

ENFER TSE verze 3

06L72 (450 testů v duplikátu)

Test k in vitro detekci prionového proteinu PrP^{Sc} souvisejícího s TSE

**Metoda A Manuální homogenizace a Metoda B Automatický odběr vzorků /
zpracování**








V Evropské unii je tento test schválen jako rychlý test v rámci programu testování dobytka na BSE v souladu s právním předpisem (ES) č. 999/2001

Určeno pouze pro veterinární *in vitro* diagnostiku

Společnost Enfer Scientific má zavedený systém managementu jakosti podle normy ISO9001

Výrobce:
Enfer Scientific
Unit T, M7 Business Park
Newhall, Naas
Co. Kildare
Irsko
Tel.: +353 459 83800

Legenda k použitým symbolům:

	Šarže:		Skladujte při teplotě mezi -25°C a -15°C
	Použijte do:		Skladujte při teplotě mezi 2°C a 8°C
	Skladujte při teplotě mezi 2°C a 30°C		Skladujte při teplotě mezi 10°C a 30°C
	Prostudujte pokyny k použití		

Obsah

	Kapitola
Všeobecné informace	1.0
Použití	2.0
Princip postupu	3.0
Reagencie	4.0
Varování a bezpečnostní opatření	5.0
Ochrana zdraví a bezpečnost práce	6.0
Odběr, přeprava a skladování vzorků	7.0
Metodická opatření	8.0
Požadovaný materiál, který není součástí soupravy	9.0
Homogenizace	9.1
Automatický přenos vzorků (volitelné)	9.2
Přístrojové vybavení	9.3
Obecné	9.4
Parametry pro nastavení přístrojů	10.0
Promývačka	10.1
Třepačka / inkubátor	10.2
Systém ETDS VIII	10.3
Příprava reagensů	11.0
Příprava kontrol z tkáně	12.0
Negativní kontrolní tkáň	12.1
Pozitivní kontrolní tkáň	12.2
Postup při přípravě vzorku	13.0
Metoda A - manuální homogenizace	13.1
Metoda B - automatizovaná homogenizace	13.2
Postup při imunoanalýze	14.0
Výsledky	15.0
Validace funkčnosti testu	15.1
Interpretace výsledků	15.2
Omezení metody	15.3
Omezení záruk a vyhrazení práv	16.0
Doporučené rozložení na destičce	17.0
Přílohy	
Pokyny pro odběr vzorku tkáně pomocí nástroje Enfer na odběr tkáně	I
Možnosti manuálního a automatizovaného zpracování	II

Výrobce rychlých testů je povinen dodržovat systém kontroly kvality schválený Referenční laboratoří evropského společenství (CRL - Community Reference Laboratory), který zajistí neměnnou funkčnost testu. Výrobce je povinen poskytnout CRL testovací protokol. Nástroje na odběr vzorků a změny rychlého testu nebo testovacího protokolu (včetně odběru vzorků) musí být předem ohlášeny CRL a mohou být provedeny pouze v případě, že CRL zjistí, že změna nesnižuje senzitivitu, specifickou ani spolehlivost rychlého testu. Rozhodnutí musí být oznámeno příslušnému úřadu a národním referenčním laboratořím (NRL).

1.0 Všeobecné informace

Přenosné spongiformní encefalopatie (TSE - Transmissible Spongiform Encephalopathies) zahrnují celou skupinu degenerativních neurologických onemocnění. Existuje celá řada typů onemocnění TSE, například bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) (u skotu), klusavka (u ovcí), CJD (Creutzfeldt-Jacobova nemoc) (u lidí), GSS (Gerstmann-Straussler-Scheinkerův syndrom) (u lidí), kuru (u lidí), přenosná encefalopatie (u norků), chronická atrofie, spongiformní encefalopatie (u koček) a jiná onemocnění zjištěná u zvířat jako je los, nyala, kudu velký, přimorožec bejsa a tygří. V laboratorních podmínkách byly také zaznamenány případy přenosu BSE na myši a vepře. Tento přenos infekčního agens mezi živočišnými druhy vedl k podezření, že by mohlo dojít i k přenosu na člověka.

U vzorků odebraných z mrtvých infikovaných zvířat se objevuje charakteristická vakuolizace mozkové tkáně. Dochází totiž k destrukci nervových buněk a ukládání vrstvy zvláštních proteinových vláken, čímž se struktura mozku změní na houbovitou. Za příčinu TSE je považován infekční protein známý pod názvem prion. Prion je částice vyvolávající infekci, která podle předpokladu obsahuje pouze protein, ne však nukleovou kyselinu. Bylo zjištěno, že protein PrP^{Sc} je jediný protein, který zůstal po procesu purifikační selekce infekčního agens, a je jedinou známou složkou charakteristických proteinových vláken vyskytujících se v mozkové tkáni infikovaných zvířat.

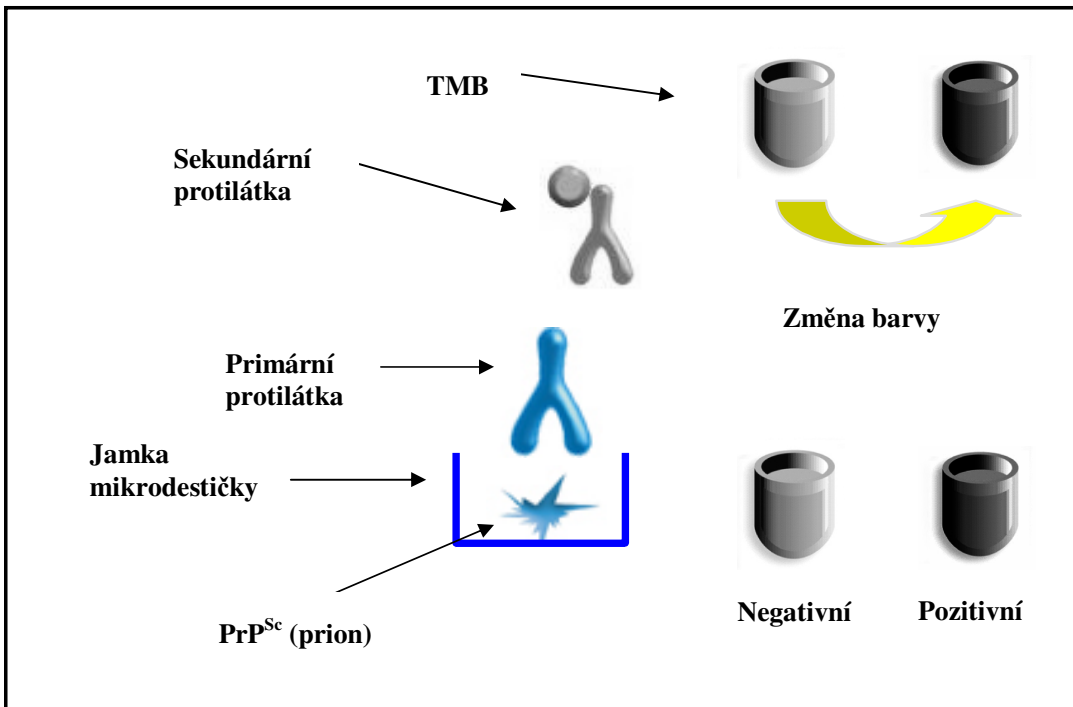
2.0 Použití

Enfer TSE, verze 3 je kvalitativní imunologická metoda pro detekci jedinečného identifikátoru přenosných spongiformních encefalopatií, proteinu prion PrP^{Sc}, v tkáni centrálního nervového systému dobytka. Souprava je určena pouze pro screening a výzkumné účely.

3.0 Princip postupu

Vzorek tkáně centrální nervové soustavy je po odběru převezen do laboratoře, kde se za stanovených podmínek zhomogenizuje a odstředí. Supernatant se inkubuje v připravených mikrojamkách: v průběhu této inkubace se veškerý PrP^{Sc} přítomný ve vzorku naváže na povrch jamek. Po promytí se do jamek přidá Enfer pufr 3. Po druhém promytí se do jamek přidají králičí protilátky anti-PrP (primární protilátky) a směs se nechá inkubovat. Je-li na povrchu jamky zachycen PrP^{Sc}, toto králičí antisérum se na něj specificky naváže. Po třetím promytí se do jamek přidá konjugát kozích anti-králičích protilátek třídy IgG s křenuvou peroxidázou (sekundární protilátky) a směs se nechá inkubovat. Pokud jsou na povrchu jamky přítomny primární protilátky, sekundární protilátky se naváží. Nenavázané sekundární protilátky se odmyjí a do jamek se přidá roztok obsahující 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) a peroxid vodíku. V jamkách s navázanými sekundárními protilátkami vznikne červené zbarvení, které se po zastavení reakce kyselinou sírovou změní na oranžové. Intenzita zbarvení se měří spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Množství sekundárních protilátek a intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci PrP^{Sc} ve vzorku.

Viz schéma níže:



4.0 Reagencie

Souprava Enfer TSE verze 3 (06L72) obsahuje:

Reagenční soupravu (06L72-06), soupravu protilátek (06L72-12), soupravu promývacího roztoku / pufru (06L72-32)

Doplňkové reagencie pro soupravu Enfer TSE verze 3

Doplňková souprava pufrů (06L72-50)

Obsah soupravy

Reagenční souprava 06L72-06. Obsahuje dostatek materiálu na 450 testů.

Reagenční soupravu skladujte při teplotě 2 – 8 °C. Viz požadavky na skladování jednotlivých složek soupravy.

	Složka soupravy	Funkce	Množství	Požadavky na skladování
1	Centrifugační destička	Centrifugační destička k oddělení pojivové tkáně.	16 destiček s 96 jamkami	2 – 30 °C v uzavřených sáčcích
2	Testovací destička Enfer	Testovací destička používaná pro vyšetření.	10 destiček s 96 jamkami	2 – 30 °C v uzavřeném sáčku s desikantem. Za stejných podmínek je nutné uskladnit i zbývající nepoužité jamky.
3	Promývací roztok Enfer 1	Odmyje nenavázaný vzorek.	1 lahev obsahující 700 g prášku	2 – 30 °C
4	Enfer pufr 3	Žlutý roztok, který zastaví reakci s proteinázou K a rozvinuje navázanou sekvenci PrP.	2 lahvičky obsahující 100 ml roztoku o pracovní koncentraci	2 – 8 °C, v pevně uzavřené lahvičce
5	Jamky s peptidovým indikátorem	Peptidem potažené jamky určené k ověření platnosti metody.	48 jamek (24 párů)	2 – 8 °C v uzavřeném sáčku s desikantem. Za stejných podmínek je nutné uskladnit i nepoužité jamky.
6	Roztok na ředění protilátek	Červený roztok na ředění primárních a sekundárních protilátek.	500 ml roztoku o pracovní koncentraci (obsahuje 0,05% Bronidox [®])	2 – 8 °C
7	Normální koží sérum (NGS)	Neředěné sérum. Zablokuje nespecifická vazebná místa.	3 lahvičky obsahující 0,3 ml séra	2 – 8 °C
8	Sekundární protilátky	Neředěný konjugát sekundárních protilátek (koží anti-králičí) s peroxidázou, který se váže na primární protilátky.	2 lahvičky obsahující 0,15 ml séra	2 – 8 °C
9	Koncentrát TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) se stabilizátory v růžovém roztoku, konvertovaný peroxidázou tak, aby v kombinaci s roztokem na ředění TMB došlo k viditelné změně barvy.	2 lahvičky obsahující 35 ml roztoku	2 – 8 °C
10	Roztok na ředění TMB	Bezbarvý roztok citrátu sodného a peroxidu vodíku. Používá se k ředění koncentrátu TMB.	2 lahvičky obsahující 35 ml roztoku	2 – 8 °C

Souprava protilátek 06L72-12. Obsahuje dostatek materiálu na 450 testů

	Složka soupravy	Funkce	Množství	Požadavky na skladování
1	Enfer pufr 2	Obsahuje proteinázu K v modrém roztoku, která primárně rozštěpí PrP ^c a zanechá PrP ^{Sc}	2 lahvičky po 15 ml roztoku o pracovní koncentraci	-25 °C až -15 °C. Lze max. 15x zmrazit a rozmrazit nebo skladovat 7 dní při teplotě 2 – 8 °C
2	Primární protilátky	Neředěné primární protilátky (králičí anti-PrP), které rozeznávají PrP ^c i PrP ^{Sc}	2 lahvičky obsahující 0,2 ml	-25 °C až -15 °C nebo skladovat 7 dní při teplotě 2 – 8 °C

Souprava promývacího roztoku / pufru 06L72-32. Obsahuje dostatek materiálu na přibližně 450 testů

	Složka soupravy	Funkce	Množství	Požadavky na skladování
1	Enfer pufr 1	Homogenizační pufr, který uvolňuje PrP ^c i PrP ^{Sc}	4,5 l roztoku o pracovní koncentraci	10 – 30 °C (pro minimalizaci precipitace a následné doby rozpouštění skladujte Enfer pufr 1 při teplotě 17 – 28 °C)
2	Promývací roztok Enfer 2	Odmyje nenasázané protilátky / reagenty	4 l 10x koncentrovaného roztoku (obsahuje 0,05% Bronidox [®])	10 – 30 °C

Doplňková souprava pufrů 06L72-50. Obsahuje dostatek materiálu na přibližně 900 testů, dodává se samostatně na vyžádání jako obecná spotřební reagenty.

	Složka soupravy	Funkce	Množství	Požadavky na skladování
1	Enfer pufr 1	Homogenizační pufr, který uvolňuje PrP ^c i PrP ^{Sc}	2 lahve po 4,5 l roztoku o pracovní koncentraci	10 – 30 °C (pro minimalizaci precipitace a následné doby rozpouštění skladujte Enfer pufr 1 při teplotě 17 – 28 °C)

5.0 Varování a bezpečnostní opatření

Reagence jsou určeny výlučně pro veterinární diagnostiku *in vitro* hovězích vzorků metodou A a metodou B. Viz Příloha II.

Pouze pro odborné použití.

Přečtěte si, prosím, bezpečnostní list od výrobce a označení výrobků, kde jsou uvedeny informace o potenciálně nebezpečných složkách.


Přípravu vzorku, přenesení vzorku na testovací destičku Enfer, odstranění krycí fólie a promývací krok 1 proveďte v laminárním boxu.

Dodržujte platná lokální bezpečnostní opatření týkající se TSE.


6.0 Ochrana zdraví a bezpečnost práce

S následujícími reagenциemi zacházejte opatrně. Pročtěte si informace na štítcích nádobek, upozorňující na případná rizika.

Enfer pufr 3 obsahuje guanidiniumchlorid, který je podle platných směrnic Evropského hospodářského společenství (EHS) klasifikován jako zdraví škodlivý (Xn). V následujícím přehledu jsou uvedena příslušná rizika (R) a bezpečnostní opatření (S).

Xn	R22	Zdraví škodlivý při požití
	R36/38	Dráždí oči a kůži
	S26	Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc
	S35	Tento materiál a jeho obal musí být zneškodněny bezpečným způsobem
	S36/37	Používejte vhodný ochranný oděv a ochranné rukavice
	S46	Při požití okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc a ukažte tento obal nebo označení

Enfer pufr 1 obsahuje methanol, který je podle platných směrnic Evropského hospodářského společenství (EHS) klasifikován jako toxický (T). V následujícím přehledu jsou uvedena příslušná rizika (R) a bezpečnostní opatření (S).

T	R10	Hořlavý
	R20/21/22	Zdraví škodlivý při vdechování, styku s kůží a při požití
	R39/23/24/25	Toxický: nebezpečí velmi vážných nevratných účinků při vdechování, styku s kůží a při požití
	S16	Uchovávejte mimo dosah zdrojů zapálení - Zákaz kouření
	S26	Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc
	S35	Tento materiál a jeho obal musí být zneškodněny bezpečným způsobem
S36/37/39	Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejový štít	
S45	V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte toto označení)	

Informace pro evropské zákazníky: Pro produkt, který není podle evropské směrnice 1999/45/EC klasifikován jako nebezpečný, jsou pro profesionální uživatele na vyžádání k dispozici bezpečnostní listy.

S těmito reagenциemi a testovanými vzorky se doporučuje zacházet v souladu s pravidly Správné laboratorní praxe.

Při dekontaminaci pracovních ploch a tekutého a pevného odpadního materiálu se doporučuje dodržovat směrnice Světové zdravotnické organizace (WHO - World Health Organization).

Vzorky tkáně z centrální nervové soustavy musíte likvidovat v souladu s platnými předpisy pro likvidaci nebezpečného materiálu.

Při práci s potenciálně infekčním biologickým materiálem vždy postupujte v souladu s pravidly Správné laboratorní praxe a dodržujte pravidla ochrany zdraví a bezpečnosti práce.

7.0 Odběr, přeprava a skladování vzorků

Viz oddíl Postup při přípravě vzorku.

Přeprava vzorků do laboratoře nevyžaduje žádné zvláštní podmínky; vzorky lze skladovat při teplotě 2 – 8 °C max. 24 hodin nebo delší dobu při teplotě -25 °C až -15 °C. Při vyšetření touto metodou se nesmí používat tkáně fixované formalínem.

Okamžitě po odběru vzorků musí být provedena formalinová fixace pro případnou konfirmační analýzu histopatologickou nebo imunohistochemickou metodou. Vzorky určené ke konfirmační analýze musí být přepravovány tak, aby nedošlo k jejich poškození. Za žádných okolností nesmí být zmrazeny před provedením formalinové fixace.

8.0 Metodická opatření

1. Neupravujte pracovní postup a nepoužívejte reagentie od jiných výrobců. Enfer pufr 1 dodávaný v této soupravě lze zaměnit za tutéž reagentii z jiných souprav Enfer TSE verze 3. Žádné jiné reagentie ze souprav s různými čísly šarže nelze zaměňovat. Při použití pipetovacího systému Tecan Genesis RSP[®]/Freedom EVO[®] musíte používat centrifugační destičky s hlubokými jamkami. Tyto centrifugační destičky jsou dodávány samostatně (01J91-10) a **mohou** být zaměňovány mezi šaržemi souprav.
2. Nepoužívejte expirované reagentie. Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentií, neboť může snížit životnost produktu a způsobit chybné výsledky.
3. Veškeré reagentie musí být připraveny v čistých skleněných nebo polypropylenových lahvíčkách. Dbejte, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci reagentií.
4. **KE SKLADOVÁNÍ A REKONSTITUCI MATERIÁLŮ SE NESMÍ POUŽÍVAT POLYSTYRENOVÉ NÁDOBKY.**
5. Zahájený test musí být dokončen bez přerušení.
6. Pro každý vzorek použijte samostatné disekční nástroje, nástroje pro přenos vzorků a jednorázové pipetovací špičky, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků.
7. Všechny reagentie musí být před použitím důkladně promíchány, nesmí obsahovat krystaly a musí být vytemperovány na pokojovou teplotu (18 – 30 °C). Ihned po použití všechny reagentie a nepoužité jamky znovu uskladněte při doporučené teplotě.
8. Nedotýkejte se okrajů jamek ani je nepotřísněte sekundárními protilátkami. Pro dávkování všech reagentií a pro přenos vzorku z homogenizačního sáčku nebo vzorkové zkumavky ETDS do centrifugační destičky se doporučuje použít reverzní pipetování; **není** však doporučováno pro přenos do testovací destičky Enfer. Pipetujte opatrně, abyste zabránili vzniku vzduchových bublin a rozstříku. Pro pipetování roztoku TMB vyčleňte samostatnou pipetu.
9. Pro skladování reagentií a vzorků nepoužívejte mrazicí zařízení s automatickým odmrazováním.
10. Během skladování či v průběhu inkubací chraňte reagentie před silným světlem a chlornanovými výpary.
11. Inkubátory zapněte minimálně 30 minut před použitím, aby se vytemperovaly na teplotu 34 ± 2 °C.
12. Ihned po vyjmutí destičky vraťte termální držák mikrodestiček zpět do inkubátoru, aby byla zajištěna jeho konstantní teplota.
13. Zajistěte, aby vzorky před vyšetřením nepřišly do kontaktu s čisticím nebo desinfekčním roztokem.
14. Alespoň 1x měsíčně je nutné provést verifikaci zařízení k měření mikrodestiček pomocí filtru s neutrální hustotou nebo pomocí ekvivalentní testovací destičky (postupujte podle pokynů výrobce). Netýká se kolorimetrických čtecích zařízení dodávaných a instalovaných společnostmi skupiny Enfer.
15. Zastavovací roztok neskladujte v mělkých vaničkách, ani jej po použití nevracejte zpět do zásobní lahve.

9.0 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy

9.1 Homogenizace

Manuální (metoda A)	nebo	Automatizované zpracování vzorku (metoda B)
Homogenizátor Interscience nebo Seward Stomacher® 80* Homogenizační sáčky (80 ml, s filtrem)		Systém ETDS VIII (EQP001-1)* Homogenizační příslušenství ETDS (obsahuje vzorkovou zkumavku ETDS, obrušovací část a jednorázové víčko) (01J90-20)* Homogenizační držák zkumavek (EQP002-1)*

9.2 Automatický přenos vzorků (volitelné)

- Tecan Genesis RSP/ Freedom EVO (01J91-01)*
- Centrifugační destička s hlubokými jamkami (01J91-10)*
- Pipetovací špička 200 µl (01J91-20)†
- Pipetovací špička 1 000 µl (01J91-30)†
- Vaničky na reagenty (01J90-40)*
- Prodloužené pipetovací špičky 1 000 µl (01J90-10)†

9.3 Přístrojové vybavení

Pro manuální zpracování destiček	nebo	Pro automatizované zpracování destiček
2 promývačky mikrodestiček Skatron Skanwasher® 300* Inkubátor / třepačka Thermo Labsystems iEMS* Zařízení k měření mikrodestiček schopné měřit při vlnové délce 450 nm s referenční vlnovou délkou 690 nm		en4lisa (08L22-01)* Lahev na reagenty en4lisa (08L22-50)* Špička en4lisa 300 µl (08L22-25)* Špička en4lisa 1 100 µl (08L22-30)*

Všechny přístroje musí být před použitím validovány.

9.4 Obecné

- Při testování vždy používejte vysoce kvalitní deionizovanou vodu, destilovanou vodu nebo vodu získanou reverzní osmózou
- Odstředivka na mikrodestičky (2 750 x g – 3 025 x g)
- Rotační míchačka, třepačka nebo magnetická míchačka pro přípravu promývacího roztoku Enfer 1 (volitelné)
- Krycí fólie na mikrodestičky (07K34-70)†
- Mikropipety a vícekanálové mikropipety odpovídajícího objemu a jednorázové špičky
- Dávkovač reagentů s nastavitelným objemem a lahev na Enfer pufr 1
- Laboratorní váha, přesnost na 2 desetinná místa
- Disekční čepele nebo nástroj Enfer na odběr tkáně (07K34-60)
- Lodičky na vážení (váženky)
- Špachtle
- Skleněné nádoby na ředění primárních a sekundárních protilátek
- Skleněné nebo polypropylenové nádoby na ředění ostatních reagentů
- Zastavovací roztok (0,5M kyselina sírová). Přidejte 3 ml koncentrované kyseliny sírové (*p.a.*) (18,0M) do cca 80 ml destilované, deionizované nebo reverzní osmózou získané vody a poté touto vodou doplňte na objem 100 ml.

* Toto vybavení od uvedených výrobců je k provedení vyšetření nezbytné. Podrobnosti o doporučených systémech, softwarových protokolech pro přístrojové vybavení a validačních postupech získáte od zástupce firmy Abbott.

† Doporučené. Lze používat jiné pipetovací špičky a krycí fólie na mikrodestičky, které však musí být validovány uživatelem.

10.0 Parametry pro nastavení přístrojů

Na doporučených přístrojích musí být nastaveny následující parametry. Jiné přístroje nebyly validovány.

10.1 Promývačka

K provedení tohoto testu jsou požadovány 2 samostatné promývačky.

Nastavení pro oba postupy:

Air Pressure (tlak vzduchu): 0,25 bar

Volume/Flow Rate, Adjustment Offset (poměr objem / průtok, seřízení kompenzace) >> σv : 1,00

Aspirate Position (odsávací pozice) - nastavení na zcela prázdnou jamku

Dispense Position (dávkovací pozice) - nastavení na vytvoření pozitivního menisku

Postup 1 (používá se s promývacím roztokem Enfer 1 a promývačkou 1. Toto promytí se musí provádět v laminárním boxu.)			Postup 2 (používá se s promývacím roztokem Enfer 2 a promývačkou 2)		
1	Odsátí	6 sekund	1	Odsátí	4 sekundy
2	Dávkování	300 μ l	2	Promytí	3 sekundy
3	Smáčení	5 sekund	3	Smáčení	5 sekund
4	Odsátí	4 sekundy	4	Odsátí	2 sekundy
5	Promytí	5 sekund	5	Promytí	3 sekundy
6	Smáčení	5 sekund	6	Smáčení	5 sekund
7	Odsátí	3 sekundy	7	Odsátí	2 sekundy
8	Promytí	2,5 sekundy	8	Promytí	3 sekundy
9	Smáčení	5 sekund	9	Smáčení	5 sekund
10	Odsátí	2 sekundy	10	Odsátí	2 sekundy
11	Promytí	2 sekundy	11	Promytí	2 sekundy
12	Smáčení	5 sekund	12	Smáčení	5 sekund
13	Odsátí	5 sekund	13	Odsátí	4 sekundy
14	Závěrečné promytí		14	Závěrečné promytí	

10.2 Třepačka / inkubátor: Shake Value (stupeň třepání): 3; teplota 34 °C. Interval a délku třepání nastavte na 24hodinový režim.

10.3 Systém ETDS VIII: nastaven na homogenizaci po dobu 10 sekund.

11.0 Příprava reagensí

Pro přípravu reagensí použijte vysoce kvalitní deionizovanou vodu, destilovanou vodu nebo vodu získanou reverzní osmózou. Před přípravou reagensí musí být všechny reagensie vytemperovány na teplotu 18 – 30 °C.

Složka soupravy	Postup	Skladování připravených reagensí
Promývací roztok Enfer 1	<ol style="list-style-type: none"> Promývací roztok Enfer 1 ve formě prášku rozpustíte ve vodě v poměru 50 g prášku na 1 l vody. Manuálně nebo pomocí příslušného zařízení míchejte do úplného rozpuštění. 	1 měsíc při teplotě 10 – 30 °C
Promývací roztok Enfer 2 o pracovní koncentraci	<ol style="list-style-type: none"> Před použitím se ujistěte, že pufr neobsahuje krystaly a že je důkladně promíchán. Jsou-li přítomny krystaly, doporučuje se inkubace při teplotě 30 °C, nesmí přesáhnout teplotu 37 °C. Koncentrovaný promývací roztok Enfer 2 zředíte 10x vodou. Důkladně promíchejte. <p>Např. pro přípravu 4 l promývacího roztoku Enfer 2 o pracovní koncentraci přidejte 400 ml koncentrovaného promývacího roztoku Enfer 2 do 3 600 ml vody.</p>	<p>2 týdny při teplotě 10 – 30 °C</p> <p>1 měsíc při teplotě 2 – 8 °C</p>
Enfer pufr 1	<ol style="list-style-type: none"> Před použitím se ujistěte, že pufr neobsahuje krystaly a že je důkladně promíchán. Jsou-li přítomny krystaly, nechte jej inkubovat při teplotě 17 – 28 °C. Pro usnadnění rozpouštění míchejte pufr míchadlem. 	Podle údajů na štítku
<p>Primární protilátky o pracovní koncentraci</p> <p>Vyžadují:</p> <ol style="list-style-type: none"> Roztok na ředění protilátek Primární protilátky Normální kozí sérum (NGS) 	<p>Připravte pouze objem potřebný k provedení daného počtu testů. Na 8 jamek je požadován 1 ml primárních protilátek o pracovní koncentraci. Na 1 destičku je třeba 12 ml primárních protilátek o pracovní koncentraci.</p> <ol style="list-style-type: none"> Primární protilátky zcela rozmrazte a promíchejte převrácením. Normální kozí sérum zředíte 500x roztokem na ředění protilátek. Primární protilátky zředíte 500x roztokem na ředění protilátek s NGS. Promíchejte převrácením lahvíček (minimálně 8x). <p>Např. do 12 ml roztoku na ředění protilátek přidejte 24 µl NGS a 24 µl primárních protilátek.</p> <p>Poznámky:</p> <p>Primární protilátky o pracovní koncentraci a nepoužité NGS znovu uskladněte při teplotě 2 – 8 °C a nepoužité primární protilátky při teplotě -25 °C až -15 °C, nebo při teplotě 2 – 8 °C.</p>	Skladujte při teplotě 2 – 8 °C a použijte do 8 hodin od přípravy.

Složka soupravy	Postup	Skladování připravených reagencií
<p>Sekundární protilátky o pracovní koncentraci</p> <p>Vyžadují:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Roztok na ředění protilátek 2. Sekundární protilátky 3. Normální kozí sérum (NGS) 	<p>Připravte pouze objem potřebný k provedení daného počtu testů. Na 8 jamek je požadován 1 ml sekundárních protilátek o pracovní koncentraci. Na 1 destičku je třeba 12 ml sekundárních protilátek o pracovní koncentraci.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. NGS zřed'te 500x roztokem na ředění protilátek 2. Sekundární protilátky zřed'te 2 000x roztokem na ředění protilátek s NGS 3. Promíchejte převrácením lahvíček (minimálně 8x) <p>Např. do 12 ml roztoku na ředění protilátek přidejte 24 µl NGS a 6 µl sekundárních protilátek.</p> <p>Poznámky: Nepoužitá sekundární protilátky, roztok na ředění protilátek a nepoužitá NGS znovu uskladněte při teplotě 2 – 8 °C.</p>	<p>Skladujte při teplotě 2 – 8 °C v temnu a použijte do 8 hodin od přípravy.</p>
<p>Roztok TMB</p>	<p>Připravte pouze objem potřebný k provedení daného počtu testů. Na 8 jamek je požadován 1 ml roztoku TMB. Na 1 destičku je třeba 12 ml roztoku TMB.</p> <p>K určitému objemu růžového koncentrovaného roztoku TMB v čisté skleněné nebo plastové nádobce přidejte stejný objem bezbarvého roztoku na ředění TMB. Roztok TMB lze také připravit přelitím celého obsahu lahvičky s roztokem na ředění TMB do lahvičky s koncentrovaným TMB.</p> <p>Poznámky:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) Je důležité, aby se reagentie smíchaly ve výše uvedeném pořadí a aby byly čisté všechny pipety a laboratorní sklo použité při přípravě roztoku TMB. b) Roztok TMB by měl být růžový: pokud je již před použitím červený, zlikvidujte jej a připravte čerstvý. c) V případě tvorby krystalů roztok TMB zlikvidujte. 	<p>Roztok TMB skladujte při teplotě 2 – 8 °C nebo 15 – 25 °C. Chraňte před slunečním světlem a použijte do 2 dnů od přípravy.</p>

12.0 Příprava kontrol z tkáně

Před homogenizací v Enfer pufru 1 musí být pozitivní a negativní kontrolní tkáně vytemperovány na pokojovou teplotu (18 – 30 °C).

12.1 Negativní kontrolní tkáň

Negativní kontrolní tkáň se doporučuje používat v případech, kdy se neprovádí rutinní screening vzorků, např. při evaluaci testu, kde může být většina vzorků pozitivní nebo zředěná pozitivní tkáň, při opakovaném testování počátečně reaktivních / suspektně pozitivních vzorků nebo pro výzkumné účely.

Připravte řez tkáně z CNS negativní na TSE stejným způsobem jako běžný vzorek a vyšetřete ji podle standardního imunoanalytického protokolu uvedeného níže. Vzorky tkáně z CNS negativní na TSE mohou být skladovány zmrazené při teplotě -25 °C až -15 °C. Rozmrazenou negativní kontrolní tkáň znovu nezmrazujte a použijte ji v den rozmrazení.

12.2 Pozitivní kontrolní tkáň

Při testu musí být použity jamky s peptidovým indikátorem dodávané v soupravě, lze však použít také pozitivní kontrolní tkáň.

Měla by být používána neporušená tkáň skladovaná při teplotě -15 °C nebo nižší. Je-li vyžadován homogenizační protokol, kontaktujte zástupce firmy Abbott.

Tkáň pozitivní na BSE je infekční a při manipulaci s ní musí být dodržována přísná bezpečnostní opatření.

13.0 Postup při přípravě vzorku

Odběr a testování vzorků se musí provádět v souladu s právním předpisem (ES) č. 999/2001, příloha X, kapitola C, který se ve věci odběru vzorků odvolává na nejnovější vydání Manuálu standardů pro diagnostické testy a vakcíny Mezinárodního úřadu pro epizootická onemocnění (Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines of the International Office of Epizootic Disease (OIE)), který uvádí: „Preferovaný vzorek pro imunoanalýzu by měl pocházet z oblasti obexu nebo místa co nejbližší k této oblasti, ale ne dále než 1,5 cm od obexu.“ Viz Obrázek 1 v Příloze 1.

Pro každý vzorek musíte použít novou čepel nebo nástroj Enfer na odběr tkáně, špachtli, lodičku na vážení (váženku) a homogenizační sáček nebo vzorkovou zkumavku ETDS, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků.

Vzorkovou zkumavku ETDS nebo homogenizační sáček označte identifikačním štítkem vzorku, přičemž štítek označuje na homogenizačním sáčku jeho přední stranu.

Před odběrem musí být vzorky vytemperovány na pokojovou teplotu (18 – 30 °C).

Pomocí čepele nebo nástroje Enfer na odběr tkáně odeberte vzorek tkáně z CNS obsahující šedou kůru mozkovou. Hmotnost vzorku by měla být přibližně 1,0 g; pro přípravu homogenátu nepoužívejte vzorky, jejichž hmotnost je nižší než 0,5 g a vyšší než 1,6 g. Vzorek je třeba zvážit.

Nástroj Enfer na odběr tkáně není vhodný pro vzorky ve stádiu autolýzy. Další informace o použití nástroje Enfer na odběr tkáně naleznete v Příloze 1.

Pokud je hmotnost vzorku nižší než 0,5 g, musíte odebrat nový vzorek tkáně.

Poznámka: Po odběru vzorku musí být pro konfirmační testování k dispozici celá hemisekce mozkového kmene s neporušenou oblastí obexu.

13.1 Metoda A - manuální homogenizace

1. Vzorek zvažte, vložte jej **před** filtr a vsuňte až na dno homogenizačního sáčku. Vzorek v sáčku stiskněte mezi palcem a ukazovákem, čímž napomůžete následné homogenizaci.
2. Do homogenizačního sáčku přidejte 12,5 ml Enfer pufru 1 na 1 g tkáně. Dávkovač pufru nesmí přijít do kontaktu se sáčkem, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků.
3. Homogenizujte vzorek po dobu 2 minut ve stomacheru[®] při rychlosti nastavené na „HIGH“ (vysoká). V homogenizátoru mohou být současně vždy max. dva sáčky. Ujistěte se, že byl vzorek tkáně rozmělněn a že za filtrem vidíte čirý, světle hnědý roztok. Nesprávné provedení tohoto kroku ovlivní výsledky metody. V případě potřeby zopakujte homogenizaci.
4. Po homogenizaci musíte vzorky nechat stát v homogenizačním sáčku po dobu 5 – 10 minut, aby se rozptýlily bubliny.

13.2 Metoda B – automatizovaná homogenizace

1. Vzorek zvažte a vložte jej do vnější části nesestavené vzorkové zkumavky ETDS. Do zkumavky vložte obrušovací část tak, aby byl vzorek vložen mezi obrušovacími destičkami, a bezpečně ji uzavřete jednorázovým víčkem.
2. Vzorkové zkumavky ETDS vložte do homogenizačního držáku a zkontrolujte jejich usazení. Do každé vzorkové zkumavky ETDS přidejte 12,5 ml Enfer pufru 1 na 1 g tkáně. Homogenizační držák vložte do systému ETDS VIII a homogenizujte po dobu 10 sekund.
3. Po homogenizaci musíte vzorky nechat stát ve vzorkové zkumavce ETDS po dobu 5 – 10 minut, aby se rozptýlily bubliny.

Pro screeningové účely: Zhomogenizované vzorky neskladujte, použijte je do 3 hodin od přípravy.

Pouze pro konfirmační testování (pokud jej umožňují lokální předpisy): Homogenáty musí být skladovány při pokojové teplotě a mohou být znovu testovány maximálně do 7 dní od přípravy. Při interpretaci těchto výsledků postupujte velmi opatrně, neboť je známo, že postupem času dochází k poklesu signálu a slabě pozitivní výsledky se ve screeningové laboratoři mohou jevit jako negativní. Při opakovaném testování je třeba použít nově odebranou tkáň, která bude analyzována metodou ELISA a Western Blot a/nebo metodou IHC.

14.0 Postup při imunoanalýze – (viz také Příloha 2)

Před zahájením testu si pozorně přečtěte oddíl „Metodická opatření“.

*Před zahájením testu musí být všechny reagentie, včetně promývacích roztoků, testovacích destiček Enfer, jamek s peptidovým indikátorem a centrifugačních destiček, vytemperovány na pokojovou teplotu (18 – 30 °C). Před zahájením testu musí být Enfer pufr 1 a koncentrát promývacího roztoku Enfer 2 vytemperovány na pokojovou teplotu (18 – 30 °C) a **nesmí obsahovat krystaly**. Jsou-li přítomny krystaly, Enfer pufr 1 nechte inkubovat při teplotě 17 – 28 °C a pro koncentrovaný promývací roztok Enfer 2 se doporučuje inkubace při teplotě 30 °C. Pro usnadnění rozpouštění míchejte pufr míchadlem. Důrazně se doporučuje skladovat tyto pufrы v průhledných nádobách, aby byly případně krystaly snadno viditelné.*

1) Manuální pipetování

Do centrifugační destičky nadávkujte 180 µl Enfer pufru 1 v kvadruplikátu (jamky pro slepou kontrolu) 180 µl jednotlivých vzorků v duplikátu a 180 µl kontrol (jsou-li testovány) v duplikátu. Musí být používána centrifugační destička dodávaná v soupravě. Na pozice A1 a A2 nedávkujte žádné vzorky ani kontroly.

Vždy pipetujte zpoza filtru v homogenizačním sáčku. Zvláště dbejte, aby nedošlo ke kontaminaci povrchu pipety materiálem z homogenizačního sáčku. Zajistěte, aby byla do sáčku zasunuta pouze jednorázová pipetovací špička.

nebo

1*) Automatické pipetování

Do centrifugační destičky s hlubokými jamkami nadávkujte 350 µl Enfer pufru 1 v kvadruplikátu (jamky pro slepou kontrolu), 350 µl jednotlivých vzorků v duplikátu a 350 µl kontrol (jsou-li testovány) v duplikátu. Na pozice A1 a A2 nedávkujte žádné vzorky ani kontroly.

Používáte-li vzorkovou zkumavku ETDS, pipetujte z vnitřku obrušovací části. Zajistěte, aby byla do zkumavky zasunuta pouze jednorázová pipetovací špička.

- 2) Přikryjte destičku krycí fólií.
- 3) Odstřed'ujte destičku při RCF (relativní odstředivá síla) 2 750 x g po dobu 5 minut při teplotě 18 – 30 °C.
- 4*) Do všech jamek testovací destičky Enfer přidejte 20 µl Enfer pufru 2. Je velice důležité tento pufr napipetovat na úplné dno jamek; má totiž tendenci ulpívat na stěnách jamek a tomuto efektu musíte předejít.
- 5*) Odstraňte z destičky krycí fólii a na příslušné pozice testovací destičky Enfer, které již obsahují Enfer pufr 2, převed'te 100 µl jednotlivých odstředěných vzorků, Enfer pufru 1 (slepá kontrola) a kontrolních tkání. S centrifugační destičkou zacházejte velmi opatrně, aby nedošlo k narušení peletu, a dbejte, aby do jamek testovací destičky Enfer nebyly přeneseny žádné pevné částice.
- 6) Přikryjte destičku krycí fólií.
- 7) Inkubujte a třepejte destičku 50 minut při teplotě 34 °C.
- 8) Odstraňte z destičky krycí fólii a destičku promyjte promývacím roztokem Enfer 1 podle promývacího postupu 1.
- 9) Obrá'te destičku dnem vzhůru a poklepejte s ní o savý papír, aby se odstranila veškerá tekutina.
- 10) Do všech jamek nadávkujte 100 µl Enfer pufru 3.
- 11) Inkubujte a třepejte destičku 15 minut při teplotě 34 °C.

- 12) Destičku promyjte promývacím roztokem Enfer 2 podle promývacího postupu 2.
- 13) Obráťte destičku dnem vzhůru a poklepejte s ní o savý papír, aby se odstranila veškerá tekutina.
- 14) Z testovací destičky Enfer vyjměte pozice A1 a A2 a nahraďte je jamkami s peptidovým indikátorem.
Je velmi důležité zajistit správné vložení jamek.
Ujistěte se, že horní okraj jamek je v rovině s okraji všech ostatních jamek v destičce.
- 15) Do každé jamky nadávkujte 100 µl primárních protilátek o pracovní koncentraci.
- 16) Inkubujte a třepejte destičku 30 minut při teplotě 34 °C.
- 17) Destičku promyjte promývacím roztokem Enfer 2 podle promývacího postupu 2.
- 18) Obráťte destičku dnem vzhůru a poklepejte s ní o savý papír, aby se odstranila veškerá tekutina.
- 19) Nadávkujte 100 µl sekundárních protilátek o pracovní koncentraci.
- 20) Inkubujte a třepejte destičku 30 minut při teplotě 34 °C.
- 21) Destičku promyjte promývacím roztokem Enfer 2 podle promývacího postupu 2.
- 22) Obráťte destičku dnem vzhůru a poklepejte s ní o savý papír, aby se odstranila veškerá tekutina.
- 23) Do každé jamky nadávkujte 100 µl roztoku TMB.
- 24) Inkubujte a třepejte destičku 30 minut při teplotě 34 °C.
- 25) Do každé jamky nadávkujte 100 µl zastavovacího roztoku.
- 26) Do 30 minut od přidání zastavovacího roztoku destičku třepejte 10 sekund na třepače a poté změřte absorbanci při vlnové délce 450 nm za použití referenční vlnové délky 690 nm. Přístroj vynulujte na vzduch (měření bez vložené destičky).

* Pro tyto kroky lze použít automatizovaný pipetovací systém Tecan Genesis RSP®/Freedom EVO®. Validované protokoly vám poskytne zástupce firmy Abbott.

Zpracování testovacích destiček lze automatizovat pomocí přístroje en4lisa následujícím způsobem:

- i) Proveďte imunoanalýzu až po krok 3 (včetně)
- ii) Přidejte jamky s peptidovým indikátorem (krok 14)
- iii) Odstraňte z centrifugační destičky krycí fólii a přeneste 100 µl každého odstředěného vzorku, Enfer pufru 1 (slepá kontrola) a kontrol z tkáně na odpovídající pozice v testovací destičce Enfer. S centrifugační destičkou zacházejte velmi opatrně, aby nedošlo k narušení peletu, a dbejte, aby do testovací destičky Enfer nebyly přeneseny žádné pevné částice.
- iv) Testovací destičku Enfer vložte do en4lisa.
- v) En4lisa přidá Enfer pufr 2 (krok 4) a bude pokračovat v imunoanalýze od kroku 7.

Validované protokoly vám poskytne zástupce firmy Abbott.

Přidání reagensů lze potvrdit pomocí přístroje k měření mikrodestiček nebo přístroje en4lisa následujícím způsobem. Enfer pufr 2 změřte při vlnové délce 620 nm za použití referenční vlnové délky 690 nm, Enfer pufr 3 změřte při vlnové délce 405 nm za použití referenční vlnové délky 690 nm, roztok na ředění protilátek změřte při vlnové délce 492 nm za použití referenční vlnové délky 690 nm a roztok TMB změřte při vlnové délce 492 nm.

Pro zajištění uspokojivé funkčnosti musí být teplota inkubace 34 ± 2 °C.

Přidaný objem Enfer pufru 1 musí být přesný s odchylkou max. ± 5 % od vypočtených hodnot. Všechny další napipetované objemy musí být přesné s odchylkou max. ± 10 % od požadované hodnoty. Následuje seznam požadovaných objemů, v závorkách je uvedeno povolené rozmezí: 100 μ l (90 – 110 μ l), 20 μ l (18 – 22 μ l) a 350 μ l (315 – 385 μ l). Doba inkubace nesmí být zkracována a musí být přesná s odchylkou max. + 10 %. Rychlost odstředování musí být nastavená na rozmezí 2 750 – 3 025 x g a doba odstředování na 5 – 10 minut.

15.0 Výsledky

15.1 Validace funkčnosti testu

Při výpočtu a interpretaci výsledků testu musí být každá destička vyhodnocena samostatně. Pro výpočet výsledků a jejich interpretaci lze použít schválený software. Před interpretací výsledků vyšetření vzorků je nutné validovat výsledky kontrol.

Slepá kontrola (blank)

Hodnota slepé kontroly se vypočte jako medián hodnot absorbance čtyř opakovaných měření s Enfer pufrem 1 (slepá kontrola). Hodnoty se vzestupně seřadí a medián je aritmetický průměr dvou prostředních hodnot.

Medián hodnot absorbancí opakovaných měření slepé kontroly (blank) musí být nižší než 0,2.

Hodnota cut-off

Hodnotu cut-off vypočtete přičtením hodnoty 0,3 k hodnotě slepé kontroly.

Jamky s peptidovým indikátorem

Vypočtete průměrnou hodnotu absorbance z opakovaných měření jamek s peptidovým indikátorem minus hodnota slepé kontroly.

Průměrná hodnota absorbance jamek s peptidovým indikátorem minus hodnota slepé kontroly musí být vyšší než 0,8.

Negativní kontrolní tkáň

Při zpracování negativní kontroly se vypočte průměrná hodnota absorbance opakovaných měření minus hodnota slepé kontroly. Výsledná hodnota musí být nižší nebo rovna 0,3.

Přijatelné rozmezí výsledků kontrol:

Pokud nejsou splněna výše uvedená kritéria, je test neplatný a je nutné jej zopakovat.

15.2 Interpretace výsledků

Nereaktivní výsledky

Vzorky s hodnotami absorbance nižšími nebo rovnými hodnotě cut-off jsou považovány za nereaktivní metodou Enfer TSE verze 3.

Reaktivní výsledky

Vzorky s hodnotami absorbance vyššími než hodnota cut-off v jedné nebo obou jamkách jsou považovány za počátečně reaktivní (viz oddíl Omezení metody). Tyto vzorky musí být znovu vyšetřeny v duplikátu, počínaje odběrem tkáně. Vzorek je považován za pozitivní, pokud je signál při opakovaném měření v jedné nebo obou jamkách vyšší než hodnota cut-off.

Vzorky příslušné tkáně vykazující v testu pozitivní výsledky je nutné odeslat ke confirmaci do lokální NRL.

15.3 Omezení metody

Enfer Scientific splňuje požadavky systému managementu jakosti dle ISO9001.

Tento test, jako každý biologický test, může v závislosti na lokálních podmínkách vykazovat falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky. Při interpretaci testu musíte brát v úvahu všechny dostupné klinické, historické a epidemiologické údaje týkající se testovaných zvířat. V určitých případech je nutné provést další konfirmační testování.

Negativní výsledek v kvalitativním imunologickém testu nevyklučuje možnost infekce prionovým proteinem PrP^{Sc}.

Jakákoli změna nebo modifikace tohoto postupu by mohla ovlivnit výsledky testu.

Výsledky získané pro materiál pozitivní na TSE se mohou lišit, jelikož výskyt prionu v tkáni je proměnlivý a nelze zaručit stabilitu skladované tkáně.

Za interpretaci testu a následná rozhodnutí o opatřeních v oblasti živočišné výroby zodpovídá uživatel, ošetřující veterinář a příslušné instituce nebo orgány veterinárního dohledu. Společnost Enfer Scientific nezodpovídá za případné ztráty či škody vyplývající z interpretace výsledků testu.

16.0 Omezení záruk a vyhrazení práv

Dojde-li k odchylkám od předepsaných instrukcí, společnost Enfer Scientific neposkytuje žádnou záruku, výslovně uvedenou i předpokládanou, na provedení testu Enfer TSE verze 3, na stabilitu a skladování soupravy Enfer a použitý pracovní postup. Enfer Scientific se zároveň zříká odpovědnosti za obchodovatelnost a použitelnost poté, kdy produkt opustí společnost Enfer Scientific. Enfer Scientific v žádném případě neodpovídá za přímé ani následné škody.

17.0 Doporučené rozložení na destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	P	V6	V6	V14	V14	V22	V22	V30	V30	V38	V38
B	S	S	V7	V7	V15	V15	V23	V23	V31	V31	V39	V39
C	S	S	V8	V8	V16	V16	V24	V24	V32	V32	V40	V40
D	V1	V1	V9	V9	V17	V17	V25	V25	V33	V33	V41	V41
E	V2	V2	V10	V10	V18	V18	V26	V26	V34	V34	V42	V42
F	V3	V3	V11	V11	V19	V19	V27	V27	V35	V35	V43	V43
G	V4	V4	V12	V12	V20	V20	V28	V28	V36	V36	V44	V44
H	V5	V5	V13	V13	V21	V21	V29	V29	V37	V37	V45	V45

P = Jamky s peptidovým indikátorem

S = Enfer pufr 1 (slepá kontrola)

V = Vzorky testované v duplikátu

Bronidox[®], Stomacher[®], Skanwasher[®], Tecan Freedom EVO[®] a Tecan Genesis RSP[®] nejsou obchodní značky firmy Enfer.

C046L72CZ

Listopad 2010

Příloha I

Pokyny pro odběr vzorku tkáně pomocí nástroje Enfer na odběr tkáně (07K34-60)

Požadovaný materiál:

Nástroj Enfer na odběr tkáně (dále uvedený jako „nástroj na odběr tkáně“)

Vzorky tkáně

Jednorázové lodičky na vážení (váženky) nebo misky na vzorky

Jednorázové stěrky nebo špachtle

Vzorkové zkumavky ETDS nebo homogenizační sáčky

Poznámka: Tuto metodu smí provádět pouze zkušený laborant

Postup:

1. Pro každý vzorek musíte použít nový nástroj na odběr tkáně, lodičku na vážení (váženku) a špachtli, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků.
2. Vzorek položte na misku a vyberte oblast, z níž chcete odebrat vzorek. Jedná se o jednu stranu oblasti obexu (viz Obrázek 1).
3. Nástroj na odběr tkáně nastavte nad požadovanou oblast řeznou plochou směrem ke tkáni.
4. Přidržte tkáň jednorázovou stěrkou nebo špachtlí, aby zůstala na místě. Nástroj na odběr tkáně přitlačte na tkáň a zároveň jím otáčejte ve směru a proti směru hodinových ručiček přibližně o čtvrtinu otáčky (viz Obrázek 2).
5. Nástroj odebere vzorek tkáně ve tvaru válce (viz Obrázek 3). Tkáň zůstane uvnitř nástroje na odběr tkáně.
6. Pro přenos tkáně do vzorkové zkumavky ETDS poklepejte okrajem nástroje na odběr tkáně o okraj vzorkové zkumavky ETDS. Tento postup je pro uvolnění tkáně z nástroje většinou dostatečný. Jestliže nedojde k uvolnění tkáně, stěrkou zatlačte na tkáň přes otvory na straně nástroje na odběr tkáně (Poznámka: Před přidáním vzorku tárujte váhu prázdnou vnější zkumavkou).

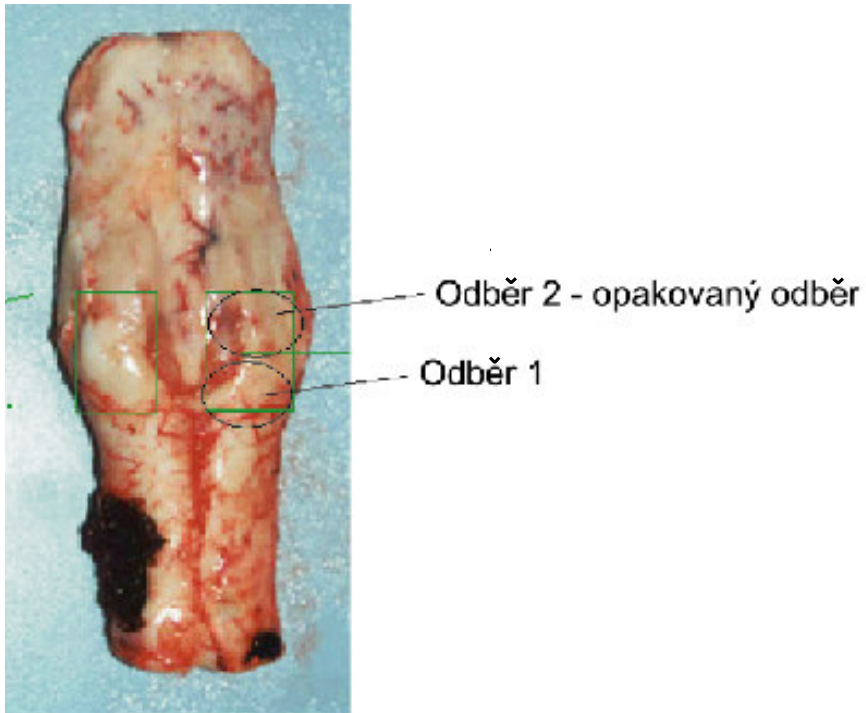
NEBO

Pro přenos tkáně do homogenizačního sáčku vsuňte konec nástroje na odběr tkáně obsahující tkáň dovnitř homogenizačního sáčku a zatlačte stěrkou na tkáň přes otvory na straně odběrového nástroje, aby se tkáň uvolnila (Poznámka: Před přidáním vzorku tárujte váhu pomocí prázdného sáčku). Před dalším postupem se ujistěte, že vzorek byl vložen až na dno homogenizačního sáčku.

Poznámky:

- 1) Po odběru vzorku musí být pro konfirmační testování k dispozici celá hemisekce mozkového kmene s neporušenou oblastí obexu.
- 2) Nástroj Enfer na odběr tkáně není vhodný pro vzorky ve stádiu autolýzy.

Obrázek 1



Obrázek 2



Obrázek 3



Příloha II

Možnosti manuálního a automatizovaného zpracování

Následující tabulka zobrazuje možné kombinace postupů při testování za použití různých stupňů automatizace.

		Možnost					
		1	2	3	4	5	6
Krok v testu	Odběr vzorku	Nástroj Enfer na odběr tkáně nebo čepel					
	Homogenizace	Seward Stomacher [®] nebo homogenizátor Interscience (metoda A)		Systém ETDS VIII (metoda B)			
	Přenos homogenátu do centrifugační destičky	manuální	manuální	manuální	Tecan Genesis RSP [®] nebo Freedom EVO [®]	manuální	Tecan Genesis RSP [®] nebo Freedom EVO [®]
	Přenos odstředěného homogenátu do testovací destičky						
	Přidání Enfer pufru 2		en4lisa		manuální	en4lisa	en4lisa
	Zpracování testovací destičky						
Schváleno pro	Pouze skot			Pouze skot			