$ najmanje 20 minuta da se uzorak ohladi. Homogenat treba ponovo ispitati unutar dva sata termičke obrade, u duplikatu, na IDEXX HerdChek BSE-Scrapie Antigen test kompletu.

Mjere predostrožnosti

- Ne izlažite tetrametilbenziden (TMB) supstrat kako svjetlosti ili oksidirajućim agensima. Za doziranje TMB koristite čistu ili jednokratnu plastičnu opremu.

- Treba paziti da se izbjegne kontaminacija komponenti kompleta. Nemojte koristiti komponente isteklog roka trajanja i nemojte miješati komponente iz različitih serija kompleta.
- Neke komponente kompleta sadrže natrijum-azid kao konzervans (pogledajte opis komponenti kompleta). Treba voditi računa da se spriječi kontaminacija anti-PrP-HRPO konjugata sa rastvorima koji sadrže azid.
- Čuvajte sve reagense na 2–8°C. Zagrijte reagense na 18–26°C prije upotrebe i vratite ih na pravilan način na temperature skladištenja nakon upotrebe (pogledajte Skladištenje pripremljenih reagensa).
- Koristite odvojene posude za doziranje za svaki reagens koji se koristi u testu. Izbjegavajte unakrsnu kontaminaciju TMB supstrata sa razblaženim rastvorom konjugata. Nemojte sipati neiskorišćeni rastvor TMB nazad u bocu.
- Nemojte dozvoliti da mikrotitarske ploče stoje duže od 5 minuta između koraka ispiranja i dodavanja reagensa.

Sigurnosne informacije

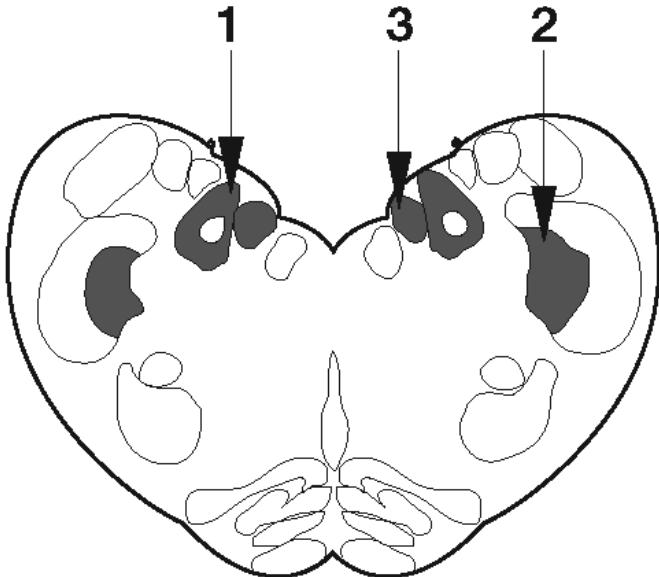
- Svo osoblje mora proći odgovarajuću obuku u vezi sa rizicima povezanim sa BSE i scrapie i preporučene procedure dekontaminacije. Procedure biološke sigurnosti bi se trebale strogo poštovati u skladu sa preporukama nacionalnih sigurnosnih propisa.
- Pufer za kondicioniranje sadrži kaotropne agense; izbegavajte kontakt sa kožom i sluzokožom.
- TMB supstrat može iritirati kožu i oči; izbegavajte direktni kontakt.
- Razblaživač za ploče 1 sadrži visoke koncentracije deterdženata; izbegavajte direktni kontakt.
- Izbjegavajte upotrebu staklenih posuda u laboratoriji.

Dodatak

Uzorkovanje goveđeg obexa sa IDEXX priborom za prikupljanje uzoraka

IDEXX ima pribor za prikupljanje uzoraka dostupan kao alternativna metoda ekstrakcije goveđeg obeksa. Ovaj pribor predstavlja šprica za uzorkovanje. IDEXX pribor za prikupljanje uzoraka je odobren od strane EURL. Smjernice u ovom odjeljku o uzorkovanju ne zabranjuju dalje informacije ili uputstva koja su u skladu sa uredbom (EC) 999/2001 i izmjenama pravila. Kada nije moguće identificirati ispravno anatomske područje za uzorkovanje, koristite instrumente za disekciju kako je opisano u odjeljku Uzorkovanje i priprema tkiva.

1. Moždano stablo treba uzeti u klaonici preko okcipitalnog foramina pomoću odgovarajućeg alata ili kašika za prikupljanje uzoraka. Identifikujte obeks region mozga kao što je naznačeno prisustvom udubljenja u obliku slova V na gornjoj površini moždanog stabla (pogledajte dijagram u odjeljku Uzorkovanje i priprema tkiva). Kada to nije moguće identifikujte ispravnu anatomsku oblast za uzorkovanje, koristite instrumente za disekciju kako je opisano u odjeljku Uzorkovanje i priprema tkiva.
2. Pozicionirajte moždano stablo sa dijelom u obliku slova V okrenuto uspravno. Stavite vrh nastavka šprice za prikupljanje uzorka u izrezani kraj stabla kaudalnog mozga tako da se približno uzorkuje 3 mm (dovoljno da se bezbjedno ulegne). Možda će biti potrebno podrezati višak tkiva kičmene moždine ako je dužina od baze kičmene moždine do vrha presjeka u obliku slova V veća od 3-4 cm.
3. Čvrsto držite klip šprice. Sa svojim prstnim indeksom gurnite vanjski cilindar šprice u moždano stablo, vodeći računa da se ne dozvoli klipu da se pomjera u bilo kom pravcu. Pogledajte sliku 2 za ispravno poravnavanje šprica za ciljanje ključnog mjesta uzorkovanja na obeksu. Kada je cilindar šprice gurnut u uzorak, mora ostati unutar odabrane strane moždanog stabla kako bi se spriječilo oštećenje suprotne strane. Potpuna hemisekcija moždanog stabla sa intaktnim obeksom moraju biti dostupni za potvrđno testiranje.



Slika 2. Poprečni presjek goveđeg moždanog stabla na nivou obeksa koji identificira ključne ciljne lokacije za uzorkovanje tkiva: 1) solitarni trakt, 2) nucleus trigeminalnog nerva, 3) dorzalno motorno jezgro vagusnog živca (dijagram iz OIE priručnika za Dijagnostičke testove i vakcine, poglavlje 2.4.6.)

4. Cilindar šprica će se kretati kroz moždano stablo u oblast obeksa. Uvjerite se da se špric pomaknuo u gornji dio područja za uzorkovanje (vidi Sliku 1). Cilindar bi sada trebao sadržavati uzoraka obeksa.

NAPOMENA: Uzorak koji želite (tj. oblast obeksa) nalazi se na vrhu cijevi.

5. Okrenite cilindar da izolujete uzorak i pažljivo uklonite špric iz tkiva.

6. Ako značajan dio tkiva visi sa kraja šprica, uvucite ga u cilindar laganim povlačenjem klipa. Sada se sa štrcaljkom može manipulirati u smislu uklanjanja zraka na vrhu i zatvaranja svih praznina između dijelova uzorka.

Napomena: Unutrašnjost šprica ima nekoliko pravilno raspoređenih „zadržavača“ ili žljebova koji se mogu locirati po osjećaju dok se klip pomiče kroz špric. Prostor između zadržavača omogućava precizno merenje zapremine uzorka.

7. Kada ste tkivo uzeli u špricu, pritisnite klip da ga poravnate sa najbližim „zadržavačem“. Uzorak treba da bude bez razmaka između klipa i vrha šprice. Neki višak materijala uzorka može se protezati izvan vrha šprica.

8. Obrišite sve manje ostatke tkiva na ravnoj površini posude za vaganje. Nemojte pritiskati klip tokom ovog procesa jer će uzorak biti izbačen ili komprimiran; oboje su nepoželjni.

9. Držite epruvetu za razbijanje tkiva okomito u jednoj ruci, a špric u drugoj, sa vrhom šprica neposredno unutar otvora epruvete za razbijanje tkiva. Staviti izmjerenu količinu obeks tkiva u epruvetu pomicanjem klipa od jednog „zadrživača“ i zaustavljanjem na drugom zadržavanju. Zapremina između detenta je 150 µL; ukupno 300 µL se dozira u epruvetu (ekvivalentno 0,30 g ±0,05 g tkiva).

10. Začepite epruvetu i nastavite sa homogenizacijom uzorka.

Osoblje koje prikuplja obex uzorke sa IDEXX priborom za prikupljanje uzoraka treba da bude dobro obučeno za korištenje kako bi osigurali prikupljanje ispravnog područja moždanog stabla. Svaki tehničar treba da prati tačnost uzorkovanja vršeći periodične provjere težine uzorka. Program korektivnih akcija treba da se uspostavi kada rezultati odstupaju od definisanih kriterijuma prihvatanja. IDEXX pribor za prikupljanje uzoraka je za jednokratnu upotrebu trebalo bi odbaciti nakon svakog uzorkovanja kako bi se sprječila unakrsna kontaminacija.

Ograničenje odgovornosti

U maksimalnoj mjeri dozvoljenoj zakonom, ni pod kojim okolnostima IDEXX ili naši davaoci licence nisu odgovorni vama ili bilo kojoj drugoj osobi za gubitak dobiti ili upotrebe, posebne, slučajne, posljedične, indirektne, primjerne, kaznene ili višestruke štete, uključujući i gubitak goodwill-a, podataka ili opreme ili za prekid poslovanja koji nastaje kod proizvodnje, prodaje, isporuke ili upotrebe naših proizvoda ili usluga ili kvara ili kašnjenja isporuke takvih proizvoda ili usluga.