

**BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY
ANTIGEN TEST KIT, EIA**

**Kit Encéphalopathie Spongiforme
Bovine Antigène, EIA**

**Kit para la detección de antígeno de la Encefalopatía
Espongiforme Bovina (EEB), EIA**

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

Kit per l'Encefalopatia Spongiforme Bovina Ag, EIA

**Trousse d'analyse de l'Antigène
Encéphalopathie Spongiforme Bovine, EIA**

IDEXX HerdChek*

Die deutsche Fassung der Gebrauchsinformation
ist entsprechend §17c TierSG zugelassen.

The German version of this insert conforms to
German animal health regulations.

IDEXX
LABORATORIES

06-04813-11
Version #11

Contents

Bovine Spongiform Encephalopathy Antigen Test Kit, EIA.....	1
Kit Encéphalopathie Spongiforme Bovine Antigène, EIA	9
Kit para la detección de antígeno de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), EIA	19
Bovine Spongiforme Enzcephalopathie Antigen-Testkit, EIA	27
Kit per l'Encefalopatia Spongiforme Bovina Ag, EIA	35
Trousse d'analyse de l'Antigène Encéphalopathie Spongiforme Bovine, EIA	43

BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY ANTIGEN TEST KIT, EIA

For veterinary use only.

English Version

Overview

The IDEXX HerdChek* Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) 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 affected by BSE. 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.

Description and Principles

This kit uses a proprietary method licensed from Microsens Biotechnologies (London; patent pending) that allows detection of abnormal prions. A PrP^{Sc}-specific ligand is immobilized on the surface of the BSE antigen-capture plate. Test samples (brain, preferably obex sections) 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 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°–7°C (35°–45°F).

Item	460 tests	1,380 tests
A Antigen-capture plates	5 plates	15 plates
N Negative control—Nonreactive with antigen-capture plate; preserved with sodium azide	5 x 1 mL	5 x 1 mL
P Positive control—Noninfectious, reactive with antigen-capture plate; preserved with sodium azide	5 x 1 mL	5 x 1 mL
D1 Plate diluent component 1; preserved with sodium azide	20 mL	40 mL
D2 Plate diluent component 2	5 x 200 µL	3 x 800 µL
R Reconstitution buffer	20 mL	20 mL
CB Conditioning buffer; preserved with sodium azide	60 mL	210 mL
CC Conjugate concentrate; preserved with Bronidox L and methylisothiazolone	300 µL	3 x 300 µL
CD Conjugate diluent buffer with detergents and protein stabilizers; preserved with kathon	60 mL	210 mL
W1 10X wash solution 1; preserved with sodium azide	450 mL	2 x 450 mL
W2 10X wash solution 2; preserved with gentamicin	450 mL	2 x 450 mL
T TMB substrate	60 mL	315 mL

Note: Reagent volumes indicated on component labels represent the minimum fill amount. In some cases the actual volume will exceed the amount listed on the label.

Materials and Equipment Required (Not Provided)

- Precision pipettes and multichannel pipettes suitable for delivering between 25 and 200 μL . Reagent volumes listed in the Test Procedure require pipette precision of $\pm 5\%$
- 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), Precess 48* 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, hair nets and face masks
- 0.5–1.0 N HCl or 1.0 N H_2SO_4 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 C.V. 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

Brain (Obex) Sampling and Preparation

1. Collect 0.30 g (± 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 as described in the appendix. Personnel collecting the obex must be experienced 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 must remain available for confirmatory testing.

2. Place the tissue in a tissue-disruption tube and cap tightly. Tubes are provided with ceramic beads and buffer.
3. Three tissue-disruption instruments have been validated for use with the IDEXX BSE 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 msec). If a second cycle is required, the instrument must be allowed to cool 5–10 minutes between cycles.
 - Precess 48* instrument program: Grind the samples on Program mode 1 (2 x 23 seconds at 6,500 rpm, with a 5-second delay between cycles).
 - Precellys 24* instrument program: Grind the samples on Program mode 1 (2 x 20 seconds at 6,500 rpm, with a 5-second delay between cycles).
4. Homogenates (fresh or thawed) can be held at room temperature (18°–25°C, 64°–77°F) 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°–7°C or held at $\leq -20^\circ\text{C}$ 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 .

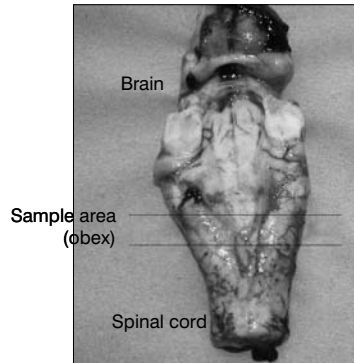


Figure 1. Bovine brain stem.

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

Preparation of Reagents

Wash Solutions (Wash Solution 1, Wash Solution 2)

The wash solution concentrates should be brought to room temperature (18°–25°C, 64°–77°F) 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 μ L of reconstitution buffer (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 room temperature (18°–25°C, 64°–77°F). 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 μ L D2 to 3.0 mL D1 per plate). Approximately 2.75 mL of working plate diluent is required 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 buffer. 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 Solution

The HRPO-conjugated anti-PrP antibody solution is prepared by diluting the conjugate concentrate (CC) into the conjugate diluent (CD) as indicated on the label (for example, a 1:100 dilution would require 120 μ L of conjugate concentrate to 12 mL of conjugate diluent).

IMPORTANT: Refer to the conjugate concentrate (CC) label for correct dilution factor. Diluted conjugate should be prepared and used within 4 hours.

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 should be at room temperature (18°–25°C, 64°–77°F) before use. Before starting the test, prepare the solutions to be used in the assay. Mix all reagents by gentle 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°–25°C 6 months at -20°C
D2	Plate diluent 2	200 μ L	1 hour at 18°–25°C 6 months at -20°C
	Working plate diluent	NA	8 hours at 18°–25°C
	HRPO: anti-PrP solution	NA	4 hours at 18°–25°C
	Wash solution 1–1X	NA	1 week at 18°–25°C
	Wash solution 2–1X	NA	1 week at 18°–25°C

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

Test Procedure

Sample homogenates are prepared as described in the Brain (Obex) 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 EIA has three approved protocols validated: Standard, Short and Ultra-Short. The three protocols have equivalent performance but have varying equipment requirements for decreased assay time. The protocols are detailed in the table on page 5.

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 μ L of working plate diluent per 120 μ L of 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 standard protocol requires that all incubations are stationary. The other two protocols involve a slow rotation (200 \pm 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 the sample up the side of the wells. Incubation times are decreased accordingly for sample and conjugate incubations as detailed in the procedure on the next page.

Assay Protocols

Test Procedure		Standard Protocol	Short Protocol	Ultra-Short Protocol
Step	Activity	18°–25°C All steps	18°–25°C All steps	32°–37°C ¹ : Incubations only (steps 3,5,8,10) 18°–25°C: All other steps including wash steps
1	Sample Addition to Dilution Plate	120 µL sample with 30 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	2–3 hours stationary	45–60 min; slow shake 200 ± 100 rpm	20–25 min; slow shake 200 ± 100 rpm
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 and cover the plate with a plate cover		
8	Conjugate Incubation	60–75 min.	45–50 min.	25–30 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 preheated to 32°–37°C

Interpretation of Results

For the assay to be valid, the negative control mean (NC \bar{x}) must run with an A₄₅₀-A_{REF} value less than 0.150, and the positive control mean (PC \bar{x}) must have an A₄₅₀-A_{REF} ≥ 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:

$$\text{Cutoff} = NC\bar{x} + 0.120$$

NOTE: See step 11 of the test procedure 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 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 Antigen Test Kit. Retesting can be done from the original tissue homogenate or from homogenate prepared using the optional 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 samples which are negative following the heat treatment protocol may be reported as negative BUT the samples must be sent to the appropriate national reference laboratory for forwarding to the CRL.

In the member states of the European Union, all samples and corresponding tissue giving positive test results should be sent to the National Reference Laboratory for confirmation. In the United States, samples and the corresponding tissue testing positive according to the test interpretation criteria must be confirmed by immunohistochemistry at the National Veterinary Services Laboratory.

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

Remove approximately 230 μ L of the initially reactive tissue homogenate and dispense into a 1.5–2.0 mL conical bottom screw-cap vial. Place the vial in a dry heating block that has been preheated to $70^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Heat the tube for 10 ± 1 min. and then place the tube in an open rack at room temperature (18° – 25°C) for a minimum of 20 minutes to allow the sample to cool. The homogenate should be retested within two hours, in duplicate, on the IDEXX HerdChek BSE Antigen Test Kit.

Precautions

- Do not expose the 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 description of kit components). Care should be taken to prevent contaminating the anti-PrP-HRPO conjugate with azide-containing solutions.
- Store all reagents at 2° – 7°C (36° – 45°F). Bring reagents to room temperature (18° – 25°C , 64° – 77°F) 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 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

Test for in vitro detection of BSE-related PrP^{Sc} within the European Union—this test is approved as a rapid test for the BSE testing program on cattle, which is set up in accordance with regulation (EC) No. 999/2001.

The producer of the rapid test must have a quality assurance system in place agreed to by the Community Reference Laboratory (CRL), which ensures that the test performance does not change. The producer must provide the test protocol to the CRL. Sampling tools and

modifications to the rapid test or to the test protocol (including sampling) may only be made following advance notification to the CRL, and provided that the CRL finds that the modification does not reduce the sensitivity, specificity or reliability of the rapid test. That finding shall be communicated to the commission and to the national reference laboratories.

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.”

Obex Sampling with the IDEXX Sample Collection Device

IDEXX has a sample collection device available as an alternative obex extraction method. This device is a sampling syringe. The IDEXX sample collection device has been approved by the CRL. The guidance in this sampling section does not prohibit additional information or instructions that are in line with regulation (EC) No. 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 Brain (Obex) 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 Sampling and Preparation section). When it is not possible to identify the correct anatomical area for sampling, use dissection instruments as described in the Brain (Obex) Sampling and Preparation section of this insert.
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.

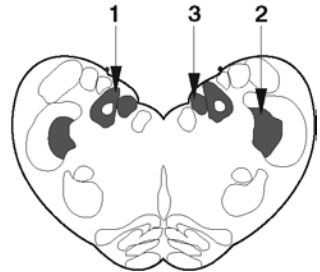


Figure 2. Cross-section of the bovine brain stem at the level of the obex identifying the key target sites for tissue sampling: 1) solitary tract, 2) nucleus of the trigeminal nerve, 3) dorsal motor nucleus of the vagus nerve (Diagram from *OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines*, chapter 2.3.13)

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.
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 that 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 actions 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 μL ; a total of 300 μL 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, call IDEXX Technical Services:
In the U.S. and Canada: 1-207-556-4890 or 1-800-548-9997
In Europe: 00-800-727-43399**

U.S. Vet Lic. No. 313

Product Code: 5430.21

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

© 2008 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

Généralités

Le kit IDEXX HerdChek* Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) Antigène est un test immuno-enzymatique (EIA) de capture de l'Antigène permettant la détection post-mortem de la protéine prion pathologique (PrP^{Sc}) à partir de tissu cérébral (obex de préférence) de bovins atteints d'ESB. 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.

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 de l'ESB. Après préparation des échantillons (tissu cérébral, obex de préférence) 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 Ag. 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°-7°C.

Réactifs	460 tests	1380 tests
A Plaques de capture Antigène	5 plaques	15 plaques
N Contrôle Négatif—non réactif avec la plaque de capture Ag. Conservateur : azide de sodium	5 x 1 ml	5 x 1 ml
P Contrôle Positif—non infectieux, réactif avec la plaque de capture Ag. Conservateur : azide de sodium	5 x 1 ml	5 x 1 ml
D1 Composant 1 du Diluant de la plaque de dilution. Conservateur : azide de sodium	20 ml	40 ml
D2 Composant 2 du Diluant de la plaque de dilution	5 x 200 µl	3 x 800 µl
R Tampon de Reconstitution	20 ml	20 ml
CB Tampon de Conditionnement. Conservateur : azide de sodium	60 ml	210 ml
CC Conjugué concentré. Conservateurs : Bronidox L et méthylisothiazolone	300 µl	3 x 300 µl
CD Diluant du Conjugué avec détergents et agents protéiniques stabilisants. Conservateur : kathon	60 ml	210 ml
W1 Solution 1 de Lavage (x10). Conservateur : azide de sodium	450 ml	2 x 450 ml
W2 Solution 2 de Lavage (x10). Conservateur : gentamicine	450 ml	2 x 450 ml
T Substrat TMB	60 ml	315 ml

N.B. : Le volume de réactif indiqué sur l'étiquetage correspond au volume de remplissage minimum. Dans certains cas, le volume réel excédera la valeur indiquée sur l'emballage.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de précision capables de délivrer des volumes compris entre 25 et 200 μl ou pipettes multicanaux. Une précision de $\pm 5\%$ est requise pour les volumes de réactifs mentionnés dans la section « Mode opératoire. »
- Epruvettes 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), Precess 48* 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 la précision de pipetage $\leq 2,5\%$ comme mesuré 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—bain à sec chauffant pour microtubes de 1,5 à 2 ml (capable d'atteindre et de maintenir une température de 70°C)
- Option—microtubes à bouchon vissant, coniques et sans jupe de 1,5 à 2 ml.

Prise d'essai et préparation des échantillons de tissu cérébral (obex)

1. 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.

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 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. Trois modèles de ribolyseurs ont respectivement été validés pour une utilisation conjointe avec le kit IDEXX BSE 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* : broyage en mode 1 (2 x 23 secondes à 6500 rpm, avec un délai de 5 secondes entre deux cycles consécutifs).
 - Programme pour appareil Precellys 24* : broyage des échantillons en mode 1 (2 x 20 secondes à 6500 rpm, avec un délai de 5 secondes entre deux cycles consécutifs).

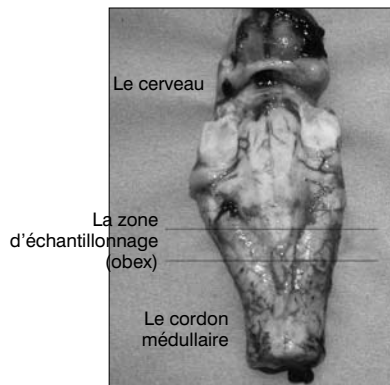


Figure 1. Tronc cérébral bovin.
© British Crown Copyright (février 2005) reproduit avec l'aimable autorisation de la Veterinary Laboratories Agency.

4. Avant la mise en œuvre du test EIA, la stabilité des homogénats (fraîchement préparés ou décongelés) est de 4 heures maximum à température ambiante (18°–25°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°–7°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 .

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 température ambiante (18°–25°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 μl de Tampon 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 température ambiante (18°–25°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 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Ex., 120 μl de D2 pour 3,0 ml de D1 par plaque. Bien homogénéiser. Environ 2,75 ml de Diluant de la plaque de dilution est nécessaire pour chaque 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 Tampon 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.**

Solution de Conjugué Anticorps anti-PrP : HRPO

La Solution de Conjugué Anticorps anti-PrP : HRPO est préparée par dilution du Conjugué Concentré (CC) dans le Diluant du Conjugué (CD) comme indiqué sur le flacon (CC) de concentré (ex : pour une dilution au 1/100, 120 μl de Conjugué Concentré + 12 ml de Diluant du Conjugué pour une plaque).

IMPORTANT : Le facteur de dilution de la Solution de Conjugué est indiqué sur l'étiquette du flacon de Conjugué Concentré (CC). La Solution de Conjugué doit être utilisée dans les quatre heures qui suivent sa préparation.

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 température ambiante (18°–25°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°–25°C 6 mois à -20°C
D2 Composant 2 du diluant	200 µl	1 heure à 18°–25°C 6 mois à -20°C
Diluant de la plaque de dilution	Sans objet	8 heures à 18°–25°C
Conjugué anti-PrP : HRPO	Sans objet	4 heures à 18°–25°C
Solution 1 de Lavage 1x	Sans objet	1 semaine à 18°–25°C
Solution 2 de Lavage 1x	Sans objet	1 semaine à 18°–25°C

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

Mode Opérateur

Les homogénats sont préparés comme indiqué au paragraphe « Prise d'essai et préparation des échantillons de tissu cérébral (obex) ». **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 EIA est respectivement validé, à partir du tissu cérébral, sur trois protocoles : Standard, Court et Ultra-Court. Les trois protocoles offrent un niveau de performance équivalent, certains nécessitent un complément d'équipement variable en fonction de l'option de protocole choisie. Ces protocoles sont décrits dans le tableau de la page 13.

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.

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 plaques en évitant la formation de bulles. Si un agitateur de plaques 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 de microplaques lors de l'étape d'incubation des échantillons (protocoles Court et Ultra-Court).

Le protocole standard ne requiert aucune agitation lors des étapes d'incubation. Les deux autres protocoles requièrent, pour l'étape d'incubation des échantillons, une agitation douce (200 ± 100 rpm) réalisée à l'aide d'un agitateur de microplaques. 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 mode opératoire décrit à la page suivante.

Les protocoles du test

Mode Opérateur		Protocole Standard	Protocole Court	Protocole Ultra-Court
Etape	Description	18°–25°C à toutes les étapes	18°–25°C à toutes les étapes	32°–37°C ¹ : à toutes les étapes d'incubations (étapes 3, 5, 8 et 10) 18°–25°C ; à toutes les autres étapes y compris les lavages
1	Distribution des homogénats dans la Plaque de dilution	120 µl d'homogénat + 30 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 de la plaque de capture	2–3 heures – sans agitation	45–60 min; sous agitation 200 ±100 rpm	20–25 min; sous agitation 200 ±100 rpm
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 350µl/puits.		
7	Conjugué	Distribuer le conjugué, dilué à raison de 100 µl/puits couvrir la plaque à l'aide d'un couvercle.		
8	Incubation du Conjugué	60–75 min.	45–50 min.	25–30 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 incubé 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 bi-chromatisme à 450/620nm ou 450/650n.		

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.

Interprétation des Résultats

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

Calculs

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

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

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

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

Calcul de la Valeur Seuil (VS) :

$$VS = NC\bar{x} + 0,120$$

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 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 Ag. La procédure de retest peut être effectuée soit à partir de l'homogénat initial soit après avoir préparé l'homogénat en suivant le protocole de traitement thermique optionnel décrit ci-après.

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 valeurs des répliqués des tests sont inférieures à la Valeur Seuil. Dans les Etats Membres de l'UE, tous les échantillons initialement réactifs et interprétés comme négatifs après application du protocole de traitement thermique peuvent être déclarés négatifs. CEPENDANT, ces échantillons doivent être envoyés au Laboratoire National de Référence pour être transmis au Laboratoire de Référence Communautaire.

Dans les Etats membres de l'Union Européenne, tous les homogénats et les prélèvements de tronc cérébral associés ayant fourni un résultat positif à l'aide d'un test ESB doivent être adressés au Laboratoire National de Référence pour confirmation. Aux Etats-Unis, un échantillon réactif selon les critères d'interprétation du kit ESB utilisé ainsi que le prélèvement de tronc cérébral associé doivent être confirmés en immuno-histochimie par le NVSL (National Veterinary Services Laboratory).

Protocole de retest par traitement thermique optionnel destiné aux homogénats initialement réactifs :

(Le protocole de traitement thermique est destiné uniquement aux échantillons d'origine bovine.)

Prélever approximativement 230 μ l d'homogénat initialement réactif et distribuer dans un microtube à bouchon vissant à fond, conique et sans jupe de 1,5 à 2,0 ml. Placer le tube dans un bain à sec chauffant préalablement porté à 70° \pm 2°C. Incuber pendant 10 \pm 1 min puis placer le tube sur un portoir aéré à température ambiante (18–25°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 Ag dans les deux heures qui suivent le traitement thermique.

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°–7°C. Les porter à température ambiante 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 relativement aux risques liés à l'ESB 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 ; éviter tout contact direct.
- 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

Test de détection in vitro de la PrP^{Sc} liée à l'ESB. Ce test a été approuvé au sein de l'Union européenne comme test de dépistage rapide dans le cadre du programme de dépistage de l'ESB, qui a été établi conformément au Règlement (CE) No. 999/2001.

Le fabricant de tests rapides de dépistage doit avoir un système d'assurance de qualité en place homologué par le Laboratoire communautaire de référence (LCR), qui veille à ce que le rendement du test ne change pas. Le fabricant doit fournir le protocole du test au LCR. 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 LCR, et avant que ce dernier convienne que la modification ne diminue pas la sensibilité, la spécificité ou la fiabilité du test rapide. Les résultats doivent être communiqués à la Commission et aux Laboratoires communautaires de référence.

L'échantillonnage et les tests de laboratoire doivent être conformes au Annexe X, Chapitre C du Règlement (CE) No 999/2001, qui se reporte à la dernière édition du manuel de réglementation pour les tests de diagnostic et les vaccinations de l'Office international des épizooties (OIE) qui stipule que : 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.

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

IDEXX propose une seringue comme méthode alternative à la prise d'essai de l'obex. 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 de tissu cérébral (obex)** ».

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 de tissu cérébral (obex) ».
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.
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.

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 μl . Le volume total requis par tube est de 300 μl (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.

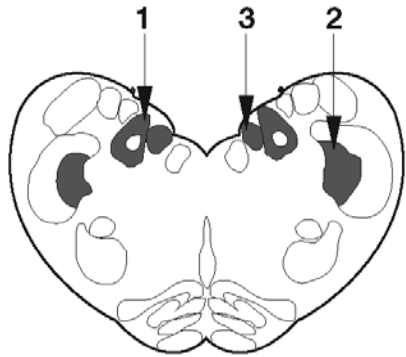


Figure 2. Coupe du tronc cérébral bovin au niveau de l'obex. Elle présente les emplacements cibles importants pour prélever des tissus. 1) canal solitaire, 2) noyau du nerf trijumeau, 3) noyau moteur dorsal du nerf vague. (Diagramme du Manuel de tests diagnostics et de vaccins de l'OIE, Section 2.3.13)

**Pour l'assistance technique,
merci de contacter les services techniques d'IDEXX :**

A partir des USA et Canada : 1-207-556-4890 ou au 1-800-548-9997

A partir de l'Europe : 00-800-727-43399

*HerdChek est une marque de fabrique ou une marque déposée d'IDEXX Laboratories, Inc. 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.

© 2008 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.

Kit para la detección de antígeno de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), EIA

Para uso veterinario solamente.

Versión española

Resumen

El kit para la detección de antígeno de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) HerdChek* de IDEXX es un inmunoensayo enzimático (EIA) de captura de antígenos para la detección de la forma anormal de la proteína del prión (PrP^{Sc}) en tejido cerebral postmortem (preferentemente óbex) de bovinos afectados por la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). 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.

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 de EEB. Las muestras (secciones del cerebro, preferentemente del óbex) 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 hará según la absorbancia obtenida de la misma. Una muestra cuyo $A_{450} - A_{REF}$ sea menor que el valor del punto corte será considerada como negativa según el kit de detección de antígenos de EEB 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

Almacene todos los componentes entre 2°–7°C.

Elemento	460 Análisis	1380 Análisis
A Placas de captura de antígenos	5 placas	15 placas
N Control negativo—no reactivo en la placa de captura de antígenos. Conservado con azida sódica.	5 x 1 ml	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	5 x 1 ml
D1 Componente 1 de dilución de la placa. Conservado con azida sódica.	20 ml	40 ml
D2 Componente 2 de dilución de la placa	5 x 200 µl	3 x 800 µl
R Solución tamponada (buffer) de reconstitución	20 ml	20 ml
CB Solución tamponada (buffer) de acondicionamiento. Conservado con azida sódica.	60 ml	210 ml
CC Solución de conjugado concentrada. Conservado con Bronidox L y metilisotiazolona.	300 µl	3 x 300 µl
CD Diluyente tamponado de conjugado con detergentes y estabilizadores de proteína. Conservado con kathon.	60 ml	210 ml
W1 Solución 1 de lavado (x10). Conservada con azida sódica.	450 ml	2 x 450 ml
W2 Solución 2 de lavado (x10). Conservada con gentamicina.	450 ml	2 x 450 ml
T Sustrato TMB	60 ml	315 ml

Nota: Los volúmenes de reactivo indicados en las etiquetas de los componentes representan una cantidad mínima. En algunos casos el volumen real superará la cantidad que figura en la etiqueta.

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 de $\pm 5\%$
- 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 de recogida de muestras.
- Lector de placas de 96 pocillos (equipado con filtros de 450-nm y 620–650-nm) y lavador
- Instrumento FastPrep* (FP120A, FP220A), Precess 48* 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 (disponible en IDEXX)
- Equipo de protección del personal: gafas de seguridad, batas de laboratorio, guantes desechables, protectores para zapatos, redes para el cabello
- Solución de parada HCl 0,5–1,0 N ó 1,0 N H_2SO_4
- 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

Extracción y preparación de la muestra de cerebro (óbex)

1. Extraiga 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 pese la muestra para verificar que es la cantidad correcta. También tiene 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 la parte opuesta del tronco cerebral con la región del óbex intacta para realizar la prueba de confirmación si fuera necesaria.

2. Coloque el tejido en un tubo de ruptura de tejidos y ciérrelo con fuerza. Los tubos contienen perlas de cerámica y solución tamponada.
3. Se han validado tres instrumentos de ruptura tisular diferentes para su empleo en la prueba BSE-EIA de IDEXX. Coloque los tubos en el instrumento y proceda a la ruptura tisular, siguiendo las instrucciones del instrumento correspondiente. Si la trituration es insuficiente, repita un ciclo más.
 - Programa del Instrumento FastPrep*: triture las muestras durante 40 segundos utilizando la velocidad máxima (6,5 m/s). Si se requiere un segundo ciclo de trituration, debe dejarse enfriar el instrumento de 5 a 10 minutos entre ciclos.
 - Programa del Instrumento Precess 48*: triture las muestras en el Modo de Programación 1 (2 x 23 segundos a una velocidad de 6.500 rpm, con un retardo de 5 segundos entre ciclos).

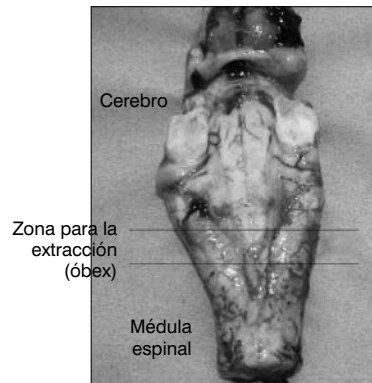


Ilustración 1. Tronco cerebral de bovino. Copyright © Corona británica (Febrero de 2005). Reproducida con el consentimiento de la Agencia de Laboratorios Veterinarios de G.B. (VLA)

- Programa del Instrumento Precellys 24*: triture las muestras en el Modo de Programación 1 (2 x 20 segundos a una velocidad de 6.500 rpm, con un retardo de 5 segundos entre ciclos).
4. Los homogeneizados (frescos o descongelados) pueden mantenerse a temperatura ambiente (18°–25°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°–7°C ó mantenerse a ≤ -20°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.

Preparación de reactivos

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

Las soluciones de lavado concentradas deben atemperarse a temperatura ambiente (18°–25°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, agregue 200 µl de solución tamponada (buffer) de reconstitución (R), déjelo reposar durante aproximadamente un minuto y después mezcle cuidadosamente. Utilice 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 temperatura ambiente (18°–25°C). Prepare 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 µl D2 a 3,0 ml D1 por placa). Se requieren aproximadamente 2,75 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. Reconstituya cada control añadiendo 1 ml de solución tamponada (buffer) de reconstitución. Deje reposar la solución durante aproximadamente 1 minuto y después mézclela bien. Utilice la solución en un tiempo máximo de 2 horas desde su preparación. **NO DILUYA 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 µl de concentrado de conjugado en 12 ml de diluyente de conjugado).

IMPORTANTE: lea 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.

Solución de frenado ácida

La solución de parada del análisis no se suministra con el kit. Esta solución (0,5–1,0 N HCl ó 1,0 N H₂SO₄) 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 temperatura ambiente (18°–25°C) antes de su uso. Antes de comenzar el análisis, prepare las soluciones que utilizará durante el mismo. Mezcle 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°–25°C 6 meses a -20°C
D2 Componente 2 de dilución de la placa	200 µl		1 hora a 18°–25°C 6 meses a -20°C
Diluyente final de la placa de trabajo	ND		8 horas entre 18°–25°C
Solución HRPO:anti-PrP	ND		4 horas entre 18°–25°C
Solución 1 de lavado 1X	ND		1 semana entre 18°–25°C
Solución 2 de lavado 1X	ND		1 semana entre 18°–25°C

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

Procedimiento de la prueba

Los homogeneizados de muestras se preparan siguiendo las indicaciones de preparación de muestras. **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: Cubra 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 de IDEXX dispone de tres protocolos aprobados para el tejido cerebral. Un protocolo Estándar, uno 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 23.

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

Utilice 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. Reserve 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 cada 120 µl de homogeneizado de la muestra.

Mezcle de nuevo los tejidos homogeneizados invirtiéndolos y pipetee 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 extraiga la muestra del fondo del mismo. Distribuya 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, mezcle 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. Proceda a realizar el análisis en las dos horas siguientes.

Utilice un agitador de placas para los protocolos con incubación de la muestra (protocolos Corto y Ultra-Corto)

El protocolo estándar requiere que todas las incubaciones de las placas se realicen sobre una superficie fija. Los otros dos protocolos implican un movimiento lento de rotación (200 ± 100 rpm) en un agitador de placas, pero únicamente en la fase de incubación de la muestra. 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.

Protocolos de ensayo

Procedimiento de la prueba		Protocolo Estándar	Protocolo Corto	Protocolo Ultra-Corto
Paso	Acción	18°–25°C todos los pasos	18°–25°C todos los pasos	32°–37°C ¹ : sólo incubaciones (pasos 3,5,8,10) 18°–25°C: el resto de pasos, incluyendo los pasos de lavado
1	Adición de la muestra a la placa de dilución	120 µl de muestra con 30 µl de diluyente de la placa de trabajo— MEZCLE BIEN (consulte 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	Pipetee 100 µl de muestra diluida sobre la placa de ensayo, mezcle bien los controles, añada 100 µl por duplicado, cubra la placa con una cubierta de placa		
3	Incubación de la placa de captura	2-3 horas sin movimiento	45–60 min; agitación lenta 200 ± 100 rpm	20–25 min; agitación lenta 200 ± 100 rpm
4	Lavado con solución 1 de lavado 1X	Lave los pocillos 6 veces con ~350 µl de solución 1 de lavado 1X		
5	Solución de acondicionamiento: Adición / Incubación	Añada 100 µl de la solución tamponada (buffer) de acondicionamiento a cada pocillo, cubra la placa e incúbela 10 ± 1 min.		
6	Lavado con solución 2 de lavado 1X	Lave los pocillos 3 veces con ~350 µl de solución 2 de lavado 1X		
7	Adición de conjugado	Añada 100 µl de conjugado diluido y cubra la placa con una cubierta de placa		
8	Incubación de conjugado	60–75 min.	45–50 min.	25–30 min.
9	Lavado con solución 2 de lavado 1X	Lave los pocillos 5 veces con ~350 µl de solución 2 de lavado 1X		
10	Adición / Incubación de sustrato	Añada 100 µl de sustrato a cada pocillo, cubra la placa, incube 15 ± 1 min alejado de la luz solar directa. (no utilice cubierta adhesiva)		
11	Adición de la solución de parada / Lectura de la placa	Añada 100 µl de solución ácida de parada; la placa puede mantenerse hasta 30 min. en la oscuridad antes de leer la densidad óptica (450 nm) utilizando una longitud de onda de referencia (A _{REF}) de 620 nm ó 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

Interpretación de los resultados

Para que el ensayo sea válido, la media del control negativo (NC \bar{x}) debe tener un valor de A₄₅₀ – A_{REF} menor que 0,150, y la media del control positivo (PC \bar{x}) debe tener un valor de A₄₅₀ – A_{REF} mayor o igual que 0,400.

Cálculos

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

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

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:

$$\text{Corte} = NC\bar{x} + 0,120$$

NOTA: Consulte 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 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 HerdChek de IDEXX. La repetición del análisis puede llevarse a cabo a partir del homogeneizado tisular original, o a partir del homogeneizado preparado utilizando el protocolo de tratamiento térmico opcional 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 pueden considerarse como negativas, PERO dichas muestras deben de ser enviadas al laboratorio nacional de referencia correspondiente para su posterior envío al CRL.

En los Estados miembros de la unión europea, todas las muestras y los tejidos correspondientes que den positivo en las pruebas habrán de ser enviados al LNR para confirmación de los resultados. En Estados Unidos, los resultados de las muestras y los tejidos correspondientes que den positivo según los criterios de interpretación de la prueba habrán de ser confirmados por inmunohistoquímica en el NVSL (National Veterinary Services Laboratory).

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

Retire unos 230 μ l del homogeneizado tisular inicialmente reactivo e introdúzcalo en un vial de 1,5-2,0 ml con tapón de rosca y fondo cónico. Coloque el vial en un termobloque que se ha precalentado hasta una temperatura de $70^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Caliente el tubo durante 10 ± 1 min. y, a continuación, coloque el tubo en una gradilla abierta a temperatura ambiente ($18-25^{\circ}\text{C}$) 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, por duplicado, utilizando el kit de detección de antígenos de EEB HerdChek de IDEXX.

Precauciones

- No esponga el sustrato TMB a luz fuerte ni a agentes oxidantes. Utilice recipientes de plástico limpios o desechables para dispensar el TMB.
- Evite la contaminación de los componentes del kit. No utilice componentes con posterioridad a su fecha de caducidad, y no mezcle componentes de kits de lotes distintos.
- Algunos componentes del kit contienen azida sódica como conservante (consulte 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.
- Almacene todos los reactivos entre $2^{\circ}-7^{\circ}\text{C}$. Los reactivos deben estar a temperatura ambiente ($18^{\circ}-25^{\circ}\text{C}$) 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).
- Use dispositivos dispensadores diferentes para cada reactivo que utilice en el análisis. Evite la contaminación cruzada de sustrato TMB con la solución de conjugado diluida. No devuelva la solución TMB no utilizada a su recipiente original.
- No permita 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 recibir una formación adecuada sobre los riesgos que conlleva la enfermedad de las vacas locas (EEB) y los procedimientos 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, evite el contacto directo.
- El diluyente 1 de la placa contiene altas concentraciones de detergentes, evite el contacto directo.
- Evite el uso de envases de cristal en el laboratorio.

Anexo

Prueba para la detección in vitro de PrP^{Sc} relacionado con la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). En la Unión Europea esta prueba está aprobada como prueba rápida para el programa de detección EEB en el ganado, organizado de acuerdo con la reglamentación N^o 999/2001 de la CE.

El fabricante de la prueba rápida debe poseer un sistema de evaluación de calidad integrado aprobado por el Laboratorio Comunitario de Referencia (LCR), que asegure que no se produce ningún cambio en el rendimiento de la prueba. El fabricante deberá proporcionar el protocolo de prueba al Laboratorio Comunitario de Referencia (LCR). 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 LCR, 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 al laboratorio de referencia nacional (LRN).

El muestreo y las pruebas de laboratorio deben respetar la reglamentación N^o 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 con el dispositivo de extracción de muestras de IDEXX

IDEXX ofrece un dispositivo de extracción de muestras como método alternativo de extracción de óbex. 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 le 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, use los instrumentos de disección como se describe en la sección **Extracción y preparación de la muestra de cerebro (óbex)**.

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. Identifique 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 la zona anatómica correcta para la toma de muestras, utilice instrumentos de disección tal y como se indica en la sección Extracción y preparación de la muestra de cerebro (óbex) del presente folleto.
2. Coloque el tronco cerebral con la sección en forma de V del tejido en posición vertical. Coloque 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.

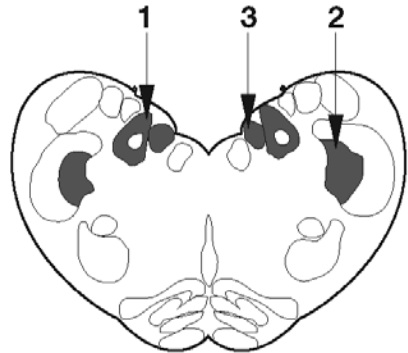


Ilustración 2. Sección transversal del tronco cerebral del bovino a la altura del óbex que identifica los puntos fundamentales de los que tomar la muestra del tejido. 1) tracto solitario, 2) núcleo trigémino espinal, 3) núcleo motor dorsal del nervio vago. (Gráfico procedente del *Manual for Diagnostic Tests and Vaccines* de la OIE, capítulo 2.3.13)

3. Agarre el émbolo de la jeringuilla con firmeza. Con el dedo índice, empuje el cilindro exterior de la jeringuilla dentro del tronco cerebral, evitando que la porción del émbolo se mueva en cualquier dirección. Consulte 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.
4. El cilindro de la jeringuilla se moverá a través del tronco cerebral y a través de la región del óbex. Asegúrese 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. Gire el cilindro para aislar la muestra y retire cuidadosamente la jeringuilla del tejido.
6. Si una porción significativa de tejido queda suspendida en el extremo de la jeringuilla, introdúzcala en el cilindro tirando del émbolo cuidadosamente. Expulse el aire del extremo de la jeringuilla y suprima los espacios entre las porciones de muestra.

Advierta 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, empuje 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. Elimine cualquier residuo que pudiera quedar en la superficie exterior. No presione el émbolo durante este proceso, ya que la muestra podría expulsarse o comprimirse; ambas situaciones son desaconsejables.
9. Sujete 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. Introduzca 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. Cierre el tubo y proceda 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 obtener asistencia técnica,
llame al Servicio Técnico de IDEXX**

En Estados Unidos y Canadá: 1-207-556-4890 ó 1-800-548-9997

En Europa: 00-800-727-43399

*HerdChek es una marca o una marca registrada de IDEXX Laboratories, Inc. 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.

© 2008 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

Überblick

Der IDEXX HerdChek* Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) Antigen-Testkit ist ein Enzymimmunoassay (EIA) zum Nachweis der anormalen Form des Prionprotein (PrP^{Sc}) in postmortal gewonnenen Hirnproben (vorzugsweise aus der Obexregion) von mit dem Erreger der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) infizierten Rindern. Mit diesem Schnelltest kann PrP^{Sc} mit geringem Untersuchungsaufwand nachgewiesen werden. Für hohe Probendurchsätze kann der Test automatisiert werden.

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 BSE-Antigens immobilisiert. Proben für den Test (Gehirn, vorzugsweise Teile der Obexregion) werden hergestellt, indem die 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 PrPspezifischen 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 Cutoff-Wert gilt im IDEXX HerdChek BSE-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°–7°C lagern.

Bestandteil	460 Tests	1380 Tests
A Antigen-Bindungsplatten	5 Platten	15 Platten
N Negativkontrolle – Nicht reaktiv mit der BSE-Antigen-Bindungsplatte. Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.	5 x 1 ml	5 x 1 ml
P Positivkontrolle – Nicht infektiös, reaktiv mit der BSE-Antigen-Bindungsplatte. Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.	5 x 1 ml	5 x 1 ml
D1 Probenverdünner 1. Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.	20 ml	40 ml
D2 Probenverdünner 2	5 x 200 µl	3 x 800 µl
R Rekonstitutionspuffer	20 ml	20 ml
CB Konditionierungspuffer. Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.	60 ml	210 ml
CC Konjugatkonzentrat. Enthält Bronidox L und Methylisothiazolon als Konservierungsmittel.	300 µl	3 x 300 µl
CD Konjugatverdünnungspuffer mit Detergenzien und Protein stabilisatoren. Enthält Kathon als Konservierungsmittel.	60 ml	210 ml
W1 10x-Waschlösung 1. Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.	450 ml	2 x 450 ml
W2 10x-Waschlösung 2. Enthält Gentamycin als Konservierungsmittel.	450 ml	2 x 450 ml
T TMB-Substrat	60 ml	315 ml

Hinweis: Die auf Komponentenetiketten angegebenen Reagenzienvolumina stellen die Mindestfüllmenge dar. In manchen Fällen überschreitet das tatsächliche Volumen die auf dem Etikett angegebene Menge.

Erforderliche Materialien und Ausrüstung (nicht im Lieferumfang enthalten)_____

- Präzisionspipetten oder Multikanalpipetten, geeignet zum Pipettieren von Volumina zwischen 25 und 200 µl. Die im Abschnitt „Testverfahren“ aufgeführten Reagenzienvolumina erfordern eine Präzision der Pipetten von ±5%.
- Messzylinder für Waschlösungen
- Abdeckungen aus Hartplastik oder Klebefolien für Mikrotiterplatten und Reagenzienreservoirs
- Probenentnahmesystem: Einweg-Präparierinstrumente oder Einweg-Probenentnahmegerät
- 96 Vertiefungen Photometer (ausgestattet mit 450 nm und 620–650 nm Messfiltern) und Mikrotiterplatten-Waschgerät
- FastPrep* Instrument (FP120A, FP220A), Precess 48* Instrument oder Precellys 24* Instrument
- Zubehörpaket: 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, deionisiertes Wasser
- Optional-Probenroboter mit einer Pipettiergenauigkeit von ≤ 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°–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 (Obex) und Herstellung von Gehirnproben_____

1. Entnehmen Sie mit Präparierinstrumenten 0,30 g (±0,05 g) Gewebe von der rechten oder linken Seite des Hirnstamms. Wiegen Sie die Probe, um sicherzustellen, dass die richtige Probenmenge entnommen wurde. Alternativ kann das im Anhang beschriebene IDEXX-Probenentnahmegerät verwendet werden. Laborpersonal, das Gewebe aus dem Obex entnimmt, muss Erfahrung im Umgang mit der Entnahmemethode haben.

Abbildung 1 zeigt den Bereich für die korrekte Gewebeentnahme.

HINWEIS: Nach Entnahme des Gewebestücks muss eine Hälfte des vollständigen Querschnitts des Hirnstamms mit intakter Obex-Region für Bestätigungstests übriggelassen werden.

2. Geben Sie das Gewebestück in ein spezielles Röhrchen zur Gewebezerkleinerung und verschließen Sie es gut. Die Röhrchen werden mit Keramikkügelchen und mit Puffer versehen.
3. Die drei unten genannten Geräte für Gewebezerkleinerung wurden für die Verwendung mit dem IDEXX BSE-EIA validiert. Geben Sie die Röhrchen zur Gewebezerkleinerung in das Gerät und homogenisieren Sie den Inhalt entsprechend der jeweiligen Gebrauchsinformation. Wiederholen Sie bei ungenügender Homogenisierung den Zyklus einmal.
 - Programm für das FastPrep* Instrument: Homogenisieren Sie die Proben mit maximaler Geschwindigkeit (6,5 m/s) 40 Sekunden lang. Wenn ein zweiter Durchgang notwendig ist, sollte das Gerät 5 - 10 Minuten zwischen den Durchgängen abkühlen.
 - Programm für das Precess 48* Instrument: Homogenisieren Sie die Proben im Programmmodus 1 (2 x 23 Sekunden bei 6500 U/min mit 5 Sekunden Verzögerung zwischen den Zyklen)

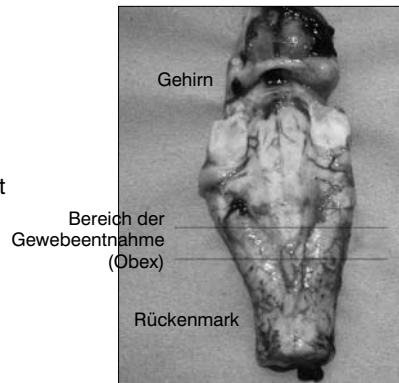


Abbildung 1. Rinder-Stammhirn.
© British Crown Copyright (Februar 2005) Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung der Veterinary Laboratories Agency.

- Programm für das Precellys 24* Instrument: Homogenisieren Sie die Proben im Programmmodus 1 (2 x 20 Sekunden bei 6500 U/min mit 5 Sekunden Verzögerung zwischen den Zyklen)
4. Frisch hergestellte oder aufgetaute Homogenate können vor Testbeginn bis zu vier Stunden bei Raumtemperatur (18°–25°C) gelagert werden.
- Die Anzahl der in einem einzigen Vorgang zu präparierenden Proben ist flexibel. Homogenate können bei 2°–7°C bis maximal 24 Stunden oder bei ≤ -20°C bis zu sechs Monate gelagert werden. Tiefgefrorene Homogenate müssen vor der Verwendung zunächst aufgetaut und durch Schwenken sorgfältig gemischt werden. Gewebeproben können bei -80°C gelagert werden.

Herstellung der Reagenzien

Waschlösungen (Waschlösung 1, Waschlösung 2)

Die Waschlösungskonzentrate sollten vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (18°–25°C) gebracht und gemischt werden, damit sich evtl. ausgefallene Salzkristalle auflösen können. Jedes Waschkonzentrat muss vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem 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 µl Rekonstitutionspuffer (R) zugegeben, die resultierende Lösung etwa eine Minute lang stehen gelassen und dann vorsichtig gemischt wird. Die Lösung sollte innerhalb einer Stunde nach der Herstellung verwendet werden.

Arbeitslösung des Probenverdünners

Der Probenverdünner 1 (D1) sollte zunächst auf Raumtemperatur (18°–25°C) gebracht werden. Stellen Sie die Probenverdünnerarbeitslösung her durch Zugabe von einem Teil Probenverdünner 2 (D2, Herstellung wie oben beschrieben) auf 25 Teile Probenverdünner 1 (D1) und mischen Sie gründlich (z. B.: 120 µl D2 auf 3,0 ml D1 für eine Platte). Je Mikrotiterplatte werden etwa 2,75 ml Probenverdünnerarbeitslösung benötigt. Die Probenverdünnerarbeitslösung sollte am Herstellungstag verwendet werden.

Negativ- und Positivkontrolle

Die Negativ- und Positivkontrollen liegen in lyophilisiertem Zustand vor. Jede Kontrolle wird durch Zugabe von 1 ml Rekonstitutionspuffer (R) hergestellt. Die resultierende Lösung etwas eine Minute lang stehen lassen und dann sorgfältig mischen. Die Lösung sollte innerhalb von 2 Stunden nach der Herstellung verwendet werden. **DIE NEGATIV-ODER POSITIVKONTROLLE 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 µl Konjugatkonzentrat auf 12 ml Konjugatverdünnung erfordern).

WICHTIG: Für das richtige Verdünnungsverhältnis beachten Sie bitte das Etikett des Konjugatkonzentrats (CC). Verdünnte Konjugate sollten innerhalb von vier Stunden nach der Herstellung verwendet 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 Raumtemperatur (18°–25 °C) haben sollen. Vor Beginn des Tests müssen die für den Test benötigten Lösungen hergestellt werden. Alle Reagenzien durch vorsichtiges Schwenken mischen. Positiv- und Negativkontrolle 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 Negativ-/Positivkontrolle	1 ml	2 Stunden bei 18°–25°C 6 Monate bei -20 °C
D2 Probenverdünner 2	200 µl	1 Stunde bei 18°–25°C 6 Monate bei -20 °C
Arbeitslösung des Probenverdünners	NA	8 Stunden bei 18°–25°C
Anti-PrP-HRPO-Konjugat	NA	4 Stunden bei 18°–25°C
Waschlösung 1–1x	NA	1 Woche bei 18°–25°C
Waschlösung 2–1x	NA	1 Woche bei 18°–25°C

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

Testverfahren

Probenhomogenate werden hergestellt, wie im Abschnitt „Probenentnahme (Obex) und Herstellung von Gehirnpflanzen“ beschrieben. **Ein Probenroboter kann anstatt der manuellen Methode von Schritt 1 verwendet werden, oder nachdem die Kontrollen und verdünnten Proben zur Antigen-Bindungsplatte hinzugefügt wurden (3. Schritt).**

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

Testprotokolle

Für den IDEXX BSE EIA sind drei anerkannte Protokolle für Gehirngewebe validiert: Standard-, Kurz- und Ultra-Kurz-Protokoll. Die Protokolle bieten dieselbe Leistung, haben aber unterschiedliche Ausrüstungsanforderungen für eine reduzierte Testzeit. Die Protokolle werden in der Tabelle auf Seite 31 beschrieben.

Verdünnung der Probe mit der Arbeitslösung des Probenverdünners.

Erstellen Sie ein Protokoll, das die Positionen der Proben auf der Antigen-Bindungsplatte und der Mikrotiterplatte zur Probenverdünnung anzeigt. Reservieren Sie für diese Kontrollen jeweils 2 Vertiefungen. 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.

Mischen Sie die Homogenate wieder durch Schwenken und pipettieren Sie die Probe sorgfältig mit Hilfe einer Transferpipette. Gehen Sie dazu mit der Pipettenspitze durch die Kügelchen hindurch und entnehmen Sie die Probe aus dem Röhrchen. Pipettieren Sie jede Probe sorgfältig in die Mitte der Vertiefungen der unbeschichteten Verdünnungsplatte. Vermeiden Sie Blasenbildung im Homogenat und achten Sie darauf, dass keine Homogenatreste an den Wänden der Plattenvertiefungen hängen bleiben .

Nachdem die Homogenate verdünnt wurden, sind die Proben gründlich zu mischen. Vermeiden Sie Blasenbildung. 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. Fahren Sie mit der Testdurchführung binnen 2 Stunden fort.

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

Beim Standard-Protokoll müssen alle Inkubationen stillstehend (ohne Schüttler) erfolgen. Die beiden anderen Protokolle erfordern nur für den Schritt der Probeninkubation eine langsame Rotation (200 ± 100 U/min) auf einem flachen Plattenschüttler. 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.

Testprotokolle

Testverfahren		Standard-Protokoll	Kurz-Protokoll	Ultra-Kurz-Protokoll
Schritt	Aktivität	Alle Schritte bei 18°–25°C	Alle Schritte bei 18°–25°C	32°–37°C ¹ : Nur Inkubationen (Schritte 3,5,8,10) 18°–25°C: Alle anderen Schritte einschließlich der Waschvorgänge
1	Probenzugabe in unbeschichtete Mikrotiterplatte zur Probenverdünnung	120 µl Probe mit 30 µl Arbeitslösung des Probenverdünners— GUT MISCHEN (Siehe Abschnitt "Verdünnung der Probe mit der Arbeitslösung des Probenverdünners")		
2	Probenzugabe in Antigen-Bindungsplatte	100 µl der verdünnten Probe auf die Antigenbindungsplatte pipettieren Kontrolllösung mischen und 100 µl im Doppelansatz auf Antigenbindungsplatte pipettieren Mikrotiterplatte abdecken		
3	Capture-Platten-Inkubation	2–3 Stunden (stillstehend)	45–60 Min., langsam schütteln, 200 ± 100 U/min	20–25 Min., langsam schütteln, 200 ± 100 U/min
4	Mit 1x-Waschlösung 1 waschen	Die Vertiefungen sechsmal mit ~350 µl 1x-Waschlösung 1 waschen		
5	Konditioniererzugabe/-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 hinzugeben und die Mikrotiterplatte zudecken.		
8	Konjugatinkubation	60–75 Min.	45–50 Min.	25–30 Min.
9	Mit 1x-Waschlösung 2 waschen	Die Vertiefungen fünfmal mit ~350 µl 1x-Waschlösung zweimal 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

Interpretation der Ergebnisse

Damit der Test gültig ist, muss der Mittelwert der Negativkontrolle (NC \bar{x}) einen A₄₅₀ – A_{REF}-Wert von unter 0,150 haben; der Mittelwert der Positivkontrolle (PC \bar{x}) muss einen A₄₅₀ – A_{REF}-Wert von ≥0,400 haben.

Berechnungen

Berechnung des Mittelwerts der Negativkontrolle (NC \bar{x}):

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

Berechnung des Mittelwerts der Positivkontrolle (PC \bar{x}):

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

Berechnung des Cutoff-Wertes:

$$\text{Cutoff} = NC\bar{x} + 0,120$$

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 A₄₅₀ – A_{REF}-Wert unter dem Cutoff liegt, gelten im IDEXX HerdChek BSE-Antigen-Testkit als negativ. Proben, deren A₄₅₀ – A_{REF}-Wert mindestens so hoch wie der Cutoff-Wert oder höher ist, werden zunächst als reaktiv für PrP^{Sc} klassifiziert, die Homogenate sollten aber noch einmal im Doppelansatz mit dem HerdChek BSE-Antigen-Testkit von IDEXX getestet werden. Zur Nachtestung kann entweder das Original-Gewebehomogenat oder das nach dem unten beschriebenen optionalen Wärmebehandlungsprotokoll aufbereitete Homogenat verwendet werden.

Wenn dann einer der beiden Probenwerte über oder gleich dem Cutoff des Tests liegt, gilt die Probe als positiv. Die Probe gilt als negativ, wenn beide Wiederholungsergebnisse niedriger sind als der Cutoff des Tests. In den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union müssen alle intinial reaktiven Proben, die anhand des Wärmebehandlungsprotokolls als negativ identifiziert wurden, an das jeweilige nationale Referenzlabor (NRL) geschickt werden, die es dann an das CRL weiterleiten.

In den Mitgliedstaaten der Europäischen Union müssen alle Proben und entsprechende Gewebestücke mit positiven Testresultaten zur Bestätigung an das jeweilige nationale Referenzlabor (NRL) geschickt werden. In den Vereinigten Staaten müssen Proben und entsprechende Gewebestücke, die gemäß den Kriterien zur Testinterpretation positiv sind, von der Abteilung für Immunhistochemie des nordamerikanischen Referenzlabors für Veterinärmedizin (NVSL) bestätigt werden.

Optionales Nachtestungsprotokoll nach Wärmebehandlung für initial reaktive Homogenate: (Das Wärmebehandlungsprotokoll ist nur anwendbar auf bovine Proben.)

Entfernen Sie ca. 230 μ l des initial reaktiven Gewebehomogenates und dispensieren Sie es in ein konisches 1,5-2,0 ml Gefäß mit Schraubverschluss. Stellen Sie das Gefäß in einen auf 70°C \pm 2°C vorgeheizten Inkubator. Inkubieren Sie das Probengefäß für 10 \pm 1min und lassen Sie es dann für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur (18°–25°C) in einem Reagenzglashalter abkühlen. Das Homogenat sollte innerhalb der nächsten zwei Stunden im Doppelansatz mit dem IDEXX HerdChek BSE AntigenTest Kit nachgetestet werden.

Vorsichtsmaßnahmen

- Das TMB-Substrat keinem starken Licht oder Oxidationsmitteln aussetzen. Für TMB saubere bzw. 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°–7°C aufbewahren. Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18°–25°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.

Sicherheitsinformationen

- Das gesamte Personal muss eine entsprechende Schulung hinsichtlich der BSE-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.
- Vermeiden Sie die Verwendung von Glasbehältern im Labor.

Anhang

Der Test ist zum in vitro-Nachweis der anormalen Konformation des Prionprotein (PrP^{Sc}) innerhalb der Europäischen Union als Schnelltest im Rahmen des Programms zur BSE-Erkennung bei Rindern gemäß der Verordnung (EC) Nr. 999/2001 anerkannt.

Der Hersteller des Schnelltests muss ein vom Community Reference Laboratory (CRL) genehmigtes Qualitätssicherungssystem haben, um eine gleichbleibende Testqualität zu gewährleisten. Der Hersteller muss das Testprotokoll dem CRL zur Verfügung stellen. Modifikationen der Probenentnahmegärte oder des Testprotokolls des Schnelltests (einschließlich Probenentnahme) sind nur nach vorheriger Mitteilung an das CRL zulässig, und auch nur unter der Voraussetzung, dass die Modifikation nach Ansicht des CRL keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit, Genauigkeit oder Zuverlässigkeit des Schnelltests hat. Das Ergebnis ist der EU-Kommission sowie den zuständigen nationalen Referenzlaboratorien mitzuteilen.

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 Obex mit dem IDEXX-Probenentnahmesystem

IDEXX stellt ein Probenentnahmegärte zur Verfügung. Bei diesem Gerärte handelt es sich um eine Probenspritze. Das IDEXX-Probenentnahmesystem wurde vom CRL 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. Identifizieren Sie die durch eine V-förmige Vertiefung in der Oberfläche des Hirnstamms gekennzeichnete Region (siehe Abbildung 1 im Abschnitt Probenentnahme und Herstellung von Gehirnproben). 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. Positionieren Sie das Stammhirn so, dass der V-förmige Gewebeabschnitt nach oben zeigt. Platzieren Sie 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). 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.
3. Halten Sie den Kolben der Spritze sicher fest. Schieben Sie mit Ihrem Zeigefinger den äußeren Zylinder der Spritze in den Hirnstamm. Achten Sie darauf, dass der Kolben sich nicht in irgendeine Richtung bewegt. Beachten Sie die Abbildung 2 für eine passende Ausrichtung der Spritze, 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

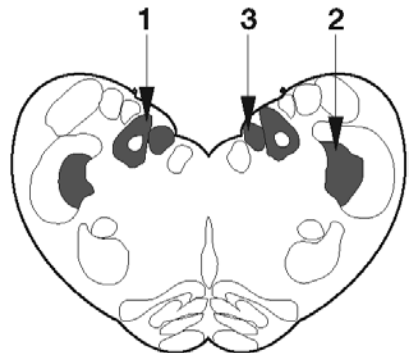


Abbildung 2. Querschnitt des Rinder-Stammhirns auf der Höhe des Obex, so dass die wichtigen Zielbereiche für die Gewebeerntnahme zu erkennen sind. 1) Tractus solitarius, 2) Kern des Trigeminusnervs, 3) dorsaler motorischer Kern des Vagus-Nervs. (Abbildung aus „OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines“, Kapitel 2.3.13)

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. Stellen Sie sicher, 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. Drehen Sie den Zylinder, um die Probe zu isolieren, und ziehen Sie die Spritze vorsichtig aus dem Gewebe.
6. Wenn noch ein Teil der Gewebeprobe aus der Spritzenöffnung herausragt, kann diese durch Zurückziehen des Spritzenkolbens in den Zylinder gezogen werden. Entfernen Sie Luft und etwaige Lücken in der Gehirnprobe in der Probenspritze.

Beachten Sie, dass die Spritze im Innern mehrere „Raster“ oder Rillen in regelmäßigen Abständen besitzt. 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, schieben Sie den Kolben, 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. Wischen Sie Gewebereste an der Außenseite der Spritze ab. Achten Sie darauf, dass Sie hierbei nicht den Kolben betätigen, da die Probe ansonsten unerwünschterweise entweder herausgedrückt oder zusammengepresst wird.
9. Halten Sie das Röhrchen zur Gewebezerkleinerung vertikal in einer Hand und die Spritze in der anderen, wobei die Spritze der Öffnung des Röhrchens liegen muss. Übertragen Sie eine genau abgemessene Menge des Obex-Gewebes in das Röhrchen zur Gewebezerkleinerung, indem Sie den Kolben über einen Raster hinweg bis zum zweiten Raster schieben. Das Volumen zwischen den Rastern entspricht 150 µl; insgesamt werden also 300 µl in ein Röhrchen übertragen (dies entspricht 0,30 g ± 0,05 g Gewebe).
10. Verschließen Sie das Röhrchen und fahren Sie mit der Homogenisierung der Probe fort.

Die mit der Entnahme von Obexproben mit Hilfe des IDEXX-Probenentnahmegeräts 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-Probenentnahmespritze 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 erhalten Sie vom technischen

Kundendienst von IDEXX

Innerhalb der USA und von Kanada: 1-207-556-4890 bzw. 1-800-548-9997

Innerhalb von Europa: 00-800-727-43399

Zul.-Nr.: BFAV-B 365

*HerdChek ist eine Schutzmarke oder eine eingetragene Schutzmarke von IDEXX Laboratories, Inc. 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.

© 2008 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Introduzione

Il kit IDEXX HerdChek* Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE—Encefalopatia Spongiforme Bovina) Antigen test kit è un saggio immunoenzimatico a cattura d'antigene (EIA) per la rilevazione del conformero anormale della proteina del prione (PrP^{Sc}) in tessuti cerebrali postmortem (preferibilmente l'obex) provenienti da bovini affetti da encefalopatia spongiforme bovina (BSE). 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.

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 immobilizzato sulla superficie della piastra di cattura dell'antigene della BSE. I campioni da analizzare (tessuti cerebrali, preferibilmente sezioni dell'obex) 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 kit di analisi dell'antigene BSE IDEXX HerdChek. 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 immunocitochimica.

Componenti del kit

Conservare tutti i componenti a 2°–7°C.

Articolo	460 tests	1380 tests
A Piastre di cattura antigene	5 piastre	15 piastre
N Controllo negativo—Non reattivo con piastra di cattura dell'antigene. Contiene azoturo di sodio come conservante.	5 x 1 ml	5 x 1 ml
P Controllo positivo—Non infettivo, reattivo con piastra di cattura dell'antigene. Contiene azoturo di sodio come conservante.	5 x 1 ml	5 x 1 ml
D1 Componente 1 diluente per piastra. Contiene azoturo di sodio come conservante.	20 ml	40 ml
D2 Componente 2 diluente per piastra	5 x 200 μ l	3 x 800 μ l
R Tampone di ricostituzione	20 ml	20 ml
CB Tampone di condizionamento. Contiene azoturo di sodio come conservante.	60 ml	210 ml
CC Coniugato concentrato. Contiene Bronidox L e metilisotiazolone come conservanti.	300 μ l	3 x 300 μ l
CD Tampone diluente per coniugato con detergenti e stabilizzanti delle proteine. Contiene Kathon come conservante.	60 ml	210 ml
W1 Soluzione 1 di lavaggio 10X. Contiene azoturo di sodio come conservante.	450 ml	2 x 450 ml
W2 Soluzione 2 di lavaggio 10X. Contiene gentamicina come conservante.	450 ml	2 x 450 ml
T Substrato TMB	60 ml	315 ml

NOTA: I volumi di reagente indicati sulle etichette dei componenti rappresentano la quantità minima di riempimento. In alcuni casi il volume effettivo supera la quantità indicata nell'etichetta.

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 di $\pm 5\%$.
- Cilindri graduati per soluzioni di lavaggio
- Coperchi in plastica rigida o coperchi adesivi per piastre, piastre di diluizione e vassoietti dove distribuire i reagenti da pipettare
- Strumenti monouso di dissezione per la raccolta del campione o dispositivo 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), Precess 48* 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 di protezione
- 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 piastrelle 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 cervello (obex)

1. 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 come descritto nell'Appendice. Il personale che raccoglie l'obex deve essere esperto nel metodo di campionamento.

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 dell'obex intatta per l'esecuzione di 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-EIA sono stati convalidati tre 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*: processare i campioni alla Modalità 1 del Programma (2 x 23 sec alla velocità di 6500 rpm, con un intervallo di 5 secondi fra un ciclo e l'altro).

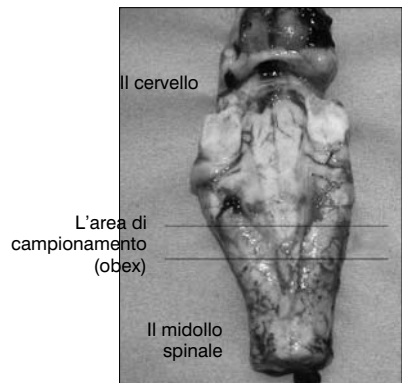


Figura 1. Tronco cerebrale bovino.

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

- Programma per lo strumento Precellys 24*: processare i campioni alla modalità 1 del Programma (2 x 20 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 temperatura ambiente (18°–25°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°–7°C oppure conservato a ≤20°C per un massimo di 6 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.

Preparazione dei reattivi

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

I concentrati delle soluzioni di lavaggio devono essere portati a temperatura ambiente (18°–25°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. 40 ml di concentrato più 360 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 µl di tampone di ricostituzione (R), lasciandola riposare per 1 minuto circa e quindi miscelandola con delicatezza. Usare entro 1 ora dalla preparazione.

Diluente per piastra di lavoro

Il diluente per piastra di lavoro 1 (D1) deve essere portato a temperatura ambiente (18°–25°C). Preparare il diluente per la piastra di lavoro attraverso l'aggiunta di 1 parte di componente del diluente 2 (D2) a 25 parti di componente 1 (D1) miscelare con cura (e.g.: 120 µl di D2 a 3,0 ml di D1 per piastra). Per ogni piastra sono necessari circa 2,75 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 tampone di ricostituzione. Assicurarsi che la soluzione riposi per almeno 1 minuto e poi miscelare vigorosamente. Usare entro 2 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 coniugati con perossidasi (HRPO) viene preparata diluendo il concentrato coniugato (CC) nel diluente coniugato (DC), come indicato sull'etichetta (per esempio, una diluizione 1:100 richiede 120 µl di concentrato coniugato per 12 ml di diluente coniugato)

IMPORTANTE: Consultare l'etichetta del concentrato coniugato (CC) per il fattore di diluizione corretto. Il coniugato diluito deve essere preparato e usato entro 4 ore.

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 temperatura ambiente (18°–25°C) prima dell'uso. Prima di avviare l'analisi, preparare le soluzioni da utilizzare nel dosaggio. Miscelare i reattivi agitando con delicatezza in senso circolare. Miscelare per bene i controlli. I controlli (negativo e positivo) sono analizzati in duplicato. Per coprire la piastra per la durata dell'analisi utilizzare un apposito coperchio.

Conservazione dei reattivi preparati

Articolo	Volume di ricostituzione	Conservazione
N/P Controllo negativo/positivo	1 ml	2 ore a 18°–25°C 6 mesi a -20°C
D2 Diluente per piastra 2	200 µl	1 ora a 18°–25°C 6 mesi a -20°C
Diluente per piastra di lavoro	Non pert.	8 ore a 18°–25°C

HRPO:soluzione anti-PrP	Non pert.	4 ore a 18°–25°C
Soluzione di lavaggio 1–1X	Non pert.	1 settimana a 18°–25°C
Soluzione di lavaggio 2–1X	Non pert.	1 settimana a 18°–25°C

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

Procedura del test

Gli omogenati dei campioni si preparano come descritto nella sezione Campionamento e preparazione del cervello (obex). **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 reattivi 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 EIA ha tre protocolli approvati e convalidati per il tessuto cerebrale: Standard, Breve ed un protocollo 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 39.

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 puo essere aggiunto alla piastra di diluizione prima o dopo il campione. Il rapporto è di 30 μ l di diluente per piastra di lavoro ogni 120 μ l 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 disaggregazione 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 puó essere effettuato o con la micropipetta o con un agitatore per micropiastre. Se viene utilizzato l'agitatore sará necessario ottimizzare la velocita 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 Protocollo Breve ed Ultra-Breve

Il protocollo normale richiede che tutte le fasi di incubazione vengano effettuate con le micropiastre ferme. Gli altri due protocolli comportano una lenta rotazione (200 ± 100 rpm) con un agitatore per micropiastre piatto soltanto per il passaggio di incubazione del campione. L'agitatore per micropiastre dovrá creare un delicato movimento orizzontale e circolare. Sebbene il campione, all'interno di ogni pozzetto della micropiastra, si muoverá leggermente, questo potrebbe non essere apparentemente visibile. Il movimento non dovrá essere cosí 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 nella procedura della pagina seguente.

Protocolli per l'esame

Procedura del test		Protocollo Standard	Protocollo Breve	Protocollo Ultra-Breve
Passaggio	Attività	18°–25°C Tutti i passaggi	18°–25°C Tutti i passaggi	32°–37°C ¹ : Solo per l'incubazione (passaggi 3, 5, 8, 10) 18°–25°C: Tutti gli altri passaggi, inclusi i passaggi di lavaggio
1	Aggiunta del campione alla piastra di diluizione	120 µl di campione con 30 µl di diluente per piastra di 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	2–3 ore fermo	45–60 minuti; agitare lentamente a 200 ± 100 rpm	20–25 minuti; agitare lentamente a 200 ± 100 rpm
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 e coprire la piastra con un coperchio		
8	Incubazione del coniugato	60–75 minuti	45–50 minuti	25–30 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

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:

$$\text{Valore limite} = NC\bar{x} + 0,120$$

NOTA: vedere il passo 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 kit di analisi dell'antigene BSE IDEXX HerdChek. 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 kit di analisi dell'antigene BSE IDEXX HerdChek. È possibile ripetere il test utilizzando l'iniziale omogenato tissutale o un omogenato preparato utilizzando il protocollo opzionale di calore 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 campioni inizialmente reattivi risultanti negativi con l'utilizzo del protocollo con trattamento termico possono essere considerati come negativi. TUTTAVIA I campioni dovranno essere inviati al laboratorio nazionale di riferimento per essere inoltrati al laboratorio di riferimento comunitario.

Negli stati membri dell'Unione Europea, tutti i campioni e i tessuti corrispondenti che diano risultati del test positivi devono essere inviati al Laboratorio di riferimento nazionale per la conferma. Negli Stati Uniti, i campioni e i tessuti corrispondenti che diano risultati positivi secondo i criteri di interpretazione del test devono essere confermati tramite immunostochimica presso NVSL (National Veterinary Services Laboratory).

Protocollo opzionale per la ripetizione del test con trattamento di calore per omogenati inizialmente reattivi:

(Il protocollo con il trattamento termico si applica solo su campioni bovini.)

Prelevare circa 230 μ 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 temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$) per almeno 20 minuti, per consentire il raffreddamento del campione. Il test dell'omogenato deve essere ripetuto entro due ore, in duplicato, con l>IDEXX HerdChek BSE 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 $2^\circ-7^\circ\text{C}$. Portare i reattivi a temperatura ambiente ($18^\circ-25^\circ\text{C}$) prima dell'uso e conservarli alle corrette temperature dopo l'uso (vedere la sezione Conservazione dei reattivi 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 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

Test per la rilevazione in-vitro dell'agente eziologico della BSE (PrP^{Sc}) nell'Unione Europea, questo test è approvato come test rapido per il programma di test della BSE sul bestiame, predisposto in base al regolamento (CE) n. 999/2001.

Il produttore del test rapido deve avere in funzione un sistema di garanzia della qualità approvato dal Community Reference Laboratory (CRL), che assicura l'immutabilità della performance del test. Il produttore deve fornire il protocollo del test al CRL. Gli strumenti di campionamento, il test rapido o il protocollo del test (compreso il campionamento) possono essere cambiati solo dopo avvenuta notifica al CRL 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.

Il campionamento e le procedure di test di laboratorio devono seguire il regolamento (CE) n. 999/2001 Annesso 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 con il dispositivo di raccolta dei campioni IDEXX

IDEXX offre un dispositivo di raccolta dei campioni come metodo alternativo di estrazione dell'obex. 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 è possibile identificare la corretta posizione anatomica per il prelievo del campione, utilizzare il dispositivo di raccolta come descritto al punto **Campionamento e preparazione del cervello (obex)**.

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 cucchiaino. Identificare la regione dell'obex del cervello, che è indicata dalla presenza di una concavità a forma di V, sulla superficie superiore del tronco encefalico (vedi il diagramma nella sezione 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 nella sezione 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. Introducete 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.

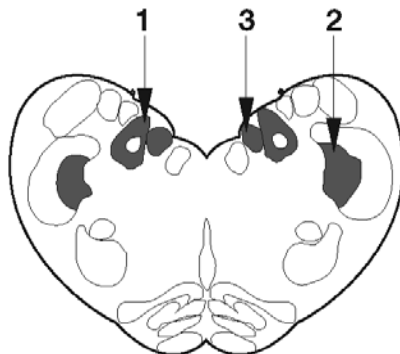


Figura 2. Sezione di tronco cerebrale bovino a livello dell'obex che evidenzia le sedi obiettivo per il prelievo del tessuto: 1) tratto solitario, 2) nucleo del nervo trigemino, 3) nucleo motorio dorsale del nervo vago (diagramma da OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines, capitolo 2.3.13)

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.
NOTA: Il campione che volete 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 trascinatela 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.
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 µl; all'interno della provetta devono essere iniettati, in totale, 300 µl (ossia un volume equivalente a 0,30 g ±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.

**Per assistenza tecnica, rivolgersi al
Servizio tecnico IDEXX ai seguenti numeri**

USA e Canada: 1-207-556-4890 or 1-800-548-9997

Europa: 00-800-727-43399

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

© 2008 IDEXX Laboratories, Inc. Tutti i diritti sono riservati.

Trousse d'analyse de l'Antigène Encéphalopathie Spongiforme Bovine, EIA

À l'usage vétérinaire seulement.

Version canadienne

Vue d'ensemble

La trousse d'analyse de l'Antigène de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) HerdChek* d'IDEXX est un test immuno-enzymatique de capture de l'antigène pour la détection post-mortem de la protéine du prion pathologique (PrP^{Sc}) dans les tissus du cerveau (de préférence l'obex) des bovins atteints d'encéphalopathie spongiforme bovine. Ce test est conçu pour identifier rapidement les échantillons contaminés avec de la PrP^{Sc} associée à la maladie, par l'intermédiaire d'une manipulation minimale des échantillons. Il est aussi conçu pour être automatisé pour les applications à grande échelle. Cette trousse est destinée à l'usage vétérinaire seulement.

Description et principes

Cette trousse utilise une méthode exclusive développée par Microsens Biotechnologies (Londres, U.K ; en attente de brevet) qui permet la mise en évidence de la structure anormale de la protéine Prion (PrP^{Sc}). Un ligand spécifique de la PrP^{Sc} est immobilisé à la surface de la plaque de capture de l'antigène de l'ESB. Les échantillons de tissu cérébral (obex de préférence) font l'objet d'une homogénéisation préalable à leur dilution respective dans le diluant de la plaque de dilution. Après la distribution des échantillons pré-dilués dans la plaque ESB de capture, la PrP^{Sc} associée à la maladie se lie au ligand immobilisé sur la phase solide avec une forte affinité. Puis les plaques sont lavées pour éliminer les substances non liées, y compris la protéine Prion physiologique normale (PrP). Après l'incubation avec le tampon conditionneur, la PrP^{Sc}, si elle est présente dans l'échantillon à vérifier, est alors détectée à l'aide d'un anticorps spécifique anti-PrP conjugué à la peroxydase de raifort (HRPO). La plaque est lavée pour éliminer les fractions non liées et un substrat de la peroxydase est ajouté. Le développement de couleur qui en résulte est proportionnel à la quantité de PrP^{Sc} capturée par le ligand immobilisé sur la phase solide.

L'interprétation des résultats est en relation directe avec la valeur de densité optique de chaque échantillon. Un échantillon dont la valeur $A_{450} - A_{REF}$ est inférieure à la valeur seuil est considéré négatif par la trousse d'IDEXX HerdChek BSE Ag, EIA pour la détection de la PrP^{Sc} de l'ESB. Un échantillon dont la valeur de densité optique $A_{450} - A_{REF}$ est supérieure ou égale à la valeur seuil est classé comme positif pour la PrP^{Sc} et une confirmation du test de type Immunohistochimie est requise.

Réactifs

Conserver tous les composants à 2°–7°C.

Article	460 tests	1380 tests
A Plaques de capture Ag (plaques sécables)	5 plaques	15 plaques
N Contrôle négatif—Non réactif avec plaque de capture Ag. Conservateur : azide de sodium	5 x 1 ml	5 x 1 ml
P Contrôle positif—Non infectieux, réactif avec plaque de capture Ag. Conservateur : azide de sodium	5 x 1 ml	5 x 1 ml
D1 Diluant de plaque 1. Conservateur : azide de sodium	20 ml	40 ml
D2 Diluant de plaque 2	5 x 200 µl	3 x 800 µl
R Tampon de reconstitution	20 ml	20 ml
CB Tampon conditionneur. Conservateur : azide de sodium	60 ml	210 ml
CC Conjugué concentré. Conservateurs : Bronidox L et Isothiazolone de méthyle	300 µl	3 x 300 µl
CD Diluant du conjugué avec détergents et stabilisateurs de protéine. Conservateur : kathon	60 ml	210 ml
W1 Solution 1 de lavage (x10). Conservateur : azide de sodium	450 ml	2 x 450 ml
W2 Solution 2 de lavage (x10). Conservateur : gentamicine	450 ml	2 x 450 ml
T Substrat TMB	60 ml	315 ml

Remarque : Le volume de réactif indiqué sur l'étiquetage correspond au volume de remplissage minimum. Dans certains cas, le volume réel excédera la valeur indiquée sur l'emballage.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de précision capables de délivrer des volumes compris entre 25 et 200 μl ou pipettes multicanaux. Une précision de $\pm 5\%$ est requise pour les volumes de réactifs mentionnés à la section du mode opératoire.
- Cylindres gradués 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
- Lecteur de plaque 96 puits (équipé avec filtres 450-nm et 620–650-nm) et appareil de lavage
- Appareil FastPrep* (FP120A, FP220A), Precess 48* ou Precellys 24*
- Kit accessoires (disponible auprès d'IDEXX) : 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
- Équipement de protection personnelle : lunettes de protection, blouses ou combinaisons de laboratoire, gants jetables, couvre-chaussures, filet pour cheveux, masques protecteurs
- Solution d'Arrêt 0,5–1,0 N HCl ou 1,0 N H_2SO_4
- Hypochlorite de sodium (eau de javel), 1N NaOH et 1N HCl, eau désionisée
- Optionnel—automate ELISA avec une précision de pipetage $\leq 2,5\%$ telle que mesurée par analyse de C.V. (par exemple Tecan)
- Optionnel—agitateur de plaques de micro-titrage (par exemple, IKA MTS 2/4)
- Optionnel—étuve à culture de plaques permettant de maintenir la température entre 32°–37°C avec courant d'air minimal
- Optionnel—bloc de chauffage à sec pour tubes microfuges de 1,5-2 ml (avec capacité de maintenir une température de 70°C)
- Optionnel—tubes microfuges coniques de 1,5-2 ml sans jupe avec bouchon à vis

Échantillonnage et préparation du cerveau (obex)

1. 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 d'échantillonnage IDEXX peut être utilisée comme décrit en Annexe. Cette étape est réalisée sous la responsabilité d'un personnel expérimenté.

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

REMARQUE : Après avoir prélevé l'échantillon, une complète hémisection du tronc cérébral avec une région intacte de l'obex 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. Trois modèles de ribolyseurs ont respectivement été validés pour une utilisation conjointe avec le trousse IDEXX BSE 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). Laisser refroidir l'instrument de 5 à 10 minutes si un second cycle est requis.
 - Programme pour appareil Precess 48* : broyage en mode 1 (2 x 23 secondes à 6500 rpm, avec un délai de 5 secondes entre deux cycles consécutifs).
 - Programme pour appareil Precellys 24* : broyage en mode 1 (2 x 20 secondes à 6500 rpm avec un délai de 5 secondes entre les deux cycles consécutifs).

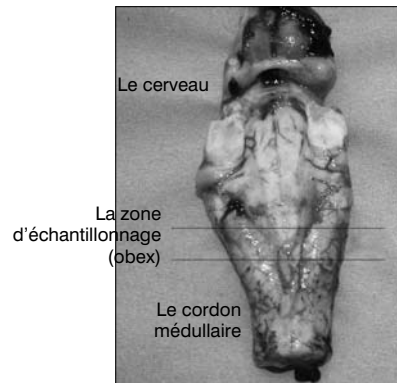


Figure 1. Tronc cérébral bovin.
© British Crown Copyright (février 2005) reproduit avec la gracieuse permission de la Veterinary Laboratories Agency.

4. Avant la mise en œuvre du test EIA, la stabilité des homogénats (fraîchement préparés ou décongelés) est de 4 heures maximum à température ambiante (18°–25°C).

Le nombre d'échantillons, devant être préparés pendant une seule session, peut varier. La durée de conservation des homogénats est respectivement de 24 heures maximum au réfrigérateur (2°–7°C) et de 6 mois maximum au congélateur à $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Les homogénats congelés doivent être décongelés et mélangés soigneusement par inversion avant d'être utilisés. Les échantillons de tissus peuvent être conservés à -80°C .

Préparation des Réactifs

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

Les solutions de lavage concentrées doivent être à température ambiante (18°–25°C) et bien homogénéisées avant l'utilisation pour assurer la dissolution de tout précipité. Diluer respectivement chacune d'elles à 1:10 avec de l'eau distillée ou désionisée (par ex : 30 ml de solution concentrée et 270 ml d'eau distillée par plaque).

Diluant D2 de la plaque de dilution

Le diluant D2 de la plaque de dilution est fourni sous forme d'un composé lyophilisé. Reconstituer avec 200 μl de tampon de reconstitution (R), laisser reposer pendant environ une minute, puis homogénéiser par agitation douce. Utiliser dans l'heure qui suit la préparation.

Diluant de plaque de dilution ppdit

Le diluant D1 de la plaque de dilution doit être à température ambiante. 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 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Ex., 120 μl de D2 pour 3,0 ml de D1 par plaque. Bien homogénéiser. Il faut environ 2,75 ml de diluant de la plaque de dilution ppdit pour une microplaque. Le diluant de la plaque de dilution ppdit doit être préparé et utilisé le même jour.

Contrôles Négatif et Positif

Les contrôles négatif et positif sont fournis lyophilisés. Reconstituer respectivement chacun d'eux avec 1 ml de tampon de reconstitution. Laisser reposer environ une minute avant l'homogénéisation au vortex. Utiliser dans les 2 heures qui suivent la préparation. **NE PAS DILUER LES CONTRÔLES NÉGATIF OU POSITIF DANS LE DILUANT DE PLAQUE DE DILUTION PPDIT.**

Conjugué Anticorps anti-PrP-HRPO

La solution d'anticorps anti-PrP conjugué à la peroxydase de raifort (HRPO) est préparée en diluant le conjugué concentré dans le diluant du conjugué comme il est indiqué sur l'étiquette du conjugué concentré (par exemple : une dilution au 1:100 exige 120 μl de conjugué concentré pour 12 ml de diluant du conjugué).

IMPORTANT : Veuillez vous référer à l'étiquette du concentré de conjugué pour connaître le facteur approprié de dilution. Le conjugué dilué doit être utilisée dans les quatre heures suivant sa préparation.

Solution d'Arrêt à base d'acide

La solution d'Arrêt (0,5–1,0 N HCl ou 1,0 N H₂SO₄) n'est pas fournie dans la trousse. On peut en faire l'acquisition auprès de fournisseurs spécialisés ou bien la préparer à partir de concentré.

Il est nécessaire de porter tous les réactifs de la trousse à température ambiante (18°–25°C) avant utilisation, et ce pour les trois protocoles décrits ci-dessous. Veiller à la reconstitution des solutions préalablement à la mise en route du test. 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 chaque microplaque, à tous les stades d'incubation à l'aide d'un couvercle de microplaque en matière plastique ou adhésif.

Conservation des réactifs reconstitués

Réactif	Volume de Reconstitution	Durée de conservation
N/P Contrôle négatif/positif	1 ml	Deux heures à 18°–25°C Six mois à -20°C
D2 Diluant 2 de la plaque de dilution	200 μl	Une heure à 18°–25°C Six mois à -20°C

Diluant de plaque de dilution ppdit	ND	Huit heures à 18°–25°C
Conjugué anti-PrP-HRP0	ND	Quatre heures à 18°–25°C
Solution 1 de lavage 1X	ND	Une semaine à 18°–25°C
Solution 2 de lavage 1X	ND	Une semaine à 18°–25°C

Conserver les plaques non utilisées dans un emballage hermétique à l'abri de la lumière et au sec.

Mode Opérateur

Les homogénats de tissu cérébral (obex) sont préparés selon le protocole décrit au paragraphe « Échantillonnage et préparation du cerveau (obex) ». **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 microplaque, à tous les stades d'incubation à l'aide d'un couvercle de microplaque en matière plastique ou adhésif. Si des incubations de réactifs sont effectuées dans un cabinet de biosécurité, les plaques doivent être recouvertes de films adhésifs.

Protocoles de test

Trois protocoles ont été validés pour la trousse d'analyse IDEXX BSE EIA : le protocole Standard, le protocole Court et le protocole Ultra-Court. Ces trois protocoles ont un niveau de performance équivalent mais requièrent un matériel différent selon la durée du protocole en question. Ces protocoles sont décrits au tableau de la page 47.

Dilution de l'échantillon avec le diluant de plaque

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.

Suspendre de nouveau par inversion les homogénats puis aspirer avec soin l'échantillon en insérant l'extrémité de la pipette de transfert d'homogénat à travers les billes et en prélevant un échantillon dans le tube de ribolyse. Déposer avec soin chaque échantillon sur la plaque de dilution en veillant à éviter de faire des bulles dans l'homogénat ou de laisser des résidus d'homogénat sur les bords du puits de la plaque de dilution.

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 plaques en évitant la formation de bulles. Si un agitateur de plaques 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 de microplaques lors de l'étape de l'incubation de l'échantillon pour les protocoles Court et Ultra-Court

Le protocole standard ne requiert aucune agitation lors des étapes d'incubation. Les deux autres protocoles requièrent, pour l'étape d'incubation des échantillons, une agitation douce (200 ±100 rpm) réalisée à l'aide d'un agitateur de microplaques. 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 mode opératoire décrit à la page suivante.

Protocoles de test

Mode Opérateur		Protocole Standard	Protocole Court	Protocole Ultra-Court
Etape	Activité	18°–25°C Toutes les étapes	18°–25°C Toutes les étapes	32°–37°C ¹ : Incubations seulement (étapes 3,5,8,10) 18°–25°C : Toutes les autres étapes incluant les étapes de lavage
1	Distribution de l'échantillon à la plaque de dilution	120 µl d'échantillon mélangé à 30 µl de diluant de plaque— BIEN HOMOGENEISER (voir section "Dilution de l'échantillon avec le diluant de plaque")		
2	Distribution de l'échantillon à la Plaque de capture de l'antigène	Distribuer à la pipette 100 µl d'échantillon dilué sur la plaque de test, mélanger les contrôles et distribuer en double 100 µl ; couvrir la plaque à l'aide d'un couvercle.		
3	Incubation de la plaque de capture	2–3 heures – sans mouvement	45-60 min; agitation douce 200 ± 100 rpm	20-25 min; agitation douce 200 ± 100 rpm
4	Laver avec la solution 1 de lavage (x1)	Laver les puits 6 fois avec ~350 µl de solution 1 de lavage (1x)		
5	Conditionnement : Distribution / Incubation	Distribuer 100 µl de tampon de conditionnement à chaque puits, couvrir la plaque et incuber pendant 10 ± 1 min.		
6	Laver avec la solution 2 de lavage (x1)	Laver les puits 3 fois avec ~350 µl de solution 2 de lavage (1x)		
7	Ajout du conjugué	Distribuer 100 µl de solution de conjugué, couvrir la plaque à l'aide d'un couvercle		
8	Incubation du conjugué	60–75 min.	45–50 min.	25–30 min.
9	Laver avec la solution 2 de lavage (x1)	Laver les puits 5 fois avec ~350 µl de solution 2 de lavage (1x)		
10	Solution de substrat : Distribution / Incubation	Distribuer 100 µl de solution de substrat à chaque puits, couvrir la plaque et incuber pendant 15 ± 1 min. Ne pas exposer à la lumière directe du soleil (ne pas utiliser de film adhésif).		
11	Ajout solution d'arrêt / Lecture des résultats	Distribuer 100 µl de solution d'arrêt acide; la plaque peut rester jusqu'à 30 minutes dans l'obscurité avant lecture de la densité optique (450 nm) en utilisant une longueur d'onde de référence située entre (A_{REF}) 620 et 650 nm.		

1. Incubation à 32°–37 °C signifie placer la plaque dans un incubateur réchauffé à 32°–37 °C

Interprétation des résultats

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

Calculs

Calcul du contrôle négatif (NC \bar{x}) :

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

Calcul du contrôle positif (PC \bar{x}) :

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

Calcul de la valeur seuil (VS) :

$$VS = NC\bar{x} + 0,120$$

Remarque : Se référer à l'étape #11 de la procédure du test pour la définition du A_{REF}

Résultats

L'interprétation des résultats est basée sur la valeur de densité optique de chaque échantillon. Les échantillons dont la valeur de $(A_{450} - A_{REF})$ est inférieure à la valeur seuil (VS) sont considérés négatifs par la trousse d>IDEXX HerdChek ESB Ag, EIA. Les échantillons dont la valeur de $(A_{450} - A_{REF})$ est supérieure ou égale à la valeur seuil (VS) sont classés initialement réactifs pour la PrP^{Sc}, et l'homogénéat doivent être vérifiés à nouveau en duplicata avec la trousse d>IDEXX HerdChek ESB Ag, EIA. La réanalyse peut être effectuée à partir de l'homogénéat initial ou à partir d'homogénéat préparé en utilisant le protocole de traitement à la chaleur facultatif décrit ci-dessous.

Si une des deux valeurs obtenues par le nouveau test est égale ou supérieure à la valeur seuil du test, l'échantillon est classé positif. L'échantillon est classé négatif lorsque les mesures obtenues par le nouveau test sont inférieures à la valeur seuil. Au sein de l'UE, tous les échantillons réactifs à l'origine qui sont négatifs à la suite du traitement à la chaleur peuvent être qualifiés de négatifs, MAIS les échantillons doivent être envoyés au laboratoire de référence national approprié afin d'être soumis au CRL.

Dans les Etats membres de l'Union Européenne, tous les échantillons et les tissus correspondants, dont les résultats de tests sont positifs, doivent être envoyés au laboratoire de référence national pour confirmation. Aux États-Unis, les échantillons et les tissus correspondants qui rendent des résultats positifs, en conformité aux critères d'interprétation du test, doivent être confirmés par immuno-histochimie au NVSL (National Veterinary Services Laboratory).

Protocole de réanalyse avec traitement à la chaleur facultatif pour les homogénéats initialement réactifs :

(Le protocole de traitement à la chaleur s'applique seulement aux échantillons bovins.)

Prélever approximativement 230 μ l de l'homogénéat du tissu initialement réactif et distribuer dans un microtube conique à vis de 1,5-2,0 ml. Mettre le tube dans un bloc de chauffage à sec préalablement porté à 70° \pm 2°C. Faire chauffer le tube pendant 10 \pm 1 min. et puis mettre le tube dans un râtelier sans le couvrir à température ambiante (18°-25°C) pendant au moins 20 minutes afin de laisser refroidir l'échantillon. L'homogénéat doit être vérifié à nouveau dans deux heures, en duplicata sur la trousse d>IDEXX HerdChek ESB Ag, EIA.

Précautions

- Ne pas exposer le substrat TMB à la lumière directe du soleil ou aux agents oxydants. Pour la distribution du TMB, utiliser des récipients propres en plastique ou du matériel à usage unique.
- Prendre soin d'éviter la contamination des composants de la trousse. Ne pas utiliser les composants après leurs dates d'expiration et ne pas mélanger les composants provenant de lots de trousse différents.
- Certains composants de la trousse contiennent de l'azide de sodium comme agent de conservation (voir description des composants de la trousse). Prendre soin d'éviter la contamination du conjugué anti-PrP-HRPO avec les solutions contenant de l'azide de sodium.
- Conserver tous les réactifs au réfrigérateur entre 2°-7°C. Les amener à température ambiante avant d'utiliser et les entreposer comme indiqué au paragraphe « Conservation des réactifs reconstitués » après usage.

- Utiliser des réservoirs d'entreposage et de distribution des réactifs bien distincts pour chacun des réactifs. Éviter la contamination croisée du substrat TMB avec la solution de conjugué reconstituée. Ne pas verser la solution TMB résiduelle dans le flacon d'origine.
- Ne pas laisser les plaques de microtitrage pendant plus de 5 minutes entre les étapes de lavage et l'ajout de réactif.

Sécurité

- Tout le personnel doit recevoir une formation adéquate relativement aux risques liés à l'ESB et aux procédures de décontamination recommandées. L'observation stricte des procédures de biosécurité est essentielle, conformément aux règlements nationaux sur la sécurité.
- Le tampon conditionneur 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 de la plaque 1 contient des concentrations élevées de détergents; éviter tout contact direct.
- Éviter l'utilisation de verrerie de laboratoire.

Annexe

Test de détection in vitro de la PrP^{Sc} liée à l'ESB. Ce test a été approuvé au sein de l'Union européenne comme test de dépistage rapide dans le cadre du programme de dépistage de l'ESB, qui a été établi conformément au Règlement (CE) No 999/2001.

Le fabricant de tests rapides de dépistage doit avoir un système d'assurance de qualité en place homologué par le Laboratoire communautaire de référence (LCR), qui veille à ce que le rendement du test ne change pas. Le fabricant doit fournir le protocole du test au LCR. 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 LCR, et avant que ce dernier convienne que la modification ne diminue pas la sensibilité, la spécificité ou la fiabilité du test rapide. Les résultats doivent être communiqués à la Commission et aux Laboratoires communautaires de référence.

L'échantillonnage et les tests de laboratoire doivent être conformes au Annexe X, Chapitre C du Règlement (CE) No 999/2001, qui se reporte à la dernière édition du manuel de réglementation pour les tests de diagnostic et les vaccinations de l'Office international des épizooties (OIE) qui stipule que : 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.

Échantillonnage de l'obex avec la seringue IDEXX

IDEXX a mis au point une seringue pour extraire des échantillons de l'obex. Il s'agit d'une seringue d'échantillonnage. 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 « **Échantillonnage et préparation du cerveau (obex)** ».

1. On doit recueillir le tronc cérébral à l'abattoir par le trou occipital avec l'outil approprié ou une cuillère de prélèvement d'échantillon. Identifier la zone obex comme indiqué par la forme en V repérable à la surface dorsale du tronc cérébral (voir schéma paragraphe « Échantillonnage et préparation du cerveau (obex) »). S'il n'est pas possible de reconnaître la bonne zone anatomique, utiliser des instruments de dissection, tel que décrit dans la section Échantillonnage et préparation du cerveau (obex) du présent encart.

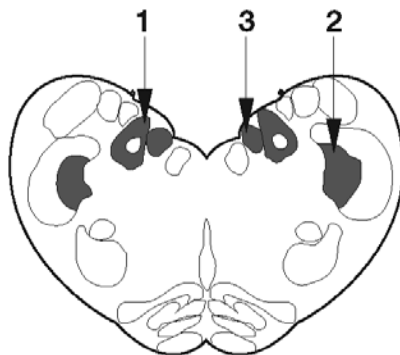


Figure 2. Coupe du tronc cérébral bovin au niveau de l'obex. Elle présente les emplacements cibles importants pour prélever des tissus : 1) canal solitaire, 2) noyau du nerf trijumeau, 3) noyau moteur dorsal du nerf vague. (Diagramme du Manuel de tests diagnostics et de vaccins de l'OIE, Section 2.3.13)

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). Il pourrait être nécessaire d'enlever du tissu excédentaire de la moelle épinière si la longueur, depuis la base de la moelle épinière jusqu'à la pointe de la section en V est supérieure à 3 ou 4 cm.
3. Tenir fermement le piston de la seringue. Avec votre index, enfoncer le cylindre externe de la seringue dans le tronc cérébral en veillant à ce que le piston ne bouge dans aucune direction. Voir la Figure 2 qui présente l'alignement adéquat de la seringue pour viser les sites importants de prélèvement de tissus dans l'obex. Quand le cylindre de la seringue s'enfonce dans l'échantillon, il doit rester dans le côté choisi du tronc cérébral pour éviter d'endommager l'autre côté. On doit conserver une hémisection complète du tronc cérébral avec un obex intact pour effectuer des 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 dans la portion supérieure de la zone d'échantillonnage (voir la Figure 1). Le cylindre devrait alors contenir un échantillon d'obex.

Remarque : l'échantillon souhaité (ex : zone obex) est situé à l'extrémité du corps de la seringue.

5. Faire tourner le cylindre pour isoler l'échantillon et retirer soigneusement la seringue du tissu.
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. La seringue peut alors être manipulée pour chasser l'air à l'extrémité et éliminer tous les espaces entre les divers échantillons.

Remarquer que l'intérieur de la seringue comporte diverses « cavités » ou rainures, réparties également. On les sent quand on déplace le piston dans la seringue. L'espace entre les cavités permet de mesurer exactement le volume d'échantillon.

7. Quand le tissu est dans la seringue, enfoncer le piston pour l'aligner avec la cavité la plus proche. L'échantillon ne devrait pas comporter d'espaces libres entre le piston et la pointe de la seringue. Il peut y avoir un peu de matériau excédentaire qui dépasse la pointe 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. N'appuyez pas sur le piston pendant ce processus parce que l'échantillon sera éjecté ou comprimé, deux choix indésirables.
9. Tenir le tube de rupture des tissus à la verticale d'une main et la seringue de l'autre. La pointe de la seringue doit être juste à l'intérieur du bout du tube de rupture des tissus. Injecter une quantité mesurée du tissu de l'obex dans le tube de rupture en poussant le piston d'une cavité. S'arrêter à la deuxième cavité. Le volume entre les cavités est de 150 μ l; on injectera un total de 300 μ l dans le tube (équivalent à 0,30 g \pm 0,05 g de tissu).
10. Boucher le tube et homogénéiser l'échantillon.

Le personnel qui effectue la prise d'échantillons dans l'obex au moyen de la seringue IDEXX devrait avoir reçu une formation adéquate afin que la prise s'effectue dans la zone appropriée du tronc cérébral. Chaque technicien doit contrôler l'exactitude de l'échantillonnage par des vérifications périodiques du poids des échantillons. On doit instaurer un programme de mesures correctives si les résultats ne sont pas conformes aux critères d'acceptation définis. Le dispositif de prélèvement d'échantillon d'IDEXX est à usage unique et doit être jeté après chaque échantillon pour éviter la contamination.

Limitation de 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 obtenir une assistance technique,
appeler le service technique d'IDEXX
Pour les Etats Unis et Canada, composer le n° 1-207-556-4890 ou 1-800-548-9997
Pour l'Europe, composer le n° 00-800-727-43399**

*HerdChek est une marque de commerce ou une marque déposée d'IDEXX Laboratories, Inc. 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 instance.

© 2008 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.

U.S. Vet Lic. No. 313
Product Code: 5430.21



One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092 USA
idexx.com