

TeSeE™ **KIT DI PURIFICAZIONE** (192 tests) **Rif. : 355-1144**
KIT DI RILEVAMENTO (192 tests) - Protocollo rapido **Rif. : 355-1194**

**KIT DI REAGENTI PER LA PURIFICAZIONE E LA RIVELAZIONE
IN VITRO DELLA PrP^{Sc}**

Nell'Unione europea, questo test è approvato come test rapido per l'uso nei programmi di sorveglianza della BSE e dello scrapie nei bovini, ovini, e caprini, come sono definiti nell'allegato III, capitolo A del regolamento (CE) n° 999/2001.

Manuale d'istruzione

BIO-RAD

INDICE

- 1 - INFORMAZIONI GENERALI
- 2 - KIT DI PURIFICAZIONE TeSeE™
 - 2 - 1 Principio di purificazione della PrP^{Sc}
 - 2 - 2 Campioni
 - 2 - 3 Composizione del Kit di Purificazione TeSeE™
 - 2 - 4 Preparazione dei reagenti
 - 2 - 5 Conservazione, validità
 - 2 - 6 Procedura
 - 2 - 7 Limiti del protocollo
- 3 - KIT DI RIVELAZIONE TeSeE™ Protocollo rapido
 - 3 - 1 Principio della rivelazione della PrP^{Sc} con il metodo EIA
 - 3 - 2 Campioni
 - 3 - 3 Composizione del Kit di rivelazione TeSeE™ Protocollo rapido
 - 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 di tessuti nervosi prelevati da 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™ (192 tests) Rif. : 355-1144
- Siringa ed ago di calibrazione (x 200) Rif. : 355-1174
 - o Piastre di filtrazione (x 50) Rif. : 355-1179
- Piastre Deepwell (x 50) Rif. : 359-0132
- Medium beads (x 2000) Rif. : 355-1171

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

Eseguita con i seguenti reagenti :

- Kit di Rivelazione TeSeE™ (192 tests) - Protocollo rapido Rif. : 355-1194

TeSeE™ KIT DI PURIFICAZIONE

192 TESTS

355-1144

KIT DI REAGENTI PER LA PURIFICAZIONE *IN VITRO* DELLA PrP^{Sc}

Manuale d'istruzione

BIO-RAD

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

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

L'elaborazione dei campioni comprende le fasi seguenti :

- Frantumazione dei campioni
- Trattamento dei campioni con la proteinasi K
- Concentrazione della PrP^{Sc} mediante precipitazione
- Solubilizzazione della PrP^{Sc} per il dosaggio immunoenzimatico con l'impiego dei reagenti del Kit di Rivelazione TeSeE™ Protocollo rapido (Ref. : 355-1194).

2-2 CAMPIONI

Bovini: la purificazione della PrP^{Sc} si esegue sui campioni di Sistema Nervoso Centrale (SNC). Il cucchiaino di estrazione BSE (Ref. :355-1130) può essere utilizzato per estrarre il tronco encefalico. Poiché la distribuzione di PrP^{Sc} è eterogenea nel sistema nervoso centrale bisogna prelevare preferibilmente nell'area dell'obex del tronco encefalico per una rivelazione ottimale. L'apposita siringa (Ref. : 355-1175) consente di prelevare dall'obex in modo facile, rapido e sicuro.

Si prega di far riferimento al protocollo di campionamento per le istruzioni dettagliate relative ad una buona procedura di campionamento.

Piccoli ruminanti i cervi: la purificazione della PrP^{Sc} si esegue sui campioni di Sistema Nervoso Centrale (SNC) o sui tessuti periferici (linfonodi, milza,...). Il cucchiaino di estrazione per gli piccoli ruminanti (Ref. :355-1184) può essere utilizzato per estrarre sia il tronco encefalico che il cervelletto.

Poiché la distribuzione della PrP^{Sc} è eterogenea nel sistema nervoso centrale, bisogna prelevare preferibilmente nell'area dell'obex del tronco encefalico per una rivelazione ottimale.

I campioni vengono tagliati e pesati singolarmente.

Nota: altri tessuti (tonsille, ileo, palpebre...) possono essere utilizzati solo a scopo di 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.

2-3 COMPOSIZIONE DEL KIT DI PURIFICAZIONE TeSeE™

| 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 A | Soluzione di denaturazione | 1 fialone (55 ml) | +2°C a +8°C |
| Reagente B | Tampone di precipitazione Colorante : blu bromofenolo | 1 fialone (55 ml) | +2°C a +8°C |
| Reagente C | Tampone di solubilizzazione Colorante : verde malachite | 1 fialone (7 ml) | +2°C a +8°C |
| PK | Proteinasi K Colorante : rosso fenolo | 1 fialone (0.5 ml) | +2°C a +8°C |

Il reagente A, il reagente B e i tubi di frantumazione sono dei componenti generici. Possono essere usati con tutti i lotti del Kit di Purificazione TeSeE™.

2-4 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Tutti i reagenti del Kit di Purificazione TeSeE™, ad eccezione della proteinasi K, sono pronti per l'uso. Il reagente A 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 A) :

| NUMERO DI CAMPIONI | REAGENTE A | 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 A. Dopo la ricostituzione, omogeneizzare la soluzione con inversioni consecutive fino ad ottenere una soluzione rossa omogenea.

2-5 CONSERVAZIONE, VALIDITÀ

Conservare il Kit di Purificazione TeSeE™ (Rif. : 355-1144) ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C. Tutti i reagenti restano stabili a questa temperatura 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 i tessuti periferici (tonsille, ileo, linfonodi, palpebra, milza,...) aggiungere una biglia di taglia media ("Medium bead", Rif. : 355-1171) nel tubo di frantumazione, prima di aggiungere il campione.

Prelevare una massa di 350 mg ± 40 mg di tessuto nervoso dal tronco encefalico, di preferenza nella zona dell'obex o 200 mg ± 20 mg di tessuto periferico.

Depositare i campioni all'interno delle provette per la frantumazione, chiudere bene e procedere con la fase di frantumazione nell'omogeneizzatore (sistemi Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ o TeSeE™ PRECESS 48™).

2. Macinazione dei campioni :

Inserire le provette nella corona dell'omogeneizzatore (sistemi Ribolyser®, TeSe™ PRECESS 24™ o TeSe™ PRECESS 48™). Eseguire un ciclo di agitazione con i seguenti parametri dello strumento :

| | Ribolyser® | | TeSe™ PRECESS 24™ o 48™ | |
|--------------|-----------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| | Tessuti nervosi | Tessuti periferici | Tessuti nervosi | Tessuti periferici |
| Tempo (seg.) | 45 | 2 x 45* | - | - |
| Velocità | 6,5 | 6,5 | - | - |
| Programma | - | - | Programma 1 | Programma 2 |

* Aspettare 5 minuti tra i 2 cicli di agitazione.

In caso la frantumazione risultasse insufficiente, sarà possibile eseguire 1 o 2 altri cicli di agitazione assicurandosi che la provetta torni a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) tra un ciclo e l'altro (usando, ad esempio, del ghiaccio tritato).

3. Trasferimento del campione :

Rimuovere i tubi di triturazione dall'omogeneizzatore, risospendere l'omogenato per inversione prima di aprire i tubi.

Trasferire l'omogenato con uno dei seguenti metodi :

• Metodo con Siringa di Calibrazione

Prelevare 250 µl con la siringa di calibrazione (Rif. : 355-1174) avendo cura di immergere l'ago di calibrazione nello strato di biglie per evitare di campionare frammenti di tessuto non ben omogenato.

Trasferire 250 µl di campione in tutti i tubi Eppendorf da 2ml o nella Deepwell (Rif. : 359-0132).

• Metodo con piastra di Filtrazione

Il trasferimento e la filtrazione sono eseguite separatamente utilizzando una Piastra di Filtrazione (Rif. : 355-1179) ed una piastra Deepwell (Rif. : 359-0132), con una delle due seguenti tecniche di filtrazione.

- Tecnica con Vuoto :

Posizionare la piastra Deepwell (Rif. : 359-0132) (la piastra master) sul fondo del collettore del vuoto, la guida del collettore e quindi la Piastra di Filtrazione (Rif. : 355-1179). Prelevare almeno 400 µl (≤ 1000 µl) con un puntale da 1000 µl e trasferire in un pozzetto della Piastra di Filtrazione (Rif. : 355-1179), con esclusione delle prime sei posizioni (da A1 a F1). Applicare un film plastico sopra la piastra di filtrazione. Posizionare la capacità di vuoto della pompa (Rif. : 359-0350) a 25,4 cm Hg ($\pm 2.5\%$). Accendere la pompa e verificare la corretta capacità di vuoto, quindi aprire la valvola per un minuto ± 6 s. chiudere la valvola, spegnere la pompa e rilasciare il vuoto dal collettore.

- Tecnica con centrifugazione :

Prelevare almeno 400 µl (≤ 1000 µl) con un puntale da 1000 µl e trasferire in un pozzetto della Deepwell (Rif. : 355-1179) preventivamente sovrapposta ad una piastra Deepwell (Rif. : 359-0132) (piastra master), con esclusione delle prime sei posizioni (da A1 a F1). Applicare un film plastico sopra la piastra di filtrazione.

Centrifugare il sistema completo (piastra di filtrazione e piastra Deepwell) per 1 min a 500 g. Assicurarsi che la piastra di filtrazione sia saldamente in posizione sulla piastra Deepwell.

Nota :

La centrifuga deve essere equipaggiata con un rotore per Deepwell (Rif. : 359-0136), per la centrifuga Eppendorf 5804R (Rif. : 359-1396).

Per entrambe le tecniche scartare poi la piastra di filtrazione e trasferire 250 µl di campione filtrato in un'altra Deepwell (la piastra di purificazione) per il protocollo manuale oppure posizionare direttamente la piastra master sullo strumento NSP (fare riferimento al manuale dell'operatore del TeSeE™ NSP).

Nota :

A questo stadio, i tubi di triturazione dopo omogenizzazione, le micro-provette e la piastra Deepwell dopo il trasferimento del campione possono essere conservati chiusi :

| | A temperature ambiente (da +18°C a +30°C) per 8 ore | Da +2°C a 8°C (in ghiaccio od in frigorifero) per 15 ore | A -20°C per 1 anno* |
|---|---|--|------------------------|
| Tubi di triturazione e le micro-provette | Si | Si | Si |
| Piastra Deepwell | Si | Si | Non |

* I campioni congelati devono essere scongelati a temperatura ambiente (da +18°C a +30°C). I campioni possono essere congelati e scongelati per un massimo di tre volte. I campioni devono essere sempre omogenati per inversione prima dell'uso.

4. Trattamento della PK :

Distribuire 250 µl (± 10%) di soluzione di proteinasi K ricostituita [vedi paragrafo 2.4] in ogni micro-provetta o pozzetto di piastra di purificazione. Non superare i 5 minuti per la distribuzione della proteinasi K ricostituita tra il primo e l'ultimo campione. Omogenare immediatamente le micro-provette chiuse oppure le piastre Deepwell sigillate con film alluminio 10 volte per inversione. Non superare i 2 minuti tra l'omogenizzazione e l'incubazione a 37°C. Incubare a 37°C ± 2°C in un incubatore a blocchi riscaldanti per 10 ± 1 minuti.

Note :

Utilizzando le Deepwell, il blocco riscaldante deve essere equipaggiato con un rack adattatore per Deepwell (Rif. : 359-0134).

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

Rimuovere le micro-provette o le piastre Deepwell dall'incubatore a blocchi riscaldanti. Aprire le provette e distribuire 250 µl (± 10%) di reagente B in tutte le microprovette o nei pozzetti della Deepwell. Seguire lo stesso ordine di distribuzione come descritto nel passaggio 4. Non superare i 2 minuti dall'estrazione dall'incubatore alla omogenizzazione. L'omogenizzazione e' effettuata seguendo la stessa procedura del passaggio 4.

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

Entro 30 minuti, dopo la distribuzione e la miscelazione del reagente B : centrifugare le micro-provette o le piastre di purificazione come di seguito :

| Centrifugazione | Micro provette | | Piastre Deepwell |
|------------------|----------------|--------|------------------|
| Velocità (g) | 20 000 | 15 000 | 2 000 |
| Tempo (mm) | 5 | 7 | 10 |
| Temperatura (°C) | 20 | 20 | 4 |

Nota : Per la piastra Deepwell aspettare 5 minuti a 37°C o 10 minuti a temperature ambiente (da +18°C a +30°C) dopo la centrifugazione.

7. Chiarificazione del campione :

Scartare il sovrinatante capovolgendo le micro-provette in un apposito contenitore. Asciugare le micro-provette capovolgendole su carta assorbente per 5 minuti.

Oppure posizionare la piastra Deepwell nell'unità DW40 (Rif. : 359-0137). Selezionare il programma 'TSE DW' e selezionare il numero di strip da processare. Alla fine del processo con il DW 40 la piastra Deepwell deve essere asciugata, capovolgendola per 5 minuti su carta assorbente.

Distribuire 25 μl ($\pm 10\%$) di reagente C in tutte le micro-provette o nei pozzetti della Deepwell.

Non superare i 10 minuti tra la fine dell'eliminazione del liquido dalla piastra e la distribuzione del tampone C.

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 C e l'inizio dell'incubazione. Non coprire la piastra Deepwell durante l'incubazione.

Note :

Se si usa la Deepwell, il blocco riscaldante deve essere equipaggiato con un rack adattatore per blocco riscaldante (Rif. : 359-0134).

Rimuovere le micro-provette o le Deepwell dall'incubatore, ed omogenare le provette con un vortex (5 ± 2 secondi).

I campioni in micro-provette o in Deepwell possono essere conservati per 5 ore a $+2^{\circ}\text{C}$ to $+8^{\circ}\text{C}$ o congelati per 72 ore a -20°C . I campioni congelati devono essere scongelati a temperatura ambiente (da $+18^{\circ}\text{C}$ a $+30^{\circ}\text{C}$) ed omogenati successivamente utilizzando un vortex (5 ± 2 secondi).

Fare riferimento alle istruzioni d'uso TeSeE™ Rivelazione Procollo rapido (Rif.: 355-1194) per i dettagli del protocollo di rivelazione.

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.

TeSeE™ KIT DI RIVELAZIONE - Protocollo rapido

192 TESTS

355-1194

**KIT DI REAGENTI PER LA RIVELAZIONE *IN VITRO* DELLA PrP^{Sc}
DOPO PURIFICAZIONE**

Manuale d'istruzione

BIO-RAD

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

Il Kit di Rivelazione TeSeE™ Protocollo rapido è una tecnica immunoenzimatica (formato sandwich) che impiega 2 anticorpi monoclonali per la rivelazione della proteina prione anormale, resistente alla proteinasi K, dai tessuti prelevati da animali 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), campioni preparati con i reagenti del Kit di Purificazione TeSeE™ (Réf. : 355-1144) 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 ottenuti dai tessuti trattati con i reagenti e nelle condizioni d'impiego previste dal Kit di Purificazione TeSeE™ (Rif. : 355-1144).

I campioni purificati vanno diluiti con il reagente R6 del Kit di Rivelazione TeSeE™ Protocollo rapido.

3-3 COMPOSIZIONE DEL KIT

| ETICHETTATURA | TIPO DI REAGENTE | PRESENTAZIONE |
|---------------|--|--------------------|
| R1 | Micropiastra : 12 strisce da 8 pozzetti rivestite di anticorpo 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 : Tampone PBS pH 7,4 integrato con peptide sintetico non infettivo. Liofilizzato Conservante : ProClin™ 300 (0,1%) | 1 flacone |
| R6 | Diluyente dei 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 (2.8 ml) |
| R8 | Tampone di substrato di perossidasi : Soluzione di acido citrico e sodio acetato pH 4,0 contenente H ₂ O ₂ 0,015 % e etilsolfossido (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: diluyente 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™ Protocollo rapido.

3-4 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Prima dell'uso, lasciare che i reagenti del Kit di Rivelazione TeSeE™ Protocollo rapido 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, lasciare che la micropiastra raggiunga la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) nella sua confezione protettiva con un dissecante 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 o 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 4 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 | Micropiastro 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 | 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 (± 10%) di reagente R6.

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

3-7 PROCEDURA

TeSeE™ Kit di Rivelazione - Protocollo rapido (Ref.: 355-1194) 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 essicante 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 100 µl (± 10%) di controlli/campioni nei pozzetti 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 in soltanto un pozzetto.
4. Coprire con film adesivo ed incubare per 30 mn ± 2 mn a 37°C ± 2°C.
5. Preparare soluzione di lavaggio (R2).
6. Preparare 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 passo successivo.
8. Distribuire 100 µl (± 10%) di soluzione di coniugato (R7) in ciascun pozzetto.
9. Coprire con film adesivo ed incubare a 30 mn ± 2 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 passo 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 ± 2 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 | RATE | Manifold | STRIPS | Met. (Method) | MODE | CKCS SW ASP. | ASP. TIME | VOLUME | OVER FLOW | LIQUID FLOW | FLOW | BOT. WASH NUMBER | BOTTOM TIME | BOT. ASP. NUMBER | SHAKE TIME | Ni-OF CYCLES | SOAKING | MET. INTER | Ni-OF KITS | KIT INTER |
|--------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------|-------|--------------|-----------|--------|-----------|-------------|---------------------------|------------------|-------------|------------------|------------|--------------|-----------------------------|------------|------------|-----------|
| Main parameter | Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575) | 1*8 (PW40/1575) 2*8 (PW41) | 1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| Method 1 | - | - | - | WASH | Plate | Yes | 0,3 | 800 | 2,5 | WT | 0 (PW40/1575) 5 (PW41) | - | - | - | - | 3 | 30 (PW41) 45 (PW40/1575) | 0 | - | - |
| Method 2 | - | - | - | BOTTOM ASP. | Plate | Yes | 0,3 | - | - | - | - | - | - | 1 | - | 1 | 0 | - | - | - |

NOME : TSE 5

| EDIT mode function | RATE | Manifold | STRIPS | Met. (Method) | MODE | CKCS SW ASP. | ASP. TIME | VOLUME | OVER FLOW | LIQUID FLOW | FLOW | BOT. WASH NUMBER | BOTTOM TIME | BOT. ASP. NUMBER | SHAKE TIME | Ni-OF CYCLES | SOAKING | MET. INTER | Ni-OF KITS | KIT INTER |
|--------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------|-------|--------------|-----------|--------|-----------|-------------|---------------------------|------------------|-------------|------------------|------------|--------------|-----------------------------|------------|------------|-----------|
| Main parameter | Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575) | 1*8 (PW40/1575) 2*8 (PW41) | 1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| Method 1 | - | - | - | WASH | Plate | Yes | 0,3 | 800 | 2,5 | WT | 0 (PW40/1575) 5 (PW41) | - | - | - | - | 5 | 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

DO R3 = media delle quattro DO dei pozzetti R3

2) Calcolo del valore di soglia

Il valore di soglia è pari a : $DO\ R3 + 0,210$

Esempio

DO R3 = 0,020

Valore di soglia = $0,020 + 0,210 = 0,230$

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 0,150.

È possibile eliminare un massimo di un singolo valore aberrante se la densità ottica è superiore o uguale a 0,150.

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 (DO R4) deve essere superiore o uguale a 1,000 (DO).

Il test va ripetuto se la media delle densità ottiche dei controlli positivi (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™ Protocollo rapido.

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 reattiva dal Kit di Rivelazione TeSeE™ Protocollo rapido 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™ Protocollo rapido quando almeno una delle 2 misurazioni è positiva (DO maggiore o equivalente al valore di soglia). Il campione è considerato negativo secondo il Kit di Rivelazione TeSeE™ Protocollo rapido quando questi due valori sono inferiori a quello di soglia.

I campioni riesaminati in duplicato e risultati negativi secondo il Kit di Rivelazione TeSeE™ Protocollo rapido 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™ Protocollo rapido. 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 in conformità 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 :

- Microprovette 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 semiautomatica del campione : sistema TeSeE™ NSP.

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 termostattizzata 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.
- 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 reagenti derivanti da kit con numeri di lotto diversi, fatta eccezione per componenti generici : soluzione di lavaggio (R2), diluente dei campioni (R6), tampone di substrato di perossidasi (R8), cromogeno (R9), soluzione di arresto (R10), tubi di frantumazione, reagente A e reagente B.

- Soluzione di lavaggio (R2), diluente dei campioni (R6), tampone di substrato di perossidasi (R8), cromogeno (R9), soluzione di arresto (R10) e i tubi di frantumazione possono essere utilizzati con gli altri prodotti della gamma TeSeE™ (TeSeE™ e TeSeE™ sheep/goat).
- 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 a 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.

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 considerate come contaminate.
- 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 1 M. Se il liquido contaminante è un acido, le superfici contaminate vanno prima neutralizzate con idrossido di sodio prima di usare ipoclorito di sodio. 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 ipoclorito di sodio o reagente B.

- 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.
- Il reagente B è una sostanza pericolosa classificata dalla legislazione europea come nociva (alcool >25%).
- I reagenti contenenti ProClin™ 300 0,1% sono classificati dalla legislazione europea come preparazioni irritanti.



Xn
(Alcool > 25%)
(0,1% ProClin™ 300)

R : 10-22-37/38-41-43-67 Infiammabile. Dannoso se ingerito. Irritante per l'apparato respiratorio e la cute. Rischio di seri danni agli occhi. Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle. L'inalazione del vapore può provocare sonnolenza e capogiri.

S : 7/9-13-26-28-37/39-46 Tenere il contenitore ben chiuso e in un luogo ben ventilato, lontano dagli alimenti, dalle bevande e dal mangime animale. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con acqua in abbondanza e consultare il medico. In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua. Indossare indumenti, guanti protettivi e protezione per gli occhi e per il viso. Se ingerito, consultare il medico immediatamente e mostrargli questo contenitore o etichetta.

7 - BIBLIOGRAFIA

1. J. GRASSI, E. COMOY, S. SIMON, C. CREMINON, Y. FROBERT, S. TRAPMANN, H. SCHIMMEL, S.A.C. HAWKINS, J. MOYNAGH, JP DESLYS, G.A.H. WELLS (2001)
Rapid Test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue.
The Veterinary Record (149) 577-582.
2. JP. DESLYS, E. COMOY, S. HAWKINS, S. SIMON, H. SCHIMMEL, G. WELLS, J. GRASSI, J. MOYNAGH (2001)
Screening slaughtered cattle for BSE - Nature (409) 476-477.
3. E. COMOY (2000)
Contribution au développement d'un test de diagnostic post mortem des bovins atteints d'Encephalopathie Spongiforme Bovine.
Thèse de doctorat vétérinaire (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort).
4. EUROPEAN COMMISSION
Directorate General DG XXIV (1999).
Preliminary Report : The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible Spongiform Encephalopathy in bovines.
5. JP. DESLYS (1999)
Prevention du risque d'Encephalopathie Spongiforme Subaiguë Trans-missible.
La Revue du Praticien (49) 966-970.
6. R. KNIGHT (1999)
The relationship between new variant Creutzfeldt-Jakob Disease and Bovine Spongiform Encephalopathy - Vox sanguinis (76) 203-208.
7. D. DORMONT (1997)
Les Agents Transmissibles Non Conventionnels ou prions - Virologie (1) 11-22
8. F. HILLA, M. DESBRULAIS, S. JOINER, KCL SIDLE, I. GOWLAND, J. COLLINGE, UJ. DOEY, P. LANTOS (1997)
The same prion strain causes CJ disease and BSE - Nature (389) 448-450.
9. CI. LASMEZAS, JP. DESLYS, O. ROBAIN, D. DORMONT (1997)
L'agent secret des maladies à prions - La Recherche 46-53.
10. AM. HAYWOOD (1997)
Transmissible Spongiform Encephalopathies.
The New England Journal of Medicine (337-25) 1821-1828.
11. J. COLLINGE, KC. SIDLE, J. MEADS, J. IRONSIDE, AF. HILL (1996)
Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD.
Nature (383) 685-690.
12. RG. WILL, J. IRONSIDE, M. ZEIDLER, SN. COUSENS, K. ESTIBEIRO, A. ALPEROVITCH, S. POSER, M. POCCHIARI, A. HOFMAN, PG. SMITH (1996)
A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the U.K. - Lancet (347) 911-925.
13. SB. PRUSINER & AL (1993)
Immunologic and molecular biologic studies of prion protein in Bovine Spongiform Encephalopathy.
The Journal of Infectious Diseases (167) 602-613

Siringa per campioni 355-1175

**METODO DI CAMPIONAMENTO PER LE ANALISI BIO-RAD
DI RIVELAZIONE DELLA TSE (PLATELIA® E TeSeE™ PROTOCOLLO
RAPIDO)**

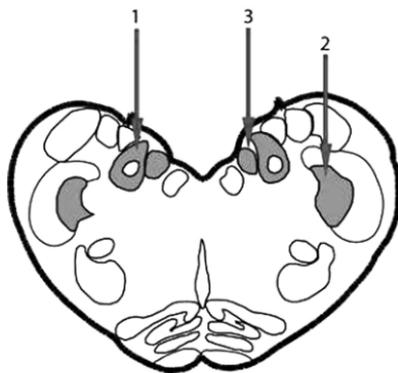
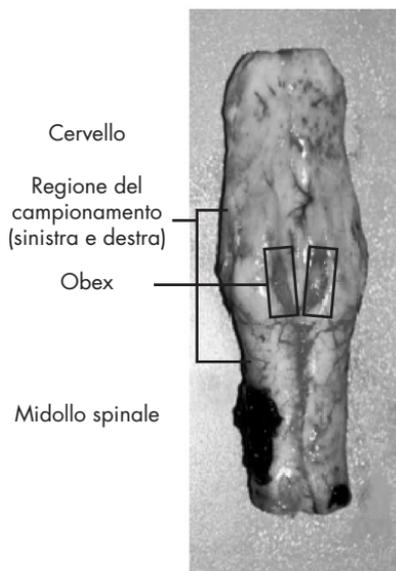
BIO-RAD

INDICE

- 1 - INFORMAZIONI GENERALI
 - 1 - 1 Raccolta di campioni al mattatoio
 - 1 - 2 Procedura di campionamento in laboratorio
- 2 - SIRINGA BIO-RAD PER IL PRELIEVO DEI CAMPIONI
- 3 - MASSA DI CAMPIONE NECESSARIA PER IL TEST
- 4 - PROCEDURA OPERATIVA
- 5 - PRECAUZIONI/AVVERTENZE
- 6 - PROCEDURE PER L'IGIENE E LA SICUREZZA

1 - INFORMAZIONI GENERALI

I saggi Bio-Rad per la rivelazione della TSE vengono eseguiti su un campione di 350 ± 40 mg di tessuto nervoso centrale (SNC). La regione anatomica più idonea per l'individuazione della PrP^{Sc} negli animali infetti è il tronco encefalico, più precisamente nella zona del nucleo del nervo vago, nella regione dell'obex. Questa è la zona del tronco encefalico in cui la PrP^{Sc} è maggiormente concentrata.

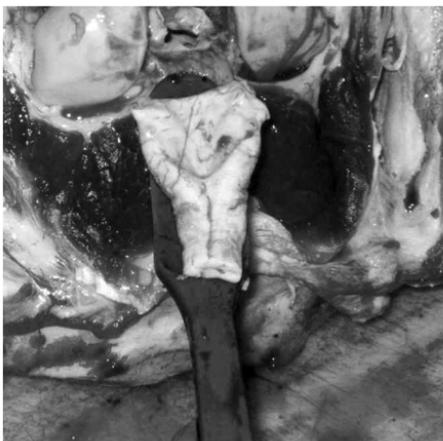


Sezione trasversale del tronco encefalico a livello dell'obex, che identifica il sito principale per la diagnosi mediante istopatologia e immunostochimica nella BSE (nucleo del tratto solitario [1] e nucleo del tratto V del trigemino [2]) e nella scrapie (nucleo dorsale del vago [3])

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

1 - 1 Raccolta dei campioni al mattatoio

Il tronco encefalico può essere prelevato rapidamente e con facilità con uno strumento adeguato o con un cucchiaio per la raccolta di campioni, attraverso il forame occipitale, senza aprire la cavità cranica.



Raccolta del campione con il cucchiaio per campioni Bio-Rad

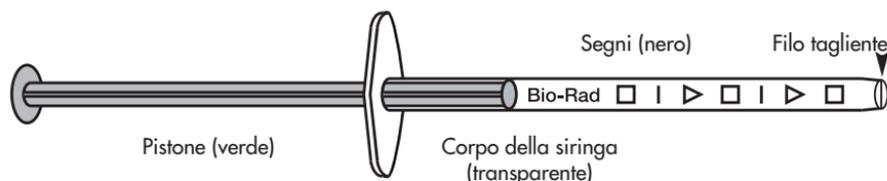
1 - 2 Procedura di campionamento in laboratorio

L'intero campione di tronco encefalico viene inviato al laboratorio dove si effettuerà il test, accertandosi che siano rispettate le misure di sicurezza biologica raccomandate dalle autorità regolatrici del paese in questione. In laboratorio, la quantità adeguata di materia celebrale viene escissa (lama del bisturi, ecc.) dalla regione dell'obex o prelevata con una **siringa per campioni Bio-Rad (Rif.: 355-1175)** che consente di prelevare dalla zona appropriata la quantità di campione necessaria in modo rapido e sicuro, senza rischi di ferite da taglio.

Di seguito viene descritta la procedura per prelevare in modo efficace il campione dalla regione dell'obex utilizzando la siringa Bio-Rad per il prelievo di campioni senza danneggiare il tessuto.

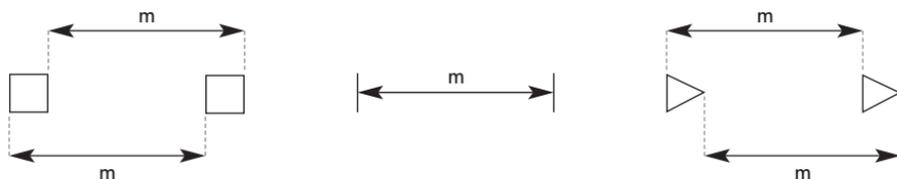
2 - SIRINGA BIO-RAD PER IL PRELIEVO DEI CAMPIONI

La siringa Bio-Rad per il prelievo dei campioni consiste in un pistone verde e un corpo trasparente. Il corpo della siringa è etichettato con una serie di forme geometriche. (□ ▷ |)



3 - MASSA DI CAMPIONE NECESSARIA PER IL TEST

La massa di campione dovrebbe occupare lo spazio compreso tra due simboli della stessa forma che corrisponde a una massa (m) di 350 +/- 40 mg.



4 - PROCEDURA OPERATIVA

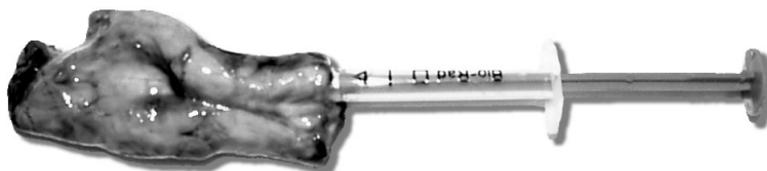
- Prendere una siringa per campioni ed estrarre il pistone verde fino a 1 cm circa dal fondo poi spingerlo di nuovo verso il fondo.
- Afferrare saldamente il tronco encefalico con una mano servendosi di un involucro monouso (busta di plastica, guanto, ecc.) al fine di evitare un'eventuale contaminazione crociata tra campioni. L'estremità del tronco encefalico dovrebbe rimanere accessibile.
- Con l'altra mano posizionare l'estremità aperta della siringa per campioni sul lato destro o sinistro della base del tronco encefalico.

Nota: è necessario che un'emissione completa del tronco encefalico con una regione dell'obex intatta rimangano disponibili dopo la raccolta del campione per i test di conferma.



- Inserire gradualmente il corpo della siringa nel tronco encefalico sempre tenendo il pistone verde nella sua posizione (relativamente al tronco encefalico).

Nota: Nel prelevare il campione dalla regione dell'obex, controllare che il corpo della siringa rimanga all'interno del lato selezionato del tronco encefalico.



- Interrompere il movimento quando l'estremità del corpo della siringa raggiunge il limite superiore della zona di campionamento.
- Tagliare la parte interna del campione ruotando il corpo della siringa di un giro completo.
- Rimuovere lentamente la siringa per campioni dal tronco encefalico, facendo attenzione a non danneggiare i tessuti circostanti. Il rimanente tronco encefalico può essere riposto nel suo contenitore per campioni originale.
- Controllare l'eventuale presenza di vuoti d'aria nella parte di campione prelevata. Se necessario, comprimere il campione prelevato chiudendo l'estremità del corpo della siringa e spingendo il pistone verde fino a completa eliminazione dei vuoti d'aria; assicurarsi inoltre che il tessuto più vicino all'apertura del corpo della siringa non fuoriesca.
- **Tenendo ferma la parte superiore del corpo della siringa, muovere il pistone verde verso il simbolo più vicino.**
- Controllare che il campione copra almeno una zona corrispondente alla "m", come descritto nella sezione precedente del presente documento (Massa di campione necessaria per il test).
- Prendere un tubo di frantumazione e rimuovere il tappo, con la siringa per campioni spingere deprimere con cautela il pistone verde fino al successivo simbolo identico al fine di assicurare che la massa esatta di tessuto ("m") venga dispensata nel tubo di frantumazione. È opportuno ricordare che il pistone deve essere spostato fino alla corrispondente posizione del simbolo successivo come indicato nella sezione "Massa di campione necessaria per il test".
- Tagliare il campione prelevato appoggiando l'estremità della siringa per campioni contro il margine interno del tubo di frantumazione.
- La parte non utilizzata del campione prelevato può essere conservata riponendo la siringa per campioni con la parte rimanente del tronco encefalico nel suo contenitore originale.

5 - PRECAUZIONI/AVVERTENZE

Come per qualunque dispositivo di pipettaggio, Bio-Rad raccomanda che gli operatori che impiegano la siringa per campioni siano sottoposti a monitoraggi periodici, per una popolazione statisticamente rappresentativa di campioni prelevati, in modo da assicurare che i pesi campionati rientrino nell'intervallo richiesto.

Le siringhe per campioni devono essere utilizzate una sola volta e poi eliminate al fine di evitare eventuali contaminazioni crociate tra i diversi campioni.

Il campione deve essere prelevato con tutte le dovute precauzioni al fine di assicurare che il rischio di contaminazione per gli operatori sia ridotto al minimo.

Le siringhe utilizzate devono essere eliminate dopo essere state decontaminate (vedere le istruzioni per l'Igiene e la Sicurezza).

Se la parte di campione prelevata non riempie tutto il corpo della siringa nonostante la procedura sia stata eseguita correttamente, si consiglia di pesare il campione.

6 - PROCEDURE PER L'IGIENE E LA SICUREZZA

Le condizioni di igiene, di sicurezza e di buona pratica di laboratorio devono essere in accordo con le norme in vigore delle autorità regolatrici del paese.

L'uso della siringa per campioni è destinato esclusivamente alle procedure diagnostiche "in vitro".

Indossare guanti monouso durante la manipolazione dei reagenti e dei campioni e lavarsi a fondo le mani dopo la loro manipolazioni.

Qualunque strumentazione che sia venuta in contatto diretto con i campioni deve essere considerata come contaminata.

Le superfici contaminate devono essere pulite con 20.000 ppm di soluzione di ipocloruro di sodio. Se il liquido contaminante è un acido, le superfici contaminate devono essere neutralizzate preventivamente con idrossido di sodio prima di utilizzare l'ipocloruro di sodio. Le superfici devono essere sciacquate con acqua distillata, asciugate con etanolo e ripassate con carta assorbente. Il materiale usato per pulire deve essere eliminato in un contenitore specifico per residui contaminati.

I campioni, la strumentazione e i prodotti contaminati devono essere eliminati dopo la decontaminazione mediante uno dei seguenti metodi:

- immergendo in 1 M di idrossido di sodio (concentrazione finale) per 1 ora a temperatura ambiente (da + 18 °C a + 30 °C).
 - immergendo in una soluzione clorometrica 20 000 ppm di ipocloruro di sodio per 1 ora a temperatura ambiente (da + 18 °C a + 30 °C).
 - mediante autoclavaggio a una temperatura di almeno 134 °C per un minimo di 18 minuti, a una pressione di 3 bar.
- **Nota: non introdurre mai nell'autoclave soluzioni contenenti candeggina.**

Tutte le operazioni necessarie per i test di rivelazione dell'Encefalopatia Spongiforme Trasmissibile (TSE) sono soggette alle norme di sicurezza locali e devono essere eseguite in un laboratorio isolato e ad accesso limitato e controllato destinato unicamente a questa attività. Al fine di salvaguardare la sicurezza dell'Operatore è necessario che questi indossi un camice da laboratorio o altro indumento protettivo, soprascarpe, guanti (due paia), maschera con visiera o maschera semplice con vetri di sicurezza.

Gli operatori devono ricevere una formazione specifica relativa ai rischi collegati con gli agenti e i prioni della TSE, e circa i metodi convalidati per la decontaminazione degli agenti non convenzionali. Le misure di sicurezza biologica devono essere in accordo con le raccomandazioni delle autorità regolatrici del paese interessato.

Group Headquarters

Bio-Rad Laboratories
2000 Alfred Nobel Drive
Hercules California 94547
Phone: (510) 741-1000
Toll-Free Phone:
1-(800) 424-6723
Fax: (510) 741-5800

Subsidiaries of Bio-Rad Laboratories:

Australia

Bio-Rad Laboratories Pty., Ltd.
PO Box 210 Regents Park
Block Y, Unit 1
Regents Park Industrial Estate
393 Park Road
Regents Park, New South Wales
2143
Phone: 02 9914 2800
Toll Free: 1800-224 354 (within
Australia only)
Fax: 02 9914 2889
email: sales_australia@bio-rad.com

Austria

Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H.
Hummelgasse 88/3-6,
A-1130 Wien
Phone: (01) 877 89 01
Fax: (01) 876 56 29

Belgium

Bio-Rad Laboratories S.A.-N.V.
Begoniastraat 5
B-9810 Nazareth EKE
Phone: 09-385 55 11
Toll-Free Phone: 0800/97032
Fax: 09-385 65 54
email: techsupport@bio-rad.com

Brazil

Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda
Av. Padre Antônio José dos Santos,
449 / 5º andar
Brooklin - São Paulo - SP
CEP.: 04563-011
Brazil
Phone: (55) 11 5044 5699
Fax: (55) 11 5543 4383
Praia de Botafogo
440 / 3º andar
Botafogo - Rio de Janeiro - RJ
CEP: 22250-040
Phone: (55) 21 3237 9400
Fax: (55) 21 2527 3099

Canada

Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd.
5671 McAdam Road
Mississauga, Ontario L4Z 1N9
Phone: (905) 712-2771
Toll-Free Phone: 1-(800) 268-0213
Fax: (905) 712-2990

Czech Republic

Bio-Rad s.r.o.
nad ostrovem 1119/7
147 00, Praha 4
Czech Republic
Phone: 420 242 430 532
Fax: 420 242 431 642
email: bio-rad@bio-rad.cz

People's Republic of China

HuiZhong Bio-Rad Technologies Ltd.
Beijing Office
14 Zhi Chun Road, Hai Dian District
Beijing 100 008
Phone: 86-10-62051850
and 86-10-6204662 ext 3401-06
Fax: 86-10-62051876

Bio-Rad Technologies (Shanghai) Ltd.
10/F Ascendas Building,
333 Tian Yao Qiao Road,
Shanghai, 200030
Phone: 86-21-6305-2255
Fax: 86-21-5396-4775

Denmark

Bio-Rad Laboratories
Generatorvej 8 C
2730 Herlev
Phone: 44 52 10 00
Fax: 44 52 10 01
email: nordic_helpdesk@bio-rad.com

Finland

Bio-Rad Laboratories
Pihatörmä 1A
Fin-02240 Espoo
Phone: 09 804 22 00
Fax: 09 804 22 00
email: nordic_helpdesk@bio-rad.com

France

Bio-Rad S.A.
3 Boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette
Phone: 01 47 95 60 00
Fax: 01 47 95 61 81

Germany

Bio-Rad Laboratories GmbH
Heidemannstraße 164
D-80939 München
Postfach 45 01 33
D-80901 München
Phone: 49 89 318 84-0
Fax: 49 89 318 84-123

Greece

Bio-Rad Laboratories EPE
24 Mesogion Ave. (Athens Tower)
155 27 Ampelokipi - Athens
Phone: 0030 210 7774396 -
7774345
Fax: 0030 210 7774376

Hong Kong

Bio-Rad Pacific Ltd.
Unit 1101, 11/F,
DCH Commercial Center,
25 Westlands, Quarry Bay,
Hong Kong
Phone : 852-2789-3300
Fax : 852-2789-1257

Hungary

Bio-Rad Hungary Ltd.
Tuzolto u. 59.
H-1094 Budapest
Phone: (361) 455 8800
Fax: (361) 455 8809
e-mail: biorad@bio-rad.hu

India

Bio-Rad Laboratories (India) Pvt. Ltd.
B&B-1, Enkay Towers, Vanija Nikunj
Udyog Vihar, Phase V
Gurgaon 122016
Phone: 91-124-
2398112/113/114,
91-124-5018111
Fax: 91-124-2398115, 2450095
email: sales.india@bio-rad.com

Israel

Bio-Rad Laboratories Ltd
14 Homa Street
PO Box 5044
Rishon Le Zion 75150
Phone: 03 951 4127
Fax: 03 951 4129
email: israel_sales@bio-rad.com

Italy

Bio-Rad Laboratories S.r.l.
Via Cellini, 18/A
20090 Segrate - Milano
Phone: 39-02-21609-1
Fax: 39-02-21609-399

Japan

Nippon Bio-Rad Laboratories
7-18 Hogashi Nippori 5-Chome,
Arakawa-ku, Tokyo 116-0014
Phone: 03-5811-6270
Fax: 03-5811-6272

Korea

Bio-Rad Korea Ltd.
10F, Hyunju BLDG,
832-41 Yeoksam dong Gangnam
gu, Seoul 135-080
Phone: 82-2-3473-4460
Fax: 82-2-3472-7003

Latin America

Bio-Rad Latin America
14100 Palmetto Frontage Road
Suite 101
Miami Lakes, Florida 33016
Phone: (305) 894-5950
Fax: (305) 894-5960
Web address: latinamerica.bio-
rad.com

Mexico

Bio-Rad, S.A.
Adolfo Prieto No. 1653
Col. del Valle
México, DF C.P. 03100
Phone: 525-55-200-0520
Fax 525-55-524-7940

Netherlands

Bio-Rad Laboratories B.V.
Fokkerstraat 2-8
3905 KV Veenendaal
Phone: 31 318-540 666
Fax: 31 318-542 216
email: techsupport.holland@bio-
rad.com

New Zealand

Bio-Rad Laboratories Pty Ltd.
PO Box 300-571
Albany, Auckland
Phone: 64 9 415 2280
Toll Free: 0508 805 500 (within
New Zealand only)
Fax: 64 9 443 3097
email: auckland@bio-rad.com

Norway

Bio-Rad Laboratories
Johan Scharffenbergs vei 91
N-0694 Oslo
Phone: 23 38 41 30
Fax: 23 38 41 39
email: nordic_helpdesk@bio-rad.com

Poland

Bio-Rad Polska Sp. zo.o.
ul. Nakielska 3
01-106 Warszawa
Phone: 48 22 331 99 99
Fax: 48 22 331 99 88
email: biorad@bio-rad.com.pl

Portugal

Bio-Rad Laboratories Lda
Rua do Entrepasto Industrial,
N3-1 Esq
2724-513 Amadora
Phone: 351 21 472.7700
Fax: 351 21 472.7777

Romania

Bio-Rad Laboratories
52, Spatarului St.
020776 Bucharest 2
Romania
Phone: (4021) 210 1703
Fax: (4021) 210 1507
email: office@bio-rad.ro

Russia

Bio-Rad Laboratorii
Leningradsky Prospect, 37A, Bld.14
RF 125167 Moscow
Phone: 7-095-721-14-04
Fax: 7-095-721-14-12
email: postmaster@bio-rad.ru

Singapore

Bio-Rad Laboratories Singapore
Pte Ltd.
27 International Business Park
#01-02 Singapore 609924
Phone: (65) 6415 3188
Fax: (65) 6415 3189
email: sales.singapore@bio-rad.com

South Africa

Bio-Rad Laboratories Ltd.
34 Bolton Road, Rosebank
Johannesburg 2195
Phone: 00 27 11 4428508
Fax: 00 27 11 4428525
email: safrica_helpdesk@bio-rad.com

Spain

Bio-Rad Laboratories S.A.
Edificio "M", Miniparc II
C/Caléndula, 95
El Soto de La Moraleja
28109 - Madrid
Phone: 34 91 590 52 22
Fax: 34 91 590 52 17

Sweden

Bio-Rad Laboratories AB
Ekensbergsvägen 128,
Box 1097
S-172 22 Sundbyberg
Phone: 46 8 555 12700
Fax: 46 8 555 12780
email: nordic_helpdesk@bio-rad.com

Switzerland

Bio-Rad Laboratories AG
Nenzlingerweg 2 - Postfach
CH-4153 Reinach
Phone: 01-809 55 55
Fax: 01-809 55 00
email: swiss@bio-rad.com

Taiwan

Bio-Rad Laboratories (Taiwan) Ltd.
3/F-A2, No. 126 Nan King Road,
Section 4,
Taipei 10567, Taiwan
Republic of Taiwan
Phone: 886-2-2578-7189
Fax: 886-2-2578-6890
email: sales.taiwan@bio-rad.com

Thailand

Bio-Rad Laboratories Ltd.
1st, and 2nd Floor, Lumpini I Building
239/2, Rajdamri Road, Lumpini,
Pathumwan, Bangkok 10330
Phone: (662) 6518311
Fax: (662) 6518312

United Kingdom

Bio-Rad Laboratories Ltd.
Bio-Rad House
Maylands Avenue
Hemel Hempstead
Hertfordshire HP2 7TD
Phone: 44 20 8328 2000
Fax: 44 20 8328 2550
Freephone: 0 800 181134
email: uk.lsg.marketing@bio-rad.com

Vietnam

Bio-Rad Laboratories Vietnam
Room B, 3rd Floor, Mansion Pasteur
180 Pasteur Street, District 1,
Ho Chi Minh City
Vietnam
Phone: (848) 8236757
Fax: (848) 8236755
email: thai_thuy@bio-rad.com

Bio-Rad

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

Tel.: +33 1 47 95 60 00

Fax.: +33 1 47 41 91 33



Rev. A - 01/2009
Code: 862193