

TeSeE™ Sheep/Goat

PURIFICATION KIT -  192

 3551165

DETECTION KIT -  192

 3551166

REAGENT KITS FOR *IN VITRO* PURIFICATION AND DETECTION OF PrP^{Sc}
IN OVINE AND CAPRINE

Within the European Union, this test is approved as rapid test for the monitoring of TSE in ovine and caprine animals which is set up in accordance with Annex X, chapter C of the Regulation (EC) No 999/2001 modified by the Commission Regulation (EC) No 253/2006 of 14 february 2006.



16006891 - 2018/09

BIO-RAD

TABLE OF CONTENTS

1 - GENERAL INFORMATION

2 - TeSeE™ Sheep/Goat PURIFICATION KIT

- 2 - 1 Principle of purification of PrP^{Sc}
- 2 - 2 Samples
- 2 - 3 Composition of the TeSeE™ Sheep/Goat Purification Kit
- 2 - 4 Preparation of reagents
- 2 - 5 Storage, shelf-life
- 2 - 6 Procedure
- 2 - 7 Limits of the purification protocol

3 - TeSeE™ Sheep/Goat DETECTION KIT

- 3 - 1 Principle of PrP^{Sc} detection by EIA
- 3 - 2 Samples
- 3 - 3 Composition of the TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit
- 3 - 4 Preparation of reagents
- 3 - 5 Storage, shelf-life
- 3 - 6 Preparation of samples for PrP^{Sc} detection by EIA
- 3 - 7 Procedure
- 3 - 8 Calculation and interpretation of the results
- 3 - 9 Limits of the test

4 - MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

5 - PRECAUTIONS

6 - HYGIENE AND SAFETY INSTRUCTIONS

7 - REFERENCES

1 - GENERAL INFORMATION

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE's) are slow degenerative diseases of the central nervous system induced by unconventional transmissible agents (UTAs) routinely called prions.

TSEs are generally classified according to their etiology, as iatrogenic, familial and/or sporadic. Sheep scrapie has been reported in the 18th century and transmission demonstrated (including to goats). However, the modes of contamination within flocks remain obscure. TSEs were also described in deer and elk (chronic wasting disease, CWD) and in cow (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE).

Humans are also susceptible to certain forms of TSE. There is compelling evidence supporting that Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) has passed from cattle to human, probably through consumption of contaminated meat.

In addition to this variant form of Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD), other forms in humans include the Kuru and the iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease.

Pure hereditary forms (such as the Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome [GSS]) and/or sporadic CJD have been demonstrated in humans, but their incidences are low. We do not know if similar sporadic TSE cases exist in animals.

The main characteristics of these diseases are:

- a slowly progressive but always fatal course,
- absence of conventional infectious agents,
- progressive accumulation in the central nervous system of an abnormal isoform of the natural prion protein (PrP) called PrP^{Sc}. This isoform is characterized by particular biochemical properties and especially by an increased resistance to proteases.

The strikingly long incubation period that precedes the neurological symptoms suggests that important events of TSE pathogenesis might take place in extra nervous sites and especially in peripheral lymphoid tissues.

In spite of many unknown and/or uncertainties, the detection of abnormal PrP^{Sc} is now established as the method, to confirm TSE diagnosis. This detection is mainly achieved from post mortal collected nervous tissues.

Abnormal PrP^{Sc} has also been detected in a number of lymphoid tissues and organs: in the germinal centres of spleen, lymph nodes, tonsils, and/or mucosa-associated lymphoid tissue (but at the research area), in animal models or in scrapie sheep, CWD deer and elks and vCJD patients.

Reagents designed by the "Commissariat à l'Énergie Atomique - CEA" (French Atomic Energy Commission), developed, produced and marketed by Bio-Rad, allow PrP^{Sc} detection on samples from Central Nervous System (CNS) and peripheral tissues taken from tested animals.

This determination comprises the following reaction steps:

- **Purification of PrP^{Sc} (192 tests)**

Step performed with the following reagents and accessories:

- TeSeE™ Sheep/Goat Purification Kit Ref.: 3551165
- Calibration syringe and needle (x 200) Ref.: 3551174
- or TSE Calibrat Syringe + Needle VITA (x 200) Ref.: 12007909
- Medium beads Ref.: 3551171

- **PrP^{Sc} detection (192 tests)**

Step performed with the following reagents:

- TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit Ref.: 3551166

TeSeE™ Sheep/Goat PURIFICATION KIT

Σ 192

REF 3551165

REAGENTS FOR *IN VITRO* PURIFICATION OF PrP^{Sc} IN OVINE
AND CAPRINE

BIO-RAD

2-1 PRINCIPLE OF PURIFICATION OF PrP^{Sc}

The reagents of the TeSeE™ Sheep/Goat Purification Kit allow purification, concentration and solubilisation of PrP^{Sc} from samples of tissues obtained from infected ovine and caprine.

Processing of the samples comprises the following steps:

- Sample homogenisation
- Digestion of PrP^c with Proteinase K
- Purification and concentration of PrP^{Sc}
- Solubilisation of PrP^{Sc} for immunoenzymatic assay using the reagents of the TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit.

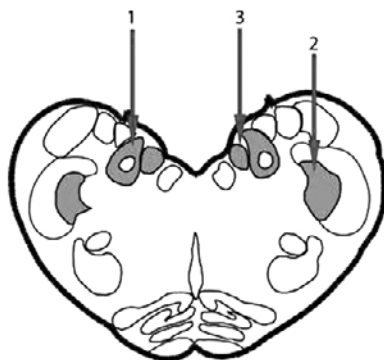
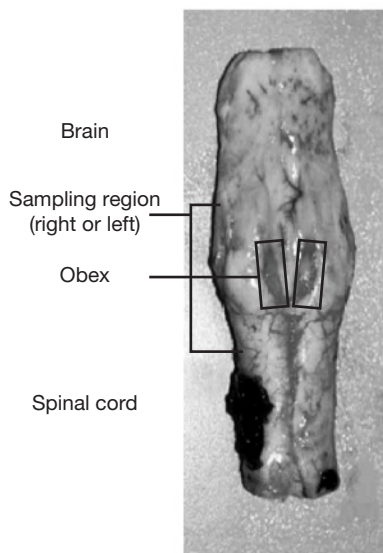
2-2 SAMPLES

Purification of PrP^{Sc} is performed on samples from Central Nervous System (CNS) or peripheral tissues (lymphoid nodes, spleen,...). Since distribution of PrP^{Sc} is heterogeneous in central nervous system, obex area from brainstem must be preferably sampled for optimal detection. The sheep and goat extraction tool (Ref.: 3551184) can be used to collect both brainstem and cerebellum.

Samples are cut and weighed individually.

Note: other tissues (tonsils, ileum, eyelid...) can be used for research purposes only.

Samples are stored at +2°C to +8°C when purification is performed within 24 hours or can be stored frozen for several months. They can only be submitted to 3 freezing/thawing cycles. If these samples must be transported, they should be packaged in accordance with current local regulations.



Cross section of the brainstem at the level of the obex identifying the key target sites for diagnosis by histopathology and immunohistochemistry in BSE (nucleus of the solitary tract [1] and the nucleus of the trigeminal tract V [2]) and scrapie (dorsal nucleus of the vagus) [3]).

(Source: OIE - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals)

2-3 COMPOSITION OF THE TeSeE™ Sheep/Goat PURIFICATION KIT

LABELLING	TYPE OF REAGENTS	PRESENTATION	STORAGE
Grinding Tube	Grinding tube containing ceramic beads in a buffer solution Preservative: ProClin™ 300 (0.1%)	2 bags (2 x 96 tubes)	+2°C to +25°C
Reagent 1	Denaturing solution	1 bottle (55 ml)	+2°C to +8°C
Reagent 2	Clarifying solution Colouring: bromophenol blue	1 bottle (55 ml)	+2°C to +25°C
Reagent 3	Resolving buffer Colouring: malachite green	1 bottle (7 ml)	+2°C to +25°C
PK	Proteinase K Colouring: phenol red	1 bottle (0.5 ml)	+2°C to +8°C

Reagent 2 and grinding tubes are generic components. They can be used with all batches of the TeSeE™ sheep/goat Purification Kits.

2-4 PREPARATION OF REAGENTS

All reagents of the TeSeE™ Sheep/Goat Purification Kit except proteinase K are ready to use. Reagent 1 is the dilution buffer for proteinase K.

The solution must be prepared in the following way (4 µl of proteinase K in 1 ml of reagent 1):

NUMBER OF SAMPLES	REAGENT 1	PROTEINASE K
2	1 ml	4 µl
10	3 ml	12 µl
18	5 ml	20 µl
26	7 ml	28 µl
34	9 ml	36 µl
42	11 ml	44 µl
50	13 ml	52 µl
58	15 ml	60 µl
66	17 ml	68 µl
74	19 ml	76 µl
82	21 ml	84 µl
90	23 ml	92 µl

The volumes must be pipetted exactly. The tip containing the PK has to be correctly rinsed by successive aspiration/distribution cycles in reagent 1.

After reconstitution, homogenize the solution by successive inversions until you obtain a red homogeneous solution.

2-5 STORAGE, SHELF-LIFE

The reagents of the TeSeE™ Sheep/Goat kit (Ref.: 3551165) are stored at +2°C to +25°C except for reagent 1 and the proteinase K which must be stored at +2°C to +8°C. All reagents are stable at those temperatures until the expiry date indicated on the kit (before and after opening of the bottles).

After dilution, the reconstituted proteinase K solution when stored at room temperature (+18°C to +30°C) must be used within 6 hours.

2-6 PROCEDURE

For the semi-automatic processing of the purification protocol, please refer to the TeSeE™ NSP operator's manual.

Procedure for manual processing:

1. Sampling:

- For obex samples, take a mass of 350 mg $\pm$ 40 mg of nervous tissue.
- For peripheral tissues (tonsil, ileum, lymphoid nodes, eyelid, spleen,...), place a medium bead (Ref.: 3551171) in the grinding tube, before adding the sample. Take a mass of 200 mg $\pm$ 20 mg of tissue (if lymphoid node is used take from 2-3 different areas of the outer cortex). Cut the tissue in 2-3 smaller pieces before depositing it in the grinding tube.

Close the tube firmly and proceed to the grinding step in the homogenizer.

2. Sample grinding:

Note: When a medium bead is to be used for the sample grinding, the TeSeE™ Precess 24™ cannot be used, as leakages are likely to occur.

Place the tubes in the crown of the homogeniser (Ribolyser® or TeSeE™ Precess 24™ or TeSeE™ Precess 48™ systems) using the instrument parameters shown in the table below:

	Obex Tissue		Lymphoid Nodes	
	Ribolyser®	TeSeE™ Precess 48™ TeSeE™ Precess 24™	Ribolyser®	TeSeE™ Precess 48™
Time (sec.)	45		45	
Speed	6.5		6.5	
Number of cycles	2	N/A	2	N/A
Program	-	Program 1	-	Program 2

If grinding is insufficient, another 1 or 2 agitation cycles can be performed. However, the temperature of the tube must return to room temperature (18-30°C) between each cycle. This can be accomplished by submersing the tubes in crushed ice.

Allow 5 minutes between each agitation cycle to let the instrument cool down.

3. Sample calibration:

Remove the grinding tubes from the homogenizer, resuspend the homogenate by inverting before opening the tubes and aspirate 250 μ l with the calibration syringe (Ref.: 3551174 or Ref.: 12007909) taking care to immerse the needle below the level of ceramic beads to avoid sampling tissue fragments.

Transfer each 250 μ l sample into a 2 ml Eppendorf micro test-tube.

Note:

At this stage, both grinding tubes after homogenisation and micro test-tubes after sample calibration can also be stored, closed:

- at room temperature (+18°C to +30°C) for 8 hours.
- at +2°C to +8°C (in ice or in the refrigerator) for 15 hours.
- at -20°C for 1 year. Frozen samples must be thawed at room temperature (+18°C to +30°C). Samples can be submitted to a maximum of 3 freezing/thawing cycles. Samples must always be homogenized by inverting before use.

4. PK treatment:

Distribute 250 µl ($\pm$ 10%) of reconstituted proteinase K solution (see paragraph 2.4) into each micro test-tube, homogenize and incubate at 37°C $\pm$ 2°C in a heating block incubator for 10 $\pm$ 1 minute.

Perform series of several micro test-tubes and adapt the number of micro test-tubes to the equipment used (automatic pipette/racks) to avoid exceeding intervals of 5 minutes for distribution of reconstituted proteinase K between the first and last micro test-tube. Do not exceed 2 minutes between the homogenization and the incubation at 37°C. Mix immediately after adding proteinase K.

Homogenization of closed tubes is performed by inverting (10 times).

5. Precipitation of PrP^{Sc} with reagent 2:

Remove the micro test-tubes from the heating block incubator. Open them and distribute 250 µl ($\pm$ 10%) of reagent 2 into each micro test-tube. Homogenize until a homogeneous blue colour is obtained. Observe the same order of distribution as described in step 4.

Do not exceed intervals of 2 minutes between the exit of the incubator and the mixing homogenization.

Homogenization is performed under the same conditions as in step 4.

6. Concentration of the PrP^{Sc} (centrifugation):

Within 30 minutes after reagent 2 distribution and mixing, centrifuge (drum rotor) the micro test-tubes for 5 minutes at 20.000 g or for 7 minutes at 15.000 g at 20°C.

7. Sample clarifying:

Discard the supernatant by inverting over a waste container when the centrifugation is over.

Dry the micro test-tubes by inverting onto absorbent paper for 5 minutes.

Distribute 25 µl ($\pm$ 10%) of reagent 3 into each micro test-tube.

Do not exceed an interval of 10 minutes between the end of the drying operation and distribution of reagent 3.

Incubate immediately for 5 $\pm$ 1 minute at 100°C $\pm$ 5°C. Do not exceed 2 minutes between the reagent 3 distribution and the beginning of the incubation.

Remove the micro-tubes from the incubator and homogenate with a Vortex (5 $\pm$ 2 secondes).

Samples can be stored for 5 hours at +2°C to +8°C or frozen for 72 hours at -20°C. Frozen samples must be thawed at room temperature (+18°C to +30°C) and homogenized with a Vortex (5 $\pm$ 2 secondes) before use.

Please refer to information on TeSeE™ Sheep/Goat Detection package insert (Ref.: 3551166) for detailed detection assay protocol.

For hazard and precaution recommendations relating to this test kit, please refer to the pictogram(s) displayed on reagent labels and the information supplied at the end of this instructions for use document. The Safety Data Sheet is available on www.bio-rad.com.

2-7 LIMITS OF THE PURIFICATION PROTOCOL

Difficulties can be encountered during the grinding step when using dehydrated samples or peripheral tissues. If necessary, the grinding step (step No.2 of the procedure) may need to be repeated several times for this type of sample.

Wait a 5 minutes pause between the 2 agitation cycles.

TeSeE™ Sheep/Goat DETECTION KIT

Σ 192

REF 3551166

REAGENTS FOR *IN VITRO* DETECTION OF PrP^{Sc} IN OVINE AND CAPRINE

BIO-RAD

3-1 PRINCIPLE OF PrP^{Sc} DETECTION BY EIA

The TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit is an immuno-enzymatic technique (sandwich format) using 2 monoclonal antibodies for the detection of the abnormal prion protein, resistant to proteinase K in tissues collected from infected ovine and caprine. The kit contains sufficient reagents to assay 192 tests (including controls).

The solid phase is composed of 12 strips of 8 polystyrene wells coated with the first monoclonal antibody. The second monoclonal antibody is bound to peroxidase.

The assay comprises the following reactive steps:

1. Distribution of negative (R3) and positive controls (R4), samples prepared with the reagents of the TeSeE™ Sheep/Goat Purification Kit (Ref.: 3551165) in the wells of the microplate coated with the first monoclonal antibody. This distribution can be visually controlled, as there is a marked colour difference between an empty well and a well containing a sample.
2. Incubation.
3. Washing, then distribution of the peroxidase-labelled antibody. This distribution can also be visually controlled by the colour difference between an empty well and a well containing the conjugate solution.
4. Incubation.
5. Washing, then revelation of enzymatic activity bound to the solid phase by addition of the substrate.
6. Stopping of the colour development, determination of optical density at 450 nm - 620 nm (bichromatism mode) and interpretation of the results.

3-2 SAMPLES

The assay can only be performed on samples obtained from collected tissues treated with the TeSeE™ Sheep/Goat Purification Kit (Ref.: 3551165).

Purified samples must be diluted with reagent R6 of the TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit.

3-3 COMPOSITION OF THE KIT

LABELLING	TYPE OF REAGENT	PRESENTATION
R1	Microplate: 12 strips of 8 wells coated with an anti-PrP monoclonal antibody	2 plates
R2	Wash solution: 10-fold concentrated Tris-NaCl buffer pH 7.4 Preservative: ProClin™ 300 (0.01%)	1 vial (250 ml)
R3	Negative Control: PBS buffer pH 7.2 supplemented with BSA Preservative: ProClin™ 300 (0.1%)	1 vial (4 ml)
R4	Positive Control: Goat serum. Lyophilized 1 vial Preservative: ProClin™ 300 (0.1%)	1 vial (2 ml)
R6	Sample diluent: PBS buffer pH 7.2 supplemented with BSA and phenol red Preservative: ProClin™ 300 (0.1%)	1 vial (35 ml)
R7	Conjugate: 10-fold concentrated peroxidase-labelled anti-PrP monoclonal antibody in PBS buffer pH 7.1 solution supplemented with bovine proteins and coloured with phenol red Preservative: ProClin™ 300 (0.1%)	1 vial (2.7 ml)
R8	Peroxidase Substrate Buffer: Solution of citric acid and sodium acetate pH 4.0 containing 0.015% H ₂ O ₂ and 4% dimethylsulfoxide (DMSO)	1 vial (60 ml)
R9	Chromogen: Tetramethylbenzidine (TMB) solution.	1 vial (5 ml)
R10	Stop solution: 1 N sulphuric acid.	1 vial (28 ml)
	Adhesive films	8

The following reagents are generic components: sample diluent (R6), wash solution (R2), peroxidase substrate buffer (R8), chromogen (R9) and stop solution (R10). They can be used with all batches of the TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kits.

3-4 PREPARATION OF REAGENTS

Before use, let the reagents of the TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit adjust to room temperature (+18°C to +30°C) for 30 minutes.

1- Ready to use reagents

Microplates (R1):

Before opening the vacuum-packed bag, let the microplate adjust to room temperature (+18°C to +30°C) in its protective packaging to avoid any water condensation in the wells. Open at the solder point and immediately return the unused rows to the sachet. Tightly close the bag after expelling any air, then store at +2°C to +8°C.

The negative control (R3), sample diluent (R6) and stop solution (R10) are ready to use.

2- Reagents to reconstitute

Wash solution (R2):

Dilute wash solution R2 to 1/10 in distilled water, ultrapure water (example 100 ml of reagent R2 in 900 ml of distilled water).

Positive control (R4):

Gently tap the vial of positive control (R4) on the laboratory bench to detach any substance adherent to the rubber stopper. Open the vial and dissolve the content with 2 ml of reagent R6. Reseal the vial and let stand for approximately 1 minute, homogenizing gently and occasionally to facilitate dissolution.

Conjugate (R7):

Dilute reagent R7 to 1/10 in the freshly reconstituted wash solution (example: 0.1 ml of reagent R7 in 0.9 ml of reconstituted wash solution) bearing in mind that 1 ml of ready-for-use conjugate is sufficient for 1 row. Homogenize gently. Avoid using a Vortex agitator.

Color development solution (R8 + R9):

Dilute reagent R9 to 1/11 in reagent R8 (example: 0.1 ml of reagent R9 in 1 ml of reagent R8) bearing in mind that 1.1 ml of color development solution is sufficient for 1 row. Homogenize gently. Avoid using a Vortex agitator.

3-5 STORAGE, SHELF-LIFE

Store the kit at +2°C to +8°C before use; all reagents are stable at this temperature until the expiry date indicated on the kit.

The shelf-lives of the reagents after preparation are as follows:

LABELLING	REAGENT	SHELF-LIFE
R1	Microplate in tightly closed sachet	1 month at +2°C to +8°C
R2	Diluted wash solution	24 hours at room temperature (+18°C to +30°C) 2 weeks at +2°C to +8°C
R4	Reconstituted positive control (with reagent R6)	2 hours at room temperature (+18°C to +30°C) 4 hours at +2°C to +8°C 6 months at -20°C It is recommended to divide the reconstituted solution into 0.5 ml aliquots and store them immediately at -20°C. Can be submitted to 3 successive freezing/thawing cycles.
R7	Reconstituted conjugate solution (with diluted wash solution)	8 hours at room temperature (+18°C to +30°C)
R8 + R9	Development solution	6 hours at room temperature (+18°C to +30°C) always protected from light

3-6 PREPARATION OF SAMPLES FOR PrP^{Sc} DETECTION BY EIA

Purified samples (chapter 2.6) must be diluted with 125 µl (± 10%) of reagent R6.
Diluted samples must be homogenized with Vortex (5 seconds ± 2 seconds) just before distribution into the plate (R1).

3-7 PROCEDURE

Procedure for manual processing:

1. Remove the microplate rack and the required number of rows (R1) from the protective packaging. Replace the unused rows with the dessicant bag in the microplate sachet and hermetically close it.
2. Prepare the positive control (R4) as described in chapter 3.4.2.
3. For each series of tests and every single plate, distribute 100 µl (± 10%) of control/sample into wells in the following order:
 - Wells A1, B1, C1, D1: negative control (R3)
 - Wells E1, F1: positive control (R4)
 - Wells G1, H1, etc... : sample diluted with reagent (R6)Samples are performed in singulate.
4. Cover with adhesive film and incubate for 75 mn ± 15 mn at 37°C ± 2°C.
5. Prepare wash solution (R2).
6. Prepare conjugate solution (R7).
7. Remove the adhesive film, perform 3 wash cycles.
Optimal washing conditions are obtained with PW40, PW41 or 1575 Bio-Rad plate washers with program TSE 3.
Do not let the microplate stand for more than 5 minutes after the last wash cycle. Dry by inverting on absorbent paper before the following step.
8. Distribute 100 µl (± 10%) of conjugate solution (R7) into each well.
9. Cover with adhesive film and incubate 60 mn ± 5 mn at +2°C to +8°C.
10. Prepare the color development solution (R8+R9).
11. Remove the adhesive film, perform 5 wash cycles.
Optimal washing conditions are obtained with PW40, PW41 or 1575 Bio-Rad plate washers with program TSE 5.
Do not let the microplate stand for more than 5 minutes after the last wash cycle. Dry by inverting on absorbent paper before the following step.
12. Distribute 100 µl (± 10%) of color development solution (R8 + R9) into each well and incubate the plate in darkness and at room temperature (+18°C to +30°C) for 30 mn ± 5 mn. Do not use adhesive film during this incubation.
13. Add 100 µl (± 10%) of stop solution (R10) to each well according to the same sequence and same distribution rate as for the color development solution.
14. Thoroughly wipe the bottom of the plate and determine the optical density at 450 nm - 620 nm (bichromatism mode) within 30 minutes after stopping the reaction (the rows must always be protected from light before reading).

Microplate washer parameters

NAME: TSE 3

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Meth. (Method)	MODE	CROS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 (PW40/1575) 278 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0.3	800	2.5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	3	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NAME: TSE 5

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Meth. (Method)	MODE	CROS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 (PW40/1575) 278 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0.3	800	2.5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	5	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

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

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

3-8 CALCULATION AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

1) Calculation of the mean optical density (OD) of the negative control

$\overline{OD\ R3}$ = mean of the four Negative control (R3) ODs

2) Calculation of the cut-off value

The cut-off value is equal to: $\overline{OD\ R3} + 0.140$

Example

$\overline{OD\ R3} = 0.020$

Cut-off value = $0.020 + 0.140 = 0.160$

3) Condition of validation of the test

• **Negative control (R3):**

a) *Validation of the individual negative control values:*

The absorbance of each individual negative control must be lower than **0.100**.

However, a maximum of one individual aberrant value can be eliminated when its optical density is higher or equal to **0.100**.

The test must be repeated if more than one of the negative control lies outside of this limit.

b) *Homogeneity of the negative control values:*

Calculate the mean of the negative controls with the individual remaining values.

Values higher than the mean of the negative controls + 40% ($\overline{OD\ R3} + 40\%$) must be eliminated.

- If one individual value is eliminated in a), one additional value can be eliminated in b).

- If no negative control value is eliminated in a), 2 values maximum can be eliminated in b).

The test must be repeated if more than two values of the negative control are eliminated [criteria a)+b)].

• **Positive control (R4):**

The mean of the positive control optical densities ($\overline{R4\ OD}$) must be higher or equal than **0.800**.

The test must be repeated if the mean of the positive control optical densities ($\overline{R4\ ODs}$) is strictly lower than this limit.

4) Interpretation of the results

Samples with an optical density lower than the cut-off value are considered to be negative according to the TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit.

However, results situated just below the cut-off value (cut-off value - 10%) must be interpreted cautiously, and the corresponding samples should be retested in duplicate, starting from the original homogenate.

Samples with an optical density greater than or equal to the cut-off value are considered to be initially reactive according to the TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit and should be retested in duplicate starting from the original homogenate before the final interpretation.

After repeating the test, the sample is considered to be positive according to the TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit when at least one of the 2 measurements is positive (greater than or equal to the cutoff value). The sample is considered to be negative according to the TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit when these two values are less than the cut-off value.

Samples retested in duplicate and found to be negative according to the TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit, but for which one of the 2 values is close to the cut-off value (cut-off value - 10%) must be interpreted cautiously.

3-9 LIMITS OF THE TEST

A negative result means that the test sample does not contain any PrP^{Sc} detectable by the TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kit. However, as very low levels of PrP^{Sc} may not be detected, such a negative result does not exclude the possibility of infection.

Any sample with a reproducible positive result according to the test interpretation criteria must be confirmed in accordance with the countries national reference laboratory for TSEs or community reference laboratory in exceptional circumstances.

4 - MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Distilled or ultrapure water.
- 20 000 ppm sodium hypochlorite (final concentration) and 1 M sodium hydroxide (final concentration).
- Absorbent paper.
- Disposable gloves.
- Protective glasses or mask with visor.

Purification step:

- 2 ml polypropylene micro test-tubes with caps and appropriate tube rack.
- Automatic or semi-automatic adjustable pipettes able to distribute volumes between 20 µl and 500 µl.
- Tissue homogenizer : Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ or TeSeE™ PRECESS 48™.*
- Centrifuge* adapted to micro test-tubes.
- One micro test-tube heating block* thermostated at 37°C ± 2°C and one micro test-tube heating block* thermostated at 100°C ± 5°C.

For the semi-automatic purification of the sample: TeSeE™ NSP System.

Detection step:

- Automatic or semi-automatic adjustable or fixed pipettes able to distribute 50 µl, 100 µl, 200 µl and 1000 µl.
- 10 ml, 20 ml, 100 ml graduated test tubes.
- Contaminated waste containers.
- Microplate incubator thermostated at 37°C ± 2°C.
- Refrigerated chamber at +2°C to +8°C.
- Automatic or semi-automatic microplate washing system.*
- Microplate reading apparatus* (equipped with 450 nm and 620 nm filters).
- Microplate system* for the automation of the assay protocol stages. The performances of the system must conform with the requirements of the test protocol.

* * Contact Bio-Rad for the list of available instruments.

5 - PRECAUTIONS

The quality of the results depends on compliance with the following good laboratory practices:

- Reagents must be stored at +2°C to +8°C (reagent 2, reagent 3 and grinding tubes can be stored at +2°C to +25°C).
- Do not use reagents whose shelf-life has expired.

- Do not use the reconstituted and stored at room temperature (+18°C to +30°C) proteinase K over 6 hours.
- Do not mix or combine reagents derived from kits with different batch numbers during the same manipulation with the exception of reagents R2, R8, R9, R10, grinding tubes and reagent 2.
- R2, R6, R8, R9, R10 and grinding tubes can be used with all kits from the TeSeE™ product line.
- Allow the reagents to adjust to room temperature (+18°C to +30°C) for 30 minutes before use.
- Thoroughly reconstitute reagents, avoiding any contamination.
- Do not perform the test in the presence of reactive vapors (acids, alkalis, aldehydes) or dust, which could alter the enzymatic activity of the conjugate.
- Only use polypropylene tubes.
- Use perfectly washed glassware, rinsed in distilled water, or preferably disposable material.
- Do not let the microplate more than 5 minutes between the end of washing and distribution of the reagents.
- The enzymatic reaction is very sensitive to all metals or metallic ions. Consequently, no metallic element must enter in contact with the various solutions containing the conjugate or the substrate.
- The revelation solution (substrate buffer + chromogen) must be colorless. The appearance of a colour few minutes after reconstitution indicates that the reagent cannot be used and must be replaced. The revelation solution should preferably be prepared with disposable plastic containers and distribution material or glassware previously washed in 1 N hydrochloric acid, rinsed in distilled water and dried. **Store this solution protected from light.**
- Use a new pipette tip for each sample.
- Washing of the wells is an essential step of the procedure: respect the recommended number of washing cycles and ensure that all wells are completely filled, then completely emptied. Inadequate washing can give incorrect results.
- Never use the same container and pipette to distribute the conjugate and the revelation solution.
- The presence of crystals in reagent 1 does not affect the performance of the reagent. Crystals disappear after few minutes at room temperature (+18°C to +30°C).
- Reagent 2 may appear slightly blue. This does not affect the performance of the reagent.

6 - HYGIENE AND SAFETY INSTRUCTIONS

Generally, hygiene conditions, biosafety measures and good laboratory practices must be in agreement with recommendation of regular authorities of the country.

- All reagents of the kit are intended for use in "*in vitro*" diagnosis.
- Wear disposable gloves when handling reagents and samples and wash your hands thoroughly after handling them.
- Do not pipette with the mouth.
- Use polypropylene containers to avoid any wounds with broken glass.
- All the materials directly in contact with the samples and the wash solutions must be considered as contaminated.
- Avoid splashing samples or solutions containing samples.
- Contaminated surfaces must be cleaned with 20 000 ppm sodium hypochlorite solution.

When the contaminating liquid is an acid, contaminated surfaces must be first neutralized with sodium hydroxide before using 20 000 ppm sodium hypochlorite solution. Surfaces must be rinsed with distilled water, dried with ethanol and wiped with absorbent paper. The material used for cleaning must be discarded in a special container for contaminated wastes.

- Samples, material and contaminated products must be eliminated after decontamination:
 - either by soaking in 1 M sodium hydroxide (final concentration) for 1 hour at room temperature (+18°C to +30°C),
 - or by soaking in 20 000 ppm sodium hypochlorite solution for 1 hour at room temperature (+18°C to +30°C),
 - or by autoclaving at 134°C minimum for at least 18 minutes, under 3 bars of pressure.

Note: never autoclave solutions containing sodium hypochlorite solution or reagent 2.

- All operations involved in Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) screening tests are subject to regulations and must be performed in an isolated, limited and controlled access laboratory devoted exclusively to this activity. A laboratory coat, overshoes, gloves, mask with visor or simple mask with safety glasses are required to ensure the operator's safety.
- Operators must receive specific training concerning the risks related to TSEs agents or prions and the validated modes of decontamination for unconventional agents. Biosafety measures must be in agreement with recommendations of regular authorities of the country.
- Avoid any contact of the substrate buffer, chromogen and stopping solution with the skin and mucous membranes.
- Neutralize and/or autoclave all wash solutions or wash wastes or any liquid containing biological samples prior to their elimination.

For hazard and precaution recommendations relating to this test kit, please refer to the pictogram(s) displayed on reagent labels and the information supplied at the end of this instructions for use document. The Safety Data Sheet is available on www.bio-rad.com.

7 - REFERENCES

- R.K MEYER, M.P. McKINLEY, K.A. BOWMAN, M.B. BRAUNFELD, R.A. BARRY, S.B. PRUSINER
Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 83 (April 1986) : 2310 2314
- D. SERBAN, A. TARABOULOS, S.J. DE ARMOND, S.B. PRUSINER
Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins – Neurology, 40 (1990) 110 117
- F. TAGUCHI, Y. TAMAI, K. UCHIDA, R. KITAJIMA, H. KOJIMA, T. KAWAGUCHI, O. OHTANI, S. MIURA
Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent – Arch Virol (1991) 119 :297 301
- D.R. ERNST, R.E. RACC
Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods – J of Virol Methods, 41 (1993) 193-202
- Y. MURAMATSU, A. ONODERA, M. HORIUCHI, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA
Detection of PrP^{Sc} in sheep at the preclinical stage of scrapie and its significance for diagnosis of insidious infection – Arch Virol (1993) 134 : 427 432
- D.M. TAYLOR, H. FRASER, I. McCONNEL, D.A. BROWN, K.L. BROWN, K.A. LAMZA, G.R.A SMITH
Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie – Arch Virol (1994) 139 : 313 326
- Z.HUANG, J.M. GABRIEL, M.A. BALDWIN, R.J. FLETTERICK, S.B. PRUSINER, F.E. COHEN
Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 91 (july 94) : 7139 7143
- M. HORIUCHI, N. YAMAZAKI, T. IKEDA, N. ISHIGURO ; M. SHINAGAWA
A cellular form of prion protein exists in many non-neuronal tissues of sheep – J of General Virology 76 (1995) 2583 2587
- KAI-UWE D. GRATHWOHL, M. HORIUCHI, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA
Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrP^{Sc} in crude tissue extracts from scrapie-affected mice – J of Virol Methods, 64 (1997) : 205 216
- JP DESLYS Les maladies à prions - Pour la science N°19, avril 1998
- JP DESLYS
Prévention du risque d'encéphalopathie spongiforme subaiguë transmissible - La revue du praticien N°49 (1999) 966 970
- J.M. ELSEN, Y. AMIGUES, F. SCHELCHER, V. DUCROCQ, O. ANDREOLETTI, F. EYCHENNE, J.V. TIEN KHANG, J.P. POIVEY, F. LANTIER, J.L. LAPLANCHE
Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie : detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov – Arch Virol, 144 (1999) 431 445

- O. ANDREOLETTI, P. BERTHON, D. MARC, P. SARRADIN, J. GROSCLAUDE, L. VAN KEULEN, F. SCHELCHER, J.M. ELSEN, F. LANTIER
Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie – J of General Virology, 81 (2000) 3115 3126
- J.D. FOSTER, D.W. PARNHAM, N. HUNTER, M. BRUCE
Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission - J of General Virology, 82 (2001) 2319 2326
- C. WEISSMANN, M. ENARI, P.C. KLOHN, D. ROSSI, E. FLECHSIG
Transmission of prions, PNAS Vol 99 (Dec 2002) 16378 16383
- O. ANDREOLETTI, C. LACROUX, A. CHABERT, L. MONNEREAU, G. TABOURET, F. LANTIER, P. BERTHON, F. EYCHENNE, S. BENESTAD, J.M. ELSEN, F. SCHELCHER
PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie : influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission – J of General Virology, 83 (2002) 2607 2616
- Conference on methods for control of scrapie – 15 & 16 may 2003 – Oslo, NORWAY
- C. ERSDAL, M.J. ULVUND, S.L. BENESTAD, M.A. TRANULIS
Accumulation of pathogenic Prion Protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie – Vet. Pathology, 40 (2003) : 164 174

TeSeE™ Sheep/Goat

KIT DE PURIFICATION -  192

REF 3551165

KIT DE DÉTECTION -  192

REF 3551166

REACTIFS POUR LA PURIFICATION ET LA DETECTION *IN VITRO* DE LA
PrP^{Sc} CHEZ LES OVINS ET CAPRINS

Dans l'union européenne, ce test est approuvé en tant que test rapide pour la surveillance des EST chez les ovins et les caprins, tel que défini dans l'annexe X, chapitre C de la réglementation (CEE) N° 999/2001 modifiée par la Commission de Régulation (CEE) N° 253/2006 le 14 février 2006.



16006891 - 2018/09

BIO-RAD

TABLE DES MATIÈRES

1 - GÉNÉRALITÉS

2 - KIT DE PURIFICATION TeSeE™ Sheep/Goat

- 2 - 1 Principe de purification de la PrP^{Sc}
- 2 - 2 Échantillons
- 2 - 3 Composition du kit de purification TeSeE™ Sheep/Goat
- 2 - 4 Préparation des réactifs
- 2 - 5 Conservation, validité
- 2 - 6 Mode opératoire
- 2 - 7 Limites du protocole de purification

3 - KIT DE DÉTECTION TeSeE™ Sheep/Goat

- 3 - 1 Principe de la détection de la PrP^{Sc} par EIA
- 3 - 2 Échantillons
- 3 - 3 Composition du kit de détection TeSeE™ Sheep/Goat
- 3 - 4 Préparation des réactifs
- 3 - 5 Conservation, validité
- 3 - 6 Préparation des échantillons pour la détection de la PrP^{Sc} par EIA
- 3 - 7 Mode opératoire
- 3 - 8 Calcul et interprétation des résultats
- 3 - 9 Limites du test

4 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

5 - PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

6 - CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

7 - BIBLIOGRAPHIE

1 - GÉNÉRALITÉS

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) sont des maladies dégénératives lentes du système nerveux central causées par des agents transmissibles atypiques (ATNC) couramment appelés prions.

Les EST sont généralement classées, selon leur étiologie, en EST iatrogènes, familiales et/ou sporadiques. La tremblante du mouton est connue depuis le 18^e siècle et son caractère transmissible (y compris à la chèvre) est démontré. Toutefois, les modes de contamination au sein des troupeaux restent mal connus. Les EST ont également été décrites chez les cervidés (maladie chronique cachectisante, MCC), ainsi que chez les bovins (encéphalopathie spongiforme bovine, ESB).

L'espèce humaine est également sensible à certaines formes d'EST. Des éléments convaincants tendent à prouver que l'ESB est passée des bovins à l'homme, probablement par consommation de viande contaminée.

Outre cette variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJv), les autres formes humaines d'EST sont le Kuru et la maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène.

Les formes héréditaires pures (comme le syndrome de Gerstmann-Sträussler [SGS]) et/ou la MCJ sporadique ont été démontrées chez l'homme, cependant leur incidence est faible. Nous ignorons si des cas similaires d'EST sporadique existent dans le monde animal.

Les principales caractéristiques de ces maladies sont les suivantes :

- évolution lente, mais toujours fatale,
- absence d'agents infectieux classiques,
- accumulation progressive, dans le système nerveux central, d'une isoforme anormale de la protéine prion naturelle (PrP) appelée PrP^{Sc}. Cette isoforme se caractérise par des propriétés biochimiques particulières et, notamment, par une plus grande résistance aux protéases.

L'exceptionnelle longueur de la période d'incubation qui précède les symptômes neurologiques laisse penser que les événements importants de la pathogenèse des EST pourraient avoir lieu hors du système nerveux, en particulier dans les tissus lymphoïdes périphériques.

Malgré de nombreuses inconnues et/ou incertitudes, la détection d'une PrP^{Sc} anormale est aujourd'hui le fondement de la confirmation d'un diagnostic d'EST. Cette détection s'effectue principalement dans les tissus nerveux prélevés post mortem.

De la PrP^{Sc} anormale a également été détectée dans différents organes et tissus lymphoïdes : dans les centres germinatifs de la rate, les ganglions lymphatiques, les amygdales et/ou les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (mais à des fins expérimentales), dans des modèles animaux ou des moutons atteints de la tremblante, des cervidés atteints de MCC et des patients atteints de MCJv.

Le test conçu par le CEA (Commissariat à l'Énergie Atomique) développé, produit et commercialisé par Bio-Rad permet la détection de la PrP^{Sc} dans des échantillons prélevés sur des tissus du système nerveux central (SNC) et sur des tissus périphériques, des animaux testés.

Ce dosage comprend les étapes réactionnelles suivantes :

- **Purification de la PrP^{Sc} (192 tests)**

Étape réalisée avec les réactifs et accessoires suivants :

- Kit de purification TeSeE™ Sheep/Goat Réf. : 3551165
- Seringue et aiguille de calibration (x 200) Réf. : 3551174
- ou TSE Calibrat Syringe + Needle VITA (x 200) Réf.: 12007909
- Medium beads Réf. : 3551171

- **Détection de la PrP^{Sc} (192 tests)**

Étape réalisée avec les réactifs suivants :

- Kit de détection TeSeE™ Sheep/Goat Réf. : 3551166

TeSeE™ Sheep/Goat KIT DE PURIFICATION

Σ 192

REF 3551165

RÉACTIFS POUR LA PURIFICATION *IN VITRO* DE LA PrP^{Sc} CHEZ LES
OVINS ET CAPRINS

BIO-RAD

2-1 PRINCIPE DE PURIFICATION DE LA PrP^{Sc}

Les réactifs du kit de purification TeSeE™ Sheep/Goat permettent de purifier, de concentrer et de solubiliser la PrP^{Sc} dans les échantillons de tissus prélevés chez des ovins et caprins infectés.

Le traitement des échantillons comprend les étapes suivantes :

- Broyage des échantillons
- Traitement de la PrP^C par la protéinase K
- Purification et concentration de la PrP^{Sc}
- Solubilisation de la PrP^{Sc} pour dosage immuno-enzymatique avec les réactifs du kit de détection TeSeE™ Sheep/Goat.

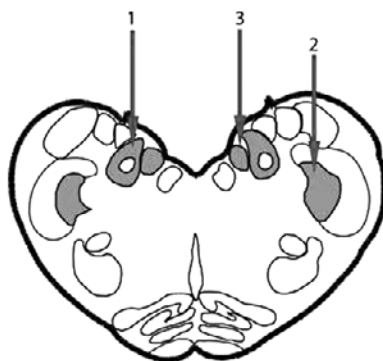
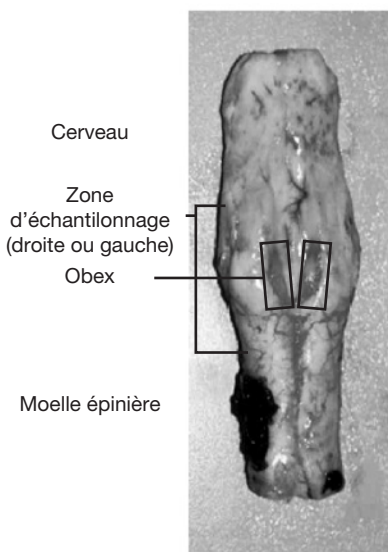
2-2 ÉCHANTILLONS

La purification de la PrP^{Sc} est effectuée sur des échantillons de Système Nerveux Central (CNS) ou de tissus périphériques (ganglions lymphatiques, rate,...). Comme la distribution de la PrP^{Sc} est hétérogène dans le système nerveux central, les prélèvements doivent être faits préférentiellement dans l'obex du tronc cérébral pour une détection optimale. L'outil de prélèvement "Petits ruminants" (Ref.: 3551184) peut être utilisé pour la collecte du tronc cérébral et du cerebellum.

Les échantillons sont coupés et pesés individuellement.

Remarque : les autres tissus (amygdales, léon, paupière...) ne peuvent être utilisés que pour la recherche.

Les échantillons sont conservés à une température de +2°C à +8°C lorsque la purification est effectuée dans les 24 heures, ou congelés si l'on souhaite les conserver plusieurs mois. Ils ne doivent pas être soumis à plus de 3 cycles de congélation-décongélation. Si ces échantillons doivent être transportés, ils doivent être emballés conformément à la réglementation nationale en vigueur.



Coupe transversale, au niveau de l'obex, du tronc cérébral permettant d'identifier les régions cibles pour le diagnostic de l'ESB par histopathologie et immunohistochimie (noyau du tractus solitaire [1] et noyau du tractus trijumeau V [2]) et tremblante (noyau dorsal du nerf vague [3])

(Source : OIE - Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres)

2-3 COMPOSITION DU KIT DE PURIFICATION TeSeE™ Sheep/Goat

DÉSIGNATION	TYPE DE RÉACTIFS	PRÉSENTATION	CONSERVATION
Tube de broyage	Tube contenant des billes de céramique dans une solution tampon Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)	2 sachets (2 x 96 tubes)	+2°C à +25°C
Réactif 1	Solution de dénaturation	1 flacon (55 ml)	+2°C à +8°C
Réactif 2	Solution clarifiante Colorant : bleu de bromophénol	1 flacon (55 ml)	+2°C à +25°C
Réactif 3	Tampon de solubilisation Colorant : vert malachite	1 flacon (7 ml)	+2°C à +25°C
PK	Protéinase K Colorant : rouge de phénol	1 flacon (0,5 ml)	+2°C à +8°C

Le réactif 2 et les tubes de broyage sont des composants génériques. Ils peuvent être utilisés avec tous les lots du Kit de purification TeSeE™ sheep/goat.

2-4 PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Tous les réactifs du kit de purification TeSeE™ Sheep/Goat, à l'exception de la protéinase K, sont prêts à l'emploi. Le réactif 1 est le tampon de dilution de la protéinase K.

La solution doit être préparée de la manière suivante (4 µl de protéinase K dans 1 ml de réactif 1) :

NOMBRE D'ÉCHANTILLONS	RÉACTIF 1	PROTÉINASE K
2	1 ml	4 µl
10	3 ml	12 µl
18	5 ml	20 µl
26	7 ml	28 µl
34	9 ml	36 µl
42	11 ml	44 µl
50	13 ml	52 µl
58	15 ml	60 µl
66	17 ml	68 µl
74	19 ml	76 µl
82	21 ml	84 µl
90	23 ml	92 µl

Les volumes indiqués doivent être mesurés avec exactitude. Rincer l'embout de la pipette contenant la PK par plusieurs cycles d'aspiration/distribution dans le réactif 1.

Après reconstitution, homogénéiser la solution par des retournements successifs du flacon jusqu'à obtention d'une solution rouge uniforme.

2-5 CONSERVATION, VALIDITÉ

Les réactifs du kit de purification TeSeE™ Sheep/Goat (Réf. : 3551165) doivent être conservés de +2°C à +25°C, à l'exception du réactif 1 et de la protéinase K qui doivent être conservés de +2°C à +8°C. À ces températures, tous les réactifs sont stables jusqu'à la date indiquée sur le kit (avant et après l'ouverture des flacons).

Après reconstitution, la solution de protéinase K conservée à température ambiante (+18°C à +30°C) doit être utilisée dans les 6 heures qui suivent.

2-6 MODE OPÉRATOIRE

Pour le traitement semi-automatique du protocole de purification, veuillez consulter le manuel d'utilisation du système TeSeE™ NSP.

Protocole manuel :

1. Échantillonnage :

- Pour les obex, prélever une masse de 350 mg $\pm$ 40 mg de tissu nerveux.
- Pour les tissus périphériques (amygdales, iléon, ganglions lymphatiques, paupière, rate, ...), une bille de taille moyenne ("Medium bead", Réf. : 3551171) doit être placée dans le tube de broyage, avant d'ajouter l'échantillon. Prélever 200 mg $\pm$ 20 mg de tissu périphérique (dans le cas de ganglions lymphatiques, prélever dans 2-3 zones différentes du cortex externe). Couper le tissu en 2-3 morceaux plus petits, avant de les déposer dans le tube de broyage.

Bien fermer le tube, puis procéder à l'étape de broyage.

2. Broyage des échantillons :

Note : Le TeSeE™ Precess 24™ ne peut être utilisé quand une bille moyenne est ajoutée dans le tube de broyage, car il y a de forts risques de fuites.

Placer les tubes dans la couronne du broyeur (systèmes Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ ou TeSeE™ PRECESS 48™). Effectuer un cycle d'agitation avec les paramètres suivants :

	Tissu Obex		Nodules lymphatiques	
	Ribolyser®	TeSeE™ Precess 48™ TeSeE™ Precess 24™	Ribolyser®	TeSeE™ Precess 48™
Temps (sec.)	45		45	
Vitesse	6,5		6,5	
Nombres de cycles	2	N/A	2	N/A
Programme	-	Programme 1	-	Programme 2

Lorsque le broyage est insuffisant, 1 ou 2 autres cycles d'agitation peuvent être effectués, en s'assurant que la température du tube revient à température ambiante (+18°C à +30°C) entre chaque cycle (au moyen de glace pilée, par exemple). Attendre 5 minutes entre les 2 cycles de broyage.

3. Calibration des échantillons :

Retirer les tubes de broyage de l'homogénéiseur. Remettre en suspension l'homogénat en retournant les tubes avant de les ouvrir. Prélever 250 μ l avec la seringue de calibration

(Réf. : 3551174 ou Réf. : 12007909), en prenant soin de plonger l'aiguille dans le culot de billes pour éviter de prélever des fragments de tissus.

Transférer chaque échantillon de 250 µl dans un micro-tube type Eppendorf de 2 ml.

Remarque :

À ce stade, les tubes de broyage après homogénéisation et les micro-tubes après calibration, peuvent également être conservés, fermés :

- à température ambiante (+18°C à +30°C) pendant 8 heures.
- de +2°C à +8°C (dans de la glace ou au réfrigérateur) pendant 15 heures.
- à -20°C pendant 1 an. Les échantillons congelés doivent être décongelés à température ambiante (+18°C à +30°C). Les échantillons peuvent être soumis à 3 cycles de congélation-décongélation au maximum. Les échantillons doivent toujours être homogénéisés par retournements avant usage.

4. Traitement par la PK :

Répartir 250 µl ($\pm 10\%$) de solution de protéinase K diluée (voir paragraphe 2.4) dans chaque micro-tube, homogénéiser et incubé à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ dans un bloc chauffant pendant 10 ± 1 minute.

Préparer des séries de plusieurs micro-tubes et adapter le nombre de micro-tubes au matériel utilisé (pipette automatique/portoirs) pour éviter de dépasser un intervalle de 5 minutes pour la répartition de la protéinase K reconstituée entre le premier et le dernier micro-tube. Ne pas dépasser 2 minutes entre l'homogénéisation et l'incubation à 37°C. Mélanger immédiatement après avoir ajouté la protéinase K.

Les micro-tubes fermés sont homogénéisés par retournements (10 fois).

5. Précipitation de la PrP^{Sc} avec le réactif 2 :

Sortir les micro-tubes du bloc chauffant, les ouvrir et ajouter 250 µl ($\pm 10\%$) de réactif 2 dans chaque micro-tube. Homogénéiser jusqu'à obtenir une couleur bleue uniforme. Respecter le même ordre de répartition que dans l'étape 4.

Ne pas dépasser des intervalles de 2 minutes entre la sortie de l'incubateur et l'étape d'homogénéisation.

L'homogénéisation est effectuée dans les mêmes conditions que dans l'étape 4.

6. Concentration de la PrP^{Sc} (centrifugation) :

Dans les 30 minutes qui suivent la distribution et le mélange du réactif 2, centrifuger (rotor tambour) les micro-tubes pendant 5 minutes à 20 000 g ou 7 minutes à 15 000 g, à 20°C.

7. Clarification des échantillons :

Au terme de la centrifugation, éliminer le surnageant par retournement au-dessus d'un récipient pour déchets biologiques.

Sécher ensuite les micro-tubes en les retournant sur du papier absorbant pendant 5 minutes.

Ajouter 25 µl ($\pm 10\%$) de réactif 3 dans chaque micro-tube.

Ne pas dépasser un intervalle de 10 minutes entre la fin du séchage et la répartition du réactif 3.

Incuber immédiatement pendant 5 ± 1 minute à $100^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$. Ne pas dépasser 2 minutes entre l'addition du réactif 3 et le début de l'incubation.

Sortir les micro-tubes de l'incubateur et les homogénéiser au Vortex (5 secondes $\pm$ 2 secondes).

Les échantillons peuvent être conservés 5 heures de +2°C à +8°C ou congelés 72 heures à -20°C. Les échantillons congelés doivent être décongelés à température ambiante (+18°C à +30°C), puis homogénéisés au Vortex (5 secondes $\pm$ 2 secondes) avant usage.

Consultez la notice du kit de détection TeSe[™] Sheep/Goat (Réf. : 3551166) pour plus de détails sur le protocole du test de détection.

Pour connaître les recommandations liées aux risques et les précautions relatives à certains produits chimiques contenus dans ce kit, consulter le(s) pictogramme(s) figurant sur les étiquettes et les informations fournies à la fin des instructions d'utilisation. La fiche technique de sécurité est disponible sur www.bio-rad.com.

2-7 LIMITES DU PROTOCOLE DE PURIFICATION

Des difficultés peuvent être rencontrées pendant l'étape de broyage si l'on utilise des échantillons déshydratés ou des tissus périphériques. Le cas échéant, l'étape de broyage (étape n°2 du mode opératoire) pourra être répétée plusieurs fois pour ce type d'échantillons.

Attendre 5 minutes entre 2 cycles d'agitation.

TeSeE™ Sheep/Goat KIT DE DÉTECTION

Σ 192

REF 3551166

RÉACTIFS POUR LA DÉTECTION *IN VITRO* DE LA PrP^{Sc} CHEZ LES OVINS
ET CAPRINS

BIO-RAD

3-1 PRINCIPE DE LA DÉTECTION DE LA PrP^{Sc} PAR EIA

Le kit de détection TeSeE™ Sheep/Goat est une technique immuno-enzymatique (sandwich) utilisant 2 anticorps monoclonaux pour la détection de la protéine prion résistante à la protéinase K, dans des tissus ovins et caprins infectés. Le kit permet de réaliser 192 tests (contrôles inclus).

La phase solide est composée de 12 barrettes de 8 puits en polystyrène, dont les parois sont recouvertes du premier anticorps monoclonal. Le second anticorps monoclonal est marqué à la peroxydase.

L'essai comprend les étapes réactionnelles suivantes :

1. Distribution des contrôles négatifs (R3) et positifs (R4) et des échantillons préparés avec les réactifs du kit de purification TeSeE™ Sheep/Goat (Réf. : 3551165) dans les micropuits sensibilisés avec le premier anticorps monoclonal. Cette distribution peut être contrôlée visuellement car il existe une nette différence de coloration entre un puits vide et un puits contenant un échantillon.
2. Incubation.
3. Lavage, puis distribution de l'anticorps marqué à la peroxydase. Cette distribution peut également être contrôlée visuellement par la différence de coloration entre un puits vide et un puits contenant la solution de conjugué.
4. Incubation.
5. Lavage, puis révélation de l'activité enzymatique liée à la phase solide par addition du substrat.
6. Arrêt de la révélation, lecture des densités optiques en bichromatisme à 450 nm - 620 nm et interprétation des résultats.

3-2 ÉCHANTILLONS

Le test ne peut être réalisé que sur des échantillons obtenus à partir de tissus préparés avec les réactifs et dans les conditions d'emploi du kit de purification TeSeE™ Sheep/Goat (Réf. : 3551165).

Les échantillons purifiés doivent être dilués avec le réactif R6 du kit de détection TeSeE™ Sheep/Goat.

3-3 COMPOSITION DU KIT

ÉTIQUETAGE	NATURE DES RÉACTIFS	PRÉSENTATION
R1	Microplaque : 12 barrettes de 8 puits sensibilisés avec un anticorps monoclonal anti-PrP	2 plaques
R2	Solution de lavage : Concentré 10x Tampon Tris-NaCl pH 7,4 Conservateur : ProClin™ 300 (0,01%)	1 flacon (250 ml)
R3	Contrôle négatif : Tampon PBS pH 7,2 additionné de BSA Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacon (4 ml)
R4	Contrôle positif : Sérum de chèvre. Lyophilisé Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacon (2 ml)
R6	Diluant échantillons : Tampon PBS pH 7,2 additionné de BSA et de rouge de phénol Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacon (35 ml)
R7	Conjugué : Solution 10x d'anticorps monoclonal anti-PrP marqué à la peroxydase, en tampon PBS pH 7,1 additionnée de protéines bovines et de rouge de phénol Conservateur : ProClin™ 300 (0,1 %)	1 flacon (2,7 ml)
R8	Tampon substrat de la peroxydase : Solution d'acide citrique et d'acétate de sodium pH 4,0 contenant 0,015 % d'H ₂ O ₂ et 4 % de diméthylsulfoxyde (DMSO)	1 flacon (60 ml)
R9	Chromogène : Solution de tétraméthylbenzidine (TMB).	1 flacon (5 ml)
R10	Solution d'arrêt : Acide sulfurique 1 N	1 flacon (28 ml)
	Films adhésifs	8

Les réactifs suivants sont des composants génériques : diluant échantillons (R6), solution de lavage (R2), tampon substrat de la peroxydase (R8), chromogène (R9) et solution d'arrêt (R10). Ils peuvent être utilisés avec tous les lots du Kit de détection TeSeE™ Sheep/Goat.

3-4 PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Avant utilisation, laisser les réactifs du kit de détection TeSeE™ Sheep/Goat revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) pendant 30 minutes.

1- Réactifs prêts à l'emploi

Microplaques (R1) :

Avant ouverture du sachet sous vide, laisser la microplaque revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) dans son emballage protecteur, afin d'éviter toute condensation d'eau dans les puits. Ouvrir au point de soudure et remettre immédiatement les barrettes inutilisées dans le sachet.

Refermer hermétiquement le sachet après avoir pris soin de chasser l'air. Conserver de +2°C à +8°C.

Le contrôle négatif (R3), le diluant des échantillons (R6) et la solution d'arrêt (R10) sont prêts à l'emploi.

2- Réactifs à reconstituer

Solution de lavage (R2) :

Diluer la solution de lavage R2 au 1/10^e dans de l'eau distillée, eau ultrapure (par exemple 100 ml de réactif R2 dans 900 ml d'eau distillée).

Contrôle positif (R4) :

Taper doucement le flacon de contrôle positif (R4) sur la paillasse pour détacher le produit adhérent éventuellement au bouchon de caoutchouc. Ouvrir le flacon et dissoudre son contenu dans 2 ml de diluant R6. Reboucher le flacon et laisser reposer pendant environ 1 minute en homogénéisant délicatement et régulièrement pour faciliter la dissolution.

Conjugué (R7) :

Diluer le réactif R7 au 1/10^e dans la solution de lavage fraîchement reconstituée (par exemple : 0,1 ml de réactif R7 dans 0,9 ml de solution de lavage reconstituée), sachant que 1 ml de conjugué est suffisant pour traiter 1 barrette. Homogénéiser délicatement. Ne pas mélanger au Vortex.

Solution de développement enzymatique (R8 + R9) :

Diluer le réactif R9 au 1/11^e dans le réactif R8 (par exemple : 0,1 ml de réactif R9 dans 1 ml de réactif R8), sachant que 1,1 ml de solution de révélation enzymatique est suffisant pour 1 barrette. Homogénéiser délicatement. Ne pas mélanger au Vortex.

3-5 CONSERVATION, VALIDITÉ

Conserver le kit de +2°C à +8°C avant utilisation ; à cette température, tous les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le kit.

Après préparation, les réactifs ont les stabilités suivantes :

ÉTIQUETAGE	RÉACTIFS	VALIDITÉ
R1	Microplaque en sachet hermétiquement fermé	1 mois de +2°C à +8°C
R2	Solution de lavage diluée	24 heures à température ambiante (+18°C à +30°C) 2 semaines de +2°C à +8°C
R4	Contrôle positif reconstitué (avec le réactif R6)	2 heures à température ambiante (+18°C à +30°C) 4 heures de +2°C à +8°C 6 mois à -20°C Il est conseillé de fractionner la solution reconstituée en aliquots de 0,5 ml et de les congeler immédiatement à -20°C. Ne pas aller au-delà de 3 cycles de congélation/décongélation successifs.
R7	Conjugué reconstitué (dans la solution de lavage diluée)	8 heures à température ambiante (+18°C à +30°C)
R8 + R9	Solution de révélation	6 heures à température ambiante (+18°C à +30°C), impérativement à l'obscurité.

3-6 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LA DÉTECTION DE LA PrP^{Sc} PAR EIA

Les échantillons purifiés (chapitre 2.6) doivent être dilués avec 125 µl ($\pm 10\%$) de réactif R6. Homogénéiser les échantillons dilués au Vortex (5 secondes $\pm$ 2 secondes) avant la distribution dans la plaque (R1).

3-7 MODE OPÉRATOIRE

Protocole manuel :

- Sortir de l'emballage protecteur le cadre support et le nombre de barrettes (R1) nécessaire. Remettre les barrettes non utilisées, avec le sachet de déshydratant, dans l'emballage et refermer celui-ci hermétiquement.
- Préparer le contrôle positif (R4), comme décrit au chapitre 3.4.2.
- Pour chaque série de tests et pour chaque plaque, remplir les puits de 100 µl ($\pm 10\%$) de contrôle/échantillon dans l'ordre suivant :
 - Puits A1, B1, C1, D1 : contrôle négatif (R3)
 - Puits E1, F1 : contrôle positif (R4)
 - Puits G1, H1, etc. : échantillon, dilué avec le réactif (R6)Chaque échantillon est déposé en un seul puits.
- Recouvrir d'un film adhésif et incuber pendant 75 min $\pm$ 15 min à 37°C $\pm$ 2°C.
- Préparer la solution de lavage (R2).
- Préparer la solution de conjugué (R7).
- Retirer le film adhésif et effectuer 3 cycles de lavage. Les conditions de lavage optimales sont obtenues avec les laveurs PW40, PW41 ou 1575 Bio-Rad, sur le programme TSE 3. Ne pas laisser la microplaque plus de 5 minutes après le dernier cycle de lavage. Sécher les barrettes par retournement sur du papier absorbant avant l'étape suivante.
- Ajouter 100 µl ($\pm 10\%$) de solution de conjugué (R7) dans chaque puits.
- Recouvrir de film adhésif et incuber 60 min $\pm$ 5 min de +2°C à +8°C.
- Préparer la solution de révélation enzymatique (R8+R9).
- Retirer le film adhésif et effectuer 5 cycles de lavage. Les conditions de lavage optimales sont obtenues avec les laveurs PW40, PW41 ou 1575 Bio-Rad, sur le programme TSE 5. Ne pas laisser la microplaque plus de 5 minutes après le dernier cycle de lavage. Sécher les barrettes par retournement sur du papier absorbant avant l'étape suivante.
- Ajouter 100 µl ($\pm 10\%$) de solution de révélation (R8+R9) dans chaque puits et placer la microplaque, pendant 30 min $\pm$ 5 min, à l'obscurité et à température ambiante (+18°C à +30°C). Ne pas utiliser de film adhésif pendant cette incubation.
- Ajouter 100 µl ($\pm 10\%$) de solution d'arrêt (R10) dans chaque puits dans le même ordre et avec le même rythme de distribution que pour la solution de révélation.
- Essuyer soigneusement le dessous de la plaque et lire les densités optiques en bichromatisme à 450 nm - 620 nm dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction (les barrettes doivent toujours être protégées de la lumière avant la lecture).

Paramètres de lavage des microplaques

NOM : TSE 3

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRPS	Meth. (Method)	MODE	CRCS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	FLOW LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 (PW40/1575) 278 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0.3	800	2.5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	3	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NOM : TSE 5

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRPS	Meth. (Method)	MODE	CRCS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	FLOW LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 (PW40/1575) 278 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0.3	800	2.5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	5	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NOM DE LA PLAQUE : FLAT 01 (PW40/PW41) - FLAT 03 (1575)

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

3-8 CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1) Calcul de la densité optique (DO) moyenne du contrôle négatif

$\overline{DO R3}$ = moyenne des 4 DO des contrôles négatifs (R3)

2) Calcul de la valeur seuil

La valeur seuil est égale à : $\overline{DO R3} + 0,140$

Exemple

$\overline{DO R3} = 0,020$

Valeur seuil = $0,020 + 0,140 = 0,160$

3) Conditions de validation du test

• Contrôle négatif (R3) :

a) Validation des valeurs individuelles du contrôle négatif :

La densité optique de chaque contrôle négatif doit être inférieure à **0,100**.

Cependant, on peut éliminer au maximum une valeur aberrante lorsque sa densité optique est supérieure ou égale à **0,100**.

Le test doit être répété si plus d'une valeur de contrôle négatif dépasse cette limite.

b) Homogénéité des valeurs de contrôle négatif :

Calculer la densité optique moyenne des contrôles négatifs sur les valeurs individuelles restantes.

Les valeurs au delà de la moyenne des contrôles négatifs + 40 % ($\overline{DO R3} + 40\%$) doivent être éliminées.

- Si une valeur de contrôle négatif est éliminée en a), une seule valeur peut être éliminée en b).

- Si aucune valeur de contrôle négatif n'est éliminée en a), au maximum deux valeurs peuvent être éliminées en b).

Le test doit être répété si plus de deux valeurs de contrôle négatif sont éliminées [règles a)+b)].

• Contrôle positif (R4) :

La moyenne des densités optiques des contrôles positifs ($\overline{DO R4}$) doit être supérieure ou égale à **0,800 DO**.

Le test doit être répété si la moyenne des densités optiques des contrôles positifs ($\overline{DO R4}$) est inférieure à cette limite.

4) Interprétation des résultats

Les échantillons dont la densité optique est inférieure à la valeur seuil sont considérés comme négatifs avec le kit de détection TeSeE™ Sheep/Goat.

Toutefois, les résultats situés juste au-dessous de la valeur seuil (valeur seuil - 10%) doivent être interprétés avec prudence, et les échantillons correspondants doivent être retestés en duplicats à partir de l'homogénat initial.

Les échantillons dont la densité optique est supérieure ou égale à la valeur seuil sont considérés comme initialement réactifs avec le kit de détection TeSeE™ Sheep/Goat et doivent être retestés en duplicats, à partir de l'homogénat initial, avant l'interprétation finale.

Après répétition de l'essai, l'échantillon est considéré comme positif avec le kit de détection TeSeE™ Sheep/Goat lorsqu'au moins une des deux mesures est positive (supérieure ou égale à la valeur seuil). Il est considéré comme négatif avec le kit de

détection TeSeE™ Sheep/Goat lorsque les deux mesures sont inférieures à la valeur seuil. Les échantillons retestés en duplicats et trouvés négatifs avec le test de détection TeSeE™ Sheep/Goat, mais pour lesquels une des deux valeurs est proche de la valeur seuil (valeur seuil - 10%) doivent être interprétés avec prudence.

3-9 LIMITES DU TEST

Un résultat négatif signifie que l'échantillon testé ne contient pas de PrP^{Sc} détectable par les réactifs du kit de détection TeSeE™ Sheep/Goat. Toutefois, comme les taux très faibles de PrP^{Sc} peuvent ne pas être détectés, un résultat négatif ne peut exclure absolument la possibilité d'une infection.

Tout échantillon donnant un résultat positif reproductible, suivant les critères d'interprétation du test, doit être confirmé par le laboratoire de référence national du pays pour les TSE, ou par le laboratoire de référence de la CEE dans des circonstances exceptionnelles.

4 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Eau distillée ou eau ultrapure
- Hypochlorite de sodium (Eau de Javel) à 20 000 ppm (concentration finale) et solution de soude 1 M (concentration finale).
- Papier absorbant.
- Gants à usage unique.
- Lunettes de sécurité ou masque à visière.

Étape de purification :

- Micro-tubes à essais de 2 ml en polypropylène avec capuchons et portoir approprié.
- Pipettes réglables, automatiques ou semi-automatiques, pouvant distribuer des volumes de 20 à 500 µl.
- Homogénéiseur de tissus : Ribolyser®, TeSeE™ Precess 24™ ou TeSeE™ Precess 48™.*
- Centrifugeuse* adaptée aux micro-tubes à essais.
- Incubateur* pour micro-tubes à essais thermostaté à 37°C ± 2°C et un autre thermostaté à 100°C ± 5°C.

Pour la purification semi-automatique de l'échantillon : système TeSeE™ NSP.

Étape de détection :

- Pipettes fixes ou réglables, automatiques ou semi-automatiques, pouvant distribuer des volumes de 50, 100, 200 et 1000 µl.
- Tubes à essais gradués de 10 ml, 20 ml et 100 ml.
- Conteneurs pour déchets contaminés.
- Incubateur pour microplaques thermostaté à 37°C ± 2°C.
- Chambre froide de +2°C à +8°C.
- Laveur* de microplaques, automatique ou semi-automatique.
- Lecteur de microplaques* (muni de filtres 450 nm et 620 nm).
- Système microplaque* pour l'automatisation des étapes du protocole de test. Les performances du système devront être compatibles avec celles du protocole de test.

* Contacter Bio-Rad pour obtenir la liste des appareils disponibles.

5 - PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

La qualité des résultats dépend de l'observation des bonnes pratiques de laboratoire suivantes :

- Les réactifs doivent être conservés à une température de +2°C à +8°C (les tampons 2, 3, R2 et les tubes de broyage doivent être conservés de +2°C à +25°C).
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de la date de péremption.
- La solution de protéinase K reconstituée et conservée à température ambiante (+18°C à +30°C) doit être utilisée dans les 6 heures.
- Ne pas mélanger ou associer, pendant la même manipulation, des réactifs provenant de kits de lots différents, à l'exception des réactifs R2, R6, R8, R9, R10, tubes de broyage et réactif 2.
- R2, R6, R8, R9, R10 et les tubes de broyage peuvent être utilisés avec tous les kits de la gamme TeSeE™.
- Laisser les réactifs revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) pendant 30 minutes avant utilisation.
- Reconstituer soigneusement les réactifs, en évitant toute contamination.
- Ne pas effectuer le test en présence de vapeurs réactives (acides, bases, aldéhydes) ou de poussières, car cela pourrait altérer l'activité enzymatique du conjugué.
- Utiliser uniquement des tubes en polypropylène.
- La verrerie doit être parfaitement lavée et rincée à l'eau distillée ou, de préférence, être constituée de produits à usage unique.
- Ne pas laisser plus de 5 minutes la microplaque entre la fin du lavage et la distribution des réactifs.
- La réaction enzymatique est très sensible à tous les métaux ou ions métalliques. En conséquence, aucun élément métallique ne doit entrer en contact avec les différentes solutions contenant le conjugué ou le substrat.
- La solution de révélation (tampon du substrat + chromogène) doit être incolore. L'apparition d'une coloration quelques minutes après la reconstitution est signe d'altération du réactif, qui ne doit donc pas être utilisé. La solution de révélation doit de préférence être préparée avec des récipients en plastique à usage unique et du matériel de distribution ou de la verrerie préalablement lavés avec de l'acide chlorhydrique 1 N, rincés à l'eau distillée et séchés. **Conserver cette solution à l'abri de la lumière.**
- Changer d'embout pour chaque échantillon.
- Le lavage des puits est une étape essentielle de la procédure : respecter le nombre de cycles de lavages recommandé et vérifier que tous les puits sont totalement remplis, puis totalement vidés. Un lavage mal effectué peut donner des résultats incorrects.
- Ne jamais utiliser le même récipient et la même pipette pour ajouter le conjugué et la solution de révélation.
- La présence de cristaux dans le flacon de réactif 1 n'affecte pas ses performances. Les cristaux disparaissent après quelques minutes à température ambiante (+18°C à +30°C).
- Le réactif 2 peut paraître légèrement bleu, ceci n'affecte pas ses performances.

6 - CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

D'une façon générale : les conditions d'hygiène, de sécurité et de bonnes pratiques de laboratoire devront être en accord avec la réglementation en vigueur.

- Tous les réactifs du kit sont exclusivement destinés au diagnostic *in vitro*.
- Porter des gants à usage unique pendant la manipulation des réactifs et des échantillons et se laver les mains soigneusement après la manipulation.
- Ne jamais pipetter à la bouche.
- Utiliser des récipients en polypropylène pour éviter les risques de blessure en cas de bris de verre.
- Tous les matériels entrant en contact avec les échantillons et les solutions de lavage doivent être considérés comme contaminés.
- Éviter d'éclabousser les échantillons ou les solutions contenant des échantillons.
- Les surfaces contaminées doivent être nettoyées avec de l'hypochlorite de sodium (Eau de Javel) à 20 000 ppm. Lorsque le liquide contaminant est un acide, les surfaces contaminées doivent d'abord être neutralisées avec de la soude avant d'utiliser l'hypochlorite de sodium à 20 000 ppm. Les surfaces seront rincées à l'eau distillée, séchées avec de l'éthanol et essuyées avec du papier absorbant. Le matériel utilisé pour le nettoyage doit être jeté dans un récipient spécial pour déchets contaminés.
- Les échantillons, le matériel et les produits contaminés doivent être éliminés après décontamination :
 - par trempage dans de la soude 1M (concentration finale) pendant 1 heure à température ambiante (+18°C à +30°C).
 - ou par trempage dans de l'hypochlorite de sodium (Eau de Javel) à 20 000 ppm pendant 1 heure à température ambiante (+18°C à +30°C).
 - ou par autoclavage à 134°C minimum pendant au moins 18 minutes, à 3 bars de pression.

Remarque : ne jamais autoclaver de solutions contenant de hypochlorite de sodium ou du réactif 2.

- Toutes les opérations relatives à la réalisation des tests de dépistage d'une encéphalopathie spongiforme transmissible (EST) font l'objet d'une réglementation et doivent être conduites dans un laboratoire isolé, réservé exclusivement à cet usage et dont l'accès est limité et contrôlé.
L'opérateur doit porter une combinaison, des surbottes, des gants et un masque à visière ou un masque simple avec des lunettes de sécurité.
- Les opérateurs doivent recevoir une formation spécifique concernant les risques liés aux agents des EST ou prions et aux modes de décontamination validés pour les agents infectieux "non conventionnels". Les mesures de sécurité biologique doivent être conformes aux recommandations des autorités réglementaires nationales.
- Éviter tout contact du tampon du substrat, du chromogène et de la solution d'arrêt avec la peau et les muqueuses.
- Avant élimination, neutraliser et/ou autoclaver toutes les solutions de lavage ou eaux usées de lavage ou tout liquide contenant des échantillons biologiques.

Pour connaître les recommandations liées aux risques et les précautions relatives à certains produits chimiques contenus dans ce kit, consulter le(s) pictogramme(s) figurant sur les étiquettes et les informations fournies à la fin des instructions d'utilisation. La fiche technique de sécurité est disponible sur www.bio-rad.com.

7 - BIBLIOGRAPHIE

- R.K MEYER, M.P. McKINLEY, K.A. BOWMAN, M.B. BRAUNFELD, R.A. BARRY, S.B. PRUSINER
Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 83 (April 1986) : 2310 2314
- D. SERBAN, A. TARABOULOS, S.J. DE ARMOND, S.B. PRUSINER
Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins – Neurology, 40 (1990) 110 117
- F. TAGUCHI, Y. TAMAI, K. UCHIDA, R. KITAJIMA, H. KOJIMA, T. KAWAGUCHI, O. OHTANI, S. MIURA
Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent – Arch Virol (1991) 119 :297 301
- D.R. ERNST, R.E. RACC
Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods – J of Virol Methods, 41 (1993) 193-202
- Y. MURAMATSU, A. ONODERA, M. HORIUCHI, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA
Detection of PrP^{Sc} in sheep at the preclinical stage of scrapie and its significance for diagnosis of insidious infection – Arch Virol (1993) 134 : 427 432
- D.M. TAYLOR, H. FRASER, I. McCONNEL, D.A. BROWN, K.L. BROWN, K.A. LAMZA, G.R.A SMITH
Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie – Arch Virol (1994) 139 : 313 326
- Z.HUANG, J.M. GABRIEL, M.A. BALDWIN, R.J. FLETTERICK, S.B. PRUSINER, F.E. COHEN
Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 91 (july 94) : 7139 7143
- M. HORIUCHI, N. YAMAZAKI, T. IKEDA, N. ISHIGURO ; M. SHINAGAWA
A cellular form of prion protein exists in many non-neuronal tissues of sheep – J of General Virology 76 (1995) 2583 2587
- KAI-UWE D. GRATHWOHL, M. HORIUCHI, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA
Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrP^{Sc} in crude tissue extracts from scrapie-affected mice – J of Virol Methods, 64 (1997) : 205 216
- JP DESLYS
Les maladies à prions - Pour la science N°19, avril 1998
- JP DESLYS
Prévention du risque d'encéphalopathie spongiforme subaiguë transmissible - La revue du praticien N°49 (1999) 966 970

- J.M. ELSÉN, Y. AMIGUES, F. SCHELCHER, V. DUCROCQ, O. ANDREOLETTI, F. EYCHENNE, J.V. TIEN KHANG, J.P. POIVEY, F. LANTIER, J.L. LAPLANCHE
Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie : detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov – Arch Virol, 144 (1999) 431 445
- O. ANDREOLETTI, P. BERTHON, D. MARC, P. SARRADIN, J. GROSCLAUDE, L. VAN KEULEN, F. SCHELCHER, J.M. ELSÉN, F. LANTIER
Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie – J of General Virology, 81 (2000) 3115 3126
- J.D. FOSTER, D.W. PARNHAM, N. HUNTER, M. BRUCE
Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission - J of General Virology, 82 (2001) 2319 2326
- C. WEISSMANN, M. ENARI, P.C. KLOHN, D. ROSSI, E. FLECHSIG
Transmission of prions, PNAS Vol 99 (Dec 2002) 16378 16383
- O. ANDREOLETTI, C. LACROUX, A. CHABERT, L. MONNEREAU, G. TABOURET, F. LANTIER, P. BERTHON, F. EYCHENNE, S. BENESTAD, J.M. ELSÉN, F. SCHELCHER
PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie : influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission – J of General Virology, 83 (2002) 2607 2616
- Conference on methods for control of scrapie – 15 & 16 may 2003 – Oslo, NORWAY
- C. ERSDAL, M.J. ULVUND, S.L. BENESTAD, M.A. TRANULIS
Accumulation of pathogenic Prion Protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie – Vet. Pathology, 40 (2003) : 164 174

TeSeE™ Sheep/Goat

KIT DE PURIFICACIÓN - ∇ 192

REF 3551165

KIT DE DETECCIÓN - ∇ 192

REF 3551166

REACTIVOS PARA LA PURIFICACIÓN Y DETECCIÓN *IN VITRO* DE LA
PrP^{Sc} EN OVEJAS Y CABRAS

En el contexto de la Unión Europea, el test está aprobado como prueba de diagnóstico rápido para el seguimiento de EETs en animales ovinos y caprinos, lo que se establece de acuerdo al anexo X, capítulo C del Reglamento (CE) n° 999/2001 modificado por el Reglamento (CE) n° 253/2006 de 14 de febrero de 2006.



16006891 - 2018/09

BIO-RAD

ÍNDICE

1 - INFORMACIONES GENERALES

2 - KIT DE PURIFICACIÓN TeSeE™ Sheep/Goat

- 2 - 1 Principio de la purificación de la PrP^{Sc}
- 2 - 2 Muestras
- 2 - 3 Composición del Kit de purificación TeSeE™ Sheep/Goat
- 2 - 4 Preparación de los reactivos
- 2 - 5 Conservación, caducidad
- 2 - 6 Procedimiento
- 2 - 7 Límites del protocolo

3 - KIT DE DETECCIÓN TeSeE™ Sheep/Goat

- 3 - 1 Principio de la detección de la PrP^{Sc} por el método EIA
- 3 - 2 Muestras
- 3 - 3 Composición del Kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat
- 3 - 4 Preparación de los reactivos
- 3 - 5 Conservación, caducidad
- 3 - 6 Preparación de las muestras para la detección de la PrP^{Sc} por el método EIA
- 3 - 7 Procedimiento
- 3 - 8 Cálculo e interpretación de los resultados
- 3 - 9 Límites de la prueba

4 - MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

5 - PRECAUCIONES

6 - NORMAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD

7 - BIBLIOGRAFÍA

1 - INFORMACIONES GENERALES

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son enfermedades degenerativas lentas del sistema nervioso central producidas por agentes transmisibles no convencionales (ATNC), llamada proteína prión.

Las EET se suelen clasificar, según su causa, como iatrogénicas, familiares o esporádicas. En el siglo XVIII se describió la tembladera (scrapie) y se demostró su transmisión (incluida a cabras). Sin embargo, los mecanismos de contaminación dentro de los rebaños siguen estando poco claros. Las EET también se describieron en el visón, en el ciervo y en el alce (enfermedad debilitante crónica, EDC) y en la vaca (encefalopatía espongiforme bovina, EEB).

Los seres humanos son también susceptibles a determinadas formas infecciosas de EET. Hay pruebas convincentes que indican que la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) ha pasado de los bovinos al ser humano, probablemente debido al consumo de carne contaminada.

Además de esta forma variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJv), otras formas en los seres humanos son el kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica.

Se han demostrado formas hereditarias puras (como el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker [GSS]) y la ECJ esporádica en seres humanos, pero sus incidencias son muy bajas. No sabemos si existen casos esporádicos similares de EET en animales.

Las principales características de estas enfermedades son:

- una evolución lenta y progresiva pero siempre mortal,
- ausencia de un agente infeccioso convencional,
- acumulación progresiva en el sistema nervioso central de una isoforma anormal de una proteína prión natural (PrP) denominada PrP^{sc}. Esta isoforma se caracteriza por unas propiedades bioquímicas particulares y especialmente, por un aumento de la resistencia a las proteasas.

El período de incubación significativamente largo que precede a los síntomas neurológicos sugiere que los acontecimientos importantes en la patogenia de la EET podrían tener lugar en localizaciones extranerviosas y especialmente en tejidos linfoides periféricos.

A pesar del desconocimiento existente en muchas áreas, la detección de la PrP^{sc} anormal se ha establecido como el método para confirmar el diagnóstico de EET. Esta detección se consigue fundamentalmente en tejidos nerviosos recogidos en autopsias.

También se ha detectado la PrP^{sc} anormal en diversos tejidos y órganos linfoides: en los centros germinales del bazo, los ganglios linfáticos, las amígdalas y/o en el tejido linfoide asociado a las mucosas (a nivel de investigación), en modelos animales o en ovejas con tembladera, ciervos o alces con EDC y en pacientes con ECJv.

El test diseñado por el "Commissariat à l'Énergie Atomique - CEA" (la comisión francesa sobre energía atómica), desarrollado, elaborado y comercializado por Bio-Rad, permite la detección de la PrP^{sc} en muestras de tejidos del Sistema Nervioso Central (CNS) y de los tejidos periféricos tomados de animales probados.

Esta determinación comprende los siguientes pasos:

- **Purificación de la PrP^{Sc} (192 pruebas)**

Paso realizado con los siguientes reactivos y accesorios

- | | |
|--|----------------|
| - Kit de purificación TeSeE™ Sheep/Goat | Ref.: 3551165 |
| - Jeringa de calibración y aguja (x 200) | Ref.: 3551174 |
| o TSE Calibrat Syringe + Needle VITA (x 200) | Ref.: 12007909 |
| - Bolitas de tamaño medio "Medium beads" | Ref.: 3551171 |

- **Detección de la PrP^{Sc} (192 pruebas)**

Paso realizado con los siguientes reactivos:

- | | |
|--------------------------------------|---------------|
| - Kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat | Ref.: 3551166 |
|--------------------------------------|---------------|

TeSeE™ Sheep/Goat KIT DE PURIFICACIÓN

Σ 192

REF 3551165

REACTIVOS PARA LA PURIFICACIÓN *IN VITRO* DE LA PrP^{Sc} EN OVEJAS
Y CABRAS

BIO-RAD

2-1 PRINCIPIO DE LA PURIFICACIÓN DE LA PrP^{Sc}

Los reactivos del kit de purificación TeSeE™ Sheep/Goat permiten la purificación, la concentración y la solubilización de la PrP^{Sc} a partir de muestras de tejidos de ovejas y cabras infectadas.

El procesamiento de las muestras comprende los siguientes pasos:

- Trituración de las muestras
- Tratamiento de la PrP^{Sc} con proteinasa K
- Purificación y concentración de la PrP^{Sc}
- Solubilización de la PrP^{Sc} para el ensayo inmunoenzimático usando los reactivos del Kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat.

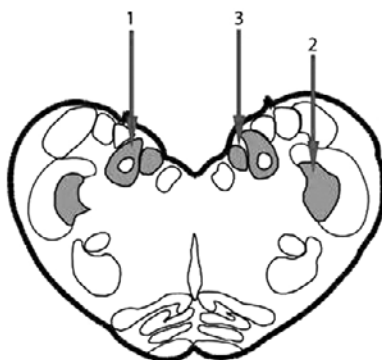
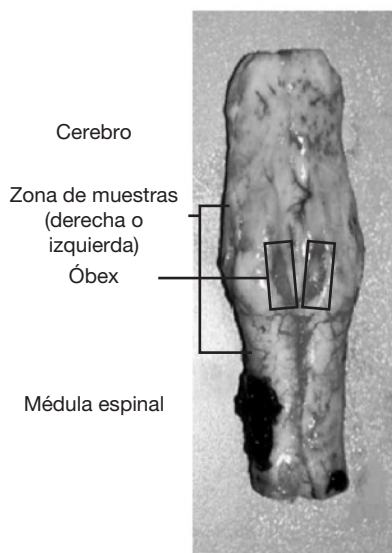
2-2 MUESTRAS

La purificación de la PrP^{Sc} se realiza en muestras de Sistema Nervioso Central (CNS) o de tejidos periféricos (ganglios linfáticos, bazo,...). Como la distribución de la PrP^{Sc} en el sistema nervioso central es heterogénea, se debe tomar preferentemente una muestra en el área del obex del tronco cerebral para una detección óptima. El utensilio de extracción de ovejas y cabras (Ref.: 3551184) puede utilizarse para extraer tanto tronco cerebral como cerebelo.

Las muestras se cortan y se pesan individualmente.

Nota: otros tejidos finos (amígdalas, íleon, párpado...) puede ser utilizado para los propósitos de la investigación solamente.

Las muestras se mantienen de +2°C a + 8°C cuando se realiza la purificación en 24 horas o se pueden conservar congeladas durante varios meses. Sólo se deben someter a 3 ciclos de congelación/descongelación. Si se tienen que transportar las muestras, se deben embalar de acuerdo con las leyes locales.



Corte transversalmente el tronco cerebral a nivel del óbex identificando las zonas claves para el diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico en EEB [núcleo del tracto solitario (1) y núcleo del tracto del trigémino V (2) y scrapie (núcleo dorsal del vago (3)]

(Procedencia: OIE Manual de Análisis diagnósticos y vacunas para animales terrestres)

2-3 COMPOSICIÓN DEL KIT DE PURIFICACIÓN TeSeE™ Sheep/Goat

ETIQUETADO	TIPO DE REACTIVOS	PRESENTACIÓN	CONSERVACIÓN
Tubo de trituración	Tubo de trituración que contiene bolitas de cerámica en una solución tampón Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	2 bolsas (2 x 96 tubos)	+2°C a +25°C
Reactivo 1	Solución de desnaturalización	1 frasco (55 ml)	+2°C a +8°C
Reactivo 2	Solución de precipitación Colorante: azul de bromofenol	1 frasco (55 ml)	+2°C a +25°C
Reactivo 3	Tampón de solubilización Colorante: verde malaquita	1 frasco (7 ml)	+2°C a +25°C
PK	Proteínasa K Colorante: rojo fenol	1 frasco (0,5 ml)	+2°C a +8°C

El reactivo 2 y los tubos de trituración son componentes genéricos. Pueden ser utilizados con cualquier lote del Kit de purificación TeSeE™ sheep/goat.

2-4 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos del kit de purificación TeSeE™ Sheep/Goat excepto la proteína K están listos para su uso.

El reactivo 1 es el tampón de dilución de la proteína K.

La solución se debe preparar de siguiente manera (4 µl de proteína K en 1 ml de reactivo 1):

NÚMERO DE MUESTRAS	REACTIVO 1	PROTEÍNAS K
2	1 ml	4 µl
10	3 ml	12 µl
18	5 ml	20 µl
26	7 ml	28 µl
34	9 ml	36 µl
42	11 ml	44 µl
50	13 ml	52 µl
58	15 ml	60 µl
66	17 ml	68 µl
74	19 ml	76 µl
82	21 ml	84 µl
90	23 ml	92 µl

Los volúmenes se deben medir de forma precisa con una pipeta. La punta de pipeta conteniendo la PK se debe aclarar por ciclos sucesivos de aspiración/distribución en el reactivo 1.

Después de su reconstitución, se homogeniza la solución mediante inversiones sucesivas hasta obtener una solución homogénea roja.

2-5 CONSERVACIÓN, CADUCIDAD

Los reactivos del kit de purificación TeSeE™ Sheep/Goat (Ref.: 3551165) se deben conservar entre +2°C y +25°C, excepto el reactivo 1 y la proteinasa K que se deben conservar entre +2°C y +8°C. Todos los reactivos son estables a estas temperaturas hasta la fecha de caducidad indicada en el kit (antes y después de abrir los frascos).

Después de la dilución, la solución reconstituida de proteinasa K mantenida a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) se debe usar en 6 horas.

2-6 PROCEDIMIENTO

Para el procesamiento semiautomático del protocolo de purificación, consultar el manual del operador de TeSeE™ NSP.

Protocolo manual:

1. Muestreo:

- Para muestras de obex, tomar una masa de 350 mg $\pm$ 40 mg de tejido nervioso.
- Para tejidos periféricos (amígdala, íleon, ganglios linfáticos, párpados, bazo...) colocar 1 medium bead o "bolita de tamaño medio" (Ref.: 3551171) en un tubo de homogeneización antes de introducir la muestra. Pesar 200 mg $\pm$ 20 mg de tejido (si se utiliza ganglio linfático tomar 2-3 zonas diferentes de la corteza externa). Cortar el tejido en 2-3 trozos pequeños antes de depositarlos en el tubo de homogeneización.

Cerrar el tubo firmemente y proceder con el paso de molienda en el homogeneizador.

2. Molienda de muestra:

Nota: Cuando se utiliza una medium bead durante la homogeneización de muestra, el TeSeE™ Precess 24™ no puede ser utilizado ya que puede darse riesgo de fugas.

Coloque los tubos en la corona del homogeneizador (sistemas Ribolyser®, TeSeE™ Precess 24™, TeSeE™ Precess 48™) utilizando los parámetros del equipo que se muestran en la tabla que figura a continuación:

	Tejido obex		Ganglios linfáticos	
	Ribolyser®	TeSeE™ Precess 48™ TeSeE™ Precess 24™	Ribolyser®	TeSeE™ Precess 48™
Tiempo (s)	45		45	
Velocidad	6.5		6.5	
Número de ciclos	2	N/A	2	N/A
Programa	-	Programa 1	-	Programa 2

Si la molienda es insuficiente, pueden realizarse 1 o 2 ciclos más. Considérese que el tubo debe alcanzar temperatura ambiente (18-30°C) entre cada ciclo. Para ello los tubos pueden introducirse en hielo picado y esperar 5 minutos entre cada ciclo de agitación para que el equipo enfríe.

3. Calibración de la muestra:

Retirar los tubos de trituración del homogenizador, resuspender el homogenizado mediante inversión antes de abrir los tubos y tomar 250 μ l con la jeringa de calibración (Ref.: 3551174 o Ref.: 12007909) teniendo cuidado de sumergir la aguja en el sedimento de bolitas para evitar tomar muestras de fragmentos de tejido.

Transferir cada muestra de 250 μ l a un microtubo de ensayo Eppendorf de 2 ml.

Nota: En esta etapa, se pueden conservar cerrados los tubos de trituración después de la homogenización, como los microtubos después de la calibración:

- a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 8 horas.
- de +2°C a +8°C (en hielo o en la nevera) durante 15 horas.
- a -20°C durante 1 año. Las muestras congeladas se deben descongelar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C). Se pueden someter las muestras hasta un máximo de 3 ciclos de congelación/descongelación. Las muestras se deben siempre homogenizar por inversión antes de su uso.

4. Tratamiento con PK:

Distribuir 250 μ l ($\pm$ 10%) de solución reconstituida de proteinasa K en cada microtubo (ver el párrafo 2.4), homogenizar e incubar a 37°C $\pm$ 2°C en un bloque térmico durante 10 $\pm$ 1 minutos.

Realizar series de varios microtubos y adaptar el número de microtubos al equipo empleado (pipetas automáticas/soporte) para evitar intervalos superiores a 5 minutos en la distribución de la proteinasa K reconstituida entre el primer microtubo y el último. No superar dos minutos entre la homogenización y la incubación a 37°C. Mezclar inmediatamente después de añadir la proteinasa K. La homogenización de los microtubos cerrados se realiza por inversión (10 veces).

5. Precipitación de la PrP^{Sc} con el reactivo 2:

Retirar los microtubos del bloque térmico. Abrirlos y distribuir 250 μ l ($\pm$ 10%) del reactivo 2 en cada microtubo. Homogenizar hasta que se obtenga un color azul homogéneo. Observar el mismo orden de distribución que se describe en el paso 4.

No superar intervalos de 2 minutos entre la salida del incubador y la homogenización de la mezcla.

La homogenización se realiza en las mismas condiciones que en el paso 4.

6. Concentración de la PrP^{Sc} (centrifugación):

En los 30 minutos siguientes a la distribución y mezcla del reactivo 2, centrifugar (rotor del tambor) los microtubos durante 5 minutos a 20.000 g o durante 7 minutos a 15.000 g a 20°C.

7. Aclaración de la muestra:

Desechar el sobrenadante invirtiendo sobre un contenedor de desechos cuando haya terminado la centrifugación.

Secar los microtubos invirtiendo sobre papel absorbente durante 5 minutos.

Distribuir 25 μ l ($\pm$ 10%) del reactivo 3 en cada microtubo.

No superar un intervalo de 10 minutos entre el final de la operación de secado y la distribución del reactivo 3.

Incubar inmediatamente durante 5 $\pm$ 1 minutos a 100°C $\pm$ 5°C. No superar los 2 minutos entre la distribución del reactivo 3 y el comienzo de la incubación.

Sacar los microtubos del incubador y homogenizar con un Vortex (5 $\pm$ 2 segundos).

Las muestras se pueden conservar durante 5 horas entre +2°C y +8°C o congeladas durante 72 horas a -20°C. Las muestras congeladas se deben descongelar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) y homogenizar con un Vortex (5 $\pm$ 2 segundos) antes del uso.

Consultar las instrucciones del kit TeSeE™ Sheep/Goat detección (Ref.: 3551166) para más detalles sobre el protocolo.

Para más información acerca de las recomendaciones relacionadas con algunos componentes químicos de este kit de prueba, consultar los pictograma(s) de las etiquetas y la información proporcionada al final de las instrucciones de uso. Podrá consultar la Hoja de datos de seguridad de materiales en www.bio-rad.com.

2-7 LÍMITES DEL PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN

Pueden encontrarse dificultades durante el paso de trituración cuando se usan muestras deshidratadas o tejidos periféricos. Si es necesario, se puede repetir el paso de trituración (paso No.2 del procedimiento) varias veces con este tipo de muestras. Esperar 5 minutos entre 2 ciclos de trituración.

TeSeE™ Sheep/Goat KIT DE DETECCIÓN

Σ 192

REF 3551166

REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN *IN VITRO* DE LA PrP^{Sc} DESPUES DE
LA PURIFICACIÓN EN OVEJAS Y CABRAS

BIO-RAD

3-1 PRINCIPIO DE LA DETECCIÓN DE LA PrP^{Sc} POR EL MÉTODO EIA

El kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat es una técnica inmunoenzimática (formato “sandwich”) en la que se usan dos anticuerpos monoclonales para la detección de la proteína priónica anormal, resistente a la proteinasa K, en los tejidos de ovejas y cabras infectados. El kit contiene suficientes reactivos para realizar 192 ensayos (incluyendo controles).

La fase sólida se compone de 12 tiras de 8 pocillos de poliestireno recubiertos con el primer anticuerpo monoclonal. El segundo anticuerpo monoclonal está unido a la peroxidasa.

El ensayo tiene los siguientes pasos reactivos:

1. Distribución de los controles negativos (R3), positivos (R4) y de las muestras preparadas con los reactivos del Kit de Purificación TeSeE™ Sheep/Goat (Ref.: 3551165) en los pocillos de la microplaca recubiertos con el primer anticuerpo monoclonal. Se puede controlar visualmente la distribución, puesto que hay una notable diferencia de color entre un pocillo vacío y un pocillo que contiene una muestra.
2. Incubación.
3. Lavado y posterior distribución del anticuerpo marcado con peroxidasa. Esta distribución también se puede controlar visualmente por la diferencia de color entre un pocillo vacío y un pocillo que contiene la solución conjugada.
4. Incubación.
5. Lavado y revelado de la actividad enzimática unida a la fase sólida por adición del sustrato.
6. Parada del revelado del color, determinación de la densidad óptica a 450 nm - 620 nm (modo bicromático) e interpretación de los resultados.

3-2 MUESTRAS

El ensayo sólo se puede realizar en muestras de PrP^{Sc} purificadas obtenidas de tejido y preparados con los reactivos y en las condiciones de uso del Kit de Purificación TeSeE™ Sheep/Goat (Ref.: 3551165).

Las muestras purificadas se deben diluir con el reactivo R6 del Kit de Detección TeSeE™ Sheep/Goat.

3-3 COMPOSICIÓN DEL KIT

ETIQUETADO	TIPO DE REACTIVO	PRESENTACIÓN
R1	Microplaca: 12 tiras de 8 pocillos recubiertos con 2 placas un anticuerpo monoclonal anti-PrP	2 placas
R2	Solución de lavado: Concentrada 10x Tampón Tris-NaCl pH 7,4 Conservante: ProClin™ 300 (0,01%)	1 frasco (250 ml)
R3	Control negativo: Tampón PBS pH 7,2 suplementado con BSA. Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco (4 ml)
R4	Control positivo: Suero de cabra. Liofilizado. Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco (2 ml)
R6	Diluyente de muestra: Tampón PBS pH 7,2 suplementado con BSA y rojo fenol Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco (35 ml)
R7	Conjugado: concentrado 10 veces del anticuerpo monoclonal anti-PrP marcado con peroxidasa en un tampón PBS pH 7,1 suplementada con proteínas bovinas y coloreada con rojo fenol Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco (2,7 ml)
R8	Tampón sustrato de la peroxidasa: Solución de ácido cítrico y acetato de sodio pH 4,0 con H ₂ O ₂ al 0,015% y dimetilsulfóxido al 4% (DMSO)	1 frasco (60 ml)
R9	Cromógeno: Solución de tetrametilbenzidina (TMB).	1 frasco (5 ml)
R10	Solución de parada: Ácido sulfúrico 1 N	1 frasco (28 ml)
	Películas adhesivas	8

Los siguientes reactivos son componentes genéricos. diluyente de las muestras (R6), solución de lavado (R2), tampón sustrato de la peroxidasa (R8), cromógeno (R9) y solución de parada (R10). Pueden ser utilizados con cualquier lote del Kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat.

3-4 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Antes de usar, permitir que los reactivos del Kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat alcancen la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 30 minutos.

1- Reactivos listos para usar

Microplacas (R1):

Antes de abrir la bolsa cerrada al vacío, hay que dejar que la microplaca se ajuste a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) en su envase protector para evitar que se produzca condensación de agua en los pocillos. Abrir en el punto de soldadura y volver a meter inmediatamente las tiras no usadas en la bolsa.

Cerrar herméticamente la bolsa después de expulsar el aire que podría quedar y conservar de +2°C a +8°C.

El control negativo (R3), la solución de dilución de la muestra (R6) y la solución de parada (R10) están listos para usar.

2- Reactivos a reconstituir

Solución de lavado (R2):

Diluir la solución de lavado R2 hasta 1/10 en agua destilada, agua ultra pura (por ejemplo, 100 ml del reactivo R2 en 900 ml de agua destilada).

Control positivo (R4):

Golpear muy suavemente el frasco del control positivo (R4) en la poyata de laboratorio para desprender cualquier sustancia que se haya adherido al tapón de goma. Abrir el frasco y disolver el contenido en 2 ml del diluyente R6. Tapar y mantener en reposo durante más o menos 1 minuto, agitando suavemente y de vez en cuando para facilitar la disolución.

Conjugado (R7):

Diluir el reactivo R7 hasta 1/10 en la solución de lavado recientemente reconstituida (por ejemplo, 0,1 ml del reactivo R7 en 0,9 ml de la solución de lavado reconstituida) teniendo en cuenta que es necesario 1 ml del conjugado preparado para completar 1 tira. Homogenizar suavemente sin utilizar un agitador Vortex.

Solución de revelado enzimático (R8 + R9):

Diluir el reactivo R9 a 1/11 en el reactivo R8 (por ejemplo, 0,1 ml del reactivo R9 en 1 ml del reactivo R8) teniendo en cuenta que 1,1 ml de solución de revelado enzimática es necesario para completar 1 tira. Homogenizar suavemente sin utilizar un agitador Vortex.

3-5 CONSERVACIÓN, CADUCIDAD

Mantener el kit de +2°C a +8°C antes de su uso; todos los reactivos son estables a esta temperatura hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

Las caducidades de los reactivos después de la preparación son las siguientes:

ETIQUETA- DO	REACTIVOS	CADUCIDAD
R1	Microplaca en bolsa cerrada herméticamente	1 mes de +2°C a +8°C
R2	Solución de lavado reconstituida	24 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) 2 semanas de +2°C a +8°C
R4	Control positivo reconstituido (con reactivo R6)	2 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) 4 horas de +2°C a +8°C 6 meses a -20°C Se recomienda dividir la solución reconstituida en alícuotas de 0,5 ml y guardarlas inmediatamente a -20°C. Se pueden someter a 3 ciclos consecutivos de congelación/descongelación.
R7	Solución conjugada reconstituida (con la solución de lavado diluida)	8 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C)
R8 + R9	Solución de revelado	6 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) siempre protegida de la luz

3-6 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA DETECCIÓN DE LA PrP^{Sc} POR EL MÉTODO EIA

Deben diluirse las muestras purificadas (capítulo 2.6) con 125 μ l ($\pm$ 10%) del reactivo R6. Homogenizar las muestras con Vortex (5 $\pm$ 2 segundos) justo antes de distribuirlas en la microplaca (R1).

3-7 PROCEDIMIENTO

Protocolo manual:

1. Retirar el soporte de microplacas y el número de tiras necesarias (R1) del envase protector. Guardar las tiras no usadas junto con la bolsa desecante en el envase de la microplaca y cerrarla herméticamente.
2. Preparar el control positivo (R4), según lo descrito en el capítulo 3.4.2.
3. Para cada serie de pruebas y para cada placa, distribuir en pocillos 100 μ l ($\pm$ 10%) de control/muestra en el siguiente orden:
 - Pocillos A1, B1, C1, D1: control negativo (R3)
 - Pocillos E1, F1: control positivo (R4)
 - Pocillos G1, H1, etc... muestra diluida con el reactivo (R6)Cada muestra se deposita en un solo pocillo.
4. Cubrir con película adhesiva e incubar durante 75 minutos $\pm$ 15 minutos a 37°C $\pm$ 2°C.
5. Preparar la solución de lavado (R2).
6. Preparar la solución del conjugado (R7).
7. Retirar la película adhesiva y realizar 3 ciclos de lavado. Se obtienen condiciones óptimas de lavado con lavadores de placas PW40, PW41 o 1575 Bio-Rad con el programa TSE 3. No dejar que la microplaca se quede al aire durante más de 5 minutos después del último ciclo de lavado. Secar por inversión en papel absorbente antes del siguiente paso.
8. Distribuir 100 μ l ($\pm$ 10%) de solución del conjugado (R7) en cada pocillo.
9. Tapar con una película adhesiva e incubar 60 min $\pm$ 5 min de +2°C a +8°C.
10. Preparar la solución de revelado enzimático (R8+R9).
11. Retirar la película adhesiva y realizar cinco ciclos de lavado. Se obtienen condiciones óptimas de lavado con lavadores de placas PW40, PW41 o 1575 Bio-Rad con el programa TSE 5. No dejar que la microplaca se quede al aire durante más de 5 minutos después del último ciclo de lavado. Secar por inversión en papel absorbente antes del siguiente paso.
12. Distribuir 100 μ l ($\pm$ 10%) de solución de revelado (R8+R9) en cada pocillo e incubar la placa en la oscuridad y a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 30 minutos $\pm$ 5 minutos. No usar la película adhesiva durante esta incubación.
13. Añadir 100 μ l ($\pm$ 10%) de solución de parada (R10) a cada pocillo de acuerdo con la misma secuencia y el mismo orden utilizado en la distribución de la solución de revelado.
14. Limpiar cuidadosamente la cara inferior de la placa y determinar la densidad óptica a 450 nm - 620 nm (modo bicromático) en un máximo de 30 minutos después de parar la reacción (las tiras deben mantenerse siempre protegidas de la luz antes de la lectura).

Parámetros del lavador de microplacas

NOMBRE: TSE 3

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Meth. (Method)	MODE	CRGS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 (PW40/1575) 278 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0.3	800	2.5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	-	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NOMBRE: TSE 5

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Meth. (Method)	MODE	CRGS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 (PW40/1575) 278 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0.3	800	2.5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	-	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NOMBRE DE LA PLACA: FLAT 01 (PW40/PW41) - FLAT 03 (1575)

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

3-8 CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1) Cálculo de la densidad óptica (DO) media del control negativo

DO R3 = media de los 4 DO de los controles negativos (R3)

2) Cálculo del valor umbral

El valor umbral es igual a: DO R3 + **0,140**

Ejemplo

DO R3 = 0,020

Valor umbral = 0,020 + **0,140** = 0,160

3) Condición de validación de la prueba

• Control negativo (R3):

a) Validación de los valores individuales del control negativo:

Todos los valores para el control negativo deben ser inferiores a **0,100** unidades de densidad óptica.

Se puede eliminar como máximo un valor individual si la densidad óptica es superior o igual a **0,100**.

Se repite la prueba si más de 1 valor del control negativo sobrepasa **0,100**.

b) Homogeneidad de los valores del control negativo:

Calcular la media de los valores de la densidad óptica de los controles negativos que quedan.

Las densidades ópticas cuyos valores son superiores al valor de la media de las densidades ópticas de los controles negativos mas 40% ($\overline{DO R3} + 40\%$) se deben eliminar.

- Si un valor esta eliminado en la parte a), un valor solamente se puede descartar en la parte b).

- Si ninguno de los valores esta eliminado en la parte a), se pueden eliminar como maximo dos valores en la parte b).

La prueba se debe repetir si más de dos valores de los controles negativos estan descartados [sección a)+b)].

• Control positivo (R4):

La media de las densidades ópticas de los controles positivos ($\overline{DO R4}$) tiene que ser superior o igual a **0.800** (DO).

Se debe repetir la prueba si la media de la densidades ópticas de los controles positivos ($\overline{DO R4}$) es menor de **0.800** (DO).

4) Interpretación de los resultados

Las muestras cuya densidad óptica sea inferior al valor umbral se consideran negativas según el kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat.

Sin embargo, los resultados situados justo por debajo del valor umbral (valor umbral - 10%) deben interpretarse con cuidado y se deben volver a estudiar las muestras correspondientes por duplicado a partir del homogenizado inicial.

Las muestras cuya densidad óptica sea mayor o igual al valor umbral se consideran inicialmente reactivas según el kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat y se deben volver a estudiar por duplicado, a partir del homogenizado inicial, antes de la interpretación final.

Después de repetir la prueba, se considera que la prueba es positiva según el kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat cuando al menos una de las 2 medidas es positiva (mayor que o igual al valor umbral). Se considera que la prueba es negativa según el kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat cuando estos dos valores son menores que el valor umbral.

Las muestras repetidas por duplicado y que resulten negativas según el kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat, pero en las que uno de los 2 valores está próximo al valor umbral (valor umbral - 10%) deben interpretarse con cuidado.

3-9 LÍMITES DE LA PRUEBA

Un resultado negativo significa que la muestra analizada no contiene ninguna PrP^{Sc} detectable por el kit de detección TeSeE™ Sheep/Goat. Sin embargo, como los niveles muy bajos de PrP^{Sc} no pueden ser detectados, un resultado negativo no descarta la posibilidad de infección.

Cualquier muestra con un resultado positivo reproducible según los criterios de interpretación de la prueba tiene que estar confirmada de acuerdo con en el laboratorio de referencia nacional del país para las EET, o el laboratorio de referencia de la Comunidad Europea en casos excepcionales.

4 - MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Agua destilada o agua ultra pura.
- Soluciones de hipoclorito de sodio 20 000 ppm (concentración final) e hidróxido de sodio 1 M (concentración final).
- Papel absorbente.
- Guantes desechables.
- Gafas protectoras o máscara con visor.

Paso de purificación:

- Microtubos de ensayo de polipropileno de 2 ml con tapas y un soporte de tubos adecuado.
- Pipetas automáticas o semiautomáticas regulables, que puedan distribuir volúmenes entre 20 µl y 500 µl.
- Homogenizador de tejidos tipo: Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ o TeSeE™ PRECESS 48™*.
- Centrífuga* adaptada a los microtubos de ensayo.
- Un incubador de microtubos* termostatzado a 37°C ± 2°C y un incubador de microtubos* termostatzado a 100°C ± 5°C.

Para la purificación semiautomática de la muestra: sistema TeSeE™ NSP.

Paso de detección:

- Pipetas automáticas o semiautomáticas regulables o fijas que puedan distribuir 50 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl.
- Tubos de ensayo graduados de 10 ml, 20 ml y 100 ml.
- Contenedores de desechos contaminantes.
- Incubador de microplaca termostatzado a 37°C ± 2°C.
- Cámara refrigerada a +2°C a +8°C.
- Sistema de lavado de microplacas automático o semiautomático.*
- Aparato de lectura de microplacas* (equipado con filtros de 450 nm y 620 nm).
- Sistema de microplacas* para la automatización de las etapas del protocolo del análisis. La calidad del sistema debe estar en concordancia con los requisitos del protocolo de la prueba.

* Contactar Bio-Rad para obtener la lista de los instrumentos disponibles.

5 - PRECAUCIONES

La calidad de los resultados depende del cumplimiento de las siguientes buenas prácticas de laboratorio:

- Los reactivos se deben conservar de +2°C a +8°C (los tampones 2, 3, R2 y los tubos de trituración pueden ser almacenados de +2°C a +25°C).
- No usar reactivos cuya caducidad haya expirado.
- No usar la proteinasa K reconstituida y conservada a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante más de 6 horas.
- No mezclar ni combinar reactivos procedentes de kits con diferentes números de lote en el mismo ensayo, excepto los reactivos R2, R6, R8, R9, R10, tubos de trituración y reactivo 2.
- R2, R6, R8, R9, R10 y los tubos de trituración se pueden utilizar con otros productos de la gama TeSeE™.
- Permitir que los reactivos se ajusten a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 30 minutos antes de su uso.
- Reconstituir cuidadosamente los reactivos, evitando cualquier contaminación.
- No realizar la prueba en presencia de vapores reactivos (ácidos, básicos, aldehídos) o polvo, que podrían alterar la actividad enzimática del conjugado.
- Usar sólo tubos de polipropileno.
- Usar elementos de vidrio perfectamente lavados, aclarados en agua destilada o preferiblemente, material desechable.
- No dejar que la microplaca se seque más de 5 minutos entre el final del lavado y la distribución de los reactivos.
- La reacción enzimática es muy sensible a todos los metales o iones metálicos. En consecuencia, ningún elemento metálico debe entrar en contacto con las diversas soluciones que contienen el conjugado o el sustrato.
- La solución de revelado (tampón de sustrato + cromógeno) debe ser incolora. La aparición de un color pocos minutos después de la reconstitución indica que no se puede usar el reactivo y debe reemplazarse. La solución de revelado se debe preparar preferiblemente en recipientes de plástico desechables o material de vidrio previamente lavado con ácido clorhídrico 1 N, aclarado en agua destilada y seco. **Conservar esta solución protegida de la luz.**
- Usar una punta de pipeta nueva para cada muestra.
- El lavado de los pocillos es un paso esencial del procedimiento: respetar el número recomendado de ciclos de lavado y asegurarse de que todos los pocillos están completamente llenos y luego completamente vacíos. Un lavado incorrecto puede dar resultados incorrectos.
- No usar nunca el mismo recipiente ni la misma punta de pipeta para distribuir el conjugado y la solución de revelado.
- La presencia de cristales en el reactivo 1 no afecta el funcionamiento del reactivo. Los cristales desaparecen después de pocos minutos en la temperatura ambiente (+18°C a +30°C).
- El reactivo 2 puede aparecer levemente azul. Esto no afecta el funcionamiento del reactivo.

6 - NORMAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD

De manera general las condiciones de higiene, las medidas de bioseguridad y los buenos métodos de trabajo tienen que seguir la recomendación de las autoridades legales del país.

- Todos los reactivos del kit están diseñados para su uso en el diagnóstico *in vitro*.
- Utilizar guantes desechables durante la manipulación de los reactivos y de las muestras y lavarse las manos concienzudamente después de manipularlos.
- No pipetear con la boca.
- Usar contenedores de polipropileno para evitar cualquier herida con vidrio roto.
- Todos los materiales que estén en contacto directo con las muestras y las soluciones de lavado se deben considerar contaminados.
- Evitar las salpicaduras de muestras o de las soluciones que las contienen.
- Las superficies contaminadas se deben limpiar con lejía a 20 000 ppm. Cuando el líquido contaminante es un ácido, las superficies contaminadas se deben neutralizar en primer lugar con sosa antes de usar lejía. Las superficies se deben aclarar con agua destilada, se deben secar con etanol y limpiar con papel absorbente. El material empleado para el lavado se debe desechar en un contenedor especial para desechos contaminados.
- Las muestras, el material y los productos contaminados se deben eliminar después de la descontaminación:
 - empapando en sosa 1M (concentración final) durante una hora a temperatura ambiente (+18°C a +30°C),
 - o empapando en lejía a 20 000 ppm durante 1 hora a temperatura ambiente (+18°C a +30°C),
 - o en autoclave a un mínimo de 134°C durante por lo menos 18 minutos, bajo 3 bares de presión.

Nota: nunca someter a autoclave soluciones que contengan lejía o reactivo 2.

- Todas las operaciones implicadas en las pruebas de detección de la encefalopatía espongiforme transmisible (EET) están sometidas a leyes y se deben realizar en un laboratorio aislado, de acceso limitado y controlado, dedicados exclusivamente a esta actividad. Es obligatorio el uso de bata de laboratorio, calzas, guantes, máscaras con visor o máscaras simples con gafas de seguridad para garantizar la seguridad del operador.
- Los operadores deben recibir una formación específica sobre los riesgos relacionados con los agentes de la EET o priones y las formas validadas de descontaminación para agentes no convencionales.

Las medidas de bioseguridad deben estar de acuerdo con recomendaciones de las autoridades legales del país.
- Evitar cualquier contacto del tampón del sustrato, del cromógeno y de la solución de parada con la piel y las mucosas.
- Neutralizar o someter a autoclave todas las soluciones de lavado o los desechos de lavado de cualquier líquido que contengan muestras biológicas antes de su eliminación.

Para más información acerca de las recomendaciones relacionadas con algunos componentes químicos de este kit de prueba, consultar los pictograma(s) de las etiquetas y la información proporcionada al final de las instrucciones de uso. Podrá consultar la Hoja de datos de seguridad de materiales en www.bio-rad.com.

7 - BIBLIOGRAFÍA

- R.K MEYER, M.P. McKINLEY, K.A. BOWMAN, M.B. BRAUNFELD, R.A. BARRY, S.B. PRUSINER
Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 83 (April 1986) : 2310 2314
- D. SERBAN, A. TARABOULOS, S.J. DE ARMOND, S.B. PRUSINER
Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins – Neurology, 40 (1990) 110 117
- F. TAGUCHI, Y. TAMAI, K. UCHIDA, R. KITAJIMA, H. KOJIMA, T. KAWAGUCHI, O. OHTANI, S. MIURA
Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent – Arch Virol (1991) 119 :297 301
- D.R. ERNST, R.E. RACC
Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods – J of Virol Methods, 41 (1993) 193-202
- Y. MURAMATSU, A. ONODERA, M. HORIUCHI, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA
Detection of PrP^{Sc} in sheep at the preclinical stage of scrapie and its significance for diagnosis of insidious infection – Arch Virol (1993) 134 : 427 432
- D.M. TAYLOR, H. FRASER, I. McCONNEL, D.A. BROWN, K.L. BROWN, K.A. LAMZA, G.R.A SMITH
Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie – Arch Virol (1994) 139 : 313 326
- Z.HUANG, J.M. GABRIEL, M.A. BALDWIN, R.J. FLETTERICK, S.B. PRUSINER, F.E. COHEN
Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 91 (july 94) : 7139 7143
- M. HORIUCHI, N. YAMAZAKI, T. IKEDA, N. ISHIGURO ; M. SHINAGAWA
A cellular form of prion protein exists in many non-neuronal tissues of sheep – J of General Virology 76 (1995) 2583 2587
- KAI-UWE D. GRATHWOHL, M. HORIUCHI, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA
Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrP^{Sc} in crude tissue extracts from scrapie-affected mice – J of Virol Methods, 64 (1997) : 205 216
- JP DESLYS
Les maladies à prions - Pour la science N°19, avril 1998
- JP DESLYS
Prévention du risque d'encéphalopathie spongiforme subaiguë transmissible - La revue du praticien N°49 (1999) 966 970

- J.M. ELSÉN, Y. AMIGUES, F. SCHELCHER, V. DUCROCQ, O. ANDREOLETTI, F. EYCHENNE, J.V. TIEN KHANG, J.P. POIVEY, F. LANTIER, J.L. LAPLANCHE
Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie : detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov – Arch Virol, 144 (1999) 431 445
- O. ANDREOLETTI, P. BERTHON, D. MARC, P. SARRADIN, J. GROSCLAUDE, L. VAN KEULEN, F. SCHELCHER, J.M. ELSÉN, F. LANTIER
Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie – J of General Virology, 81 (2000) 3115 3126
- J.D. FOSTER, D.W. PARNHAM, N. HUNTER, M. BRUCE
Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission - J of General Virology, 82 (2001) 2319 2326
- C. WEISSMANN, M. ENARI, P.C. KLOHN, D. ROSSI, E. FLECHSIG
Transmission of prions, PNAS Vol 99 (Dec 2002) 16378 16383
- O. ANDREOLETTI, C. LACROUX, A. CHABERT, L. MONNEREAU, G. TABOURET, F. LANTIER, P. BERTHON, F. EYCHENNE, S. BENESTAD, J.M. ELSÉN, F. SCHELCHER
PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie : influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission – J of General Virology, 83 (2002) 2607 2616
- Conference on methods for control of scrapie – 15 & 16 may 2003 – Oslo, NORWAY
- C. ERSDAL, M.J. ULVUND, S.L. BENESTAD, M.A. TRANULIS
Accumulation of pathogenic Prion Protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie – Vet. Pathology, 40 (2003) : 164 174

TeSeE™ Sheep/Goat

KIT DI PURIFICAZIONE - ∇ 192

REF 3551165

KIT DI RILEVAMENTO - ∇ 192

REF 3551166

REAGENTI PER LA PURIFICAZIONE E LA RIVELAZIONE *IN VITRO* DELLA PrP^{Sc} NEGLI OVINI E CAPRINI

All'interno dell'Unione Europea, questo test è stato approvato come test rapido per il monitoraggio della TSE negli ovicapri. Tale test è sviluppato in conformità con l'Annex X, capitolo C del Regolamento (EC) No 999/2001 modificato dal Regolamento della Commissione (EC) No 253/2006 del 14 Febbraio 2006.



16006891 - 2018/09

BIO-RAD

INDICE

- 1 - INFORMAZIONI GENERALI
- 2 - KIT DI PURIFICAZIONE TeSeE™ Sheep/Goat
 - 2 - 1 Principio di purificazione della PrP^{Sc}
 - 2 - 2 Campioni
 - 2 - 3 Composizione del Kit di Purificazione TeSeE™ Sheep/Goat
 - 2 - 4 Preparazione dei reagenti
 - 2 - 5 Conservazione, validità
 - 2 - 6 Procedura
 - 2 - 7 Limiti del protocollo
- 3 - KIT DI RIVELAZIONE TeSeE™ Sheep/Goat
 - 3 - 1 Principio della rivelazione della PrP^{Sc} con il metodo EIA
 - 3 - 2 Campioni
 - 3 - 3 Composizione del Kit di rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat
 - 3 - 4 Preparazione dei reagenti
 - 3 - 5 Conservazione, validità
 - 3 - 6 Preparazione dei campioni per la rivelazione della PrP^{Sc} con il metodo EIA
 - 3 - 7 Procedura
 - 3 - 8 Calcolo ed interpretazione dei risultati
 - 3 - 9 Limiti del test
- 4 - MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO
- 5 - PRECAUZIONI
- 6 - ISTRUZIONI DI IGIENE E SICUREZZA
- 7 - BIBLIOGRAFIA

1 - INFORMAZIONI GENERALI

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) sono malattie degenerative a lento decorso del sistema nervoso centrale indotte da agenti trasmissibili non convenzionali (agenti EST) abitualmente noti con il nome di prioni.

Le EST vengono generalmente classificate in base alla loro eziologia come iatrogene, ereditarie e/o sporadiche. Nel 18° secolo è stata segnalata la scrapie ovina di cui è stata dimostrata la trasmissione (anche alle capre) anche se le modalità di contaminazione all'interno dei greggi rimangono comunque oscure. Le EST sono state anche osservate nei cervi e nelle alci (sindrome di dimagrimento cronico, CWD) e nelle mucche (encefalopatia spongiforme bovina, BSE).

Anche l'uomo è suscettibile di alcune forme di EST. Esistono prove convincenti secondo le quali l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) sia passata dal bestiame all'uomo, probabilmente attraverso il consumo di carne contaminata.

Oltre a questa variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob, tra le altre forme negli umani ci sono il Kuru e la malattia di Creutzfeldt-Jakob iatrogena.

Nell'uomo sono state, inoltre, dimostrate forme puramente ereditarie (come la sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker [GSS]) e/o la malattia di Creutzfeldt-Jakob sporadica, ma le rispettive incidenze sono piuttosto basse. Non sappiamo se esistono simili casi di EST sporadica negli animali.

Le principali caratteristiche di queste patologie sono :

- un decorso progressivo piuttosto lento ma sempre fatale,
- assenza di agenti infettivi convenzionali,
- accumulo progressivo nel sistema nervoso centrale di un'isoforma anormale della proteina prionica naturale (PrP) denominata PrP^{Sc}. Tale isoforma è caratterizzata da particolari proprietà biochimiche e, in special modo, da un aumento della resistenza alle proteasi.

Il periodo di incubazione sorprendentemente lungo precedente ai sintomi neurologici suggerisce che eventi importanti della patogenesi delle EST possano aver luogo in siti extra nervosi e, in particolar modo, nei tessuti linfoidi periferici.

Malgrado le numerose incognite e/o incertezze, il rilevamento della PrP^{Sc} anormale è ora riconosciuto quale il metodo di conferma della diagnosi di EST. Tale rilevamento viene principalmente condotto su tessuti nervosi autoptici.

PrP^{Sc} anormali sono state anche rilevate in una serie di tessuti ed organi linfoidi : nei centri germinali della milza, nei linfonodi, tonsille, e/o tessuto linfoide associato alla mucosa (in fase di ricerca), nei modelli animali o in pecore affette da scrapie, cervi ed alci con CWD e pazienti con vCJD.

I reagenti progettati dal "Commissariat à l'Énergie Atomique - CEA" (Commissione dell'Energia Atomica Francese), sviluppati, prodotti e commercializzati da Bio-Rad, consentono il rilevamento delle PrP^{Sc} su campioni prelevati dal Sistema Nervoso Centrale (SNC) e tessuti periferici di animali.

Tale determinazione comprende le seguenti procedure di reazione :

- **Purificazione della PrP^{Sc} (192 tests)**

Eseguita con i seguenti reagenti ed accessori :

- Kit di Purificazione TeSeE™ Sheep/Goat Rif. : 3551165
- Siringa ed ago di calibrazione (x 200) Rif. : 3551174
 - o TSE Calibrat Syringe + Needle VITA (x 200) Rif. : 12007909
- Medium beads Rif. : 3551171

- **Rivelazione della PrP^{Sc} (192 tests)**

Eseguita con i seguenti reagenti :

- Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat Rif. : 3551166

TeSeE™ Sheep/Goat KIT DI PURIFICAZIONE

Σ 192

REF 3551165

REAGENTI PER LA PURIFICAZIONE *IN VITRO* DELLA PrP^{Sc} NEGLI OVINI E CAPRINI

BIO-RAD

2-1 PRINCIPIO DI PURIFICAZIONE DELLA PrP^{Sc}

I reagenti del Kit di Purificazione TeSeE™ Sheep/Goat, consentono la purificazione, la concentrazione e la solubilizzazione della PrP^{Sc} dai campioni di tessuto prelevati da ovini e caprini infetti.

L'elaborazione dei campioni comprende le fasi seguenti :

- Frantumazione dei campioni
- Trattamento della PrP^C con la proteinasi K
- Purificazione e concentrazione della PrP^{Sc}
- Solubilizzazione della PrP^{Sc} per il dosaggio immunoenzimatico con l'impiego dei reagenti del Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat.

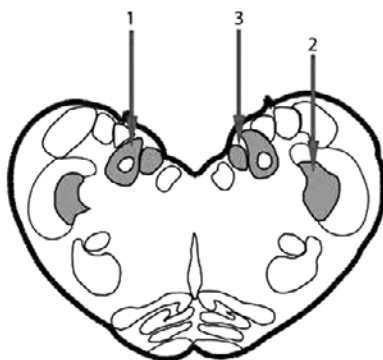
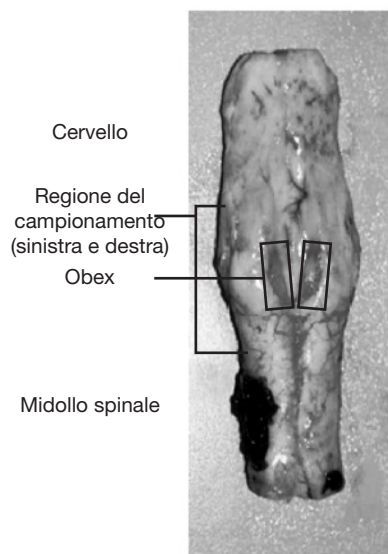
2-2 CAMPIONI

La purificazione della PrP^{Sc} si esegue sui campioni dal Sistema Nervoso Centrale (SNC) e tessuti periferici (linfonodi, milza,...). Dal momento che la distribuzione di PrP^{Sc} è eterogenea nel sistema nervoso centrale, per un rivelazione ottimale, bisogna prelevare preferibilmente nell'area dell'obex del tronco encefalico. Il cucchiaino di estrazione per gli ovicaprini (rif: 3551184) può essere utilizzato per estrarre sia il tronco encefalico che il cervelletto. I campioni sono tagliati individualmente e pesati.

Nota : altri tessuti (tonsille, ileo, palpebra...) possono essere utilizzati solo per ricerca.

I campioni vengono conservati ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C se la purificazione viene eseguita entro le 24 ore, altrimenti possono essere congelati per diversi mesi.

È possibile sottoporre i campioni solo a 3 cicli di congelamento/scongelo. Se è necessario trasportare i campioni, bisognerà confezionarli secondo la normativa locale in vigore.



Sezione trasversale del tronco encefalico a livello dell'obex, che identifica il sito principale per la diagnosi mediante istopatologia e immunoistochimica nella BSE (nucleo del tratto solitario [1] e nucleo del tratto V del trigemino [2]) e nella scrapie (nucleo dorsale del vago [3])

(Fonte: OIE- Manuale di Test Diagnostici e Vaccini per Animali Terrestri)

2-3 COMPOSIZIONE DEL KIT DI PURIFICAZIONE TeSeE™ Sheep/Goat

ETICHETTATURA	TIPO DI REAGENTE	PRESENTAZIONE	CONSERVAZIONE
Tubo di frantumazione	Tubo di frantumazione contenente perline di ceramica in una soluzione tampone Conservante : ProClin™ 300 (0,1%)	2 buste (2 x 96 provette)	+2°C a +25°C
Reagente 1	Soluzione di denaturazione	1 flacone (55 ml)	+2°C a +8°C
Reagente 2	Tampone di precipitazione Colorante : blu bromofenolo	1 flacone (55 ml)	+2°C a +25°C
Reagente 3	Tampone di solubilizzazione Colorante : verde malachite	1 flacone (7 ml)	+2°C a +25°C
PK	Proteinasi K Colorante : rosso fenolo	1 flacone (0,5 ml)	+2°C a +8°C

Il reagente 2 e tubi di frantumazione sono dei componenti generici. Possono essere usati con tutti i lotti del Kit di Purificazione TeSeE™sheep/goat.

2-4 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Tutti i reagenti del Kit di Purificazione TeSeE™ Sheep/Goat, ad eccezione della proteinasi K, sono pronti per l'uso. Il reagente 1 è il tampone di diluizione per la proteinasi K.

La soluzione va preparata nel modo seguente (4 µl di proteinasi K in 1 ml di reagente 1) :

NUMERO DI CAMPIONI	REAGENTE 1	PROTEINASI K
2	1 ml	4 µl
10	3 ml	12 µl
18	5 ml	20 µl
26	7 ml	28 µl
34	9 ml	36 µl
42	11 ml	44 µl
50	13 ml	52 µl
58	15 ml	60 µl
66	17 ml	68 µl
74	19 ml	76 µl
82	21 ml	84 µl
90	23 ml	92 µl

I volumi indicati devono essere pipettati esattamente. La punta che contiene la PK deve essere correttamente risciacquata con cicli successivi di aspirazione/distribuzione nel reagente 1. Dopo la ricostituzione, omogeneizzare la soluzione con inversioni consecutive fino ad ottenere una soluzione rossa omogenea.

2-5 CONSERVAZIONE, VALIDITÀ

I reagenti del kit di purificazione TeSeE™ Sheep/Goat kit (Ref.: 3551165) devono essere conservati ad una temperatura compresa tra +2°C e +25°C, ad eccezione del reagente 1 e della proteinasi K, i quali devono essere conservati tra +2°C e +8°C. Tutti i reagenti restano stabili a queste temperature fino alla data di scadenza indicata sul kit (prima e dopo l'apertura dei flaconi).

Dopo la diluizione, la soluzione di proteinasi K ricostituita, se conservata a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) va usata entro 6 ore.

2-6 PROCEDURA

Per il processamento semiautomatico dei campioni durante il protocollo di purificazione, fare riferimento al manuale del sistema NSP TeSeE™.

Protocollo manuale:

1. Campionamento :

- Per campioni di obex, prelevare una massa di 350 mg $\pm$ 40 mg di tessuto nervosa.
- Per i tessuti periferici (tonsille, ileo, gangli linfatici, palpebre, milza etc) inserire una biglia di dimensioni medie ("Medium bead", Ref. : 3551171) deve essere inserita nella provetta da triturazione prima di inserire il campione. Prelevare 200 mg $\pm$ 20 mg di tessuto periferico (se il campione è un ganglio linfatico prelevare in 2/3 punti differenti della corteccia esterna). Tagliare il tessuto in 2-3 piccoli pezzi prima di metterlo nella provetta da triturazione.

Chiudere bene la provetta e procedere con la fase di omogeneizzazione

2. Triturazione del campione :

Note: quando si utilizza una biglia media per tritare il campione non può essere utilizzato il TeSeE™ Precess 24™, in quanto potrebbero verificarsi dispersioni (perdite)

Place the tubes in the crown of the homogeniser (Ribolyser® or TeSeE™ Precess 24™ or TeSeE™ Precess 48™ systems) using the instrument parameters shown in the table below:

	Obex Tissue		Lymphoid Nodes	
	Ribolyser®	TeSeE™ Precess 48™ TeSeE™ Precess 24™	Ribolyser®	TeSeE™ Precess 48™
Tempo (sec.)	45		45	
Velocità	6.5		6.5	
Numero di cicli	2	N/A	2	N/A
Programma	-	Programma 1	-	Programma 2

Se la triturazione è insufficiente è possibile effettuare 1 o 2 agitazioni ulteriori. Tuttavia la temperatura dei tubi deve essere riportata a temperatura ambiente (18-30°C) tra i cicli. Questo può essere ottenuto sommergendo i tubi in ghiaccio tritato. Attendere 5 minuti tra un ciclo ed il successivo per lasciar raffreddare lo strumento.

3. Calibrazione dei campioni :

Togliere le provette di frantumazione dall'omogeneizzatore, risospendere l'omogenato per inversione prima di aprire le provette ed aspirare 250 µl con la siringa di calibrazione (Rif. : 3551174 o Rif. : 12007909) facendo attenzione ad immergere l'ago nelle perle per evitare di prelevare frammenti di tessuto.

Trasferire ogni campione da 250 µl in una microprovetta tipo Eppendorf da analisi da 2 ml.

Nota : A questo punto, le provette di frantumazione dopo omogeneizzazione e le microprovette dopo calibrazione dei campioni possono anche essere conservate chiuse :

- a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) per 8 ore.
- a +2°C e +8°C (in ghiaccio o nel frigo) per 15 ore.
- a -20°C per 1 anno. I campioni congelati vanno scongelati a temperatura ambiente (+18°C a +30°C). I campioni possono essere sottoposti ad un massimo di 3 cicli di congelamento/scongelamento. I campioni devono essere sempre omogeneizzati per inversione prima dell'uso.

4. Trattamento della PK :

Distribuire 250 µl ($\pm 10\%$) di soluzione di proteinasi K ricostituita in ciascuna microprovetta (vd. paragrafo 2.4), omogeneizzare e introdurre in un incubatore con blocco riscaldante a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 10 ± 1 minuti.

Eseguire serie di diverse micro-provette ed adattare il numero di micro-provette allo strumento impiegato (pipetta automatica / rack) per evitare di superare intervalli di 5 minuti per la distribuzione della proteinasi K ricostituita fra la prima e l'ultima microprovetta. Non superare i 2 minuti tra l'omogeneizzazione e l'incubazione a 37°C . Mescolare subito dopo aver aggiunto la proteinasi K. L'omogeneizzazione delle microprovette chiuse viene eseguita per inversione (10 volte).

5. Precipitazione della PrP^{Sc} con il reagente 2 :

Togliere le micro-provette dall'incubatore a blocchi riscaldanti. Aprirle e distribuire 250 µl di reagente 2 in ciascuna micro-provetta. Omogeneizzare fino ad ottenere un colore blu omogeneo. Osservare lo stesso ordine di distribuzione descritto al punto 4.

Non superare intervalli di 2 minuti tra l'uscita dall'incubatore e l'omogeneizzazione.

L'omogeneizzazione si esegue nelle stesse condizioni descritte al punto 4.

6. Concentrazione delle PrP^{Sc} (centrifugazione) :

Entro i 30 minuti dopo aver aggiunto e mescolato il reagente 2, centrifugare (rotore da tamburo) le provette per 5 minuti a 20.000 g o per 7 minuti a 15.000 g a 20°C .

7. Chiarificazione dei campioni :

Una volta terminata la centrifugazione, eliminare il surnatante capovolgendolo su un contenitore dei rifiuti.

Asciugare le micro-provette capovolgendole su carta assorbente per 5 minuti.

Distribuire 25 µl ($\pm 10\%$) di reagente 3 in ciascuna micro-provetta.

Non superare un intervallo di 10 minuti tra il termine dell'asciugatura e la distribuzione del reagente 3.

Incubare immediatamente per 5 ± 1 minuti a $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Non superare i 2 minuti tra la distribuzione del reagente 3 e l'inizio dell'incubazione.

Togliere le micro-provette dall'incubatrice ed omogeneizzare con un Vortex (5 ± 2 secondi).

I campioni vanno conservati per 5 ore ad una temperatura compresa tra $+2^{\circ}\text{C}$ e $+8^{\circ}\text{C}$ o congelati per 72 ore a -20°C . I campioni congelati devono essere scongelati a temperatura ambiente ($+18^{\circ}\text{C}$ a $+30^{\circ}\text{C}$) ed omogeneizzati con un Vortex (5 ± 2 secondi) prima dell'uso.

Consultare le informazioni contenute nel foglio illustrativo del Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat (Rif. : 3551166) per il protocollo dettagliato del test di rivelazione.

Per le raccomandazioni su precauzioni e rischi correlati ad alcuni componenti chimici del presente kit, consultare i simboli riportati sulle etichette e le informazioni fornite alla fine delle istruzioni per l'uso. La Scheda di Sicurezza è disponibile su www.bio-rad.com.

2-7 LIMITI DEL PROTOCOLLO DI PURIFICAZIONE

Si possono incontrare difficoltà durante la fase di frantumazione se si usano campioni disidratati o tessuti periferici. Potrebbe dunque essere necessario ripetere diverse volte la fase di frantumazione (fase No.2 della procedura) per questo tipo di campione.

Aspettare 5 minuti tra i 2 cicli di agitazione.

TeSeE™ Sheep/Goat KIT DI RIVELAZIONE

Σ 192

REF 3551166

REAGENTI PER LA RIVELAZIONE *IN VITRO* DELLA PrP^{Sc} DOPO
PURIFICAZIONE NEGLI OVINI E CAPRINI

BIO-RAD

3-1 PRINCIPIO DI RIVELAZIONE DELLA PrP^{Sc} CON IL METODO EIA

Il Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat è una tecnica immunoenzimatica (formato sandwich) che impiega 2 anticorpi monoclonali per la rivelazione della proteina prione anormale, resistente alla proteinasi K, nei tessuti degli ovini e caprini infetti. Il kit contiene reagenti a sufficienza per 192 test (compreso i controlli).

La fase solida si compone di 12 strisce di pozzetti in polistirene rivestiti del primo anticorpo monoclonale. Il secondo anticorpo monoclonale è legato alla perossidasi.

Il test comprende le seguenti fasi reattive :

1. Distribuzione di controlli negativi (R3) e positivi (R4), dei campioni preparati con i reagenti del Kit di Purificazione TeSeE™ Sheep/Goat (Rif. : 3551165) nei pozzetti della micropiastra rivestiti con il primo anticorpo monoclonale. Tale distribuzione può essere controllata a vista grazie ad una marcata differenza di colore tra un pozzetto vuoto ed un pozzetto contenente un campione.
2. Incubazione.
3. Lavaggio, quindi distribuzione dell'anticorpo marcato con perossidasi. Tale distribuzione può essere ugualmente controllata a vista grazie alla differenza di colore tra un pozzetto vuoto ed uno contenente la soluzione di coniugato.
4. Incubazione.
5. Lavaggio, dunque rivelazione dell'attività enzimatica legata alla fase solida mediante aggiunta del substrato.
6. Arresto dello sviluppo cromatico, determinazione della densità ottica in lettura bicromatica a 450 nm - 620 nm ed interpretazione dei risultati.

3-2 CAMPIONI

Il test si può eseguire solo su campioni di PrP^{Sc} purificata ottenuta dai tessuti preparati con i reagenti e nelle condizioni d'impiego previste dal Kit di Purificazione TeSeE™ Sheep/Goat (Rif. : 3551165).

I campioni purificati vanno diluiti con il reagente R6 del Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat.

3-3 COMPOSIZIONE DEL KIT

ETICHETTA-TURA	TIPO DI REAGENTE	PRESENTAZIONE
R1	Micropiastre : 12 strisce da 8 pozzetti rivestite di anticorpo 2 piastre monoclonale anti-PrP	2 piastre
R2	Soluzione di lavaggio : 10 volte concentrato Tampone Tris-NaCl pH 7,4 Conservante : ProClin™ 300 (0,01%)	1 flacone (250 ml)
R3	Controllo negativo : Tampone PBS pH 7,2 integrato con BSA Conservante : ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacone (4 ml)
R4	Controllo positivo : Siero di capra. Liofilizzato. Conservante : ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacone (2 ml)
R6	Diluyente campioni : Tampone PBS pH 7,2 integrato con BSA e rosso fenolo Conservante : ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacone (35 ml)
R7	Coniugato : 10 volte concentrato anticorpo monoclonale anti-PrP marcato con perossidasi in tampone PBS pH 7,1 integrata con proteine bovine e colorata con rosso fenolo Conservante : ProClin™ 300 (0,1 %)	1 flacone (2,7 ml)
R8	Tampone di substrato di perossidasi : 1 flacone Soluzione di acido citrico e sodio acetato pH 4,0 contenente H ₂ O ₂ 0,015 % e dimetilsolfossido (DMSO) 4%	1 flacone (60 ml)
R9	Cromogeno : Soluzione di tetrametilbenzidina (TMB)	1 flacone (5 ml)
R10	Soluzione di arresto : Acido solforico 1 N	1 flacone (28 ml)
	Film adesivo	8

I seguenti reagenti sono dei componenti generici: diluente dei campioni (R6), soluzione di lavaggio (R2), tampone di substrato di perossidasi (R8), cromogeno (R9) e soluzione di arresto (R10). Possono essere usati con tutti i lotti del Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat.

3-4 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Prima dell'uso, lasciare che i reagenti del Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat raggiungano la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) per 30 minuti.

1- Reagenti pronti per l'uso

Micropiastre (R1) :

Prima di aprire la busta sotto vuoto, lasciare che la micropiastre raggiunga la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) nella sua confezione protettiva per prevenire la condensa d'acqua all'interno dei pozzetti. Aprire al punto di saldatura e riporre immediatamente le file non utilizzate all'interno della bustina.

Chiudere bene la busta dopo aver espulso l'aria eventualmente presente, conservare ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C.

Il controllo negativo (R3), la soluzione per la diluizione dei campioni (R6) e la soluzione di arresto (R10) sono pronti per l'uso.

2- Reagenti da ricostituire

Soluzione di lavaggio (R2) :

Diluire la soluzione di lavaggio R2 a 1/10 in acqua distillata, acqua ultrapura (ad esempio 100 ml di reagente R2 in 900 ml di acqua distillata).

Controllo positivo (R4) :

Picchiettare con delicatezza il flacone del controllo positivo (R4) sul banco di laboratorio per far staccare eventuali sostanze adese al tappo di gomma. Aprire il flacone e scioglierne il contenuto in 2 ml di diluente R6. Richiudere il flacone, e per favorire la dissoluzione, lasciarlo riposare per approssimativamente 1 minuto.

Coniugato (R7) :

Diluire il reagente R7 a 1/10 nella soluzione di lavaggio recentemente ricostituita (ad esempio: 0,1 ml di reagente R7 in 0,9 ml di soluzione di lavaggio ricostituita). Per 1 striscia è necessario e sufficiente 1 ml di coniugato pronto per l'uso. Omogeneizzare con delicatezza. Evitare l'impiego di un agitatore Vortex.

Soluzione per lo sviluppo enzimatico (R8 + R9) :

Diluire il reagente R9 a 1/11 nel reagente R8 (ad esempio: 0,1 ml di reagente R9 in 1 ml di reagente R8). Per 1 striscia è necessario e sufficiente 1,1 ml di soluzione per la rivelazione enzimatica. Omogeneizzare con delicatezza. Evitare l'impiego di un agitatore Vortex.

3-5 CONSERVAZIONE, VITA UTILE

Conservare il kit ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C prima dell'uso; tutti i reagenti sono stabili a questa temperatura fino alla data di scadenza indicata sul kit.

La vita utile dei reagenti dopo la preparazione è la seguente :

ETICHETTATURA	REAGENTE	VITA UTILE
R1	Micropiastra in bustina chiusa ermeticamente	1 mese a +2°C a +8°C
R2	Soluzione di lavaggio ricostituita	24 ore a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) 2 settimane a +2°C a +8°C
R4	Controllo positivo ricostituito (con il reagente R6)	2 ore a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) 4 ore a +2°C a +8°C 6 mesi a -20°C Si raccomanda di dividere la soluzione ricostituita in aliquote da 0,5 ml e di conservarle immediatamente a -20°C. Si possono sottoporre a 3 cicli consecutivi di congelamento/scongelo.
R7	Coniugato ricostituito (nella soluzione di lavaggio diluita)	8 ore a temperatura ambiente (+18°C a +30°C)
R8 + R9	Soluzione di sviluppo	6 ore a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), sempre a riparo dalla luce.

3-6 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA RIVELAZIONE DELLA PrP^{Sc} CON IL METODO EIA

I campioni purificati (capitolo 2.6) vanno diluiti con 125 µl di reagente R6.

Omogeneizzare i campioni diluiti con il Vortex (5 ± 2 secondi) prima di distribuirli sulla piastra (R1).

3-7 PROCEDURA

Protocollo manuale :

1. Rimuovere il rack di micropiastre e il numero necessario di strisce (R1) dall'involucro protettivo. Riporre le strisce non utilizzate con la busta essiccante nella bustina di micropiastre e chiuderla ermeticamente.
2. Preparare il controllo positivo (R4), come descritto nel capitolo 3.4.2.
3. Per ogni serie di test e per ogni piastra, distribuire in pozzetti 100 µl (± 10%) di controllo/campione nell'ordine seguente :
 - Pozzetti A1, B1, C1, D1 : controllo negativo (R3)
 - Pozzetti E1, F1 : controllo positivo (R4)
 - Pozzetti G1, H1, ecc... : campione diluito con reagente (R6)Ogni campione è depositato soltanto in un pozzetto.
4. Coprire con film adesivo ed incubare per 75 mn ± 15 mn a 37°C ± 2°C.
5. Preparare la soluzione di lavaggio (R2).
6. Preparare la soluzione di coniugato (R7).
7. Rimuovere il film adesivo, eseguire 3 cicli di lavaggio. Le condizioni ottimali di lavaggio si ottengono con dispositivi di lavaggio per piastre PW40, PW41, o 1575 Bio-Rad con programma TSE 3.
Non lasciare la micropiastra per più di 5 minuti dall'ultimo ciclo di lavaggio. Asciugare capovolgendo su carta assorbente prima del punto successivo.
8. Distribuire 100 µl (± 10%) di soluzione di coniugato (R7) in ciascun pozzetto.
9. Coprire con film adesivo ed incubare a 60 mn ± 5 mn a +2°C a +8°C.
10. Preparare la soluzione per la rivelazione enzimatica (R8+R9).
11. Rimuovere il film adesivo, eseguire 5 cicli di lavaggio. Le condizioni ottimali di lavaggio si ottengono con dispositivi di lavaggio per piastre PW40, PW41, o 1575 Bio-Rad con programma TSE 5.
Non lasciare la micropiastra per più di 5 minuti dall'ultimo ciclo di lavaggio. Asciugare capovolgendo su carta assorbente prima del punto successivo.
12. Distribuire 100 µl (± 10%) di soluzione di rivelazione (R8+R9) in ciascun pozzetto ed incubare la piastra al buio e a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) per 30 mn ± 5 mn.
Non usare il film adesivo durante l'incubazione.
13. Aggiungere 100 µl (± 10%) di soluzione di arresto (R10) in ciascun pozzetto secondo la stessa sequenza e seguendo lo stesso tasso di distribuzione usato per la soluzione di rivelazione.
14. Pulire accuratamente il fondo della piastra e stabilire la densità ottica in lettura bicromatica a 450 nm - 620 nm entro i 30 minuti dall'arresto della reazione (le strisce devono essere sempre protette dalla luce prima della lettura).

Parametri per dispositivi di lavaggio micropiastre

NOME : TSE 3

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 (PW40/1575) 278 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0.3	800	2.5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	-	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NOME : TSE 5

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 (PW40/1575) 278 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0.3	800	2.5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	-	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NOME DELLA PIASTRA : FLAT 01 (PW40/PW41) - FLAT 03 (1575)

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

3-8 CALCOLO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1) Calcolo della densità ottica media (DO) del controllo negativo

$\overline{DO\ R3}$ = media delle quattro DO dei controlli negativi (R3).

2) Calcolo del valore di soglia

Il valore di soglia è pari a : $\overline{DO\ R3} + 0,140$

Esempio

$\overline{DO\ R3} = 0,020$

Valore di soglia = $0,020 + 0,140 = 0,160$

3) Condizione di validazione del test

• **Controllo negativo (R3) :**

a) *Validazione dei valori individuali del controllo negativo :*

La densità ottica di ciascun controllo negativo deve essere inferiore a **0,100**.

È possibile eliminare un massimo di un singolo valore aberrante se la densità ottica è superiore o uguale a **0,100**.

Se più di 1 valore del controllo negativo è superiore a questo limite, il test va ripetuto.

b) *Omogeneità dei valori del controllo negativo :*

Calcolare il valore medio delle densità ottiche dei controlli negativi sui valori individuali rimanenti.

I valori al di fuori del valore medio dei controlli negativi + 40 % ($\overline{DO\ R3} + 40\%$) devono essere eliminati.

- Se un valore del controllo negativo è eliminato in a), un solo altro valore può essere eliminato in b).

- Se nessun valore del controllo negativo è eliminato in a) è possibile eliminare un massimo di due valori in b).

Il test va ripetuto se più di due valori del controllo negativo sono eliminati [punti a)+b)].

• **Controllo positivo (R4) :**

La media delle densità ottiche dei controlli positivi ($\overline{DO\ R4}$) deve essere superiore o uguale a **0,800** (DO).

Il test va ripetuto se la media delle densità ottiche dei controlli positivi ($\overline{DO\ R4}$) è inferiore a questo limite.

4) Interpretazione dei risultati

I campioni con una densità ottica inferiore al valore di soglia sono considerati negativi secondo il Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat.

Tuttavia, i risultati che si trovano appena sotto il valore di soglia (valore di soglia -10%) vanno interpretati con cautela e i campioni riesaminati in duplicato, ripartendo dall'omogenato iniziale.

I campioni con una densità ottica maggiore o equivalente al valore di soglia sono considerati inizialmente reattivi dal Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat e vanno riesaminati in duplicato, ripartendo dall'omogenato iniziale, prima dell'interpretazione finale.

Dopo aver ripetuto il test, il campione viene considerato positivo secondo il Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat quando almeno una delle 2 misurazioni è positiva (DO superiore o uguale al valore di soglia). Il campione è considerato negativo secondo il Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat quando questi due valori sono inferiori a quello di soglia.

I campioni riesaminati in duplicato e risultati negativi secondo il Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat, ma per cui uno dei 2 valori si avvicina al valore di soglia (valore di soglia -10%) vanno interpretati con cautela.

3-9 LIMITI DEL TEST

Un risultato negativo indica che il campione sottoposto al test non contiene PrP^{Sc} rilevabile dal Kit di Rivelazione TeSeE™ Sheep/Goat. Comunque, dal momento che livelli bassissimi di PrP^{Sc} potrebbero non essere rilevati, un tale risultato negativo non esclude la possibilità d'infezione.

Ogni campione con un risultato positivo riproducibile secondo i criteri d'interpretazione del test va confermato con il laboratorio nazionale di riferimento del paese per le EST o il laboratorio di riferimento della Comunità Europea nelle circostanze eccezionali.

4 - MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Acqua distillata o acqua ultrapura.
- Soluzione di ipoclorito di sodio 20 000 ppm (concentrazione finale) e di idrossido di sodio 1 M (concentrazione finale).
- Carta assorbente.
- Guanti monouso.
- Occhiali protettivi o mascherina con visiera.

Fase di purificazione :

- Micro-provette da analisi in polipropilene da 2 ml con relativo tappo e rack.
- Pipette regolabili automatiche o semiautomatiche capaci di distribuire volumi compresi tra 20 µl e 500 µl.
- Omogeneizzatore di tessuti : Ribolyser®, TeSeE™ Precess 24™ o TeSeE™ PRECESS 48™.*
- Centrifuga* per microprovette da analisi.
- Un incubatore* per microprovette da analisi termostattizzato a 37°C ± 2°C ed un incubatore* per microprovette da analisi termostattizzato a 100°C ± 5°C.

Per la purificazione automatica del campione : sistemi TeSeE™ Key 1 e TeSeE™ Key 2.

Fase di rivelazione :

- Pipette regolabili o fisse, automatiche o semiautomatiche, capaci di distribuire volumi di 50 µl, 100 µl, 200 µl e 1000 µl.
- Provette da analisi graduate da 10 ml, 20 ml e 100 ml.
- Contenitori per rifiuti contaminati.
- Incubatore per micropiastre termostattizzato a 37°C ± 2°C.
- Camera refrigerata a temperatura compresa tra +2°C e +8°C.
- Sistema* di lavaggio per micropiastre automatico o semiautomatico.
- Apparecchio* di lettura delle micropiastre (dotato di filtri 450 nm e 620 nm).
- Sistema microplate* per l'automatizzazione delle fasi di protocollo di analisi. Le prestazioni del sistema devono essere conformi ai requisiti del protocollo del test.

* Contattare Bio-Rad per ottenere l'elenco degli strumenti disponibili.

5 - PRECAUZIONI

La qualità dei risultati dipende dal rispetto delle seguenti pratiche di laboratorio raccomandate:

- I reagenti vanno conservati a temperatura compresa tra +2°C e +8°C (il reagente 2, reagente 3, R2 e tubi di frantumazione possono essere immagazzinati tra +2°C e +25°C).
- Non usare reagenti scaduti.
- Non usare la proteinasi K ricostituita e conservata a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) per più di 6 ore.

- Nell'ambito della stessa manipolazione, non mischiare o combinare reagenti derivanti dakit con numeri di lotto diversi, fatta eccezione per i reagenti R2, R6, R8, R9, R10, tubi difrantumazione e reagente 2.
- R2, R6, R8, R9, R10 e i tubi di frantumazione possono essere utilizzati con gli altri prodotti della gamma TeSeE™.
- Prima dell'uso, lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) per 30 minuti.
- Ricostituire accuratamente i reagenti, evitando ogni contaminazione.
- Non eseguire il test in presenza di vapori reattivi (acidi, alcali, aldeidi) o polvere, che potrebbero alterare l'attività enzimatica del coniugato.
- Usare solo provette in polipropilene.
- Usare componenti in vetro perfettamente lavati, sciacquati in acqua distillata o preferibilmente materiale monouso.
- Non lasciare più di 5 minuti tra la fine del lavaggio della micropiastre e la distribuzione dei reagenti.
- La reazione enzimatica è molto sensibile a tutti i metalli o ioni metallici. Di conseguenza, non bisogna far entrare in contatto alcun elemento metallico con le varie soluzioni contenenti il coniugato o il substrato.
- La soluzione di rivelazione (tampone substrato + cromogeno) deve essere incolore. La comparsa di un colore pochi minuti dopo la ricostituzione indica che il reagente non può essere usato e va sostituito. La soluzione di rivelazione deve essere preparata preferibilmente con contenitori in plastica monouso e materiale di distribuzione o componenti in vetro precedentemente lavati in acido idroclorico 1 N, sciacquati in acqua distillata ed asciugati. **Conservare la soluzione al riparo dalla luce.**
- Usare un nuovo puntale di distribuzione per ciascun campione.
- Il lavaggio dei pozzetti costituisce un passo essenziale della procedura: rispettare il numero raccomandato di cicli di lavaggio ed assicurarsi che tutti i pozzetti siano riempiti completamente e, successivamente, svuotati completamente. Un lavaggio non adeguato può portare a risultati erranei.
- Non usare mai lo stesso contenitore e pipetta per distribuire il coniugato e la soluzione di rivelazione.
- La presenza di cristalli nel reagente 1 non influisce sulle prestazioni del tampone. I cristalli spariscono dopo pochi minuti alla temperatura ambiente (+18°C a +30°C).
- Il reagente 2 può sembrare un po' blu. Ciò non interessa le prestazioni del reagente.

6 - ISTRUZIONI DI IGIENE E SICUREZZA

In generale : condizioni di igiene, di sicurezza e di buona pratica di laboratorio devono essere in accordo con le norme in vigore.

- Tutti i reagenti del kit sono progettati per l'uso nell'ambito della diagnosi *in vitro*.
- Indossare guanti monouso per manipolare i reagenti e i campioni e lavarsi le mani accuratamente dopo averli manipolati.
- Non usare la pipetta con la bocca.
- Usare contenitori in polipropilene per evitare ferite da vetro rotto.
- Tutti i materiali a contatto diretto con i campioni e le soluzioni di lavaggio vanno considerati come contaminati.
- Evitare di schizzare i campioni o le soluzioni contenenti i campioni.
- Le superfici contaminate vanno pulite con una soluzione di ipoclorito di sodio 20 000 ppm. Se il liquido contaminante è un acido, le superfici contaminate vanno prima neutralizzate con idrossido di sodio prima di usare la candeggina. Le superfici vanno

sciacquate con acqua distillata, asciugate con etanolo e strofinate con carta assorbente. Il materiale usato per la pulizia va smaltito in uno speciale contenitore per rifiuti contaminati.

- I campioni, il materiale e i prodotti contaminati vanno eliminati dopo la decontaminazione :
 - immergendo in idrossido di sodio 1 M (concentrazione finale) per 1 ora a temperatura ambiente (+18°C a 30°C).
 - immergendo in soluzione di ipoclorito di sodio 20 000 ppm per 1 ora a temperatura ambiente (+18°C a 30°C).
 - sterilizzando in autoclave a minimo 134°C per almeno 18 minuti, a 3 bar di pressione.

Nota : mai mettere in autoclave soluzioni contenenti candeggina o reagente 2.

- Tutte le operazioni previste per i test di screening per Encefalopatia Spongiforme Trasmissibile (EST) sono soggette a delle normative e vanno eseguite in un laboratorio ad accesso isolato, limitato e controllato dedicato esclusivamente a questa attività. Un camice da laboratorio, soprascarpe, guanti, mascherina con visiera o semplice con occhiali protettivi sono necessari per garantire la sicurezza dell'operatore.
- Gli operatori devono ricevere una formazione specifica in merito ai rischi relativi agli agenti EST o ai prioni e ai modi di contaminazione riconosciuti per gli agenti non convenzionali. Le misure di biosicurezza devono essere in accordo con le raccomandazioni delle autorità regolatorie del paese.
- Evitare che cute e mucose vengano a contatto con il tampone di substrato, il cromogeno e la soluzione di arresto.
- Neutralizzare e/o sterilizzare in autoclave tutte le soluzioni di lavaggio o i rifiuti del lavaggio oppure eventuali liquidi contenenti campioni biologici prima della loro eliminazione.

Per le raccomandazioni su precauzioni e rischi correlati ad alcuni componenti chimici del presente kit, consultare i simboli riportati sulle etichette e le informazioni fornite alla fine delle istruzioni per l'uso. La Scheda di Sicurezza è disponibile su www.bio-rad.com.

7 - BIBLIOGRAFIA

- R.K MEYER, M.P. McKINLEY, K.A. BOWMAN, M.B. BRAUNFELD, R.A. BARRY, S.B. PRUSINER
Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 83 (April 1986) : 2310 2314
- D. SERBAN, A. TARABOULOS, S.J. DE ARMOND, S.B. PRUSINER
Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins – Neurology, 40 (1990) 110 117
- F. TAGUCHI, Y. TAMAI, K. UCHIDA, R. KITAJIMA, H. KOJIMA, T. KAWAGUCHI, O. OHTANI, S. MIURA
Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent – Arch Virol (1991) 119 :297 301
- D.R. ERNST, R.E. RACC
Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods – J of Virol Methods, 41 (1993) 193-202
- Y. MURAMATSU, A. ONODERA, M. HORIUCHI, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA
Detection of PrP^{Sc} in sheep at the preclinical stage of scrapie and its significance for diagnosis of insidious infection – Arch Virol (1993) 134 : 427 432
- D.M. TAYLOR, H. FRASER, I. McCONNEL, D.A. BROWN, K.L. BROWN, K.A. LAMZA, G.R.A SMITH
Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie – Arch Virol (1994) 139 : 313 326
- Z.HUANG, J.M. GABRIEL, M.A. BALDWIN, R.J. FLETTERICK, S.B. PRUSINER, F.E. COHEN
Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 91 (july 94) : 7139 7143
- M. HORIUCHI, N. YAMAZAKI, T. IKEDA, N. ISHIGURO ; M. SHINAGAWA
A cellular form of prion protein exists in many non-neuronal tissues of sheep – J of General Virology 76 (1995) 2583 2587
- KAI-UWE D. GRATHWOHL, M. HORIUCHI, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA
Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrP^{Sc} in crude tissue extracts from scrapie-affected mice – J of Virol Methods, 64 (1997) : 205 216
- JP DESLYS
Les maladies à prions - Pour la science N°19, avril 1998
- JP DESLYS
Prévention du risque d'encéphalopathie spongiforme subaiguë transmissible - La revue du praticien N°49 (1999) 966 970

- J.M. ELSÉN, Y. AMIGUES, F. SCHELCHER, V. DUCROCQ, O. ANDREOLETTI, F. EYCHENNE, J.V. TIEN KHANG, J.P. POIVEY, F. LANTIER, J.L. LAPLANCHE
Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie : detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov – Arch Virol, 144 (1999) 431 445

- O. ANDREOLETTI, P. BERTHON, D. MARC, P. SARRADIN, J. GROSCLAUDE, L. VAN KEULEN, F. SCHELCHER, J.M. ELSÉN, F. LANTIER
Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie – J of General Virology, 81 (2000) 3115 3126

- J.D. FOSTER, D.W. PARNHAM, N. HUNTER, M. BRUCE
Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission - J of General Virology, 82 (2001) 2319 2326

- C. WEISSMANN, M. ENARI, P.C. KLOHN, D. ROSSI, E. FLECHSIG
Transmission of prions, PNAS Vol 99 (Dec 2002) 16378 16383

- O. ANDREOLETTI, C. LACROUX, A. CHABERT, L. MONNEREAU, G. TABOURET, F. LANTIER, P. BERTHON, F. EYCHENNE, S. BENESTAD, J.M. ELSÉN, F. SCHELCHER
PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie : influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission – J of General Virology, 83 (2002) 2607 2616

- Conference on methods for control of scrapie – 15 & 16 may 2003 – Oslo, NORWAY

- C. ERSDAL, M.J. ULVUND, S.L. BENESTAD, M.A. TRANULIS
Accumulation of pathogenic Prion Protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie – Vet. Pathology, 40 (2003) : 164 174

TeSeE™ Sheep/Goat

REINIGUNGS-KIT -  192

 3551165

NACHWEIS-KIT -  192

 3551166

KITS MIT REAGENZIEN FÜR DIE IN VITRO REINIGUNG UND DEN *IN VITRO* NACHWEIS VON PrP^{Sc} BEI SCHAFEN UND ZIEGEN

Innerhalb der Europäischen Union ist dieser Schnelltest für die Überwachung von TSE bei Schafen und Ziegen zugelassen, die gemäß Anhang X, Kapitel C der Verordnung der Europäischen Union (EC) No 999 / 2001, welche durch die Verordnung der Kommission (EC) No 253 / 2006 vom 14. Februar 2006 geändert wurde, durchgeführt wird.



16006891 - 2018/09

Bitte beachten Sie, dass in Deutschland bei Tätigkeiten mit Transmissibler Spongiformer Enzephalopathie (TSE) die Empfehlungen des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) zu beachten sind. Die Schutzmaßnahmen des Beschlusses 603 können von den Vorgaben dieser Gebrauchsinformation abweichen.

BIO-RAD

INHALTSVERZEICHNIS

1 - ALLGEMEINE INFORMATION

2 - TeSeE™ Sheep/Goat REINIGUNGS-KIT

- 2 - 1 Prinzip der Reinigung von PrP^{Sc}
- 2 - 2 Proben
- 2 - 3 Zusammensetzung des TeSeE™ Sheep/Goat Reinigungs-Kits
- 2 - 4 Vorbereitung der Reagenzien
- 2 - 5 Lagerung, Haltbarkeit
- 2 - 6 Testdurchführung
- 2 - 7 Verfahrensgrenzen

3 - TeSeE™ Sheep/Goat NACHWEIS-KIT

- 3 - 1 Prinzip der Bestimmung von PrP^{Sc} mittels EIA
- 3 - 2 Proben
- 3 - 3 Zusammensetzung des TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kits
- 3 - 4 Vorbereitung der Reagenzien
- 3 - 5 Lagerung, Haltbarkeit
- 3 - 6 Vorbereitung der Proben für die Bestimmung von PrP^{Sc} mittels EIA
- 3 - 7 Testdurchführung
- 3 - 8 Berechnung und Auswertung der Ergebnisse
- 3 - 9 Verfahrensgrenzen

4 - ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN

5 - VORSICHTSMASSNAHMEN

6 - HYGIENE- UND SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

7 - LITERATUR

1 - ALLGEMEINE INFORMATION

Übertragbare spongiforme Enzephalopathien (Transmissible Spongiform Encephalopathies [TSEs]) sind langsam fortschreitende degenerative Erkrankungen des Zentralnervensystems, die von einem unkonventionellen, übertragbaren Krankheitserreger, üblicherweise als Prion bezeichnet, verursacht werden.

Formen von TSE werden im Allgemeinen entsprechend ihrer Ätiologie in iatrogen, familiär und / oder sporadisch eingeteilt. Im 18. Jh. wurde die Scrapie beim Schaf beschrieben und deren Übertragung (einschließlich auf Ziegen) nachgewiesen. Allerdings bleiben die Ansteckungswege innerhalb von Herden unklar. Darüber hinaus wurden Formen von TSE bei Rotwild und Elchen (Chronic Wasting Disease = CWD) und Rindern (Bovine Spongiforme Enzephalopathie, BSE) beschrieben.

Auch Menschen sind für bestimmte Formen von TSE anfällig. Es gibt zwingende Beweise dafür, daß die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) wahrscheinlich durch den Verzehr von infiziertem Fleisch vom Rind auf den Menschen übergegangen ist.

Zusätzlich zu dieser Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) sind beim Menschen weitere Formen bekannt, u.a. Kuru sowie die iatrogene Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit.

Rein erbliche Formen (wie z.B. das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom [GSS]) und / oder sporadisch auftretende CJD wurden beim Menschen nachgewiesen, aber ihre Inzidenz ist gering. Es ist nicht bekannt, ob es beim Tier vergleichbare sporadisch auftretende TSE gibt.

Die Hauptmerkmale dieser Krankheiten sind:

- ein langsam fortschreitender aber immer tödlich endender Verlauf,
- Fehlen von konventionellen Krankheitserregern,
- progressive Ansammlung einer anomalen Isoform des natürlichen Prionproteins (PrP), die als PrP^{Sc} bezeichnet wird, im Zentralnervensystem. Diese Isoform ist durch besondere biochemische Eigenschaften und vor allem durch eine gesteigerte Widerstandsfähigkeit gegen Proteasen gekennzeichnet.

Die erstaunlich lange Inkubationszeit, die dem Auftreten von neurologischen Symptomen vorausgeht, läßt darauf schließen, daß wichtige Abläufe in der Pathogenese der TSE wahrscheinlich außerhalb des Nervensystems und besonders im peripheren Lymphgewebe stattfinden.

Trotz zahlreicher unbekannter Faktoren und / oder Unsicherheiten ist der Nachweis von PrP^{Sc} jetzt als Verfahren zur Bestätigung der Diagnose TSE anerkannt. Dieser Nachweis erfolgt hauptsächlich an Hand von post mortem gewonnenen Proben von Nervengewebe.

Auch in zahlreichen Lymphgeweben und Organen, wie z.B. in den Keimzentren der Milz, der Lymphknoten, der Mandeln und / oder von Schleimhaut-nahen Lymphgeweben (aber im Forschungsbereich), im Tiermodell oder in an Scrapie erkrankten Schafen, bei Rotwild und Elchen mit CWD und bei Patienten mit vCJD wurde anomales PrP^{Sc} nachgewiesen.

Die vom "Commissariat à l'énergie atomique - CEA" (französische Behörde für Atomenergie) entwickelten Reagenzien, die von Bio-Rad weiterentwickelt, hergestellt und vertrieben werden, ermöglichen die Bestimmung von PrP^{Sc} in Proben des Zentralen Nervensystems (ZNS) und in peripheren Geweben, die den zu testenden Tieren entnommen wurden.

Die Bestimmung umfaßt die folgenden Reaktionsschritte:

- **Reinigung von PrP^{Sc} (192 tests)**

Dieser Schritt erfolgt unter Verwendung folgender Reagenzien und folgenden Zubehörs:

- | | |
|---|-------------------|
| - TeSeE™ Sheep/Goat Reinigungs-Kit | Best.-Nr. 3551165 |
| - Spritze und Nadel für die Kalibration (x 200) | Best.-Nr. 3551174 |
| oder TSE Calibrat Syringe + Needle VITA (x 200) | Best.-Nr.12007909 |
| - Medium beads | Best.-Nr. 3551171 |

- **Nachweis von PrP^{Sc} (192 tests)**

Dieser Schritt erfolgt unter Verwendung folgender Reagenzien:

- | | |
|----------------------------------|-------------------|
| - TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kit | Best.-Nr. 3551166 |
|----------------------------------|-------------------|

TeSeE™ Sheep/Goat REINIGUNGS-KIT

Σ 192

REF 3551165

KIT MIT REAGENZIEN FÜR DIE *IN VITRO* REINIGUNG VON PrP^{Sc} BEI
SCHAFEN UND ZIEGEN

BIO-RAD

2-1 PRINZIP DER REINIGUNG VON PrP^{Sc}

Mit den Reagenzien des TeSeE™ Sheep/Goat Reinigungs-Kits ist die Reinigung, die Konzentrierung und das Solubilisieren von PrP^{Sc} aus Proben von infizierten Schafen und Ziegen möglich.

Die Behandlung der Proben umfaßt die folgenden Schritte:

- Homogenisieren der Proben
- Behandlung der Proben mit Proteinase K
- Reinigung und Konzentrierung des PrP^{Sc}
- Solubilisierung des PrP^{Sc} für die enzym-immunologische Analyse mit den Reagenzien aus dem TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kit.

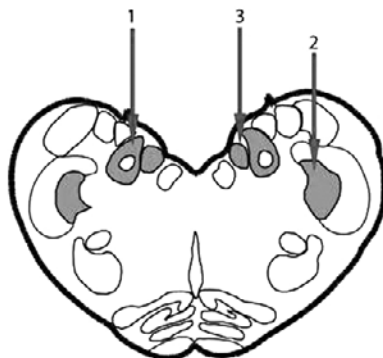
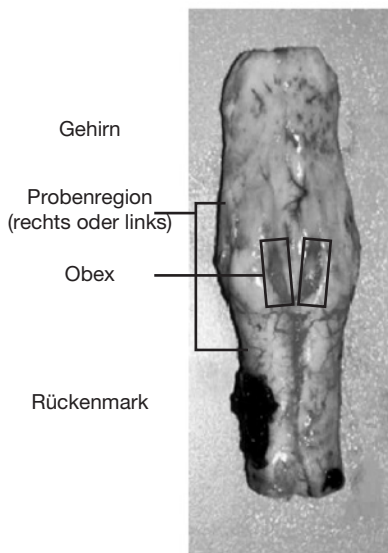
2-2 PROBEN

Die Reinigung von PrP^{Sc} erfolgt an Hand von Proben aus dem Zentralen Nervensystem (ZNS) oder aus peripherem Gewebe (Lymphknoten, Milz,...). Da PrP^{Sc} im Zentralnervensystem heterogen verteilt ist, müssen die Proben für einen optimalen Nachweis bevorzugt aus dem Bereich des Obex im Hirnstamm entnommen werden. Der Probenentnahmeföhrer für Schafe und Ziegen (Best.-Nr. 3551184) kann für die Entnahme sowohl von Hirnstamm als auch von Cerebellum eingesetzt werden.

Proben werden einzeln geschnitten und gewogen.

Anmerkung : andere Gewebe (Mandeln, Dünndarm, Augenlid...) nur für können Forschungszwecke verwendet werden.

Die Proben werden bei +2°C bis +8°C gelagert, wenn die Aufreinigung innerhalb von 24 Stunden erfolgt, oder sie lassen sich gefroren mehrere Monate aufbewahren. Sie können höchstens dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Bei einem eventuellen Transport müssen diese Proben entsprechend den aktuell geltenden, nationalen oder örtlichen, gesetzlichen Bestimmungen verpackt werden.



Querschnitt durch den Hirnstamm auf der Ebene des Obex, in dem die wichtigsten Zielstellen für eine histopathologische und immunohistochemische Diagnostik von BSE (Nucleus solitarius [1] und Trigemuskern V [2]) und von Scrapie (dorsaler Vagus Kern [3]) eingezeichnet sind.

(Quelle: OIE – Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals)

2-3 ZUSAMMENSETZUNG DES TeSeE™ Sheep/Goat REINIGUNGS-KITS

BEZEICHNUNG	ART DER REAGENZIEN	MENGE	LAGERUNG
Probenröhrchen	Probenröhrchen mit Keramikperlen in einer Pufferlösung Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	2 Beutel (2 x 96 Probenröhrchen)	+2°C bis +25°C
Reagenz 1	Denaturierungspuffer	1 Flasche (55 ml)	+2°C bis +8°C
Reagenz 2	Fällungspuffer Farbstoff: Bromphenolblau	1 Flasche (55 ml)	+2°C bis +25°C
Reagenz 3	Solubilisierungspuffer Farbstoff: Malachitgrün	1 Flasche (7 ml)	+2°C bis +25°C
PK	Proteinase K Farbstoff: Phenolrot	1 Flasche (0,5 ml)	+2°C bis 8°C

Bei dem Reagenz 2 und den Probenröhrchen handelt es sich um generische Komponenten. Diese können in allen Chargen des TeSeE™ sheep/goat Purification Kits verwendet werden.

2-4 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Mit Ausnahme von Proteinase K sind sämtliche in dem TeSeE™ Sheep/Goat Reinigungs-Kit enthaltenen Reagenzien gebrauchsfertig. Der Reagenz 1 ist der Verdünnungspuffer für die Proteinase K.
Die PK-Lösung ist auf folgende Weise herzustellen (4 µl Proteinase K auf 1 ml Reagenz 1):

ANZAHL DER PROBEN	REAGENZ 1	PROTEINASE K
2	1 ml	4 µl
10	3 ml	12 µl
18	5 ml	20 µl
26	7 ml	28 µl
34	9 ml	36 µl
42	11 ml	44 µl
50	13 ml	52 µl
58	15 ml	60 µl
66	17 ml	68 µl
74	19 ml	76 µl
82	21 ml	84 µl
90	23 ml	92 µl

Exaktes Pipettieren ist essentiell. Reste der Proteinase K aus der Pipettenspitze in Reagenz 1 durch mehrmaliges Ansaugen/Dispendieren ausspülen.
Nach der Herstellung die Lösung durch mehrmaliges Umdrehen des Röhrchens homogenisieren, bis eine gleichmäßig rötliche Lösung entstanden ist.

2-5 LAGERUNG, HALTBARKEIT

Die Reagenzien "Probenröhrchen, Reagenz 2 und Reagenz 3" des TeSeE™ Sheep/Goat Reinigungskits (Best.-Nr. 3551165) werden bei +2°C bis +25°C aufbewahrt. Reagenz 1 und die Proteinase K müssen bei +2°C bis +8°C gelagert werden. Bei diesen Temperaturen sind sämtliche Reagenzien bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatum haltbar (vor und nach dem Öffnen der Flaschen).

Wird die rekonstituierte Proteinase-K-Lösung nach dem Verdünnen bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) aufbewahrt, muß sie innerhalb von 6 Std. verbraucht werden.

2-6 TESTDURCHFÜHRUNG

Für die halbautomatische Durchführung des Reinigungsverfahrens siehe das Bedienungshandbuch für TeSeE™ NSP.

Ablauf der manuellen Durchführung:

1. Probenentnahme:

- Für Obex Proben entnimmt man eine Masse von 350 mg $\pm$ 40 mg Nervengewebe.
- Für Peripheres Gewebe (Mandeln, Ileum, Lymphknoten, Augenlider, Milz, ...), wird eine Keramikperle mittlerer Größe („Medium bead“, Ref: 3551171) vor Zugabe der Probe in das Probenröhrchen vorgelegt. Dann entnimmt man eine Gewebemasse von 200 mg $\pm$ 20 mg (bei Verwendung von Lymphknoten wird die Masse aus 2-3 unterschiedlichen Arealen des äußeren Cortex entnommen). Danach wird das Gewebe in 2-3 kleinere Stücke zerschnitten, bevor man es in das Probenröhrchen überführt.

Nun das Probenröhrchen fest verschließen und die Proben im Homogenisator zermahlen.

2. Zermahlen der Probe:

Anmerkung: Der TeSeE™ Precess 24™ kann nicht eingesetzt werden, wenn eine Keramikperle verwendet wird, da mit einem Auslaufen zu rechnen ist.

Die Probenröhrchen in den Aufsatz des Homogenisators (Ribolyser® oder TeSeE™ Precess 24™ or TeSeE™ Precess 48™ Systeme) setzen und die Geräte Einstellungen wie in der Tabelle unten angezeigt verwenden:

	Obex Proben		Lymphknoten	
	Ribolyser®	TeSeE™ Precess 48™ TeSeE™ Precess 24™	Ribolyser®	TeSeE™ Precess 48™
Zeit (sec.)	45		45	
Geschwindigkeit	6.5		6.5	
Zyklusanzahl	2	N/A	2	N/A
Programm	-	Programm 1	-	Programm 2

Falls die Proben nicht gründlich genug zermahlen sind, können 1 oder 2 weitere Schüttelzyklen durchgeführt werden, wobei sichergestellt sein muss, dass die Temperatur der Probenröhrchen zwischen den Zyklen wieder auf Raumtemperatur (+18°C bis +30°C), z.B. mit Hilfe von zerstoßenem Eis, sinkt. Zwischen 2 Schüttelzyklen, 5 Minuten warten, um das Gerät runterzukühlen.

3. Kalibrieren der Proben:

Die Probenröhrchen aus dem Homogenisator nehmen, das Homogenat durch Umdrehen der Probenröhrchen vor dem Öffnen wieder in Suspension bringen, und mit der Kalibrationsspritze (Best.-Nr. 3551174 oder Best.-Nr. 12007909) 250 µl entnehmen,

wobei die Nadel in das Perlenbett einzutauchen ist, um zu verhindern, daß Gewebestücke entnommen werden.

Jede Probe von 250 µl wird in ein 2 ml-Mikroreagenzröhrchen vom Typ Eppendorf gegeben.

Anmerkung:

In diesem Stadium können sowohl die Probenröhrchen nach dem Homogenisieren als auch die 2 ml-Röhrchen nach dem Kalibrieren verschlossen auch wie folgt aufbewahrt werden:

- bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) für eine Dauer von 8 Std.
- bei +2°C bis +8°C (im Eisbad oder im Kühlschrank) für eine Dauer von 15 Std.
- bei -20°C für eine Dauer von 1 Jahr. Gefrorene Proben müssen bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) aufgetaut werden. Die Proben können höchstens dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Die Proben müssen vor Gebrauch stets durch Invertieren durchmischt werden.

4. PK-Aufbereitung:

250 µl ($\pm 10\%$) der rekonstituierten Proteinase-K-Lösung in jedes 2 ml-Röhrchen verteilen (s. Abschnitt 2.4.), durchmischen und bei 37°C $\pm 2^\circ\text{C}$ in einem Heizblockinkubator für die Dauer von 10 ± 1 Min. inkubieren.

Werden Serien mit mehreren 2 ml-Röhrchen bearbeitet, sollte die Anzahl der 2 ml-Röhrchen an die verwendeten Gerätschaften angepasst werden (automatische Pipette / Ständer für 2 ml-Röhrchen), um zu verhindern, daß zwischen dem ersten und dem letzten 2 ml-Röhrchen Zeitabstände von mehr als 5 Min. für die Verteilung der rekonstituierten Proteinase-K-Lösung verstreichen. Nicht mehr als 2 Min. zwischen dem Durchmischen und dem Inkubieren bei 37°C vergehen lassen. Das Durchmischen sollte sofort nach dem Zusatz von Proteinase K erfolgen.

Das Durchmischen der verschlossenen 2 ml-Röhrchen geschieht durch mehrmaliges Invertieren (10x).

5. Ausfällen von PrP^{Sc} mit Reagenz 2:

Die 2 ml-Röhrchen aus dem Heizblockinkubator nehmen. Die 2 ml-Röhrchen öffnen und 250 µl ($\pm 10\%$) Reagenz 2 in jedes 2 ml-Röhrchen geben. Gut durchmischen bis eine gleichmäßig blaue Färbung entsteht. Dieselbe Reihenfolge beim Verteilen einhalten wie unter Schritt 4.

Nicht mehr als 2 Min. zwischen dem Entnehmen aus dem Inkubator und dem Durchmischen verstreichen lassen.

Das Durchmischen erfolgt unter denselben Bedingungen wie unter Schritt 4.

6. Konzentrierung von PrP^{Sc} (Zentrifugieren):

Anschließend oder nach max. 30 min. Wartezeit die 2 ml-Probenröhrchen bei 20°C für eine Dauer von 5 Min. bei 20.000 g oder für eine Dauer von 7 Min. bei 15.000 g zentrifugieren (Trommelrotor).

7. Aufarbeitung des Niederschlages:

Den Überstand nach dem Zentrifugieren durch Abschütten über einem Abfallbehälter entfernen.

Die 2 ml-Probenröhrchen umgedreht für eine Dauer von 5 Min. auf saugfähiges Papier stellen und so trocknen.

25 µl ($\pm 10\%$) Reagenz 3 in jedes 2 ml-Röhrchen geben.

Nicht mehr als 10 Min. zwischen dem Abschluß des Trocknungsvorgangs und dem Zugeben von Reagenz 3 verstreichen lassen.

Umgehend für eine Dauer von 5 ± 1 Min. bei 100°C $\pm 5^\circ\text{C}$ inkubieren. Nicht mehr als 2 Min. zwischen dem Zugeben von Reagenz 3 und dem Beginn der Inkubation verstreichen lassen.

Die 2 ml-Röhrchen aus dem Inkubator nehmen und mittels eines Mischgerätes vom Typ Vortex für 5 Sek. ± 2 Sek. homogenisieren.

Die Proben können für eine Dauer von 5 Std. bei +2°C bis +8°C oder gefroren für eine Dauer von 72 Std. bei -20°C aufbewahrt werden. Eingefrorene Proben müssen vor Weiterverwendung bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) aufgetaut und anschließend erneut mittels Vortex (5 Sek. ± 2 Sek.) durchmischt werden.

Das genaue Verfahren für den Nachweistest bitte der Packungsbeilage im TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kit (Best.-Nr. 3551166) entnehmen.

Bezüglich Empfehlungen zu Risiken und Vorsichtsmaßnahmen in Zusammenhang mit einigen Chemikalien in diesem Testkit sind das/die Piktogramm(e) auf den Etiketten und die Angaben am Ende der Gebrauchsanweisung zu beachten. Das Sicherheitsdatenblatt ist auf www.bio-rad.com erhältlich.

2-7 VERFAHRENSGRENZEN

Beim Homogenisierungsschritt der Proben (2.6.2) können Schwierigkeiten auftreten, wenn getrocknete oder aus peripherem Gewebe entnommene Proben verwendet werden. Bei dieser Art von Proben muss der Homogenisierungsschritt ggf. mehrmals wiederholt werden. Zwischen 2 Schüttelzyklen, 5 Minuten warten.

TeSeE™ Sheep/Goat NACHWEIS-KIT

Σ 192

REF 3551166

KIT MIT REAGENZIEN FÜR DEN *IN VITRO* NACHWEIS VON PRP^{SC} NACH
AUFREINIGUNG BEI SCHAFEN UND ZIEGENS

BIO-RAD

3-1 PRINZIP DER BESTIMMUNG VON PrP^{Sc} MITTELS EIA

Bei dem TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kit handelt es sich um eine enzymimmunologische Technik (nach der Sandwichmethode), für die 2 monoklonale Antikörper zum Nachweis des anormalen Prionenproteins verwendet werden, die gegen Proteinase K in Proben von infizierten Schafen und Ziegen resistent sind. Ein Kit enthält ausreichend Reagenzien für 192 Tests (inkl. der Kontrollen).

Die Festphase besteht aus 12 Streifen mit 8 Vertiefungen aus Polystyrol, die mit dem ersten Antikörper beschichtet sind. Der zweite monoklonale Antikörper ist an Peroxidase gebunden.

Die Bestimmung umfasst folgende Reaktionsetappen:

1. Verteilung der negativen (R3) und positiven (R4) Kontrollen und der, mit den Reagenzien aus dem TeSeE™ Sheep/Goat Reinigungs-Kit (Best.-Nr. 3551165) vorbereiteten Proben in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Diese Verteilung kann durch Sichtkontrolle überprüft werden, denn der Farbunterschied zwischen einer leeren Vertiefung und einer Vertiefung mit Probe ist deutlich erkennbar.
2. Inkubation.
3. Waschen, dann Zugabe des Peroxidase-markierten Antikörpers. Diese Verteilung kann ebenfalls aufgrund des Farbunterschiedes zwischen einer leeren Vertiefung und einer Vertiefung mit Konjugatlösung einer Sichtkontrolle unterzogen werden.
4. Inkubation.
5. Waschen, dann Entwickeln der enzymatischen Aktivität der Festphase durch Zugabe von Substrat.
6. Stoppen der Enzymaktivität, Ablesen der Extinktion bei 450 nm - 620 nm (bichromatischer Modus) und Auswertung der Ergebnisse.

3-2 PROBEN

Der Test kann nur an Proben von gereinigtem PrP^{Sc} durchgeführt werden, die aus den entsprechenden Geweben entnommen und mit den Reagenzien aus dem TeSeE™ Sheep/Goat Reinigungs-Kit (Best.-Nr. 3551165) und gemäß den Gebrauchsanweisungen aus diesem Kit vorbereitet wurde.

Die gereinigten Proben müssen mit Reagenz R6 aus dem TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kit verdünnt werden.

3-3 ZUSAMMENSETZUNG DES TeSeE™ Sheep/Goat NACHWEIS-KITS

BEZEICHNUNG	ART DER REAGENZIEN	MENGE
R1	Mikrotiterplatte: 12 Streifen mit 8 mit einem monoklonalen Anti-PrP-Antikörper beschichteten Vertiefungen	2 Platten
R2	Waschlösung: Tris-NaCl-Puffer pH 7,4 in 10-facher Konzentrierung Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,01%)	1 Flasche (250 ml)
R3	Negativkontrolle: PBS-Puffer pH 7,2, mit BSA supplementiert Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	1 Flasche (4 ml)
R4	Positivkontrolle: Serum aus Ziegen. Lyophilisiert Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	1 Flasche (2 ml)
R6	Probenverdünnungsmittel: PBS-Puffer pH 7,2, mit BSA und Phenolrot versetzt Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	1 Flasche (35 ml)
R7	Konjugat: Peroxidase-markierter monoklonaler Anti-PrP-Antikörper in 10-facher Konzentrierung in PBS-Puffer pH 7,1, mit bovinem Protein versetzt und mit Phenolrot gefärbt Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	1 Flasche (2,7 ml)
R8	Peroxidase-Substratpuffer: Lösung aus Zitronensäure und Natriumacetat pH 4,0 mit 0,015% H ₂ O ₂ und 4% Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 Flasche (60 ml)
R9	Chromogen: Tetramethylbenzidinlösung (TMB)	1 Flasche (5 ml)
R10	Stopplösung: Schwefelsäure, 1N	1 Flasche (28 ml)
	Klebefolien	8

Bei den nachfolgenden Reagenzien handelt es sich um generische Komponenten: Probenverdünnungsmittel (R6), Waschlösung (R2), Peroxidase-Substratpuffer (R8), Chromogen (R9) und Stopplösung (R10). Diese können in allen Chargen des TeSeE™ Sheep/Goat Detection Kits verwendet werden.

3-4 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Die Reagenzien aus dem TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kit vor Gebrauch über einen Zeitraum von 30 Min. auf Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) erwärmen lassen.

1- Gebrauchsfertige Reagenzien

Mikrotiterplatten (R1):

Vor dem Öffnen des Vakuum-verpackten Beutels, die Mikrotiterplatte in ihrer Schutzpackung auf Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) erwärmen lassen, um eine Ansammlung von Kondenswasser in den Vertiefungen zu vermeiden. An der Schweißnaht öffnen, und die nicht gebrauchten Reihen sofort in die Verpackung zurückgeben.

Den Beutel nach Entfernen von Luft dicht verschließen und bei +2°C bis +8°C aufbewahren.

Die Negativkontrolle (R3), die Probenverdünnungslösung (R6) und die Stopplösung (R10) sind gebrauchsfertig.

2- Herzustellende Reagenzien

Waschlösung (R2):

Die Waschlösung R2 1 :10 mit destilliertem Wasser oder aqua bidest. verdünnen (z.B. 100 ml Reagenz R2 in 900 ml destilliertem Wasser).

Positivkontrolle (R4):

Die Flasche mit der Positivkontrolle R4 behutsam auf die Arbeitsfläche klopfen, um jegliche an dem Gummistopfen hängende Substanz zu lösen. Die Flasche öffnen und den Inhalt in 2 ml Verdünnungslösung R6 auflösen. Die Flasche wieder verschließen und ca. 1 Min. stehen lassen, wobei der Inhalt gelegentlich behutsam durchmischt wird, um das Auflösen zu erleichtern.

Konjugat (R7):

Reagenz R7 im Verhältnis 1:10 in der frisch hergestellten Waschlösung verdünnen (z.B. 0,1 ml Reagenz R7 in 0,9 ml wiederhergestellter Waschlösung), und dabei beachten, daß für einen Streifen 1 ml gebrauchsfertiges Konjugat erforderlich und ausreichend ist. Behutsam durchmischen, den Einsatz eines Vortex-Schüttlers vermeiden.

Enzymatische Entwicklungslösung (R8 + R9):

Reagenz R9 im Verhältnis 1:11 im Reagenz R8 verdünnen (z.B. 0,1 ml Reagenz R9 in 1 ml Reagenz R8), und dabei beachten, daß für einen Streifen 1,1 ml enzymatische Entwicklungslösung erforderlich und ausreichend ist. Behutsam durchmischen, den Einsatz eines Vortex-Schüttlers vermeiden.

3-5 LAGERUNG, HALTBARKEIT

Das Kit bei +2°C bis +8°C aufbewahren; bei dieser Temperatur sind sämtliche Reagenzien bis zu dem auf dem Kit angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Nach der Zubereitung haben die Reagenzien die folgende Haltbarkeit:

BEZEICHNUNG	ART DER REAGENZIEN	HALTBARKEIT
R1	Mikrotiterplatte in fest verschlossener Verpackung	1 Monat bei +2°C bis +8°C
R2	Verdünnte Waschlösung	24 Stunden bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) 2 Wochen bei +2°C bis +8°C
R4	Verdünnte Positivkontrolle (verdünnt mit Reagenz R6)	2 Stunden bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) 4 Stunden bei +2°C bis +8°C 6 Monate bei -20°C Es empfiehlt sich, die rekonstituierte Lösung in Aliquote zu je 0,5 ml aufzuteilen und diese umgehend bei -20°C zu lagern. Die Lösung kann max. dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden.
R7	Verdünnte Konjugatlösung (in verdünnter Waschlsg.)	8 Stunden bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C)
R8 + R9	Entwicklungslösung	6 Stunden bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) unbedingt im Dunkeln lagern

3-6 VORBEREITUNG DER PROBEN FÜR DIE BESTIMMUNG VON PrP^{Sc} MITTELS EIA

Die Proben aus Schritt 2.6 der Aufreinigung müssen mit 125 µl Reagenz R6 verdünnt werden. Die Probe unmittelbar vor dem Auftragen auf die Platte (R1) mit einem Vortex-Schüttler durchmischen (5 sek. ± 2 sek.).

3-7 TESTDURCHFÜHRUNG

Ablauf der manuellen Durchführung:

1. Den Ständer für die Mikrotiterplatte und die erforderliche Anzahl von Reihen (R1) aus der Schutzpackung entnehmen. Die nicht gebrauchten Reihen mit dem Trocknungsmittel zurück in die Verpackung der Mikrotiterplatte geben und diese fest verschließen.
2. Die Positivkontrolle (R4) gemäß 3.4.2. vorbereiten.
3. Für jeden Testansatz und jede Platte entsprechend dem folgenden Schema , 100 µl (± 10%) Kontrolle/Proben in die Vertiefungen verteilen:
 - Vertiefung A1, B1, C1, D1: Negativkontrolle (R3)
 - Vertiefung E1, F1: Positivkontrolle (R4)
 - Vertiefung G1, H1, usw.: Reagenz (R6) verdünnte Probe
 Alle Proben werden in Einfachbestimmung untersucht.
4. Mit Klebefolie abdecken und für eine Dauer von 75 Min. ± 15 Min. bei 37°C ± 2°C inkubieren.
5. Die Waschlösung (R2) vorbereiten.
6. Die Konjugatlösung vorbereiten (R7).
7. Die Klebefolie entfernen und 3 Waschzyklen durchführen.

Optimale Waschbedingungen werden mit Bio-Rad Waschgeräten für Mikrotiterplatten vom Typ PW40, PW41 oder 1575 mit dem Programm TSE 3 erzielt.
Die Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschzyklus nicht länger als 5 Min. stehen lassen.
Vor dem nächsten Schritt durch Umdrehen auf saugfähigem Papier trocknen.

8. 100 µl ($\pm 10\%$) Konjugatlösung (R7) in jede Vertiefung geben.
9. Mit Klebefolie abdecken und für eine Dauer von 60 Min. $\pm$ 5 Min. bei $+2^{\circ}\text{C}$ bis $+8^{\circ}\text{C}$ inkubieren.
10. Die enzymatische Entwicklungslösung (R8+R9) vorbereiten.
11. Die Klebefolie entfernen und 5 Waschzyklen unter denselben Bedingungen wie unter Schritt 7 beschrieben durchführen.
Optimale Waschbedingungen werden mit Bio-Rad Waschgeräten für Mikrotiterplatten vom Typ PW40, PW41 oder 1575 mit dem Programm TSE 5 erzielt.
Die Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschzyklus nicht länger als 5 Min. stehen lassen.
Vor dem nächsten Schritt durch Umdrehen auf saugfähigem Papier trocknen.
12. 100 µl ($\pm 10\%$) Entwicklungslösung (R8+R9) in jede Vertiefung geben und die Mikrotiterplatte im Dunkeln und bei Raumtemperatur ($+18^{\circ}\text{C}$ bis $+30^{\circ}\text{C}$) für eine Dauer von 30 Min. $\pm$ 5 Min. inkubieren. Während dieser Inkubation keine Klebefolie verwenden.
13. 100 µl ($\pm 10\%$) Stopplösung (R10) in jede Vertiefung geben, und zwar nach demselben Schema und derselben Verteilungsgeschwindigkeit wie bei der Entwicklungslösung.
14. Den Boden der Mikrotiterplatte gründlich abwischen und die optische Dichte bei 450 nm - 620 nm (bichromatischer Modus) innerhalb von 30 Min. nach dem Stoppen der Reaktion bestimmen (die Reihe muß vor dem Ablesen ständig vor Licht geschützt bleiben).

Waschparameter für Mikrotiterplatten

NAME: TSE 3

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	T8 (PW40/1575) 2*8 (PW41)	1,234, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0,3	800	2,5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	3	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0,3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NAME: TSE 5

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	T8 (PW40/1575) 2*8 (PW41)	1,234, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0,3	800	2,5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	5	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0,3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

PLATTENNAME: FLAT 01 (PW40/PW41) - FLAT 03 (1575)

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

3-8 BERECHNUNG UND AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

1) Berechnung der mittleren Extinktion (DE) der negativen Kontrollen:

$\overline{OD\ R3}$ = Mittelwert der 4 Extinktionswerte der negativen Kontrollen R3 (OD = optische Dichte)

2) Berechnung des Grenzwerts:

Zum Mittelwert der R3 **0,140** hinzufügen, um den Grenzwert zu erhalten.

Beispiel:

$\overline{OD\ R3} = 0,020$

Grenzwert = $0,020 + 0,140 = 0,160$

3) Bedingungen für die Testvalidierung

• Negative Kontrollen (R3):

a) Validierung der einzelnen Werte der negativen Kontrollen:

Der Wert jeder einzelnen negativen Kontrolle muss niedriger als **0,100** Extinktionseinheiten liegen.

Allerdings kann höchstens ein einzelner abweichender Wert eliminiert werden, wenn sein Wert gleich oder höher ist als **0,100** Extinktionseinheiten

Der Test muß wiederholt werden, wenn mehr als ein einzelner Wert für die negativen Kontrollen außerhalb dieses oben angegebenen Grenzwertes liegt.

b) Homogenität der Werte für die negativen Kontrollen:

Aus den verbleibenden einzelnen Werten für die negativen Kontrollen wird der Durchschnittswert berechnet.

Einzelne Werte größer + 40% im Vergleich zum Durchschnittswert aller Werte ($\overline{OD\ R3} + 40\%$) müssen eliminiert werden.

- Falls ein einzelner Wert in a) eliminiert wurde, so kann ein weiterer Wert in b) eliminiert werden.

- Falls kein Wert für die negativen Kontrollen in a) eliminiert wurde, so können höchstens zwei Werte in b) eliminiert werden.

Der Test muß wiederholt werden, wenn mehr als zwei Werte für die negativen Kontrollen eliminiert wurden [Kriterium a)+b)].

• Positive Kontrolle (R4):

Der Mittelwert der optischen Dichten der beiden positiven Kontrollen ($\overline{OD\ R4}$) muß höher oder gleich **0,8** sein. Der Test muß in jedem Fall wiederholt werden, wenn der Mittelwert der positiven Kontrollen unter diesem Grenzwert liegt.

4) Auswertung der Ergebnisse

Proben mit einer optischen Dichte unterhalb des Grenzwertes gelten als negativ im Sinne des TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kits.

Allerdings sind Ergebnisse, die knapp unterhalb des Grenzwertes liegen (Grenzwert minus 10%) mit Vorsicht auszuwerten, und die entsprechenden Proben sollten, ausgehend vom ursprünglichen Homogenat im Doppelansatz erneut getestet werden.

Proben mit einer optischen Dichte oberhalb oder gleich dem Grenzwert gelten als ursprünglich reaktiv im Sinne des TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kits und sollten, ausgehend vom ursprünglichen Homogenat im Doppelansatz erneut getestet werden.

Nach Wiederholung des Tests gilt eine Probe als positiv im Sinne des TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kits, wenn mindestens eine der beiden Messungen positiv ist (größer oder gleich dem Grenzwert).

Die Probe gilt als negativ im Sinne des TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kits, wenn die beiden Werte niedriger als der Grenzwert sind.

Im Doppelansatz getestete Proben, die im Sinne des TeSeE™ Sheep/Goat, Nachweis-Kits als negativ gelten, für die aber einer der beiden Werte nahe an dem Grenzwert liegen (Grenzwert minus 10%), sind mit Vorsicht auszuwerten.

3-9 VERFAHRENSGRENZEN

Ein negatives Ergebnis bedeutet, daß die getestete Probe keine durch das TeSeE™ Sheep/Goat Nachweis-Kit nachweisbare PrP^{Sc} enthält. Da sehr niedrige Konzentrationen an PrP^{Sc} allerdings dem Nachweis entgehen können, schließt ein solches negatives Ergebnis die Möglichkeit einer Infektion nicht aus.

Jede Probe, welche ein reproduzierbares, positives Ergebnis gemäß den Auswertekriterien des Tests aufweist, muß im jeweiligen Nationalen Referenzlabor für TSEs oder in Ausnahmefällen im Referenzlabor der EU bestätigt werden.

4 - ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN

- Destilliertes oder vollständig entionisiertes Wasser (ultrapur).
- 20 000 ppm Natriumhypochloritlösung (Endkonzentration) und 1M Natriumhydroxid (Endkonzentration).
- Saugfähiges Papier.
- Einmalhandschuhe.
- Schutzbrille oder Schutzmaske mit Visier.

Reinigungsschritt:

- Mikro-Probenröhrchen zu 2 ml vom Typ Eppendorf aus Polypropylen mit Verschlußkappen und einem entsprechenden Röhrchenständer.
- Automatisch oder halbautomatisch einstellbare Pipetten, mit denen sich Volumen zwischen 20 µl und 500 µl verteilen lassen.
- Gewebehomogenisator: Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ oder TeSeE™ PRECESS 48™.*
- Zentrifuge, passend für die 2 ml-Röhrchen.*
- Einen Inkubator für 2 ml-Röhrchen mit einem auf 37°C ± 2°C eingestellten Thermostat und einen Inkubator für 2 ml-Röhrchen mit einem auf 100°C ± 5°C eingestellten Thermostat.*

Für die halbautomatische Reinigung der Probe: SystemTeSeE™ NSP.

Nachweisschritt:

- Automatisch oder halbautomatisch einstellbare Pipetten, mit denen sich Volumen zwischen 50 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl verteilen lassen.
- Messzylinder zu 10 ml, 20 ml und 100 ml.
- Behälter für infektiöse Abfälle
- Inkubator für Mikrotiterplatten mit einem auf 37°C ± 2°C eingestellten Thermostat*.
- Kühlzelle mit +2°C bis +8°C.
- Automatisches und halbautomatisches Waschesystem für Mikrotiterplatten*.
- Ablesegerät für Mikrotiterplatten (mit Filtern zu 450 nm und 620 nm ausgestattet)*.
- Mikrotiterplatten-System für die Automatisierung der einzelnen Abschnitte des Testprotokolls. Die Funktionsweise des Systems bei der Abarbeitung des Tests muß mit den Bedingungen des Testprotokolls übereinstimmen.*

** Bitte kontaktieren Sie Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung um eine Liste der verfügbaren Geräte zu erhalten.*

5 - VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Qualität der Ergebnisse hängt von der Einhaltung der folgenden Prinzipien der Guten Laborpraxis ab:

- Reagenzien bei +2°C bis +8°C lagern (der Reagenzien Reagenz 2, Reagenz 3 und R2 sowie die Probenröhrchen können bei +2°C bis +25°C gelagert werden).
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Die rekonstituierte und bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) aufbewahrte Proteinase K im Zeitraum von 6 Stunden verwenden.
- Reagenzien von Kits mit unterschiedlichen Chargen-Nr. nicht für denselben Testansatzmischen oder kombinieren, mit Ausnahme der Reagenzien R2, R6, R8, R9, R10, Probenröhrchen und Reagenz 2.
- R2, R6, R8, R9, R10 und Probenröhrchen können mit anderen Kits der TeSeE™ Produktlinie verwendet werden.
- Reagenzien vor Gebrauch über einen Zeitraum von 30 Min. auf Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) erwärmen lassen.
- Reagenzien sorgfältig ansetzen und dabei jegliche Verunreinigung vermeiden.
- Den Test nicht in Gegenwart von reaktiven Dämpfen (Säuren, Basen, Aldehyden) oder Staub, die die Enzymaktivität des Konjugats beeinträchtigen könnten, durchführen.
- Ausschließlich Probenröhrchen aus Polypropylen verwenden.
- Gründlich gewaschene und in destilliertem Wasser gereinigte Artikel aus Glas oder vorzugsweise Einmalmaterialien verwenden.
- Die Mikrotiterplatte zwischen dem Abschluß eines Waschvorgangs und der Verteilung der nächsten Reagenzien nicht länger als 5 Minuten trocknen lassen.
- Die Enzymreaktion ist gegen Metalle und Metallionen jeglicher Art sehr empfindlich. Dementsprechend dürfen die verschiedenen Lösungen, die das Konjugat oder das Substrat enthalten, nicht in Kontakt mit Metallelementen gebracht werden.
- Die Entwicklungslösung (Substratpuffer und Farbbildner) müssen farblos sein. Tritt wenige Minuten nach der Herstellung der Entwicklungslösung eine Farbreaktion auf, bedeutet dies, daß das Reagenz nicht verwendet werden darf und durch ein neues Reagenz ersetzt werden muß. Die Entwicklungslösung sollte vorzugsweise in Plastikbehältern zum Einmalgebrauch oder in, zuvor in 1 N HCl gewaschenen und in destilliertem Wasser gereinigten und getrockneten Materialien oder Glasartikeln zubereitet werden. **Diese Lösung unbedingt im Dunkeln aufbewahren.**
- Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden.
- Das Waschen der Vertiefungen ist ein wesentlicher Schritt des Verfahrens: die empfohlene Anzahl von Waschzyklen einhalten und sicherstellen, daß die Vertiefungen zunächst vollständig gefüllt und anschließend vollständig geleert werden. Unkorrektes Waschen kann zu unkorrekten Ergebnissen führen.
- Für die Verteilung des Konjugats und der Entwicklungslösung niemals denselben Behälter und dieselbe Pipette verwenden.
- Das Vorhandensein von Kristallen in Reagenz 1 beeinflusst nicht die Leistung des Reagenz. Die Kristalle lösen sich nach wenigen Minuten bei Raumtemperatur (+18°C zu +30°C).
- Reagenz 2 kann leicht blau gefärbt aussehen. Dies beeinflusst nicht die Leistung des Reagenz.

6 - HYGIENE- UND SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

Die Maßnahmen zur biologischen Sicherheit, die Hygiene- und Sicherheitsvorkehrungen und die Regeln der Guten Laborpraxis müssen den jeweils geltenden Richtlinien der nationalen Behörden entsprechen.

- Sämtliche Reagenzien des Kits sind zum Gebrauch für die in vitro Diagnostik bestimmt.
- Bei der Handhabung der Reagenzien und der Proben Einmalhandschuhe tragen und anschließend die Hände gründlich waschen.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Behälter aus Polypropylen verwenden, um Verletzungen durch zerbrochenes Glas vorzubeugen.
- Sämtliche Materialien, die in direkten Kontakt mit den Proben und den Waschlösungen kommen, gelten als kontaminiert.
- Das Verspritzen von Proben oder von Proben-haltigen Lösungen vermeiden.
- Kontaminierte Arbeitsflächen müssen mit 20 000 ppm Natriumhypochlorit-Lösung gereinigt werden. Handelt es sich bei der kontaminierenden Flüssigkeit um eine Säure, müssen die Arbeitsflächen zunächst mit Natriumhydroxid neutralisiert werden, bevor Bleiche verwendet wird. Arbeitsflächen sind mit destilliertem Wasser zu reinigen, mit Äthanol zu trocknen und mit saugfähigem Papier abzuwischen. Die für die Säuberung verwendeten Materialien müssen in einem speziellen Abfallbehälter als kontaminierte Abfälle entsorgt werden.
- Proben, Arbeitsmaterialien und kontaminierte Produkte sind zu entsorgen, nachdem sie wie folgt dekontaminiert wurden:
 - entweder durch Einweichen in 1 M (Endkonzentration) Natriumhydroxid für eine Dauer von 1 h bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C),
 - oder durch Einweichen in 20 000 ppm Natriumhypochlorit-Lösung für eine Dauer von 1 h bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C),
 - oder durch Behandlung im Autoklaven bei mindestens 134°C für eine Dauer von mindestens 18 Min. und mit einem Druck von 3 bar.

Anmerkung: Lösungen, die Natriumhypochlorit-Lösung enthalten, nie im Autoklaven behandeln oder Reagenz 2.

- Sämtliche Aktivitäten im Zusammenhang mit Screeninguntersuchungen für die übertragbare spongiforme Enzephalopathie (TSE) unterliegen gesetzlichen Bestimmungen und sind in einem Labor mit einem isolierten Bereich mit begrenztem und kontrolliertem Zugang durchzuführen, der ausschließlich für diese Aktivitäten bestimmt ist. Für die Sicherheit des Bedienungspersonals sind Laborkittel, Überschuhe, Handschuhe, Schutzmaske mit Visier oder eine einfache Schutzmaske mit Sicherheitsglas zu tragen.
- Das Bedienungspersonal muß besonders im Hinblick auf die von den Krankheitserregern von TSE oder Prionen ausgehenden Gefahren sowie die anerkannten Verfahren zur Dekontaminierung von unkonventionellen Krankheitserregern geschult sein. Die Maßnahmen zur biologischen Sicherheit müssen den jeweils geltenden Richtlinien der nationalen Behörden entsprechen.
- Jeglichen Kontakt des Substratpuffers, des Farbbildners und der Stopplösung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- Sämtliche Waschlösungen, Waschrückstände oder andere Flüssigkeiten, die biologische Proben enthalten, vor deren Entsorgung neutralisieren und / oder im Autoklaven behandeln

Bezüglich Empfehlungen zu Risiken und Vorsichtsmaßnahmen in Zusammenhang mit einigen Chemikalien in diesem Testkit sind das/die Piktogramm(e) auf den Etiketten und die Angaben am Ende der Gebrauchsanweisung zu beachten. Das Sicherheitsdatenblatt ist auf www.bio-rad.com erhältlich.

7 - LITERATUR

- R.K MEYER, M.P. McKINLEY, K.A. BOWMAN, M.B. BRAUNFELD, R.A. BARRY, S.B. PRUSINER
Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 83 (April 1986) : 2310 2314
- D. SERBAN, A. TARABOULOS, S.J. DE ARMOND, S.B. PRUSINER
Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins – Neurology, 40 (1990) 110 117
- F. TAGUCHI, Y. TAMAI, K. UCHIDA, R. KITAJIMA, H. KOJIMA, T. KAWAGUCHI, O. OHTANI, S. MIURA
Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent – Arch Virol (1991) 119 :297 301
- D.R. ERNST, R.E. RACC
Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods – J of Virol Methods, 41 (1993) 193-202
- Y. MURAMATSU, A. ONODERA, M. HORIUCHI, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA
Detection of PrP^{Sc} in sheep at the preclinical stage of scrapie and its significance for diagnosis of insidious infection – Arch Virol (1993) 134 : 427 432
- D.M. TAYLOR, H. FRASER, I. McCONNEL, D.A. BROWN, K.L. BROWN, K.A. LAMZA, G.R.A SMITH
Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie – Arch Virol (1994) 139 : 313 326
- Z.HUANG, J.M. GABRIEL, M.A. BALDWIN, R.J. FLETTERICK, S.B. PRUSINER, F.E. COHEN
Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 91 (july 94) : 7139 7143
- M. HORIUCHI, N. YAMAZAKI, T. IKEDA, N. ISHIGURO ; M. SHINAGAWA
A cellular form of prion protein exists in many non-neuronal tissues of sheep – J of General Virology 76 (1995) 2583 2587
- KAI-UWE D. GRATHWOHL, M. HORIUCHI, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA
Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrP^{Sc} in crude tissue extracts from scrapie-affected mice – J of Virol Methods, 64 (1997) : 205 216
- JP DESLYS
Les maladies à prions - Pour la science N°19, avril 1998
- JP DESLYS
Prévention du risque d'encéphalopathie spongiforme subaiguë transmissible - La revue du praticien N°49 (1999) 966 970

- J.M. ELSEN, Y. AMIGUES, F. SCHELCHER, V. DUCROCQ, O. ANDREOLETTI, F. EYCHENNE, J.V. TIEN KHANG, J.P. POIVEY, F. LANTIER, J.L. LAPLANCHE
Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie : detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov – Arch Virol, 144 (1999) 431 445
- O. ANDREOLETTI, P. BERTHON, D. MARC, P. SARRADIN, J. GROSCLAUDE, L. VAN KEULEN, F. SCHELCHER, J.M. ELSEN, F. LANTIER
Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie – J of General Virology, 81 (2000) 3115 3126
- J.D. FOSTER, D.W. PARNHAM, N. HUNTER, M. BRUCE
Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission - J of General Virology, 82 (2001) 2319 2326
- C. WEISSMANN, M. ENARI, P.C. KLOHN, D. ROSSI, E. FLECHSIG
Transmission of prions, PNAS Vol 99 (Dec 2002) 16378 16383
- O. ANDREOLETTI, C. LACROUX, A. CHABERT, L. MONNEREAU, G. TABOURET, F. LANTIER, P. BERTHON, F. EYCHENNE, S. BENESTAD, J.M. ELSEN, F. SCHELCHER
PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie : influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission – J of General Virology, 83 (2002) 2607 2616
- Conference on methods for control of scrapie – 15 & 16 may 2003 – Oslo, NORWAY
- C. ERSDAL, M.J. ULVUND, S.L. BENESTAD, M.A. TRANULIS
Accumulation of pathogenic Prion Protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie – Vet. Pathology, 40 (2003) : 164 174

(BG)	• Този продукт съдържа човешки или животински компоненти. Бъдете внимателни при работа с него.
(CN)	• 本产品包含人/动物成分，请小心处理。
(CN) Traditional	• 本產品包含人/動物成分，請小心處理。
(CZ)	• Tento výrobek obsahuje lidské nebo zvířecí komponenty. Zacházejte s ním opatrně.
(DE)	• Dieses Produkt enthält Bestandteile menschlichen oder tierischen Ursprungs. Vorsichtig handhaben.
(DK)	• Dette produkt indeholder humane og animalske komponenter. Skal behandles med forsigtighed.
(EE)	• Käesolev toode sisaldab inim- või loomseid komponente. Käsitleda ettevaatlikult.
(EN)	• This product contains human or animal components. Handle with care.
(ES)	• Este producto contiene componentes humanos o animales. Manejar con cuidado.
(FI)	• Tässä tuotteessa on ihmistä tai eläimistä peräisin olevia osia. Käsittele varovasti.
(FR)	• Ce produit contient des composants d'origine humaine ou animale. Manipuler avec précaution.
(GR)	• Αυτό το προϊόν περιέχει ανθρώπινα ή ζωικά στοιχεία. Χειριστείτε το με προσοχή.
(HR)	• Ovaj proizvod sadrži ljudske ili životinjske sastojke. Pažljivo rukovati.
(HU)	• A készítmény emberi vagy állati eredetű összetevőket tartalmaz. Óvatosan kezelendő.
(IT)	• Questo prodotto contiene componenti umane o animali. Maneggiare con cura.
(JP)	• 本製品にはヒトまたは動物由来の構成成分が含まれます。取り扱いにご注意下さい。
(KR)	• 본 제품은 사람 또는 동물 유래의 성분이 포함되어 있습니다. 취급에 주의하시기 바랍니다.
(LT)	• Šiame produktė yra žmogiškosios arba gyvūninės kilmės sudėtiniai. Elgtis atsargiai.
(MT)	• Dan il-prodott fih komponenti umani jew tal-annimali. Uża b'attenzjoni.
(NL)	• Dit product bevat menselijke of dierlijke bestanddelen. Breekbaar.
(NO)	• Dette produktet inneholder humane eller animalske komponenter. Håndteres med forsiktighet.
(PL)	• Niniejszy produkt zawiera składniki pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego. Należy obchodzić się z nim ostrożnie.
(PT)	• Este medicamento contém componentes de origem humana ou animal. Manuseie com cuidado.
(RO)	• Acest produs conține materiale de origine umană sau animală. Manevrați-l cu grijă.
(SE)	• Denna produkt innehåller beståndsdelar från människa eller djur. Hantera produkten varsamt.
(SI)	• Izdelek vsebuje človeške ali živalske sestavine. Rokujte previdno.
(SK)	• Tento výrobok obsahuje ľudské alebo zvieracie zložky. Narábajte s ním opatrne.



H314 - H317 - H226 - H318 - H315 - H302

H334 - H335 - H336 - H412

P210 - P261 - P280 - P305+P351+P338

P301+P330+P331 - P302+P352 - P333+P313

P273 - P501

(BG)

опасно

Причинава тежки изгаряния на кожата и сериозно увреждане на очите. Може да причини алергична кожна реакция. Запалими течност и пари. Предизвиква сериозно увреждане на очите. Предизвиква дразнене на кожата. Вреден при поглъщане. Може да причини алергични или астматични симптоми или затруднения в дишането при вдихане. Може да предизвика дразнене на дихателните пътища. Може да предизвика съвместимост или световъртеж. Вреден за водните организми, с дълготраен ефект.

Да се пази от топлина. Тютюнопушенето е забранено. Избягвайте вдишване на прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промийте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължавайте да промивате. ПРИ ПОГЛЪЩАНЕ: изплезнете устата. НЕ предизвиквайте повръщане. ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно със сапун и вода. При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ. Да се избягва изпускане в околната среда. Изхвърлете съдържанието/контейнера в съответствие с местните/регионалните/националните/международните разпоредби.

(CN)

危险

引起严重的皮肤灼伤和眼睛损伤。可能引起皮肤过敏反应。易燃液体和蒸气。引起严重的眼睛损伤。引起皮肤刺激。吞咽有害。吸入可能引起过敏或哮喘症状或呼吸困难。可刺激呼吸道。可引致睡意或眩晕。对水生生物有害并且有长期持续影响。

远离热源/火花/明火/热表面。禁止吸烟。避免吸入粉尘/烟/气体/烟雾/蒸气/喷雾。戴防护手套/穿防护服/戴防护眼罩/戴防护面具。如进入眼睛：用水小心冲洗几分钟。如戴隐形眼镜并可方便地取出，取出隐形眼镜。继续冲洗。如误吞咽：漱口。不要诱导呕吐。如皮肤沾染：用大量肥皂和水清洗。如发生皮肤刺激或皮疹：求医/就诊。避免释放到环境中。按照本地/地区/国家/国际惯例处理内容物/容器。

(CN) Traditional

危险

引起严重的皮肤灼伤和眼睛损伤。可能引起皮肤过敏反应。易燃液体和蒸气。引起严重的眼睛损伤。引起皮肤刺激。吞咽有害。吸入可能引起过敏或哮喘症状或呼吸困难。可刺激呼吸道。可引致睡意或眩晕。对水生生物有害并且有长期持续影响。

远离热源/火花/明火/热表面。禁止吸烟。避免吸入粉尘/烟/气体/烟雾/蒸气/喷雾。戴防护手套/穿防护服/戴防护眼罩/戴防护面具。如进入眼睛：用水小心冲洗几分钟。

如戴隐形眼镜并可方便地取出，取出隐形眼镜。继续冲洗。如误吞咽：漱口。不要诱导呕吐。如皮肤沾染：用大量肥皂和水清洗。如发生皮肤刺激或皮疹：求医/就诊。避免释放到环境中。按照本地/地区/国家/国际惯例处理内容物/容器。

(CZ)

Nebezpečí

Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Může vyvolat alergickou kožní reakci. Hořlavá kapalina a páry. Způsobuje vážné poškození očí. Dráždí kůži. Zdraví škodlivý při požití. Při dýchování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže. Může způsobit podráždění dýchacích cest. Může způsobit ospalost nebo závratě. Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. Chraňte před teplem/jiskrami/otevřeným plamenem/horkými povrchy. Zákaz kouření. Zamezte dýchání prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. PŘI POŽITÍ: Vypláchněte ústa. NEVYVOLÁVEJTE zvracení. PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla. Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Obsah/nádoba likvidujte v souladu s místními/regionálními/národními/mezinárodními předpisy.

(DE)

Gefahr

Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Flüssigkeit und Dampf entzündbar. Verursacht schwere Augenschäden. Verursacht Hautreizungen. Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Kann die Atemwege reizen. Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen. BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Entsorgung des Inhalts / des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen / internationalen Vorschriften.

(DK)

Fare

Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader. Kan forårsage allergisk hudreaktion. Brandfarlig væske og damp. Forårsager alvorlig øjenskade. Forårsager hudirritation. Farlig ved indtagelse. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Kan forårsage irritation af luftvejene. Kan forårsage sløvhed eller svimmelhed. Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.

Holdes væk fra varme/gnister/åben ild/varme overflader. Rygning forbudt. Undgå indånding af pulver/rog/gas/tåge/damp/spray. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsesøjelensbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse VED KONTAKT MED

ÕJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skyning. I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Skyl munden. Fremkald IKKE opkastning. **VED KONTAKT MED HUDEN:** Vask med rigeligt sæbe og vand. Ved hudirritation eller udslet: Søg lægehjælp. Undgå uledning til miljøet. Bortskaffelse af indholdet/beholderen i henhold til de lokale/regionale/nationale/internationale forskrifter.

(EE) **Ettevaatus**

Põhjustab rasket nahasõõvitus ja silmakahjustusi. Võib põhjustada allergilist nahareaktsiooni. Tulehtlik vedelik ja aur. Põhjustab raskeid silmakahjustusi. Põhjustab nahaärritust. Allaneelamisel kahjulik. Sissehingamisel võib põhjustada allergia- või astma sümptomeid või hingamisraskusi. Võib põhjustada hingamisteede ärritust. Võib põhjustada unisust või peapööritust. Ohtlik veoorganismidele, pikaajaline toime. Hoida eemal soojusallikast/sädemetest/lekidest/kuumadest pindadest. Mitte suitsetada. Vältida tolmu/suitsu/gaasi/udu/auru/pihustatud aine sissehingamist. Kanda kaitsekindaid/kaitserõvastust/kaitseprille/kaitsemaski. **SILMA SATTUMISE KORRAL:** loputada mitme minuti jooksul ettevaatlikult veega. Eemaldada kontaktläätsed, kui neid kasutatakse ja kui neid on kerge eemaldada. Loputada veel kord. **ALLANEELAMISE KORRAL:** loputada suud. **MITTE** kutsuda esile oksendamist. **NAHALE SATTUMISE KORRAL:** pesta rohke vee ja seebiga. Nahaärrituse või _obe korral: pöörduda arsti poole. Vältida sattumist keskkonda. Sisu/konteineri kätlus vastavuses kohalike/regionaalsete/rahvuslike/rahvusvaheliste nõuetega.

(EN) **Danger**

Causes severe skin burns and eye damage. May cause an allergic skin reaction. Flammable liquid and vapour. Causes serious eye damage. Causes skin irritation. Harmful if swallowed. May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled. May cause respiratory irritation. May cause drowsiness or dizziness. Harmful to aquatic life with long lasting effects. Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. No smoking. Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting. IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. Avoid release to the environment. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

(ES) **Peligro**

Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Líquidos y vapores inflamables. Provoca lesiones oculares graves. Provoca irritación cutánea. Nocivo en caso de ingestión. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Puede irritar las vías respiratorias. Puede provocar somnolencia o vértigo. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. Mantener alejado de fuentes de calor/chispas/lama abierta/superficies calientes. No fumar. Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. Llevar guantes que aislen del frío/gas/máscara. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de

contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagarse la boca. No provocar el vómito. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. Evitar su liberación al medio ambiente. Eliminar el contenido o el recipiente conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional.

(FI) **Vaara**

Voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion. Sytyttävä neste ja höyry. Vaurioittaa vakavasti silmiä. Ärsyttää ihoa. Haitallista nieltynä. Voi aiheuttaa hengitettynä allergia- tai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Saattaa aiheuttaa hengitysteiden ärsytystä. Saattaa aiheuttaa uneliaisuutta ja huimausta. Haitallista vesieläimille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. Suojaa lämmöltä/kipinöiltä/avotulelta/kuumilta pinnoilta. Tupakointi kielletty. Vältä pölyn/savun/kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvosuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhdo huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, _edical voi tehdä helposti. Jatka huutomista. JOS KEMIKAALIA ON NIELTY: Huuhdo suu. El saa oksennuttaa. JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOHLE: Pese runsaalla vedellä ja saippualla. Jos ilmenee ihoärsytystä tai ihottumaa: Hakeudu lääkäriin. Vältettävä päästämistä ympäristöön. Säilytä säiliö(t) noudattaen paikallisia/alueellisia/kansallisia/kansainvälisiä määräyksiä.

(FR) **Danger**

Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Peut provoquer une allergie cutanée. Liquide et vapeurs inflammables. Provoque des lésions oculaires graves. Provoque une irritation cutanée. Nocif en cas d'ingestion. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires. Peut provoquer somnolence ou vertiges. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. EN CAS D'INGESTION: rincer la bouche. NE PAS faire vomir. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon. En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin. Éviter le rejet dans l'environnement. Éliminer le contenu/réceptient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

(GR)

Κίνδυνος
Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση. Υγρό και ατμοί εύφλεκτα. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής. Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού. Μπορεί να προκαλέσει υπνηλία ή ζάλη. Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς,

με μακροχρόνιες επιπτώσεις.

Μακριά από θερμότητα/στινήθρες/γυμνές φλόγες/θερμές επιφάνειες. Μην καπνίζετε. Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για ταμάρτια/πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φρακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: Ξεπλύνετε το στόμα. ΜΗΝ προκαλέσετε εμετό. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό και σαπούνι. Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε/γιατρό. Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον. Απορρίψτε τα περιεχόμενα/δοχείο σύμφωνα με τους τοπικούς/εθνικούς/διεθνείς κανονισμούς.

(HR)

Opasnost

Uzrokuje teške opekline kože i ozljede oka. Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Zapalja tekućina i para. Uzrokuje teške ozljede oka. Nadražuje kožu. Štetno ako se proguta. Ako se udiše može izazvati simptome alergije ili astme ili poteškoće s disanjem. Može nadražiti dišni sustav. Može izazvati pospanost ili vrtoglavicu. Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima.

Čuvati odvojeno od topline/iskre/otvorenog plamena/vrućih površina. – Ne pušiti. Izbjegavati udisanje prašine/dima/plina/magle/pare/aerosola. Nositi zaštitne rukavice/zaštitnu odjeleg/zaštitu za oči/zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ukoliko ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. AKO SE PROGUTA: ispirati usta. NE izazivati povraćanje. U SLUČAJU DODIRA S KOŽOM: oprati velikom količinom sapuna i vode. U slučaju nadražaja ili osipa na koži: zatražiti savjet/pomoć liječnika. Izbjegavati ispuštanje u okoliš. Odložite sadržaje /spremnike u skladu s lokalnim/regionalnim/nacionalnim/međunarodnim odredbama.

(HU)

Veszély

Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis. Allergiás bőrreakciók válthat ki. Tűzveszélyes folyadék és gőz. Súlyos szemkárosodást okoz. Bőrirritáló hatású. Lenyelve ártalmas. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Légúti irritációt okozhat. Álmosságát vagy szédülést okozhat. Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.

Hőforró/szikráto/nyílt lángtól/forró felületektől távol tartandó. Tilos a dohányzás. Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. BEMÉLYES KÉRÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés kell. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. LENYELÉS ESETÉN: a száját ki kell öblíteni. TILOS hánytatni. HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő szappanos vízzel. Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni. Kerülni kell az anyagnak a környezetre való kijutását. Az edény tartalmát / a tartályt a helyi/regionális/nemzeti/nemzetközi szabályozásoknak megfelelően kell hulladékként elhelyezni.

(IT)

Pericolo

Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Può provocare una reazione allergica cutanea. Liquido e vapori infiammabili. Provoca gravi lesioni oculari. Provoca irritazione

cutanea. Nocivo se ingerito. Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. Può irritare le vie respiratorie. Può provocare sonnolenza o vertigini. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Tenere lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici riscaldate. Non fumare. Evitare di respirare la polvere/fumi/gas/la nebbia/vapori/gli aerosol. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. Non provocare il vomito. IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone. In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. Non disperdere nell'ambiente. Smettere il prodotto/recipiente in conformità con le disposizioni locali / regionali / nazionali / internazionali.

(JP)

危険

重篤な皮膚の薬傷及び眼の損傷。アレルギー性皮膚反応を起こすおそれ。引火性液体及び蒸気。重篤な眼の損傷。皮膚刺激。飲み込むと有害。吸入するとアレルギー、ぜん（喘）息又は呼吸困難を起こすおそれ。呼吸器への刺激のおそれ。眼又はめままいのおそれ。長期継続の影響によって水生生物に有害。

熱/火花/裸火/高温のもののような着火源から遠ざけること。禁煙。粉じん/煙/ガス/ミスト/蒸気/スプレーの吸入を避けること。保護手袋/保護衣/保護眼鏡/顔保護面の着用。眼に入った場合: 水で数分間注意深く洗うこと。次にコンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は外すこと。その後も洗浄を続けること。飲み込んだ場合: 口をすすぐこと。無理に吐かせないこと。皮膚に付着した場合: 多量の水と石けん（鹸）で洗うこと。皮膚刺激又は発しん（疹）が生じた場合: 医師の診断/手当てを受けること。環境への放出を避けること。現地/地域/国/国際規定に従い内容物/容器の露出。

(KR)

위험

피부에 심한 화상과 눈에 손상을 일으킴 알레르기성 피부 반응을 일으킬 수 있음. 인화성 액체 및 증기. 눈에 심한 손상을 일으킴. 피부에 자극을 일으킴, 심각한 유해함. 흡입시 알레르기성 반응, 천식 또는 호흡 곤란을 일으킬 수 있음. 호흡기를 자극을 일으킬 수 있음. 줄을 또는 헝거증을 일으킬 수 있음. 장기적인 영향에 의해 수생생물에 유해함. 알-스파크-화염-고열로부터 멀리하십시오 - 급연. (분진-흙-가스-미스트-증기-스프레이)의 흡입을 피하십시오. (보충장갑-보호의-보안경-안전보호구)를(을) 착용하십시오. 모든 문헌 몇 분간 물로 조심해서 씻으십시오. 가능하면 콘택트렌즈를 제거하십시오. 계속 씻으십시오. 상쾌하다면: 입을 씻어내십시오. 토하게 하러 가지 마십시오. 피부에 닿으면 다양한 비누와 물로 씻으십시오. 피부자극성 또는 홍반이 나타나면 의학적인 조치-조언을 구하십시오. 환경으로 배출하지 마십시오. 현지/지역/국가/국제규정에 따라서 내용물/용기 노출.

(LT)

Pavojinga

Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis. Gali sukelti alerginę odos reakciją. Degūs skystis ir garai. Smarkiai pažeidžia akis. Dirgina odą. Kenksminga prarijus. Įkvėpus gali sukelti alerginę reakciją, astmos simptomus arba apsinkeinti kvėpavimą. Gali dirginti kvėpavimo takus. Gali sukelti mieguistumą arba galvos svaigimą. Kenksminga vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus.

Laikyti atokiau nuo šilumos šaltinių/žiežirbų/atviros liepsnos/karštų paviršių. Nerūkyti. Stengtis neįkvėpti dulkių/dūmų/dujų/rūko/garų/aerolio. Mūvėti apsaugines pirštines/dėvėti apsauginius drabužius/naudoti akių (veido) apsaugos priemonės. PATEKUS Į AKIS: Kelias minutes atsargiai plauti

vandeni. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. PRARIJUS: išsklauti burną. NESKATINTI vėmimo. PATEKUS ANT ODOS: Nuplauti dideliu kiekiu muilo ir vandens. Jeigu sudirginama oda arba ja išberia: kreiptis į gydytoją. Saugoti, kad nepatektų į aplinką. Turinį/talpą išpilti (išmesti) - šalinti pagal vietines / regionines / nacionalines / tarptautines taisykles.

(NL)

Gevaar

Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Ontvlambare vloeistof en damp. Veroorzaakt ernstig oogletsel. Veroorzaakt huidirritatie. Schadelijk bij inslikken. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken. Kan slaperigheid of duizeligheid veroorzaken. Schadelijk voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen. Verwijderd houden van warmte/vonken/open vuur/hete oppervlakken. Niet roken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden. Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen. BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen. NA INSLIKKEN: de mond spoelen - GEEN braken opwekken. BIJ CONTACT MET DE HUID: met veel water en zeep wassen. Bij huidirritatie of uitslag: een arts raadplegen. Voorkom lozing in het milieu. De inhoud en de verpakking verwerken volgens de plaatselijke/regionale/nationale/internationale voorschriften.

(NO)

Fare

Forårsaker alvorlige hudforbrenninger og øyeskader. Kan forårsake allergiske hudreaksjoner. Brennbar væske og damp. Forårsaker alvorlige øyeskader. Irriterer huden. Helsekader ved svelging. Kan forårsake allergi, astmalignende symptomer eller pusteproblemer ved innånding. Kan irritere luftveiene. Kan forårsake døshighet og ørhet. Skadelig for vannlevende organismer, langtidsvirkning. Holdes adskilt fra varme. Ikke røyk. Unngå innånding av støv/ røyk/gass/sprøytetåke/damp/aerosol. Bruk vernehansker/ verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. Ved CONTACT MED ØYENNE: Skyll forsiktig med vann i opptil flere minutter. Fjern evt. kontaktlinser såfremt dette er lett mulig. Fortsett skyllingen. Ved SVELGING: Skyll munnen. IKKE fremkall brekninger. Ved HUDKONTAKT: Vask med store mengder vann og såpe. Ved hudirritasjon eller -utslett: Kontakt / tilkall lege. Unngå utslipp til miljøet. Innholdet / emballasjen skal avhendes i henhold til de lokale / regionale / nasjonale / internasjonale forskrifter.

(PL)

Niebezpieczeństwo

Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. Może powodować reakcję alergiczną skóry. Łatwopalna ciecz i pary. Powoduje poważne uszkodzenie oczu. Działa drażniaco na skórę. Działa szkodliwie po połknięciu. Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. Może powodować podrażnienie dróg oddechowych. Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy. Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. Przechowywać z dala od źródeł ciepła/iskrzienia/otwartego ognia/gorących powierzchni. Palenie wzbronione. Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć

soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. W PRZYPADKU POŁKNIECIA: wypłukać usta. NIE wywoływać wymiotów. W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody z mydłem. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnać porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. Unikać uwolnienia do środowiska. Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z przepisami miejscowymi / regionalnymi / narodowymi / międzynarodowymi.

(PT)

Perigo

Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Líquido e vapor inflamáveis. Provoca lesões oculares graves. Provoca irritação cutânea. Nocivo por ingestão. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Pode provocar irritação das vias respiratórias. Pode provocar sonolência ou vertigens. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Manter afastado do calor/da faísca/da chama aberta/das superfícies quentes. Não fumar. Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito. SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. Evitar a libertação para o ambiente. Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com a legislação local/regional/nacional/internacional.

(RO)

Pericol

Provoacă arsuri grave ale pielii și lezarea ochilor. Poate provoca o reacție alergică a pielii. Lichid și vaporii inflamabili. Provoacă leziuni oculare grave. Provoacă iritarea pielii. Nociv în caz de înghițire. Poate provoca simptome de alergie sau astm sau dificultăți de respirație în caz de inhalare. Poate provoca iritarea căilor respiratorii. Poate provoca somnolență sau amețeală. Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung.

A se păstra departe de surse de căldură/scântei/flăcări deschise/suprafețe încinse. Fumatul interzis. Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/cea a vaporii/spray-ul. Purtați măști de protecție/imbrăcămintă de protecție/echipament de protecție a ochilor/chipament de protecție a feței. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. ÎN CAZ DE ÎNGHIȚIRE: clătiți gura. NU provocați vomă. ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: spălați cu multă apă și săpun. În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: consultați medicul. Evitați dispersarea în mediu. Aruncați conținutul/containerul în acord cu regulamentele locale/regionale/nationale/internaționale.

(SE)

Fara

Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon. Kan orsaka allergisk hudreaktion. Brandfarlig vätska och ånga. Orsakar allvarliga ögonskador. Irriterar huden. Skadligt vid förtäring. Kan orsaka allergi- eller astmasymtom eller andningssvårigheter vid inandning. Kan orsaka irritation i luftvägarna. Kan göra att man blir dåsig eller ömtöknad. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Får inte utsättas för värme/gnistor/öppen låga/heta ytor.

Rökning förbjuden. Undvik att inandas damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. VID FÖRTÄRING: Skölj munnen. Framkalla INTE kräkning. VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten. Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp. Undvik utsläpp till miljön. Innehållet / behållaren avfallshanteras enligt lokala / regionala / nationella / internationella föreskrifter.

(SI)

Nevarno

Povzroča hude opekline kože in poškodbe oči. Lahko povzroči alergijski odziv kože. Vnetljiva tekočina in hlapi. Povzroča hude poškodbe oči. Povzroča draženje kože. Zdravju škodljivo pri zaužitju. Lahko povzroči simptome alergije ali astme ali težave z dihanjem pri vdihavanju. Lahko povzroči draženje dihalnih poti. Lahko povzroči zaspanost ali omotico. Škodljivo za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki.

Hraniti ločeno od vročine/isker/odprtega ognja/vročih površin. Kajenje prepovedano. Ne vdihavati prahu/dima/plina/meglice/hlapov/razpršila. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščitno za oči/zaščitno za obraz. PRI STIKU Z OČMI: previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. PRI ZAUŽITJU: izprati usta. NE izzvati bruhanja. PRI STIKU S KOŽO: umiti z veliko mila in vode. Če nastopi draženje kože ali se pojavi izpuščaj: poiščite zdravniško pomoč/oskrbo. Preprečiti sproščanje v okolje. Vsebinsko/vsebnik odstranite v skladu z lokalnimi/regionalnimi/narodnimi/mednarodnimi predpisi.

(SK)

Nebezpečenstvo

Provoacă arsuri grave ale pielii și lezarea ochilor. Poate provoca alergickú kožnú reakciu. Horľavá kvapalina a pary. Spôsobuje vážne poškodenie očí. Dráždi kožu. Škodlivý po požití. Pri vdýchnutí môže vyvolať alergiu alebo príznaky astmy, alebo dýchacie ťažkosti. Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest. Môže spôsobiť ospalosť alebo závraty. Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.

Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite. Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. PO POŽITÍ: vypláchnite ústa. Nevyvolávajte zvracanie. PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom vody a mydla. Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvorí vyrážky: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia. Zneškodnenie obsahu/obalu v súlade s miestnymi/oblastnými/národnými/medzinárodnými nariadeniami.

Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France

Tel.: +33 (0)1 47 95 60 00

Fax: +33 (0)1 47 41 91 33

www.bio-rad.com



2018/09
16006891