

PrioWESTERN BSE Kit

Test Kit zum *in vitro* Nachweis von TSE verwandtem PrP^{Sc}

Katalog-Nummer PR12000

Pub. Nr. MAN0013786 Version A.0

Von der EU zugelassener Schnelltest für das BSE Testprogramm bei Rindern gemäss der Verordnung (EG) Nr. 999/2001.

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach §11 Absatz 2 TierGesG zugelassen

Für Deutschland: Zulassungsnummer: BFAV/BSE/1/2000

ACHTUNG! Bitte die Sicherheitsdatenblätter (SDB) lesen und Handlungsanweisungen befolgen. Es ist angemessene persönliche Schutzausrüstung (PSA) zu tragen (Brille, Kleidung, Handschuhe). Die Sicherheitsdatenblätter (SDB) sind abzurufen unter thermofisher.com/support.

ACHTUNG! POTENZIELLE BIOGEFAHR. Informieren Sie sich auf der jeweiligen Produktwebsite (unter thermofisher.com) über biologische Gefahren, die von dem Produkt ausgehen können. Tragen Sie eine geeignete Schutzbrille sowie Schutzkleidung und -handschuhe.

Der Hersteller der Schnelltests muss über ein Qualitätssicherungssystem verfügen, das vom EU-Referenzlabor (EURL) anerkannt worden ist und sicherstellt, dass das Testverfahren sich nicht ändert. Geräte zur Probenentnahme und Modifikationen, die den Schnelltest oder das Protokoll (inklusive Probenentnahme) betreffen, dürfen nur nach vorheriger Mitteilung an das EURL und nur unter der Voraussetzung gemacht werden, dass das EURL befundet, dass die Modifikation weder die Sensitivität noch die Spezifität oder Zuverlässigkeit des Schnelltests beeinträchtigt. Dieser Befund muss der EU-Kommission und den Nationalen EU-Referenzlaboratorien mitgeteilt werden.

Einführung

Verschiedene Gewebe eines prioneninfizierten Tieres enthalten eine pathologisch veränderte Form des Prion-Proteins, PrP. Die veränderte, krankheitsassoziierte Form des Prion-Proteins wird als PrP^{Sc} bezeichnet. Die normale Isoform des PrP wird PrP^C (die zelluläre Form des PrP) genannt. PrP^{Sc} unterscheidet sich vom normalen PrP in ihrer Proteaseresistenz. Durch die Behandlung mit Proteinase K wird die normale Form des PrP degradiert, während PrP^{Sc} von ihrer Originalgrösse von 32–35 kD auf 27–30 kD reduziert wird. Das noch vorhandene proteaseresistente PrP^{Sc}-Fragment wird PrP 27-30 genannt. Der Applied Biosystems™ PrioWESTERN BSE Kit erreicht seine methodisch bedingte hohe Präzision und Verlässlichkeit durch die Berücksichtigung von drei unabhängigen Kriterien: Proteaseresistenz, Glykosylierungsmusters und reduziertes Molekulargewicht des proteaseresistenten PrP^{Sc}-Fragmentes (27–30 kD) im Vergleich zu unverdaulichem PrP. Durch die spezifischen Eigenschaften der Pufferlösungen und die hohe Affinität des Antikörpers 6H4 kann der Test direkt mit Gewebehomogenaten durchgeführt werden und vereinfacht dadurch die Zuverlässigkeit des Western-Blot-Verfahrens mit der für ein Massenscreening notwendigen kurzen Testdauer.

Der PrioWESTERN BSE Kit wurde 1998 als erster BSE-Schnelltest von den Schweizer Behörden anerkannt und 1999 mit 100% Sensitivität und 100% Spezifität auch von der EU zugelassen. In der CRL-Studie zur analytischen Sensitivität von 2009 wurde für PrioWESTERN BSE Kit auf einen maximalen Unterlegenheitsbereich von 2 log₁₀ verglichen mit dem sensitivsten Testsystem geschlossen.

Die Validierungsdaten dieses Kits sind basierend auf einem Experten-Review von der OIE in folgender Hinsicht zertifiziert worden:

Zur post mortem-Diagnose von BSE bei Rindern und für folgende Zwecke:

1. Zur Bestätigung von Verdachtsdiagnosen oder klinischer Fälle (einschließlich der Bestätigung eines positiven Screening-Tests);
2. Zur Einschätzung der Prävalenz der Infektion, um die Risikoanalyse zu erleichtern (Erfassung / Herdengesundheitsprogramme / Erkrankungskontrolle, z. B. Bestandsaufnahme, Umsetzung der Erkrankungskontrollmaßnahmen) und zur Unterstützung in der Demonstration der Effizienz der Kontrollstrategien;
3. Zur Bestätigung eines nicht-negativen Testergebnisses aus der aktiven Überwachung mit einer anderen Testart.

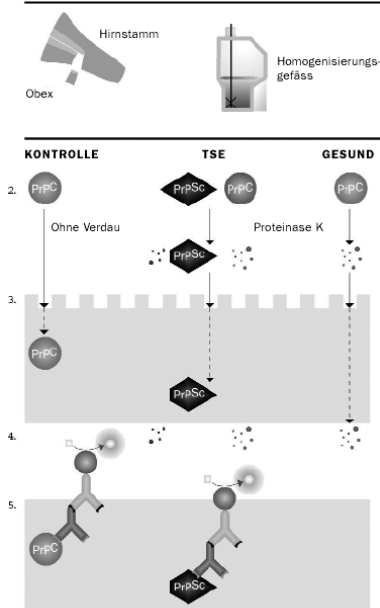
Testprinzip

Nach der Probenentnahme und Registrierung werden die Proben mit dem PrioWESTERN BSE Kit untersucht. Der PrioWESTERN BSE Kit folgt einem Protokoll aus fünf Schritten: Homogenisierung, Protease-Verdau, Gel Elektrophorese, Blotten und immunologischer Nachweis. Eine Person kann in 6–8 Stunden 100 Proben (Doppelbestimmungen) untersuchen.

Nach der Registrierung der entnommenen Proben wird aus einem definierten Stück Hirngewebe ein Homogenat hergestellt. Durch Behandlung mit Proteinase K wird PrP^C vollständig verdaut, während PrP^{Sc} zu einem 27–30 kD-Fragment abgebaut wird. Die proteolytische Reaktion wird gestoppt und das proteaseresistente PrP^{Sc}-Fragment wird mit dem PrioWESTERN BSE Kit nachgewiesen.

Verdaute Homogenate werden der Gel Elektrophorese und Western Blotting unterworfen. Die Western Blot Membranen werden mit einem monoklonalen Antikörper mit hoher Affinität für PrP inkubiert, um die protease-resistente Form, PrP^{Sc}, zu detektieren. Das Signal wird mit Hilfe des sekundären Antikörper-Konjugates gekoppelt an alkalische Phosphatase detektiert.

1. PROBENTENNAHME + HOMOGENISIERUNG



Inhalt des Kits (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Kit für 100 Proben (Doppelbestimmungen). Die Haltbarkeit aller ungeöffneten Komponenten beträgt 1 Jahr ab Produktion sofern diese bei 5±3°C gelagert werden. Haltbarkeitsdatum: siehe Kit-Etikette. Die Haltbarkeiten verdünnter, geöffneter und rekonstituierter Komponenten sind unten angegeben.

Komponente	Beschreibung
1: Homogenisierungspuffer (5x)	5-fach konzentriert, vor Gebrauch verdünnen. Eine Flasche enthält 200 ml 5-fach konzentrierter Homogenisierungspuffer. Gebrauchslösung (Homogenisierungslösung 1x) wird hergestellt aus vier Teilen reinem Wasser und einem Teil Homogenisierungspuffer 5x. Zusätzliche Etiketten für die Gebrauchslösung sind im Kit enthalten. Haltbarkeit der Gebrauchslösung: 1 Woche bei Lagerung bei 5±3°C.
2: Verdauungspuffer (1x) (Verschlusskappe: gelb)	Gebrauchsfertig. Ein Fläschchen enthält 4 ml Verdauungspuffer.
3: Proteinase K (Verschlusskappe: weiss)	Gebrauchsfertig. Ein Fläschchen enthält 4 ml Proteinase K.
4: Proteinase Inhibitor (1x) (Verschlusskappe: rot)	Gebrauchsfertig. Ein Fläschchen enthält 4 ml Proteinase K Blocker, um die proteolytische Aktivität der Proteinase K zu stoppen.
5: Kontrollprobe	Gebrauchsfertig. Ein Fläschchen enthält 200 µl einer Mischung aus funktioneller Kontrolle (normalem, unverdaulichem PrP ^C) und Molekulargewichts-Marker (97/66/45/30/20/14 kD) in PAGE Probenpuffer. Vor Gebrauch mischen, z.B. durch klopfen.
6: PAGE Probenpuffer (1x)	Gebrauchsfertig. Ein Fläschchen enthält 25 ml Probenpuffer, gebrauchsfertig, für die SDS-Polyacrylamid Gel-elektrophorese (SDS-PAGE). (Enthält 2-Mercaptoethanol. Bei längerem Öffnen kann Geruchsbelästigung eintreten, jedoch liegt die Konzentration in der Luft in einem durchschnittlich belüfteten Raum selbst bei gleichzeitiger Benützung von 100 Fläschchen unter dem von der American Industrial Hygiene Association festgelegten Grenzwert (Workplace Environmental Exposure Level) von 0.65 mg/m ³ .)

Für tierärztlichen Gebrauch. Ausschließlich für *in vitro* zu verwenden.

Komponente	Beschreibung
7: PVDF Blockierungs-Puffer Konzentrat (5x)	Eine Flasche enthält 100 ml konzentrierten Blockierungspuffer. Dieser wird mit reinem Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml verdünnt.
8: 1. Antikörper 6H4	Ein Fläschchen enthält 30 µl monoklonalen Antikörper 6H4 gegen PrP (Maus anti-PrP IgG1). Arbeitsverdünnung: 1:5000 (Falls sich nicht die gesamte Flüssigkeit unten am Gefässboden befindet, kann zentrifugiert werden).
9: 2. Antikörper-AP	Ein Fläschchen enthält 30 µl Ziegen anti-Maus IgG-AP, (ein Antikörper gegen Maus-IgG, konjugiert mit alkalischer Phosphatase) Arbeitsverdünnung: 1:5000 (Falls sich nicht die gesamte Flüssigkeit unten am Gefässboden befindet, kann zentrifugiert werden).
10: Lumineszenzpuffer Konzentrat (10x)	Vor Gebrauch 10x verdünnen. Eine Flasche enthält 27 ml des Lumineszenzpuffer-Konzentrats. Vor Gebrauch mit reinem Wasser auf 270 ml verdünnen.
Zusätzliche Bestandteile des Kits	<ul style="list-style-type: none"> Gebrauchsinformation Etiketten für die Gebrauchslösung

Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

Sofern nichts Gegenteiliges angegeben wurde, können alle Materialien auf **thermofisher.com** bezogen werden. Die **markierten** Materialien und Geräte wurden für die Verwendung mit dem PrioWESTERN BSE Kit validiert. Die Verwendung anderer Materialien und Geräte liegt in der Verantwortung des Benutzers.

Schritt	Beschreibung
Allgemeines	<p>Laborausrüstung entsprechend den nationalen Sicherheits-Richtlinien.</p> <ul style="list-style-type: none"> Reines Wasser: mindestens entsprechend Grad 3 Wasser gemäss ISO 3696:1987 [E] Einkanalpipette (1–10 µl) Einkanalpipette (10–100 µl) Einkanalpipette (100–1000 µl) Einkanalpipette (1–5 ml) Multikanalpipette (0.5–10 µl) Multikanalpipette (10–100 µl) Pipettenspitzen (gemäss Empfehlung des Pipettenherstellers) Reagenzreservoir (für Gebrauchslösungen) Inkubationsschalen 15 ml Gefässe, konisch 50 ml Gefässe, konisch
Homogenisierung	<ul style="list-style-type: none"> Schneidewerkzeuge und Pinzetten Laborwaage Dispenser für Homogenisierungspuffer 1.2 ml 96-Loch-Platte als Masterplatte PrioGENIZER™ (Homogenisierungsgerät mit sechs Racks und einem Tablett; Kat.-Nr. PR10000) und PrioCLIP™ Homogenisierungsgefäss (Kat.-Nr. PR10010) oder FASTH/MediFASTH/FASTH 2 Homogenisierungsgerät und Prypcon Homogenisierungsgefäss (Syntec International) oder Omni Tissue Homogenizer (TH115, TH220) und Soft Tissue Omni Tip™ Plastic Homogenizing Probes (32750) (Omni International)
Protease Verdau	<ul style="list-style-type: none"> 96 Lochplatte (0.2 ml Löcher; zu benutzen als Verdau-Platte) Abdichtfolie Inkubator für Mikrotiterplatten (mindestens 100°C erreichbar)
Gel Elektrophorese	<ul style="list-style-type: none"> NuPAGE™ 12% Bis-Tris Protein Gels (17 Taschen) (Kat.-Nr. NP0349BOX) NuPAGE™ MOPS SDS Laufpuffer (20x) (500 ml: Kat.-Nr. NP0001; 5 L: Kat.-Nr. NP000102) NuPAGE™ Antioxidant (Kat.-Nr. NP0005)
Western Blotting	<ul style="list-style-type: none"> PVDF Membrane, Immobilon-P, 0.45 µm (EMD Millipore) Methanol (approx. 98%) Transfer Puffer (10x): 30.28 g Tris Base/144.13 g Glycine/ reines Wasser auf 1000 ml.
Immunologische Detektion	<ul style="list-style-type: none"> Tris-Buffered Saline (TBS, pH 7.4): 8 g NaCl/ 0.2 g KCl/ 3 g Tris Base. Reines Wasser auf 1000 ml, adjust pH to 7.4 with HCl Tris- Buffered Saline mit Tween (TBST): TBS mit 0.05% (v/v) Tween-20 Ponceau S (20x): 0.5% (w/v) Ponceau S/ 5% (v/v) Essigsäure. Mit TBST verdünnen auf 1x Gebrauchslösung. CDP-Star Konzentrat (= Alkalische Phosphatase Substrat) 12.5 mM (Kat.-Nr. T2310) oder 25 mM (Roche) oder CDP-Star, gebrauchsfertig 0.25 mM (Kat.-Nr. T2146) X-Ray Filme

Test-Verfahren

Vorsichtsmassnahmen

- Nationale Sicherheitsbestimmungen müssen strikt eingehalten werden. Für Anwender in Deutschland gelten die unter www.baua.de veröffentlichten Beschlüsse des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) Nr. 602 und 603.
- Der PrioWESTERN BSE Kit darf nur in geeigneten Laboratorien durchgeführt werden.
- Weiter darf der PrioWESTERN BSE Kit nur von Personen ausgeführt werden, die über eine allgemeine Laborausbildung zum Umgang mit Prionen verfügen und die eine Einführung zur Testdurchführung des PrioWESTERN BSE Kit erhalten haben.
- Alle Proben müssen als potenziell infektiös und alle Gegenstände, die mit Probenmaterial in Kontakt gekommen sind, als potenziell kontaminiert betrachtet werden.

Hinweise

- Um optimale Testresultate mit dem PrioWESTERN BSE Kit zu erzielen müssen folgende Hinweise beachtet werden:
- Die Arbeitsanleitung muss strikt befolgt werden.**
 - Die Verwendung von Filterpipettenspitzen oder separaten Pipetten für die verschiedenen Pipettierschritte wird dringend empfohlen. Zusätzlich sind die Pipetten regelmässig zu kalibrieren.
 - Pipettenspitzen sind nach jedem Arbeitsschritt zu wechseln.
 - Für jedes Reagenz muss ein separates Reservoir verwendet werden.
 - Reagenzien dürfen nicht über die angegebene Haltbarkeit hinaus verwendet werden und sollten verworfen werden, sobald sich ihr Aussehen verändert hat.
 - Reagenzien verschiedener Kit-Lotnummern dürfen nicht im Einsatz kombiniert werden.
 - Mehrfach verwendbares Schneidewerkzeug und Pinzetten müssen gemäss nationalen Richtlinien dekontaminiert werden.
 - Falls der PrioGENIZER™ benützt wird, darf für die Homogenisierung von Gehirnproben ausschliesslich das Programm „P0 PRIONICS TSE“ verwendet werden.

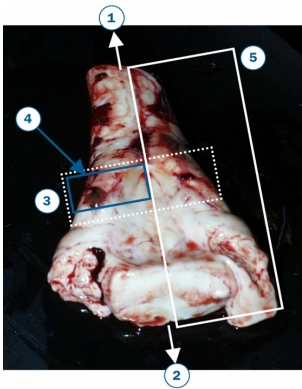
Probenentnahme und Homogenisierung

Entnehmen Sie ein 0.45–0.70 g schweres Stück Nervengewebe von der gekennzeichneten Stelle aus der linken **oder** rechten Seite des Hirnstamms z.B. mit einem Skalpell.

Die Probenentnahme und das Testen im Labor muss gemäss der EU-Richtlinie 999/2001 Kapitel C erfolgen, das sich auf die aktuellste Ausgabe des “Manual Standards for Diagnostic Test and Vaccines of the International Office of Epizootic Diseases (OIE)” bezieht und besagt: “Die bevorzugte Gewebeprobe für den Nachweistest sollte entweder aus dem Obex oder so nah als möglich von dieser Region entnommen werden, jedoch nicht weiter als 1.5 Zentimeter anterior zum Obex.” Das Bild zeigt die Region der Probenentnahme innerhalb der gekennzeichneten Stelle (Kasten 4).

Anmerkung: Nach der Probenentnahme muss eine vollständige Hemi-Sektion des Hirnstamms mit einer intakten Obex Region für den Bestätigungstest verfügbar sein.

(Ein detailliertes Probenentnahme-Protokoll über den technischen Support angefragt werden.)



- (1) Rückenmark
- (2) Gehirn
- (3) Obex-Region
- (4) Bereich, der Probenentnahme für PrioWESTERN BSE Kit
- (5) Gewebestück für das TSE Referenz-Zentrum

Medulla oblongata (Obex Region)

Die Probe ist ein ca. 8 cm langes Gewebestück vom Hirnstamm/Hirn-Rückenmark.

Homogenisierung

Vorbereitung

- 5x Homogenisierungspuffer (Komponente 1) mit reinem Wasser verdünnen, um Gebrauchs-lösung (Homogenisierungspuffer 1x) zu erhalten (Anhang A).

Homogenisierung

- Gewebeprobe in ein Homogenisierungsgefäß übertragen und wiegen (0.45–0.70 g).
- Das zehnfache Volumen der Gebrauchslösung (Homogenisierungspuffer 1x) zugeben (w/v; z.B. 5 ml auf 0.50 g Probenmaterial) und homogenisieren mit dem PrioGENIZER™ (Programm P0 Prionics TSE) oder dem FASTH/MediFASTH/FASTH 2 (45±5 s, 20'000±1'000 rpm) oder Omni Homogenisierungsgerät (60±10 s bei maximale Geschwindigkeit).
- Zweimal 1 ml des Homogenats pro Probe in eine Proben-Masterplatte transferieren (von diesem Zeitpunkt an wird jeder Schritt mit zwei Proben pro Original-Homogenat durchgeführt).
- PrioCLIP™ und Pypcon Homogenisierungsgefäße von „TSE-negativ“ getesteten Proben können gewaschen und wiederverwendet werden (siehe PrioCLIP™ und Pypcon Waschprotokoll, Anhang D).

Protease-Verdau

Folgende Mengen sind für 48 Proben.

(Siehe Anhang B für die benötigten Volumen für eine andere Anzahl von Proben als 48.)

Vorbereitung

- Inkubator für Mikrotiterplatten eine Stunde vor Gebrauch auf 48±1°C einstellen.
- Geben Sie 10 µl Verdauopuffer (Komponente 2) in jedes Loch der Verdau-Platte zu.

Protease Verdau

- Transferieren Sie 100 µl (zuerst mischen durch mindestens dreimaliges Auf- und Abpipettieren) von jedem Homogenat von der Master-Platte ins entsprechende Loch der Verdau-Platte mit einer Multichannel Pipette. Danach kann die Masterplatte abgedeckt werden und bei –20°C bis –80°C für bis zu 12 Monate gelagert werden.
- Geben Sie 10 µl Proteinase K (Komponente 3) in jedes Loch der Verdau-Platte und mischen Sie durch mindestens dreimaliges Auf- und Abpipettieren.
- Bedecken Sie die Verdau-Platte mit einer Abdichtfolie.
- Inkubieren Sie für 40±1 min bei 48±1°C.
- Stoppen Sie die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Protease-Inhibitor (Komponente 4). Mischen Sie durch mindestens dreimaliges Auf- und Abpipettieren.

Gel Elektrophorese

Vorbereitung

- 17-Taschen 12% NuPAGE™ Gele und Xcell sure-lock Kammern vorbereiten. Fertiggele aus dem Plastikbeutel nehmen und vorsichtig den Kamm und die weisse Folie am unteren Ende des Gels entfernen.
- Kontrollprobe auf 65±3°C für 2–5 Minuten heizen.
- Inkubator für Mikrotiterplatten ungefähr eine Stunde vor Gebrauch auf 98±4°C einstellen.

Gel Elektrophorese

- Geben Sie 100 µl vom PAGE Probenpuffer (Komponente 6) zum verdauten Homogenat in der Verdau-Platte und mischen Sie durch mindestens dreimaliges Auf- und Abpipettieren.
- Kochen Sie die Proben bei 98±4°C für 5 min±30 s.
- Die Verdau-Platte kann mit einer Abdeckfolie verschlossen werden und bei –20°C bis –80°C für bis zu 5 Tage gelagert werden.
- Vorher vorbereitete Proben werden vor dem Laden bei 65±3°C für 2–5 Minuten erwärmt.

Laden der Proben:

- Laden Sie 10 µl der Kontrollprobe in die erste Spur.
- Laden Sie 10 µl der erhitzten Proben pro Spur.
- Füllen Sie die innere und äussere Kammer mit 1x NuPAGE™ SDS-MOPS Laufpuffer auf und geben Sie 500 µl NuPAGE™ Antioxidant nur zur inneren Kammer zu.

Elektrophorese:

- Das Gel wird bei 200 V laufen gelassen, bis die blaue Farbstoff-Front ca. 1–2 cm vom unteren Rand entfernt ist (circa 30 Minuten).

Blotten

Vorbereitung

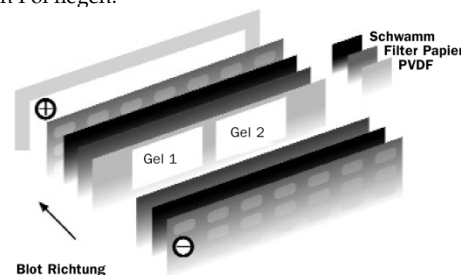
- Die PVDF Membrane (EMD Millipore, Immobilon-P, 0.45 µm; 13 × 17 cm) einige Minuten in Methanol (Circa 98%) schwenken und anschliessend sofort mindestens 10 Minuten in 1x Transferpuffer equilibrieren (für Membrangrößen siehe Anhang B).
- Transfertank mit gekühltem 1x Transferpuffer (5±3°C) füllen.

Blotten

Zusammensetzen des Transfer-Sandwiches

- Die equilibrierte Membrane auf ein mit reinem Wasser oder 1x Transfer Puffer angefeuchtetes Whatman Papier legen.

- Die NuPAGE™ Gele öffnen, oben den Kamm und unten die blaue Farbfront abschneiden und Gele blasenfrei auf die Membran legen. Bis zu 6 Gele haben Platz auf einer Membran von oben erwähnte Grösse (siehe Anhang C).
- Die Gele mit H₂O angefeuchtetem Whatman Papier bedecken, und Schwamm darauf legen.
- Sandwich schliessen und in den Transfertank stellen. Proteine sind negativ geladen und wandern zum positiven (roten) Pol. Daher müssen die PVDF-Membran näher am positiven Pol und die Gele näher am negativen Pol liegen.



- Die Transferzeit beträgt 60±2 Minuten bei 150 V und kontinuierlichem Kühlen (5±3°C).
- Membran mit den gebundenen Proteinen aus dem Sandwich nehmen und mit 1x Ponceau S anfärben. Molekulargewichtsmarker mit einem Buntstift anzeichnen und Membran mit TBST entfärben, bis die rote Farbe verschwunden ist (circa 2 × 1 Minute).

Immunologischer Nachweis

Blockierung

- Die Membran in eine saubere Plastikschaale legen und mit 50±2 ml 1x PVDF Blockierungspuffer Komponente 7; Siehe Anhang A für die Verdünnungstabelle) für 35±5 Minuten auf einem Wippschüttler inkubieren bei 22±3°C.

1. Antikörper

- 10 µl des 1. Antikörpers 6H4 (Komponente 8) in 50±2 ml TBST verdünnen (1:5000) zu die Membran geben und die Membran 60±5 Minuten bei 22±3°C (oder 12–18 Std. bei 5±3°C) unter sanftem Schütteln auf einem Wippschüttler inkubieren.
- Danach Membran mit TBST 3x während je circa 5 Minuten waschen.

2. Antikörper

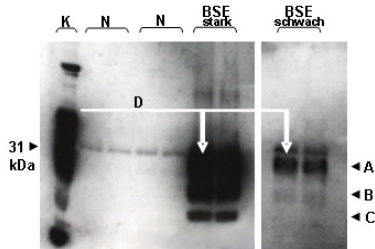
- 10 µl des 2. Antikörper-AP (Komponente 9) in 50±2 ml TBST verdünnen (1:5000) und die Membran 30±1 Minuten unter sanftem Schütteln auf einem Wippschüttler inkubieren.
- Danach Membran 5x während circa 5 Minuten mit TBST waschen.

Detektion

- Membran während 5–10 Minuten in 50±2 ml 1x Lumineszenzpuffer (Komponente 10; Siehe Anhang A für die Verdünnungstabelle) equilibrieren.
- 100 µl CDP-Star (12.5 mM, 50x) resp. 50 µl (25 mM, 100x) in 5 ml 1x Lumineszenzpuffer verdünnen.
- Membran auf eine Glasplatte legen. Das verdünnte CDP-Star gleichmässig auf die Membran geben und 5±1 Minuten bei 22±3°C inkubieren.
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen. Membrane mit einem Kleenex leicht abtupfen und mit Frischhaltefolie (Saran) abdecken. Zur Sichtbarmachung der Chemilumineszenz wird im Dunkeln ein ECL-Film solange belichtet, bis ein starkes Signal der Kontrollprobe und entweder eine Hintergrundfärbung oder die Proteinase K-Bande sichtbar sind (ca. 5–20 Minuten). Um ein optimales Resultat zu erreichen, müssen eventuell auch längere oder kürzere Entwicklungszeiten gewählt werden. Alternativ die Chemilumineszenz-Signale mit einem CCD Detektionssystem detektieren (z.B. mit FluorChem™, Alpha Innotech Corp.).

Interpretation der Ergebnisse

Die Abbildung auf der nächsten Seite illustriert die bei BSE-negativen und BSE-positiven Proben sowie bei der Kontrollprobe zu erwartenden Ergebnisse. Die Kontrollprobe (K) enthält die normale Isoform des Prionproteins (PrP^C), das beim immunologischen Nachweis detektiert wird. Hieraus resultiert eine diffuse Bande im Bereich von 25–35 kD (das Prionprotein hat verschiedene Glykosylierungs-varianten, die zu einer heterogenen Verteilung führen).



Bei negativen Proben (N) wird kein spezifisches Signal sichtbar. Die nicht immer deutlich erkennbare Bande bei 31 kD ist auf eine unspezifische Bindung des 2. Antikörpers an Proteinase K zurückzuführen und kann als zusätzliche Orientierungshilfe dienen.

Bei positiven Proben (BSE_{stark}; BSE_{schwach}) wird ein Signal sichtbar, dessen oberste Bande (A) bei ca. 30 kD liegt. Die Signalintensität aller Banden (insbesondere der unteren Banden B und C) kann hierbei schwächer sein als abgebildet, es muss aber zumindest die oberste Bande (A) deutlich erkennbar sein. Der Pfeil D bezeichnet den für die krankheits-spezifische Form des Prionproteins nach Verdau mit Proteinase K typischen Molekulargewichtsunterschied zu normalem, unverdaulichem PrP.

Wird der PrioWESTERN BSE Kit als Schnelltest verwendet muss ein positives Resultat mit einem Bestätigungstest abgesichert werden. Der PrioWESTERN BSE Kit darf nur gemäss den OIE/CRL Vorgaben als Referenztest verwendet werden.

Anhang A - Mischungstabellen für die Vorbereitung der Arbeitslösungen

Homogenisierungspuffer 1x (Gebrauchslösung)

Gebrauchslösung des Homogenisierungspuffers aus den angegebenen Volumina für Homogenisierungspuffer (5x) und für reines Wasser ansetzen.

Haltbarkeit der Gebrauchslösung: 1 Woche bei Lagerung bei 5±3°C.

Gebrauchslösung (Homogenisierungspuffer 1x)		Homogenisierungspuffer (5x) (Komponente 1)		Reines Wasser
250 ml	=	50 ml	+	200 ml
500 ml	=	100 ml	+	400 ml
1000 ml	=	200 ml	+	800 ml

Vol. PVDF Blockierungs-Puffer (1x)		Vol. PVDF Blockierungs-Puffer (5x) (Komponente 7)		Vol. reines Wasser
500 ml	=	100 ml	+	400 ml

Lumineszenzpuffer

Angegebene Volumina von reinem Wasser und 10x Lumineszenzpuffer (Komponente 10) werden gemischt um das gewünschte Volumen des Lumineszenzpuffers (1x) zu erhalten.

Vol. Lumineszenzpuffer (1x)		Vol. Lumineszenzpuffer (10x) (Komponente 10)		Vol. reines Wasser
270 ml	=	27 ml	+	243 ml

Vol. NuPAGE™ SDS-MOPS Laufpuffer (1x)		Vol. NuPAGE™ SDS-MOPS Laufpuffer (20x)		Vol. reines Wasser
1000 ml		50 ml		950 ml

Vol. Transfer Puffer (1x)		Vol. Transfer Puffer (10x)		Vol. reines Wasser		Vol. Methanol (98%)
2000 ml		200 ml		1600 ml		200 ml

Vol. TBST (1x)		Vol. TBS (20x)		Vol. reines Wasser		50% Tween 20
1000 ml		50 ml		950 ml		1 ml

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

Anhang B - Benötigte Volumina für unterschiedliche Proben-anzahl

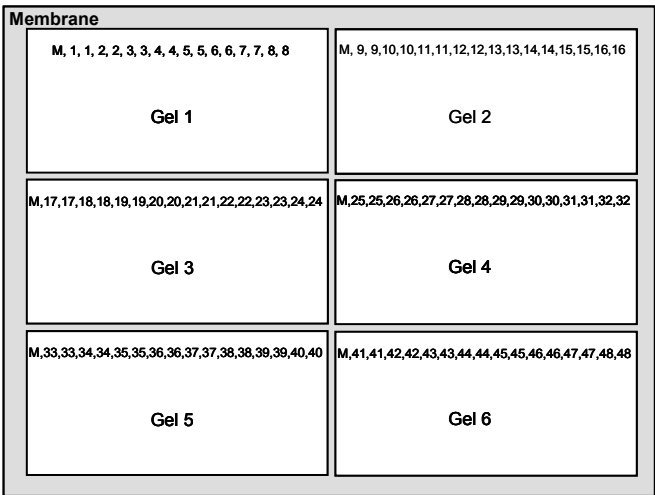
Anz. Gele	Schalengröße (cm)	Membran-größe	TBST	1. Anti-körper
6	Gross (22.4 × 15.6)	13 × 17 cm	50 ml	10 µl
4	Gross (22.4 × 15.6)	9 × 17 cm	50 ml	10 µl
3	Mittel (15 × 11.4)	13 × 8.5 cm	25 ml	5 µl
2	Mittel (15 × 11.4)	9 × 8.5 cm	25 ml	5 µl
1	Klein (5.5 × 9.5)	4.5 × 8.5 cm	10 ml	2 µl

Schalengröße (cm)	TBST	2. Anti-körper	Lumineszenzpuffer	CDP-Star	
				12.5 mM	25 mM
Gross (22.4 × 15.6)	50 ml	10 µl	5 ml	100 µl	50 µl
Gross (22.4 × 15.6)	50 ml	10 µl	4 ml	80 µl	40 µl
Mittel (15 × 11.4)	25 ml	5 µl	3 ml	60 µl	30 µl
Mittel (15 × 11.4)	25 ml	5 µl	3 ml	60 µl	30 µl
Klein (5.5 × 9.5)	10 ml	2 µl	2 ml	40 µl	20 µl

Anhang C - Schema für die Platzierung der Gele auf der Membran

Empfohlenes Schema für die Platzierung der Gele auf der Blot-Membran:

- 96-Loch Platte gefüllt mit 48 Doppel-Proben, auf 6 Gele mit je 17 Taschen transferiert.
- Nummern bezeichnen Proben 1–48 (M=Molekulargewichtsmarker mit unverdaulichem PrPC).



Anhang D - PrioCLIP™/Prypcon Wasch-Protokoll

Allgemeine Anweisungen

Rückverfolgbarkeit von Proben:

PrioCLIP™ und Prypcon Homogenisierungsgefässe müssen—durch Benutzen eines wasserfesten Stifts oder eines Etiketts—mit der Proben-Nummer gekennzeichnet werden, um die Rückverfolgbarkeit der Proben sicherzustellen. Die Markierung am Homogenisierungsgefäss darf erst nach Freigabe der Resultate entfernt werden.

Rückverfolgbarkeit des PrioCLIP™/Prypcon Gebrauchs:

Die Homogenisierungsgefässe sollten nicht mehr als 5-mal wiederverwendet werden. PrioCLIP™/Prypcon müssen nach jedem Gebrauch mit einem Punkt oder Gedankenstrich mittels wasserfesten Stifts gekennzeichnet werden.

Verwenden Sie keine Hypochlorit-haltigen Desinfektionsmittel fürs Waschen.

Vorbereitungen

- Füllen Sie zwei Behälter mit ausreichend deionisiertem Wasser (mindestens 25 L), um das vollständige Untertauchen der PrioCLIP™/Prypcon während des Waschens zu gewährleisten.

Entleerung

- Entleeren Sie die Gefässe mit den „TSE-negativ“ getesteten Homogenaten in eine autoklavierbare, hitze-resistente Flasche oder einen Einwegbehälter.
- Homogenisierungsgefässe, deren Inhalt als „initial reaktiv“ identifiziert wurde, dürfen nicht wiederverwendet werden und müssen gemäss nationalen Sicherheitsrichtlinien entsorgt werden.**

Waschen

- Tauchen Sie die leeren PrioCLIP™/Prypcon in einen Behälter mit deionisiertem Wasser, spülen Sie sie gründlich.
- Kontrollieren Sie die Homogenisierungs-Gefässe visuell auf mögliche Beschädigungen und Geweberückstände während dem Transfer von Behälter eins in Behälter zwei.
- Tauchen Sie die Gefässe ein und inkubieren Sie diese mindestens 30 Minuten bei 22±3°C.

Trocknen

- Nehmen Sie die PrioCLIP™/Prypcon aus dem Behälter, schütten Sie das restliche Wasser aus und lassen Sie sie bei 22±3°C vollständig trocknen.
- Alternativ können die PrioCLIP™/Prypcon in einem Trockenschrank getrocknet werden. Legen Sie die Gefässe auf eine hitzeresistente Unterlage. Erhitzen Sie sie für 2 Stunden auf 85±5°C und trocknen Sie sie über Nacht bei 50°C im Trockenschrank. Wiederholen Sie den Erhitzungs-Schritt (2 Stunden, 85±5°C).
- Überprüfen Sie die PrioCLIP™/Prypcon visuell. Entsorgen Sie Gefässe, die beschädigt sind oder Flüssigkeit oder Gewebe enthalten.
- Jetzt sind die PrioCLIP™/Prypcon bereit für den Wiedergebrauch.

Abfall-Entsorgung

- Homogenate und Waschlösungen müssen gemäss nationalen Sicherheitsrichtlinien entsorgt werden.

Ein detailliertes PrioCLIP™/Prypcon Waschprotokoll (inklusive Bilder) kann über den technischen Support angefragt werden.

Anhang E - OIE Zertifizierung: Zusammenfassung der Validierungsstudien

Anmerkung: Der Name des Kits wurde von Prionics™-Check WESTERN Kit in PrioWESTERN BSE Kit geändert.

Analytische Eigenschaften

Analytische Sensitivität

- Im Rahmen der EU-Validierungsstudie wurden Verdünnungsreihen getestet. Bei einer Verdünnung von 10⁻¹ reagierten von den 20 positiven Homogenaten 15 positiv, zwei fraglich und drei negativ. Bei einer Verdünnung von 10^{-1,5} zeigten sich drei Proben fraglich und der Rest negativ. Ebenso reagierten zwei Proben bei einer 10⁻² und eine einzelne Probe bei einer 10^{-2,5} Verdünnung fraglich. [Die positiven Proben wurden vom Central Veterinary Laboratory (CVL) in Weybridge zur Verfügung gestellt: Verwendet wurden Proben aus Hirnstamm und Rückenmark von Rindern mit klinischen Anzeichen von BSE, bestätigt durch histologische Untersuchung.]

Analytische Spezifität

- Die Spezifität wurde nicht gesondert untersucht. Einige Feldstudien, durchgeführt mit Proben verendeter Tiere, die an anderen Krankheiten als BSE litten (z.B. Enzephalitis, Hirnödemen, Tollwut oder Listeriose), zeigten jedoch konsistent, dass der Prionics™-Check WESTERN Kit über eine gute analytische Spezifität verfügt [siehe: D. Heim et al. (2000) Surveillance of BSE. *Arch Virol Suppl.* (16):127–33].

Datenreproduzierbarkeit

- Die im Zeitraum von 2002 bis 2007 durchgeführten Tests zeigen, dass mit dem Kit eine BSE-positive Probe in einer 1:10 Verdünnung nachgewiesen werden kann.
- Die Reproduzierbarkeit wurde außerdem in einer Vergleichsprüfung mit drei BSE Tests (Enfer – Bio-Rad TeSeE – der Prionics™-Check WESTERN Kit) untersucht. Durchgeführt wurde diese Untersuchung vom EU-Referenzlabor für TSE (VLA, Vereinigtes Königreich). Die Übereinstimmung zwischen den Probenduplikaten (n = 277) war hoch, außer in zwei Fällen, bei denen eine Übertragung aus einem positiven Well in einem kleinen unspezifischen Schmierfleck in einem der angrenzenden Wells einer negativen Probe führte. Dieser unterschied sich jedoch eindeutig von den positiven Ergebnissen, die eine charakteristische Größe und ein charakteristisches Bandenmuster für beide Wellduplikate zeigten.

Diagnostische Eigenschaften

Schwellenwertbestimmung

Dieser Test erlaubt keine quantitative Auswertung. Die Reaktion ist qualitativ und basiert auf zwei Kriterien, dem Auftreten des Signals und dessen Position. Dies ermöglicht eine einfache Unterscheidung zwischen echt positiven und (möglichen) falsch positiven Ergebnissen durch unverdaute, normale PrP.

Diagnostische Sensitivitäts- (DSn) und Spezifitätsbestimmungen (DSp)

Drei extern durchgeführte Evaluierungsstudien sind zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität beschrieben worden:

- Im Februar 2003 am schweizerischen BSE Referenzlabor (Neurozentrum/Universität Bern) durchgeführte Tests mit 38 positiven Proben (18 Homogenate & 20 Gewebeproben) aus dem Vereinigten Königreich / 190 Proben aus dem schweizerischen BSE Überwachungsprogramm (Gewebeproben von Rindern, die älter als 30 Monate sind und die histologisch/immunohistochemisch negativ getestet wurden).

	BSE-positiv bei IHC	BSE-negativ bei IHC
Test positiv bei der Prionics™-Check WESTERN Kit	38	0
Test negativ bei der Prionics™-Check WESTERN Kit	0	190
Diagnostische Sensitivität: 100%, CI [90,7 – 100,0%] Diagnostische Spezifität: 100%, CI [98,1 – 100,0%]		

- Kanadische Feldstudie 2003. Als Verlaufskontrolle zum Nachweis des Indexfalls im Mai 2003 wurden 2036 Geburts- und Futtermittelkohorten immunohistochemisch (IHC) und mit dem Prionics™-Check WESTERN Kit getestet. Diese Studie wurde von den Laboren der kanadischen Behörde für Lebensmittelkontrolle in Lethbridge, Winnipeg, Nepean und St-Hyacinthe durchgeführt.

	BSE-positiv bei IHC	BSE-negativ bei IHC
Test positiv bei der Prionics™-Check WESTERN Kit	1	0
Test negativ bei der Prionics™-Check WESTERN Kit	0	2036
Diagnostische Spezifität: 100%, CI [99,8 – 100,0%]		

- Evaluierung der Tests zur Diagnose übertragbarer spongiformer Enzephalitis bei Rindern für die Europäische Kommission 1999. Alle Proben wurden vom EU-Institut für Referenzmaterialien und Messungen (IRMM) in Geed, Belgien, vorbereitet und den unterschiedlichen Teilnehmern (der der Prionics™-Check WESTERN Kit war einer der ausgewählten Kits) in einem kodierten Blindformat präsentiert: Insgesamt 300 positive Proben (von Rindern mit klinischen Anzeichen von BSE, bestätigt durch histologische Untersuchung – zur Verfügung gestellt vom CVL Weybridge) und 1000 negative Proben (aus Neuseeland von gesunden, erwachsenen Rindern mit einem Mindestalter von 4 Jahren, bei der histologischen Untersuchung als negativ bestätigt).

	BSE-positiv in Histologie	BSE-negativ in Histologie
Test positiv bei Prionics™-Check WESTERN Kit	300	0
Test negativ bei Prionics™-Check WESTERN Kit	0	1000
Diagnostische Sensitivität: 100%, CI [98,8 – 100,0%] Diagnostische Spezifität: 100%, CI [99,6 – 100,0%]		

Übereinstimmung der Tests

Die Übereinstimmung des der Prionics™-Check WESTERN Kit mit der histologischen Untersuchung und der IHC ist hoch.

Reproduzierbarkeit

Bei der EU-Feldevaluierung 2004 wurden die Proben mit dem der Prionics™-Check WESTERN Kit untersucht. Diese Ergebnisse wurden mit Ergebnissen anderer in Evaluierung befindlicher Tests verglichen. Die Proben wurden in drei Kategorien unterteilt: positive Proben, negative Proben und Proben von geringer Qualität.

- Insgesamt 335 BSE-positive Proben wurden in drei Laboren getestet (VLA, Newcastle, UK - Analytico Food BV, Heerenveen, Holland und Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, Spanien).
- Insgesamt 24.534 BSE-negative Proben wurden in acht Laboren getestet (Analytico Food BV, Heerenveen, Holland; Institut für Veterinärmedizin, Mödling, Österreich; Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid, Lelystad, Holland; Laboratorio EET, Leon, Spanien; Labor Dr. Guenteert, Luzern, Schweiz; Instituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Turin, Italien; Irish Equine Centre, Kildare, Irland; Arthus Biotech GmbH, Hamburg, Deutschland).
- 423 zusätzliche Proben von geringer Qualität wurden in zwei Laboren getestet (VLA, Newcastle, UK und NeuroCenter, Bern, Schweiz).

Die inter-Labor-Ergebnisse aller getesteten Proben waren für den der Prionics™-Check WESTERN Kit identisch. Die Übereinstimmung mit anderen in Evaluierung befindlichen Tests war sehr hoch, mit Ausnahme einer schwach positiven Probe, die im Prionics™-Check WESTERN Kit, aber nicht im CediTect als positiv identifiziert wurde.

Quelle: Bericht: The Field Trial of Seven New Rapid Post Mortem Test for the Diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy in Bovines; IRMM; 12. November 2004.

Anwendungen

Der PrioWESTERN BSE Kit wird derzeit sowohl in Referenz- als auch in Routinelaboren überall auf der Welt eingesetzt.

Testlaboren wird empfohlen, an von OIE-Referenz- laboren organisierten Leistungstests und Labortrainingsprogrammen teilzunehmen.

Appendix F – Sicherheitsbestimmungen

Nationale Sicherheitsbestimmungen müssen von den Laboratorien eingehalten werden. Folgende Informationen – publiziert von der ACDP (the Advisory Committee on Dangerous Pathogens) – sind als Richtlinie verfügbar: “Transmissible spongiform encephalopathy agents: safe working and the prevention of infection”, Department of Health, London, UK (kann unter folgender Adresse bestellt werden: Stationery Office, ISBN 0113221665). Die derzeit aktuelle Version ist abrufbar auf <https://www.gov.uk/government/publications/guidance-from-the-acdp-tse-risk-management-subgroup-formerly-tse-working-group>.

Appendix G - Referenzen

1. 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.
2. Doherr MG, Oesch B, Moser M, Vandeveld M, Heim D (1999 Dec 4) Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record* 145:672.
3. 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.
4. 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.
5. Heim D, Wilesmith JW (2000) Surveillance of BSE. *Arch Virol* (16):127–33.
6. (2012) Bovine Spongiform Encephalopathy. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* OIE Chapter 2.4.6.
7. 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.



WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH

Protecting animals, preserving our future

Validiert und zertifiziert von der OIE als geeignet für die in dieser Gebrauchsinformation definierten Zwecke.

Zulassungsnummer: 20080102

Kundendienst und technischer Support

Besuchen Sie thermofisher.com/askaquestion, um technischen Support zu erhalten.

Aktuelles zum Kundendienst und technischen Support finden Sie unter thermofisher.com/support, darunter:

- Telefonnummern von Ansprechpartnern weltweit
- Bestellungs- und Web-Support
- Betriebsanweisungen, Handbücher und Protokolle
- Analysezertifikate
- Sicherheitsdatenblätter (SDB)

HINWEIS: Wenden Sie sich für Sicherheitsdatenblätter für Reagenzien und Chemikalien anderer Hersteller an den jeweiligen Hersteller.

Beschränkte Gewährleistung

Die Life Technologies Corporation bzw. ihre verbundenen Unternehmen räumt dem Käufer für ihre Produkte Gewährleistungsrechte wie in den Allgemeinen Verkaufsbedingungen von Life Technologies beschrieben ein, die auf der Website von Life Technologies unter thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions eingesehen werden können. Sollten Sie Fragen haben, kontaktieren Sie bitte Life Technologies unter thermofisher.com/support.



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

Inhaltliche Änderungen dieses Leitfadens behalten wir uns ohne Ankündigung vor.

HAFTUNGS-AUSSCHLUSS: IN DEM GESETZLICH ZUGELASSENEN UMFANG HAFTET LIFE TECHNOLOGIES UND/ODER SEINE TOCHTERUNTERNEHMEN NICHT FÜR BESONDERE, VERSEHENTLICHE, INDIREKTE, STRAFBARE, MEHRERE ODER FOLGESCHÄDEN IN VERBINDUNG MIT ODER HERVORGEHEND AUS DIESEM DOKUMENT, EINSCHLIESSLICH IHRER NUTZUNG DIESES DOKUMENTS.

Versionsgeschichte: Pub. Nr. MAN0013786 (Deutsch)

Ver.	Datum	Beschreibung
A.0	13. Juni 2019	<ul style="list-style-type: none">• Neues Dokument. Altes Dokument (WESTERN_PI_v12.1_d_160718.doc) zu neuester Dokumentvorlage aktualisiert, mit zugehörigen Aktualisierungen zu Informationen über beschränkte Lizenzen, Gewährleistungen, Marken und Logos.• Der Produktname wurde von Prionics™-Check WESTERN Kit in PrioWESTERN BSE Kit geändert.

Wichtige Lizenzinformationen: Für dieses Produkt gelten unter Umständen eine oder mehrere Lizenzen zur eingeschränkten Nutzung („Limited Use Label License“). Mit der Verwendung dieses Produkts erklären Sie sich mit den Bedingungen und Bestimmungen aller anwendbaren Lizenzen zur eingeschränkten Nutzung einverstanden.

©2019 Thermo Fisher Scientific Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Thermo Fisher Scientific und ihrer Tochtergesellschaften, sofern nicht anders angegeben.