

## PrioWESTERN BSE Kit

Ensayo para la detección *in vitro* de la PrP<sup>Sc</sup> relacionada con las EETs

Número de Catálogo PR12000

N.º de Pub. MAN0013788 Rev. A.0

Dentro de la Unión Europea, este ensayo está aprobado como test rápido para el programa de detección de la EEB en vacuno, el cual ha sido establecido de acuerdo al Reglamento (CE) No 999/2001.

**¡ADVERTENCIA!** Lea las hojas de datos de seguridad (SDS) y siga las instrucciones de manipulación. Lleve el equipo de protección individual (EPI) adecuado (gafas, ropa, guantes). Las hojas de datos de seguridad (SDS) se encuentran disponibles en [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

**¡ADVERTENCIA! POSIBLE RIESGO BIOLÓGICO.** Lea la información sobre seguridad frente a los riesgos biológicos en la página de este producto en [thermofisher.com](http://thermofisher.com). Lleve el equipo de protección individual (EPI) adecuado (gafas, ropa, y guantes)

Los productores de tests rápidos de TSE deben tener establecido un sistema de control de calidad aprobado por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EURL), el cual asegure que el protocolo de trabajo del test no es modificado. Los métodos de toma de muestras así como las posibles modificaciones del test rápido o del protocolo del mismo (incluida la toma de muestras) deben llevarse a cabo solamente tras notificación preliminar al EURL y sólo se concederá a condición de que el EURL concluya que dicha modificación no reduce la sensibilidad, la especificidad o la fiabilidad del ensayo rápido. Una vez obtenida la aprobación del EURL, los detalles de la modificación deberán ser comunicados a la Comisión y a los Laboratorios Nacionales de Referencia de la Unión Europea.

### Introducción

Hay distintos tejidos de un animal infectado con priones que contienen una forma modificada, patológica, de la proteína priónica, PrP.

La forma alterada de la proteína priónica, asociada a la enfermedad, se denomina PrP<sup>Sc</sup> (isoforma específica del scrapie de la PrP), o bien PrP<sup>EBB</sup>. La isoforma normal de la PrP se denomina PrP<sup>C</sup> (forma celular de la PrP).

La PrP<sup>Sc</sup> y la PrP<sup>EBB</sup> se diferencian de la PrP normal en su resistencia a las proteasas. Con el tratamiento con Proteinasa K se degrada la forma normal de la PrP, mientras que la PrP<sup>Sc</sup> o bien la PrP<sup>EBB</sup> ven reducido su tamaño original de 32–35 kD a 27–30 kD. El fragmento aún existente resistente a la proteasa PrP<sup>Sc</sup>/PrP<sup>EBB</sup> se llama PrP 27–30.

El Applied Biosystems™ PrioWESTERN BSE Kit alcanza su alta precisión y fiabilidad, debido a que considera tres criterios analíticos independientes: resistencia a la proteasa, patrón de glicosilación y el menor peso molecular del fragmento resistente a la proteasa PrP<sup>Sc</sup> (27–30 kD) en comparación con la PrP no digerida.

Debido a las características específicas de las soluciones tampón y a la alta afinidad del anticuerpo, el test puede llevarse a cabo directamente con homogeneizados de tejidos y combina la fiabilidad del método Western-Blot con una corta duración del test, necesaria en caso de un muestreo en masa. El PrioWESTERN BSE Kit fue el primer test rápido para EEB aprobado en 1998 por las autoridades suizas. En 1999 fue oficialmente reconocido por la UE como el único test con el 100% de sensibilidad y el 100% de especificidad sin necesidad de otro ensayo confirmatorio.

En el estudio de sensibilidad analítica realizado en 2009 por el Laboratorio Central de Referencia (CRL), se concluyó que PrioWESTERN BSE Kit funciona en un rango de inferioridad máximo de 2 log<sub>10</sub> cuando se compara con el test más sensible.

El ensayo ha sido validado y certificado como APTO por la OIE, tras el análisis de expertos, para los siguientes fines:

APTO para diagnóstico post-mortem de la encefalopatía espongiforme bovina en ganado vacuno para:

1. Confirmación de animales sospechosos o casos clínicos (incluye confirmación de positivos en screening);
2. Estimación de la prevalencia de infección para análisis de riesgo (sondeos/sistemas de salud en rebaños/control de enfermedad, ej. vigilancia, ejecución de medidas de control de la enfermedad) y para asistencia en la demostración de la eficiencia de políticas de control;
3. Confirmación de resultados no negativos obtenidos con diferentes tipos de ensayos en programas de vigilancia activos.

### Principio del ensayo

Tras la toma y registro de las muestras, éstas se analizan con el ensayo inmunocromatográfico PrioWESTERN BSE Kit. El PrioWESTERN BSE Kit sigue un protocolo de 5 pasos, consistentes en la homogeneización, la digestión con la proteasa, la electroforesis en gel, transferencia y la detección inmunológica. Una sola persona puede procesar 100 muestras en duplicado en 6–8 horas.

Se toma una muestra de la médula oblongada de la región del óbex en el tronco cerebral, se registra y se homogeneiza. El tratamiento con proteinasa K destruye por completo la PrP<sup>C</sup> mientras que la PrP<sup>Sc</sup> se ve reducida al fragmento 27–30 kD. Se interrumpe la reacción proteolítica y la PrP<sup>Sc</sup> se detecta mediante el ensayo PrioWESTERN BSE Kit.

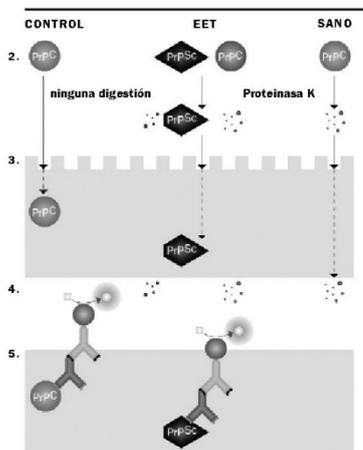
Los homogeneizados digeridos se corren en un gel de electroforesis y se transfieren a una membrana. Posteriormente, se incuba dicha membrana con un anticuerpo monoclonal - de elevada afinidad por la PrP - para la detección de la PrP<sup>Sc</sup> resistente a la proteasa. La señal se visualiza mediante un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (FA).

#### 1. TOMA DE MUESTRAS + HOMOGENEIZACIÓN



### Componentes del kit (Continúa en la página siguiente)

Kit para 100 muestras (Determinaciones por duplicado). Conserve el kit a 5±3°C hasta su fecha de vencimiento. La caducidad de todos los componentes no abiertos es de 1 año a partir de la fecha de fabricación. La fecha concreta de caducidad se indica en la etiqueta de cada kit. La estabilidad de los componentes diluidos, abiertos o reconstituídos se indica más abajo.



Componente	Descripción
1: Tampón de homogeneización (5x)	Concentrado 5x, diluir antes del uso. Un frasco, con 200 mL de tampón de homogeneización concentrado 5x. Preparar la solución de trabajo de homogeneización 1x mezclando una parte del tampón de homogeneización (5x) con 4 partes de agua purificada. Caducidad de la solución de trabajo de homogeneización: 1 semana a 5±3°C.
2: Tampón de digestión (1x) [Color del tapón: amarillo]	Listo para usar. Un frasco con 4 mL de tampón de digestión.
3: Proteinasa K [Color del tapón: blanco]	Listo para usar. Un frasco con 4 mL de proteinasa K para la digestión de la PrP <sup>C</sup> normal durante la digestión con proteasa.
4: Solución de parada de la digestión (1x) [Color del tapón: rojo]	Listo para usar. Un frasco con 4 mL de inhibidor de la proteinasa K para interrumpir la actividad proteolítica de la proteinasa K. Caducidad: 12 meses a 5±3°C.
5: Muestra de control	Listo para usar. Un frasquito contiene 200 µL de una mezcla de Control funcional (PrP <sup>C</sup> normal sin digerir) y marcadores de peso molecular (97/66/45/30/20/14 kD) en tampón de muestra PAGE. Mezclar antes de usar, por ejemplo dando ligeros golpes al tubo.
6: Tampón para muestras PAGE (1x)	Listo para usar. Un frasco con 25 mL de tampón para muestras para la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). [Contiene 2-mercaptoetanol. Los frascos abiertos liberan un mal olor. Sin embargo, si 100 frasquitos son abiertos simultáneamente en una sala aireada normalmente, la concentración en el aire no alcanza el límite de 0.65 mg/m <sup>3</sup> de exposición ambiental en el lugar de trabajo definido por la Asociación Americana de Higiene Industrial].

Componente	Descripción
7: Tampón de bloqueo PVDF concentrado (5x)	Concentrado 5x, diluir antes de usar. Un frasco con 100 mL de tampón de bloqueo concentrado 5x para bloquear sitios de unión inespecíficos. Diluir con agua purificada hasta un volumen final de 500 mL.
8: 1. Anticuerpo 6H4	Un frasco con 30 µL de anticuerpo monoclonal 6H4 anti-PrP (IgG1 anti-PrP de ratón). Dilución de trabajo: 1:5000. (Si no se halla todo el líquido en la base del envase, puede centrifugarse).
9: 2. Anticuerpo FA	Un frasco con 30 µL de anticuerpo cabra-anti IgG ratón-FA (un anticuerpo contra IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina). Dilución de trabajo: 1:5000. (Si no se halla todo el líquido en la base del envase, puede centrifugarse).
10: Tampón de luminiscencia concentrado (10x)	(Concentrado 10x, diluir antes de usar). Un frasco contiene 27 mL de tampón de luminiscencia concentrado 10x. Antes de usar diluir con agua purificada hasta 270 mL.
Contenido adicional del kit	<ul style="list-style-type: none"> <li>Instrucciones de uso del kit</li> <li>Etiquetas adicionales para la solución de trabajo</li> </ul>

## Material adicional necesario

A menos que se indique lo contrario, todos los materiales están disponibles en **thermofisher.com**. Los puntos marcados en **negrita** han sido validados para su uso con PrioWESTERN BSE Kit. El empleo de elementos diferentes cae bajo la responsabilidad del usuario.

Uso	Descripción
General	Equipos de laboratorio acordes con las normativas de seguridad de cada país. <ul style="list-style-type: none"> <li>Agua purificada; equivalente, al menos, al agua de grado 3 según lo definido por la norma ISO 3696: 1987 [E].</li> <li>Pipeta monocal (1–10 µL)</li> <li>Pipeta monocal (10–100 µL)</li> <li>Pipeta monocal (100–1000 µL)</li> <li>Pipeta monocal (1–5 mL)</li> <li>Pipeta multicanal (0.5–10 µL)</li> <li>Pipeta multicanal (10–100 µL)</li> <li>Puntas de pipeta [según la recomendación del fabricante de las pipetas]</li> <li>Reservorios para reactivos</li> <li>Tubos cónicos de 15 mL</li> <li>Tubos cónicos de 50 mL</li> </ul>
Homogeneización	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bisturís y pinzas</li> <li>Balanza</li> <li>Dispensador para la solución de trabajo de homogeneización.</li> <li>Microplaca de 96 pocillos de 1.2 mL (empleada como placa madre de las muestras homogeneizadas).</li> <li><b>PrioGENIZER™</b> (equipo de homogeneización con seis racks y una bandeja [N.º de Cat. PR10000] y recipientes de homogeneización <b>PrioCLIP™</b> [N.º de Cat. PR10010]. o bien</li> <li>Equipo de homogeneización <b>FASTH/FASTH2/MediFASTH</b> y recipientes de homogeneización <b>Prypcon</b> (Syntec International) o bien</li> <li><b>Omni Tissue Homogenizer</b> (TH115, TH220) y <b>Soft Tissue Omni Tip™ Plastic Homogenizing Probes</b> (32750) (Omni International)</li> </ul>
Digestión	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microplacas de 96 pocillos (pocillos 0.2 mL; se utilizan como placas de digestión)</li> <li>Tapas Selladoras</li> <li>Incubador de microplacas (debe alcanzar al menos 100°C)</li> </ul>
Electroforesis en gel	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>NuPAGE™ 12% Bis-Tris Protein Gels</b> (17 pocillos) [N.º de Cat. NP0349BOX]</li> <li><b>NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer</b> (20x) (500 mL: N.º de Cat. NP0001; 5 L: N.º de Cat. NP000102)</li> <li><b>NuPAGE™ Antioxidant</b> [N.º de Cat. NP0005]</li> </ul>
Transferencia	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Membrana PVDF, Immobilon-P, 0.45 µm</b> (EMD Millipore)</li> <li>Metanol (aprox. 98%)</li> <li>Tampón de transferencia (10x): 30.28 g Tris base/144.13 g Glycine/agregar agua purificada hasta 1 L.</li> </ul>
Detección inmunológica	<ul style="list-style-type: none"> <li>Solución salina tamponada con Tris (TBS, pH 7.4): 8 g NaCl/0.2 g KCl/3 g Tris base. agregar H2O purificada hasta 1 L, ajustar con HCl a un pH de 7.4</li> <li>Solución salina tamponada con Tris y con Tween (TBST): TBS con 0.05% (v/v) Tween-20</li> <li>Ponceau S (20x): 0.5% (w/v) Ponceau S/5% (v/v) Ácido acético. antes de usar diluir con TBST a una solución 1x</li> <li>CDP-Star Concentrado (Sustrato de fosfatasa alcalina [APS]) (12.5 mM; N.º de Cat. T2310) o Roche Diagnostics GmbH (25 mM) o bien CDP-Star, lista para su uso (0.25 mM; N.º de Cat. T2146)</li> <li>Film para rayos-X</li> </ul>

## Protocolo del test

### Precauciones

- Se deben seguir estrictamente las normas nacionales de seguridad.
- El PrioWESTERN BSE Kit debe ser llevado a cabo en laboratorios adecuados para este propósito.
- El personal que lleva a cabo el test debe haber sido entrenado en el trabajo general con priones y en el uso específico del PrioWESTERN BSE Kit.
- Las muestras deben considerarse como potencialmente infecciosas y todo el material que entre en contacto con las muestras como potencialmente contaminado.

### Notas

Para obtener resultados óptimos con el PrioWESTERN BSE Kit deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos:

- Hay que seguir estrictamente al protocolo del test.**
- Se deben cambiar las puntas de las pipetas tras cada pipeteo.
- Es muy recomendable usar puntas de pipeta con filtro o pipetas diferentes para los sucesivos pasos de pipeteo. Además, se debe calibrar periódicamente la precisión de las pipetas.
- Se deben utilizar reservorios diferentes para cada uno de los reactivos.
- Los componentes del kit no deben ser utilizados tras la fecha de caducidad o si se observan cambios en su aspecto.
- No deben utilizarse juntos componentes de kits con números de lote diferentes.
- Las pinzas y los bisturís no desechables deben ser descontaminados de acuerdo con las directrices de las autoridades y la normativa de cada país.
- Cuando se utilice el equipo PrioGENIZER™ para la homogeneización, solamente se debe utilizar el programa P0 PRIONICS TSE.

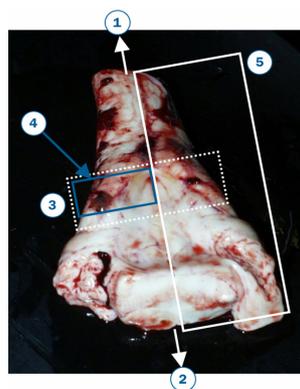
### Toma de muestras y homogeneización

- Cortar con un bisturí 0.45–0.70 g de tejido nervioso del área definida de la parte izquierda o bien de la parte derecha del tronco cerebral.

La toma de muestras y los ensayos de laboratorio deben seguir el Reglamento (CE) n.º 999/2001 capítulo C que, en lo que se refiere a la toma de muestras, hace referencia al «Manual de los estándares para las pruebas de diagnóstico y vacunas de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE)» que establece que: «La muestra preferida para el inmunoensayo debe ser tomada del mismo óbex o lo más cercanamente posible a él, pero no más de 1.5 cm antes del mismo». La figura muestra el área de la toma de la muestra dentro del recuadro.

**Nota:** Para ensayos posteriores de confirmación, tras la toma de la muestra debe quedar disponible una hemisección completa del tronco cerebral con su región del óbex intacta.

(Para más detalles de la toma de muestras, contactar con el Servicio de Asistencia Técnica.)



- Médula espinal
- Cerebro
- Región del óbex
- Área a utilizar para el test PrioWESTERN BSE Kit
- Área a utilizar por el Laboratorio Nacional de Referencia de la EET

### Médula oblongada (región del óbex)

La muestra consiste en un trozo del tronco cerebral / médula espinal cervical de unos 8 cm de largo.

### Homogeneización

#### Pasos previos

- Diluir el tampón de homogeneización 5x con agua ultrapura para preparar la solución de trabajo de homogeneización (Apéndice A).

#### Homogeneización

- Transferir la muestra al equipo de homogeneización y determinar su peso con una balanza (0.45–0.70 g).
- Añadir diez volúmenes de solución de trabajo de homogeneización (p/v; p.ej. 5 mL para 0.50 g de tejido cerebral de la región del óbex) y homogeneizar la muestra mediante el equipo de homogeneización PrioGENIZER™ o FASTH/FASTH2/MediFASTH (45 s±5 s, a 20,000±1,000 rpm) u Omni Tissue Homogenizer (60±10 s a máxima velocidad).
- Almacenar 2 alícuotas de 1 mL por cada homogenizado en una placa madre de 96 pocillos (de ahora en adelante, cada paso se realiza en duplicado – dos muestras por cada homogenizado–).

- Los recipientes de homogeneización PrioCLIP™ y Prypcon con muestras que den resultado «TSE negativo» pueden lavarse para ser reutilizados (ver protocolo de lavado de los PrioCLIP™/Prypcon, Apéndice D).

## Digestión con proteasa

Las siguientes indicaciones se refieren a 48 muestras.

(Ver el apéndice B para los volúmenes necesarios para otro número de muestras).

### Pasos previos

- Ajustar la temperatura del incubador de microplacas a  $48 \pm 1^\circ\text{C}$  aproximadamente 1 hora antes de su uso.
- Añadir 10  $\mu\text{L}$  de tampón de digestión (componente 2) a cada pocillo de la placa de digestión de 96 pocillos.

### Digestión con la proteasa

- Transferir 100  $\mu\text{L}$  de cada homogeneizado (mezclar primero pipeteando arriba y abajo al menos tres veces) de la placa madre al pocillo correspondiente de la placa de digestión con pipeta multicanal. Seguidamente, la placa madre se puede cubrir y almacenar hasta 12 meses entre  $-20^\circ\text{C}$  y  $-80^\circ\text{C}$ .
- Añadir 10  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K (componente 3) y mezclar aspirando tres veces con la pipeta.
- Cubrir la placa de digestión con una tapa selladora.
- Digerir durante  $40 \pm 1$  min a  $48 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Parar la reacción añadiendo 10  $\mu\text{L}$  de solución de parada (componente 4). Mezclar pipeteando arriba y abajo al menos tres veces.

## Electroforesis en gel

### Pasos previos

- Preparar los geles NuPAGE™ al 12% de 17 pocillos. Extraer los geles del envoltorio de plástico y retirar el peine con cuidado. Retirar la lámina blanca en la parte inferior del gel.
- Calentar la muestra de control (componente 5) a  $65 \pm 3^\circ\text{C}$  durante 2–5 minutos.
- Ajustar la temperatura del incubador de microplacas a  $98 \pm 4^\circ\text{C}$  aproximadamente 1 hora antes de su uso.

### Electroforesis en gel

- Añadir a cada muestra 100  $\mu\text{L}$  de tampón de muestra PAGE (componente 6). Mezclar pipeteando arriba y abajo al menos tres veces.
- Calentar las muestras a  $98 \pm 4^\circ\text{C}$  durante 5 min  $\pm$  30 s.
- La placa madre se puede cubrir y almacenar hasta 5 días entre  $-20^\circ\text{C}$  y  $-80^\circ\text{C}$ .
- Las muestras procesadas, que ya han sido desnaturalizadas una vez, es suficiente con calentarlas durante 2–5 minutos a  $65 \pm 3^\circ\text{C}$  antes de cargarlas en el gel.

### Carga de las muestras

- Cargar 10  $\mu\text{L}$  de muestra de control en el primer pocillo.
- Cargar 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra calentada en los pocillos correspondientes de cada gel.
- Rellenar las cámaras interna y externa con tampón de corrida NuPAGE™ MOPS/SDS 1x y añadir 500  $\mu\text{L}$  de antioxidante sólo en la cámara interna.

### Electroforesis

- Correr el gel a 200 V hasta que el frente del colorante esté a 1–2 cm del borde inferior del gel (aproximadamente 30 minutos).

## Transferencia

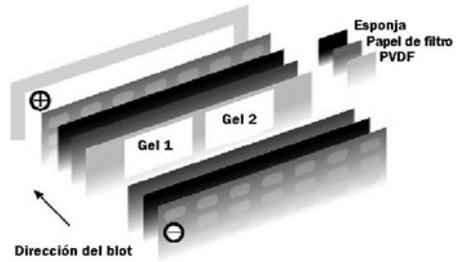
### Pasos previos

- Enjuagar la membrana PVDF (EMD Millipore, Immobilon-P, 0.45  $\mu\text{m}$ , 13 cm  $\times$  17 cm) en metanol (aproximadamente al 98%) durante pocos segundos y a continuación equilibrar de inmediato durante al menos 10 minutos en tampón de transferencia 1x (ver el Apéndice B para los volúmenes necesarios para los diferentes números de muestras).
- Llenar el tanque de transferencia con tampón de transferencia 1x refrigerado ( $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ).

### Blot

#### Composición del sándwich de transferencia

- Colocar la membrana equilibrada sobre un papel de Whatman humedecido con tampón de transferencia 1x o con agua purificada.
- Abrir los geles NuPAGE™, recortar arriba el peine y abajo el margen azul y colocar los geles sobre la membrana (evitando la formación de burbujas). Se pueden colocar hasta 6 geles en una membrana del tamaño indicado arriba (ver Apéndice C).
- Cubrir los geles con papel Whatman humedecido, colocar la esponja en la parte superior.
- Cerrar el sándwich y colocar en el tanque de transferencia. Las proteínas tienen carga negativa y se desplazan hacia el polo positivo (rojo). Por eso la membrana PVDF ha de estar más cerca del polo positivo y los geles más cerca del polo negativo.



- El tiempo de transferencia es de  $60 \pm 2$  min a 150 V y con refrigeración continua a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ .
- Sacar del sándwich la membrana con las proteínas adheridas y teñir con Ponceau S 1x. Señalar la posición de los marcadores de peso molecular con un lápiz de color y decolorar la membrana con TBST hasta que haya desaparecido el color rojo (aproximadamente  $2 \times 1$  minuto).

## Detección inmunológica

### Bloqueo

- Colocar la membrana en una bandeja de plástico limpia e incubarla con  $50 \pm 2$  mL de tampón de bloqueo PVDF 1x durante  $35 \pm 5$  min en un agitador con movimiento suave a  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ .

### 1er Anticuerpo 6H4

- Diluir 10  $\mu\text{L}$  del 1er Anticuerpo 6H4 en  $50 \pm 2$  mL de TBST (dilución 1:5000) e incubar la membrana durante  $60 \pm 5$  min a  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  (o bien 12–18 h a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ) en un agitador con movimiento suave.
- Lavar la membrana 3 veces durante aproximadamente 5 minutos cada vez con TBST.

### 2do Anticuerpo-FA

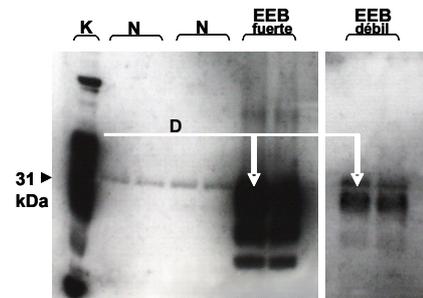
- Diluir 10  $\mu\text{L}$  del 2do Anticuerpo-FA en  $50 \pm 2$  mL de TBST (dilución 1:5000) e incubar la membrana durante  $30 \pm 1$  min a  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  en agitador con movimiento suave.
- Lavar la membrana 5 veces durante 5 minutos cada vez con TBST.

### Detección

- Equilibrar la membrana durante 5–10 min en  $50 \pm 2$  mL de tampón de luminiscencia 1x (componente 10, ver Apéndice A para la tabla de diluciones).
- Diluir 100  $\mu\text{L}$  de CDP-Star (12.5 mM, 50x) o bien 50  $\mu\text{L}$  (25 mM, 100x) en 5 mL de tampón de luminiscencia 1x.
- Colocar la membrana sobre una placa de vidrio. Distribuir uniformemente el CDP-Star diluido (5 mL) uniformemente sobre la membrana e incubar  $5 \pm 1$  minutos a  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ .
- Retirar el líquido sobrante. Secar la membrana suavemente con un pañuelo de papel y cubrir con un film transparente (Saran). Para hacer visible la quimioluminiscencia se expone una película Rayos X a oscuras hasta ver una señal intensa de la muestra de control así como, o bien una coloración de fondo, o bien la banda de Proteinasa K (aprox. 5–20 min). Para conseguir un resultado óptimo puede ser necesario escoger tiempos de revelado más cortos o más largos. Alternativamente pueden detectarse las señales de quimioluminiscencia con un sistema LumiImager. (p. ej. FluorChem™, Alpha Innotech Corp.)

## Interpretación de los resultados

La figura siguiente ilustra los resultados a esperar en muestras negativas y positivas para EEB y los de la muestra control. La muestra de control (K) contiene la isoforma normal de la proteína prión ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), que es detectada inmunológicamente. De esto resulta una banda difusa en la zona de 25–35 kD (la proteína prión tiene distintas variantes de glicosilación, que conducen a una distribución heterogénea).



Las muestras negativas (N) no presentan ninguna señal específica. La banda a 31 kD, no siempre bien reconocible, se debe a una unión inespecífica del anticuerpo 2º a la Proteinasa K y puede servir de ayuda orientativa suplementaria.

En muestras positivas (EEB<sub>fuerte</sub>; EEB<sub>débil</sub>) es visible una señal, cuya banda superior (A) está a unos 30 kD. La intensidad en la señal de todas las bandas (en especial de las bandas inferiores B y C) puede ser más débil que en la figura, pero al menos ha de ser bien visible la banda superior (A). La

flecha D indica la diferencia típica en el peso molecular de la proteína prión específica de la enfermedad tras la digestión con Proteinasa K en comparación con la PrP normal, no digerida.

Si el test ha de ser usado como prueba tamiz, una muestra reactiva en pruebas repetidas debe ser enviada al Laboratorio Nacional de Referencia para su confirmación usando un método confirmatorio adicional. Si el test ha de ser usado como confirmatorio, sólo será válido si se ajusta a las recomendaciones de la OIE/CRL.

## Apéndice A - Tabla para la preparación de la solución de trabajo

### Solución de trabajo de homogeneización

Mezclar los volúmenes indicados de agua purificada y del tampón de homogeneización 5x (componente 1) para obtener el volumen deseado de solución de trabajo de homogeneización.

Caducidad de la solución de trabajo de homogeneización: 1 semana a 5±3°C.

Sol. de trabajo de homogeneización		Vol. de concentrado (5x) (componente 1)		Vol. de agua purificada
250 mL	=	50 mL	+	200 mL
500 mL	=	100 mL	+	400 mL
1000 mL	=	200 mL	+	800 mL

### Tampón de bloqueo PVDF

Vol. tampón de bloqueo (1x)		Vol. de tampón de bloqueo (5x) (componente 7)		Vol. de agua purificada
500 mL	=	100 mL	+	400 mL

### Tampón de luminiscencia

Mezclar los volúmenes indicados de agua ultrapura y tampón de luminiscencia 10x (Componente 10) para obtener el volumen deseado de tampón de luminiscencia 1x:

Vol. de tampón de luminiscencia (1x)		Vol. de tampón de luminiscencia (10x) (componente 10)		Vol. de agua purificada
270 mL	=	27 mL	+	243 mL

### Tampón de corrida NuPAGE™ SDS-MOPS

Vol. de tampón de corrida NuPAGE™ SDS-MOPS (1x)		Vol. de tampón de corrida NuPAGE™ SDS-MOPS (20x)		Vol. de agua purificada
1000 mL	=	50 mL	+	950 mL

### Tampón de transferencia

Vol. de tampón de transferencia (1x)		Vol. de tampón de transferencia (10x)		Vol. de agua purificada		Vol. of metanol (98%)
2000 mL	=	200 mL	+	1600 mL	+	200 mL

### TBST

Vol. de TBST (1x)		Vol. de TBS (20x)		Vol. de agua purificada		Tween 20 al 50%
1000 mL		50 mL		950 mL		1 mL

### Ponceau S

Vol. de Ponceau S (1x)		Vol. de Ponceau S (20x)		Vol. de TBST (1x)
1000 mL		50 mL		950 mL

## Apéndice B - Volúmenes necesarios para los diferentes números de muestras

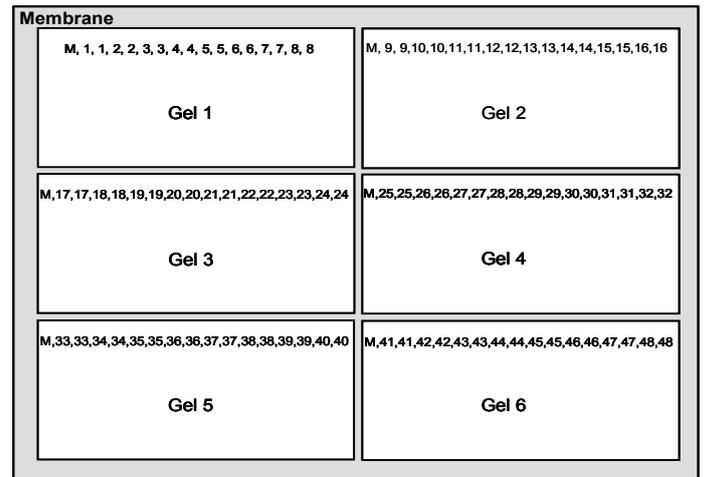
No. geles	Tamaño de Bandeja (cm)	Tamaño de membrana	TBST	1er. Anticuerpo
6	Grande (22.4 × 15.6)	13 × 17 cm	50 mL	10 µL
4	Grande (22.4 × 15.6)	9 × 17 cm	50 mL	10 µL
3	Mediano (15 × 11.4)	13 × 8.5 cm	25 mL	5 µL
2	Mediano (15 × 11.4)	9 × 8.5 cm	25 mL	5 µL
1	Pequeño (5.5 × 9.5)	4.5 × 8.5 cm	10 mL	2 µL

Tamaño de bandeja (cm)	TBST	2do. Anticuerpo	Tampón de luminiscencia	CDP-Star	
				12.5 mM	25 mM
Grande (22.4 × 15.6)	50 mL	10 µL	5 mL	100 µL	50 µL
Grande (22.4 × 15.6)	50 mL	10 µL	4 mL	80 µL	40 µL
Mediano (15 × 11.4)	25 mL	5 µL	3 mL	60 µL	30 µL
Mediano (15 × 11.4)	25 mL	5 µL	3 mL	60 µL	30 µL
Pequeño (5.5 × 9.5)	10 mL	2 µL	2 mL	40 µL	20 µL

## Apéndice C - Esquema para colocar los geles en la membrana

Esquema recomendado para la colocación de los geles en la membrana de transferencia.

- Placa de 96 pocillos con 48 muestras por duplicado transferidas a 6 geles con 17 pocillos cada uno.
- 1–48 = Numeración de las muestras, (M = Marcadores de peso molecular con PrP<sup>C</sup> sin digerir).



## Apéndice D - Protocolo de lavado de los PrioCLIP™/Prypcon

### Instrucciones generales

#### Trazabilidad de la muestra

Para garantizar la trazabilidad de la muestra, los recipientes de homogeneización PrioCLIP™/Prypcon deben rotularse con el número de la muestra, usando p.ej. un rotulador o etiquetas resistentes al agua. La rotulación de los recipientes sólo puede eliminarse tras la comunicación de los resultados.

#### Trazabilidad del uso

Los recipientes de homogeneización no deben usarse más de 5 veces. Tras cada uso, los PrioCLIP™/Prypcon deben marcarse con guiones o puntos mediante un rotulador resistente al agua.

Para el lavado, no usar desinfectantes que contengan cloro.

#### Pasos preparatorios

- Llenar dos recipientes con cantidades suficientes de agua desionizada (al menos 25 L) de modo que los PrioCLIP™/Prypcon se puedan sumergir completamente durante los pasos de lavado.

#### Vaciado

- Vaciar los recipientes con homogeneizado que han dado resultado «TSE negativo» en una botella termorresistente autoclavable o en un frasco o recipiente desechable.
- Los recipientes cuyo contenido ha sido identificado como «inicialmente reactivo» no deben usarse otra vez y deben ser eliminados según las normas nacionales de seguridad.

#### Lavado

- Sumergir el PrioCLIP™/Prypcon vacío en un recipiente con agua desionizada y enjuagar a fondo.
- Al transferir los recipientes de homogeneización del recipiente de lavado uno al dos, comprobar que no están dañados ni contienen restos de tejido. Desechar cualquier recipiente de homogeneización PrioCLIP™/Prypcon que esté dañado o contaminado.
- Sumergir los recipientes e incubarlos por lo menos durante 30 minutos a 22±3°C.

## Secado

- Sacar los PrioCLIP™/Prypcon del recipiente de lavado, sacudirlos para eliminar restos de agua y dejarlos secar por completo a 22±3°C.
- Los PrioCLIP™/Prypcon también pueden secarse en una estufa de calentado o secado. Poner los recipientes sobre una superficie termorresistente, calentarlos durante 2 horas a 85±5°C y secarlos por la noche a 50°C en una estufa de secado. Repetir el paso de calentado (2 horas, 85±5°C).
- Controlar los PrioCLIP™/Prypcon visualmente. Desechar los recipientes dañados o que contienen restos líquidos o de tejidos.
- Los PrioCLIP™/Prypcon están ahora listos para ser reutilizados.

## Eliminación de desechos

- Los homogeneizados y las soluciones de lavado deben eliminarse según las normas nacionales de seguridad.

Puede solicitarse un protocolo de lavado PrioCLIP™/Prypcon detallado (con ilustraciones) en la Asistencia técnica.

## Apéndice E - Certificación OIE: Resumen de los estudios de validación

### Características analíticas

#### Sensibilidad analítica

- Durante el proceso de estudio de validación de la Unión Europea, se evaluaron diluciones seriadas. De 20 homogeneizados positivos evaluados a una dilución de 10<sup>-1</sup>, 15 mostraron un resultado positivo, dos, dudo-so y tres negativo. En la dilución 10<sup>-1.5</sup>, tres muestras mostraron resultado dudoso y el resto, negativo. En la dilución de 10<sup>-2</sup>, dos muestras mostraron también un resultado dudoso, al igual que una muestra a dilución de 10<sup>-2.5</sup>. [Las muestras positivas fueron suministradas por el Central Veterinary Laboratory (CVL), Weybridge: las muestras de tronco encefálico y médula espinal se seleccionaron a partir de animales bovinos que mostraban signos clínicos de EEB, confirmados por el examen histológico.]

#### Especificidad analítica

- No se ha examinado específicamente. Sin embargo, algunos estudios de campo sobre muestras de ganado muerto (animales que sufrían trastornos que no eran EEB, p. ej. encefalitis, edema cerebral, rabia, listeriosis) han demostrado repetidamente que el PrioWESTERN BSE Kit tiene una buena especificidad analítica [ver D. Heim et al. (2000) Surveillance of BSE. *Arch Virol Suppl.* (16):127-33].

#### Datos de repetibilidad

- Los ensayos llevados a cabo entre 2002 y 2007 muestran que el kit pudo detectar una muestra positiva de EEB a una dilución 1:10.
- La repetibilidad también se estudió en pruebas comparativas de tres ensayos EEB (Enfer – Bio-Rad TeSeE – PrioWESTERN BSE Kit) llevados a cabo por el Laboratorio de Referencia de la UE para EET (VLA, Reino Unido). La coherencia entre las muestras duplicadas (n = 277) fue alta, excepto en dos ocasiones, cuando el sobrante de un pocillo positivo dio como resultado una pequeña mancha no específica en uno de los pocillos adyacentes de una muestra negativa. Esto era claramente diferente de los resultados positivos, que tenían un tamaño y patrón de bandas característicos, y que estaban presentes en ambos pocillos duplicados.

### Características diagnósticas

#### Determinación del umbral

Este ensayo no ofrece una lectura cuantitativa. La respuesta es cualitativa y se basa en los criterios de: presencia de señal y posición. Esto permite distinguir fácilmente entre positivos reales y (posibles) falsos positivos debido a la PRNP normal sin digerir.

#### Estimaciones de la sensibilidad diagnóstica (SD) y la especificidad diagnóstica (ED)

Se han descrito tres estudios de evaluación externos para la estimación de la sensibilidad y la especificidad diagnósticas:

- Ensayos realizados en el laboratorio de referencia EEB suizo (Neurocenter/Universidad de Berna) en febrero de 2003 sobre 38 muestras positivas (18 homogeneizados y 20 muestras de tejido) del Reino Unido/190 muestras negativas del programa de vigilancia de EEB suizo (muestras de tejido de ganado mayor de 30 meses que habían ofrecido un resultado negativo por histología/inmunohistoquímica).

	EEB positivo por IHQ	EEB negativo por IHQ
Ensayo positivo por PrioWESTERN BSE Kit	38	0
Ensayo negativo por PrioWESTERN BSE Kit	0	190
Sensibilidad diagnóstica: 100%, IC [90.7–100.0%] Especificidad diagnóstica: 100%, IC [98.1–100.0%]		

- Estudio de campo canadiense, 2003. Como seguimiento de la detección de un caso confirmado en mayo de 2003, se realizó un estudio de cohorte en el que se analizaron 2036 animales desde el nacimiento hasta cebo mediante inmunohistoquímica (IHQ) y el PrioWESTERN BSE Kit. Este ensayo fue llevado a cabo por laboratorios de la Canadian Food Inspection Agency en Lethbridge, Winnipeg, Nepean y St-Hyacinthe.

	EEB positivo por IHQ	EEB negativo por IHQ
Ensayo positivo por PrioWESTERN BSE Kit	1	0
Ensayo negativo por PrioWESTERN BSE Kit	0	2036
Especificidad diagnóstica: 100%, IC [99.8–100%]		

- Evaluación de ensayos para el diagnóstico de la encefalopatía espongiforme transmisible en animales bovinos para la Comisión Europea, 1999. Todas las muestras fueron preparadas por el Instituto para la Referencia de Materiales y Medidas (IRMM) de la UE en Geed, Bélgica, y presentadas para su análisis en un formato codificado «ciego» para los diferentes participantes (el PrioWESTERN BSE Kit fue uno de los cuatro kits seleccionados): Se analizaron un total de 300 muestras positivas (recogidas a partir de ganado que mostraba signos clínicos de EEB y confirmadas por examen histológico, suministradas por CVL Weybridge) y 1000 muestras negativas (recogidas en Nueva Zelanda a partir de ganado adulto sano de al menos 4 años de edad y negativas confirmadas por examen histológico).

	EEB positivo por histología	EEB negativo por histología
Ensayo positivo por PrioWESTERN BSE Kit	300	0
Ensayo negativo por PrioWESTERN BSE Kit	0	1000
Sensibilidad diagnóstica: 100%, IC [98.8–100%] Especificidad diagnóstica: 100%, IC [99.6–100%]		

#### Concordancia entre ensayos

La concordancia del ensayo PrioWESTERN BSE Kit con el examen histológico y la IHQ es alta.

#### Reproducibilidad

Durante la evaluación de campo de la UE de 2004, se analizaron muestras mediante PrioWESTERN BSE Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos con otros ensayos evaluados. Las muestras se dividieron en tres categorías: muestras positivas, muestras negativas y muestras de mala calidad.

- Se analizaron un total de 335 muestras positivas para EEB en tres laboratorios (VLA, Newcastle, Reino Unido - Analytico Food BV, Heerenveen, Países Bajos y Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, España).
- Se analizaron un total de 24.534 muestras negativas para EEB en ocho laboratorios (Analytico Food BV, Heerenveen, Países Bajos; Institut für Veterinärmedizin, Mödling, Austria; Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid, Lelystad, Países Bajos; Laboratorio EET, León, España; Labor Dr. Guenteert, Lucerna, Suiza; Instituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Turín, Italia; Irish Equine Centre, Kildare, Irlanda; Arthus Biotech GmbH, Hamburgo, Alemania).
- Se analizaron 423 muestras de mala calidad en dos laboratorios (VLA, Newcastle, Reino Unido y NeuroCenter, Berna, Suiza).

Los resultados interlaboratoriales de todas las muestras analizadas fueron idénticos para el ensayo PrioWESTERN BSE Kit. La concordancia con otros ensayos evaluados fue muy alta, con la excepción de una muestra positiva débil detectada en el ensayo PrioWESTERN BSE Kit que no se identificó como positiva al utilizar el ensayo CediTect.

Fuente: Informe: The Field Trial of Seven New Rapid Post Mortem Test for the Diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy in Bovines; IRMM; 12 de noviembre de 2004.

#### Aplicaciones

PrioWESTERN BSE Kit se emplea actualmente tanto en laboratorios de referencia como en laboratorios de rutina de todo el mundo. Los laboratorios de análisis deben participar en las pruebas de aptitud y los programas de formación organizados por los laboratorios de referencia de la OIE.

## Apéndice F - Normas de seguridad

Los laboratorios **están obligados** a seguir las normas nacionales de seguridad. La siguiente información –publicada por el Comité asesor en materia de patógenos peligrosos (ACDP) – está disponible como orientación: «Agentes de la encefalopatía espongiforme transmisible: seguridad en el trabajo y prevención de infecciones (“Transmissible spongiform encephalopathy agents: safe working and the prevention of infection”)), Department of Health, London, UK (puede solicitarse en la oficina de papelería, ISBN 0113221665. Una actualización está disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/guidance-from-the-acdp-tse-risk-management-subgroup-formerly-tse-working-group>.

## Apéndice G - Referencias

- Oesch B, Doherr M, Heim D, Fischer K, Egli S, Bolliger S, Biffiger K, Schaller O, Vandeveld M, Moser M (2000) Application of Prionics Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs. *Arch Virol* 16:189–195.
- Doherr MG, Oesch B, Moser M, Vandeveld M, Heim D (1999 Dec 4) Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record* 145:672.
- Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vandeveld M, Heim D, Oesch B, Moser M (1999 Nov) Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol (Berl)* 98(5):437–43.
- Calavas D, Ducrot C, Baron T, Morignat E, Vinard JL, Biacabe AG, Madec JY, Bencsik A, Debeer S, Eliazewicz M (2001 Jul 14) Prevalence of BSE in western France by screening cattle at risk: preliminary results of a pilot study. *Vet Rec* 149:55–56.
- Heim D, Wilesmith JW (2000) Surveillance of BSE. *Arch Virol* (16):127–33.
- (2012) Bovine Spongiform Encephalopathy. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* OIE Chapter 2.4.6.
- European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy (2009) Scientific Opinion on Analytical sensitivity of approved TSE rapid test, EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal* 7(12):1436.



Validado y certificado por la OIE como APTO para los fines definidos en este protocolo.

Nº de Registro: 20080102

## Asistencia al cliente y soporte técnico

Asistencia técnica: visite [thermofisher.com/askaquestion](http://thermofisher.com/askaquestion)

Visite [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support) para conocer lo último en servicios y asistencia, incluyendo lo siguiente:

- Números de teléfono de contacto de todo el mundo
- Pedidos y soporte web
- Guías de usuario, manuales y protocolos
- Certificados de análisis
- Fichas técnicas de seguridad (Safety Data Sheets, SDS; también conocidas como MSDS)

**NOTA:** Para conocer las SDS de los reactivos y productos químicos de otros fabricantes, póngase en contacto con el fabricante.

## Garantía limitada del producto

Life Technologies Corporation y/o su(s) filial(es) garantizan sus productos tal y como se establece en los términos y condiciones generales de venta de Life Technologies, que se pueden encontrar en el sitio web de Life Technologies [www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions](http://www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions). Si tiene alguna duda, póngase en contacto con Life Technologies en [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).



Prionics Lelystad B.V. | Platinastraat 33 | 8211 AR Lelystad | The Netherlands

La información incluida en esta guía está sujeta a cambios sin previo aviso.

**EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD:** EN LA MEDIDA DE LO ESTIPULADO POR LA LEY, LIFE TECHNOLOGIES Y/O SUS AFILIADOS NO SE HACEN RESPONSABLES POR DAÑOS ESPECIALES, INCIDENTALES, INDIRECTOS, PUNITIVOS, MÚLTIPLES O CONSIGUIENTES EN RELACIÓN CON DERIVADOS DE ESTE DOCUMENTO, INCLUYENDO EL USO DEL MISMO.

Historial de revisiones: N.º de Pub. MAN0013788 (Español)

Rev.	Fecha	Descripción
A.0	03 abril 2019	Documento nuevo. Se ha convertido el documento anterior (WESTERN_PI_v12.0_es_220213.doc) a la plantilla del documento actual, con actualizaciones asociadas a la información sobre la licencia limitada, la garantía, las marcas comerciales y logotipos.

**Información importante sobre licencias:** Este producto puede estar cubierto por una o más licencias de etiquetado de uso limitado. Mediante el uso de este producto, acepta los términos y condiciones de todas las licencias de etiquetado de uso limitado aplicables.

©2019 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales son propiedad de Thermo Fisher Scientific y sus subsidiarias a menos que se especifique lo contrario.