

TeSeE™ sheep/goat

PURIFICATION KIT

Ref.: 355 1165

DETECTION KIT

Ref.: 355 1166

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

TABLE OF CONTENTS

- 1 - GENERAL INFORMATION
- 2 - TeSeE™ sheep/goat PURIFICATION KIT
 - 2 - 1 Principle of purification of PrP^{Sc}
 - 2 - 2 Samples
 - 2 - 3 Composition of the TeSeE™ sheep/goat Purification Kit
 - 2 - 4 Preparation of reagents
 - 2 - 5 Storage, shelf-life
 - 2 - 6 Procedure
 - 2 - 7 Limits of the purification protocol
- 3 - TeSeE™ sheep/goat DETECTION KIT
 - 3 - 1 Principle of PrP^{Sc} detection by EIA
 - 3 - 2 Samples
 - 3 - 3 Composition of the TeSeE™ sheep/goat Detection Kit
 - 3 - 4 Preparation of reagents
 - 3 - 5 Storage, shelf-life
 - 3 - 6 Preparation of samples for PrP^{Sc} detection by EIA
 - 3 - 7 Procedure
 - 3 - 8 Calculation and interpretation of the results
 - 3 - 9 Limits of the test
- 4 - MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED
- 5 - PRECAUTIONS
- 6 - HYGIENE AND SAFETY INSTRUCTIONS
- 7 - REFERENCES

1 - GENERAL INFORMATION

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

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

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

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

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

The main characteristics of these diseases are:

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

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

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

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

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

This determination comprises the following reaction steps:

- **Purification of PrP^{Sc}**

Step performed with the following reagents and accessories:

- TeSeE™ sheep/goat Purification Kit Ref.: 355 1165
- Calibration syringe and needle (x 100) Ref.: 355 1120
- Calibration syringe and needle (x 200) Ref.: 355 1174
- Medium beads Ref.: 355 1171

- **PrP^{Sc} detection**

Step performed with the following reagents:

- TeSeE™ sheep/goat Detection Kit Ref.: 355 1166

TeSeE™ sheep/goat PURIFICATION KIT

192 TESTS

355 1165

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

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

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

Processing of the samples comprises the following steps:

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

2-2 SAMPLES

Purification of PrP^{Sc} is performed on samples from Central Nervous System (CNS) or peripheral tissues (lymphoid nodes, spleen,...). Since distribution of PrP^{Sc} is heterogeneous in central nervous system, obex area from brainstem must be preferably sampled for optimal detection.

Samples are cut and weighed individually.

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

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

2-3 COMPOSITION OF THE TeSeE™ sheep/goat PURIFICATION KIT

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

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

2-4 PREPARATION OF REAGENTS

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

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

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

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

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

2-5 STORAGE, SHELF-LIFE

The reagents of the TeSeE™ sheep/goat kit (Ref.: 355 1165) are stored at +2°C to +25°C except for reagent 1 and the proteinase K which must be stored at +2°C to +8°C. All reagents are stable at those temperatures until the expiry date indicated on the kit (before and after opening of the vials).

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

2-6 PROCEDURE

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

For the automatic processing of the purification protocol, please refer to the TeSeE™ Key 1 and TeSeE™ Key 2 operator manuals.

Procedure for manual processing:

1. Sampling:

For peripheral tissues (tonsil, ileum, lymph nodes, eyelid, spleen,...) insert one medium bead (Ref.: 355 1171) in the grinding tube, before to add the sample.

Take a mass of 350 mg ± 40 mg of nervous tissue (preferably in the obex area) or 200 mg ± 20 mg of peripheral tissue.

Deposit the sample in the grinding tube, close firmly and proceed to the grinding step in the homogenizer (Ribolyser®, TeSeE™ Precess 24™ or TeSeE™ PRECESS 48™ systems).

2. Sample grinding:

Place the grinding tubes in the crown of the homogenizer (Ribolyser[®], TeSeE[™] Precess 24[™] or TeSeE[™] PRECESS 48[™] systems). Perform one agitation cycle with the following instrument parameters:

	Ribolyser [®]		TeSeE [™] 48 [™]	
	Nervous tissues	Peripheral tissues	Nervous tissues	Peripheral tissues
Time (sec.)	45	2 x 45*	–	–
Speed	6.5	6.5	–	–
Program	–	–	Program 1	Program 2

* Wait a 5 minutes pause between the 2 agitation cycles.

When grinding is insufficient, another 1 or 2 agitation cycles can be performed, by ensuring that the temperature of the tube returns to room temperature (+18°C to +30°C) between each cycle (using crushed ice for example).

3. Sample calibration:

Remove the grinding tubes from the homogenizer, resuspend the homogenate by inverting before opening the tubes and aspirate 250 µl with the calibration syringe (Ref.: 355 1120 or Ref.: 355 1174) taking care to immerse the needle below the level of ceramic beads to avoid sampling tissue fragments. Transfer each 250 µl sample into a 2 ml Eppendorf micro test-tube.

Note:

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

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

4. PK treatment:

Distribute 250 µl (± 5%) of reconstituted proteinase K solution (see paragraph 2.4) into each micro test-tube, homogenize and incubate at 37°C ± 2°C in a heating block incubator for 10 ± 1 minute.

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

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

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

Remove the micro test-tubes from the heating block incubator. Open them and distribute 250 µl (± 5%) of reagent 2 into each micro test-tube. Homogenize until a homogeneous blue colour is obtained. Observe the same order of distribution as described in step 4.

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

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

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

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

7. Sample clarifying:

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

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

Distribute 25 μ l (\pm 5%) of reagent 3 into each micro test-tube.

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

Incubate immediately for 5 ± 1 minute at $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Do not exceed 2 minutes between the reagent 3 distribution and the beginning of the incubation.

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

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

Please refer to information on TeSeE™ sheep/goat Detection package insert (Ref.: 355 1166) for detailed detection assay protocol.

2-7 LIMITS OF THE PURIFICATION PROTOCOL

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

Wait a 5 minutes pause between the 2 agitation cycles.

TeSeE™ sheep/goat DETECTION KIT

192 TESTS

355 1166

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

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

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

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

The assay comprises the following reactive steps:

1. Distribution of negative (R3) and positive controls (R4), samples prepared with the reagents of the TeSeE™ sheep/goat Purification Kit (Ref.: 355 1165) in the wells of the microplate coated with the first monoclonal antibody. This distribution can be visually controlled, as there is a marked colour difference between an empty well and a well containing a sample.
2. Incubation.
3. Washing, then distribution of the peroxidase-labelled antibody. This distribution can also be visually controlled by the colour difference between an empty well and a well containing the conjugate solution.
4. Incubation.
5. Washing, then revelation of enzymatic activity bound to the solid phase by addition of the substrate.
6. Stopping of the colour development, determination of optical density at 450 nm - 620 nm (bichromatism mode) and interpretation of the results.

3-2 SAMPLES

The assay can only be performed on samples obtained from collected tissues prepared with the reagents and under the conditions of use of the TeSeE™ sheep/goat Purification Kit (Ref.: 355 1165).

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

3-3 COMPOSITION OF THE KIT

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

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

3-4 PREPARATION OF REAGENTS

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

1- Ready to use reagents

Microplates (R1):

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

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

2- Reagents to reconstitute

Wash solution (R2):

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

Positive control (R4):

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

Conjugate (R7):

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

Color development solution (R8 + R9):

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

3-5 STORAGE, SHELF-LIFE

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

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

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

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

Purified samples (chapter 2.6) must be diluted with 125 µl (± 5%) of reagent R6.

Diluted samples must be homogenized with Vortex (5 seconds ± 2 seconds) just before distribution into the plate (R1).

3-7 PROCEDURE

For the automatic processing of the detection protocol, refer to the TeSeE™ Key 2 operator's manual.

Procedure for manual processing:

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

Microplate washer parameters

NAME: TSE 3

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CKCS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	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	.	.	.

NAME: TSE 5

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CKCS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	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	.	.	.	

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

BOT. SHAPE	ASP. HOR. POS.	CENTERING	ASP. VERT. POS.	BOT. VERT. POS.	B. W. VERT. POS.	HORIZONTAL SPEED	VERTICAL SPEED	ASP. DOWNW. SPEED	DISP. UPW. SPEED	BOT. DOWNW. SPEED	BOT. UPWARD SPEED	SHAKING AMPLITUDE	SHAKING SPEED
Flat	1,4	0.3	13,5	9,5	9,5	6	8	6	9	6	9	1	9

3-8 CALCULATION AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

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

OD R3 = mean of the four Negative control (R3) ODs

2) Calculation of the cut-off value

The cut-off value is equal to: OD R3 + 0.140

Example

OD R3 = 0.020

Cut-off value = 0.020 + 0.140 = 0.160

3) Condition of validation of the test

• Negative control (R3):

a) Validation of the individual negative control values:

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

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

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

b) Homogeneity of the negative control values:

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

Values higher than the mean of the negative controls + 40% (OD R3 + 40%) must be eliminated.

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

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

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

• Positive control (R4):

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

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

4) Interpretation of the results

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

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

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

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

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

3-9 LIMITS OF THE TEST

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

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

4 - MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

Purification step:

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

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

For the automatic purification of the sample: TeSeE™ Key 1 and TeSeE™ Key 2 systems.

Detection step:

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

For the automatic detection of the sample: TeSeE™ Key 1 and TeSeE™ Key 2 systems.

* Contact us for detailed information about Bio-Rad instruments validated by our technical departments.

5 - PRECAUTIONS

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

- Reagents must be stored at +2°C to +8°C (reagent 2, reagent 3 and grinding tubes can be stored at +2°C to +25°C).
- Do not use reagents whose shelf-life has expired.
- Do not use the reconstituted and stored at room temperature (+18°C to +30°C) proteinase K over 6 hours.
- Do not mix reagents derived from different batches of the TeSeE™ sheep/goat kits during the same manipulation, with the exception of generic reagents: wash solution (R2), sample diluent (R6), peroxidase substrate buffer (R8), chromogen (R9), stop solution (R10), grinding tubes and reagent 2.

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

6 - HYGIENE AND SAFETY INSTRUCTIONS

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

- All reagents of the kit are intended for use in "in vitro" diagnosis.
- Wear disposable gloves when handling reagents and samples and wash your hands thoroughly after handling them.
- Do not pipette with the mouth.
- Use polypropylene containers to avoid any wounds with broken glass.
- All the materials directly in contact with the samples and the wash solutions must be considered as contaminated.
- Avoid splashing samples or solutions containing samples.
- Contaminated surfaces must be cleaned with 20 000 ppm sodium hypochlorite solution. When the contaminating liquid is an acid, contaminated surfaces must be first neutralized with sodium hydroxide before using 20 000 ppm sodium hypochlorite solution. Surfaces must be rinsed with distilled water, dried with ethanol and wiped with absorbent paper. The material used for cleaning must be discarded in a special container for contaminated wastes.
- Samples, material and contaminated products must be eliminated after decontamination:
 - either by soaking in 1 M sodium hydroxide (final concentration) for 1 hour at room temperature (+18°C to +30°C),
 - or by soaking in 20 000 ppm sodium hypochlorite solution for 1 hour at room temperature (+18°C to +30°C),
 - or by autoclaving at 134°C minimum for at least 18 minutes, under 3 bars of pressure.

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

- All operations involved in Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) screening tests are subject to regulations and must be performed in an isolated, limited and controlled access laboratory devoted exclusively to this activity. A laboratory coat, overshoes, gloves, mask with visor or simple mask with safety glasses are required to ensure the operator's safety.
- Operators must receive specific training concerning the risks related to TSEs agents or prions and the validated modes of decontamination for unconventional agents. Biosafety measures must be in agreement with recommendations of regular authorities of the country.
- Avoid any contact of the substrate buffer, chromogen and stopping solution with the skin and mucous membranes.
- Neutralize and/or autoclave all wash solutions or wash wastes or any liquid containing biological samples prior to their elimination.
- Reagent 2 is classified as a dangerous substance according to European legislation.



(Alcohol > 25%)

R : 10-22-37/38-41-67 Flammable. Harmful if swallowed. Irritating to respiratory system and skin. Risk of serious damage to eyes. Inhalation of vapour may cause drowsiness and dizziness.

S : 7/9-13-26-37/39-46 Keep container tightly closed and in a well ventilated place. Keep away from food, drink and animal feed. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protecting clothings, gloves and eye/face protection. If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.

- Reagents 1 and 3 contain detergents and chaotropic agents. Use appropriate sampling devices to avoid contact with the skin and/or mucous membranes.

7 - REFERENCES

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

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

TeSeE™ sheep/goat

KIT DE PURIFICATION

Réf. : 355 1165

KIT DE DÉTECTION

Réf. : 355 1166

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

TABLE DES MATIÈRES

- 1 - GÉNÉRALITÉS
- 2 - KIT DE PURIFICATION TeSeE™ sheep/goat
 - 2 - 1 Principe de purification de la PrP^{Sc}
 - 2 - 2 Échantillons
 - 2 - 3 Composition du kit de purification TeSeE™ sheep/goat
 - 2 - 4 Préparation des réactifs
 - 2 - 5 Conservation, validité
 - 2 - 6 Mode opératoire
 - 2 - 7 Limites du protocole de purification
- 3 - KIT DE DÉTECTION TeSeE™ sheep/goat
 - 3 - 1 Principe de la détection de la PrP^{Sc} par EIA
 - 3 - 2 Échantillons
 - 3 - 3 Composition du kit de détection TeSeE™ sheep/goat
 - 3 - 4 Préparation des réactifs
 - 3 - 5 Conservation, validité
 - 3 - 6 Préparation des échantillons pour la détection de la PrP^{Sc} par EIA
 - 3 - 7 Mode opératoire
 - 3 - 8 Calcul et interprétation des résultats
 - 3 - 9 Limites du test
- 4 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI
- 5 - PRÉCAUTIONS D'EMPLOI
- 6 - CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ
- 7 - BIBLIOGRAPHIE

1 - GÉNÉRALITÉS

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

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

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

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

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

Les principales caractéristiques de ces maladies sont les suivantes :

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

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

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

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

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

Ce dosage comprend les étapes réactionnelles suivantes :

- **Purification de la PrP^{Sc}**

Étape réalisée avec les réactifs et accessoires suivants :

- Kit de purification TeSeE™ sheep/goat Réf. : 355 1165
- Seringue et aiguille de calibration (x 100) Réf. : 355 1120
- Seringue et aiguille de calibration (x 200) Réf. : 355 1174
- Medium beads Réf. : 355 1171

- **Détection de la PrP^{Sc}**

Étape réalisée avec les réactifs suivants :

- Kit de détection TeSeE™ sheep/goat Réf. : 355 1166

TeSeE™ sheep/goat KIT DE PURIFICATION

192 TESTS

355 1165

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

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

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

Le traitement des échantillons comprend les étapes suivantes :

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

2-2 ÉCHANTILLONS

La purification de la PrP^{Sc} est effectuée sur des échantillons de Système Nerveux Central (CNS) ou de tissus périphériques (ganglions lymphatiques, rate,...). Comme la distribution de la PrP^{Sc} est hétérogène dans le système nerveux central, les prélèvements doivent être faits préférentiellement dans l'obex du tronc cérébral pour une détection optimale.

Les échantillons sont coupés et pesés individuellement.

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

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

2-3 COMPOSITION DU KIT DE PURIFICATION TeSeE™ sheep/goat

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

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

2-4 PRÉPARATION DES RÉACTIFS

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

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

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

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

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

2-5 CONSERVATION, VALIDITÉ

Les réactifs du kit de purification TeSeE™ sheep/goat (Réf. : 355 1165) doivent être conservés de +2°C à +25°C, à l'exception du réactif 1 et de la protéinase K qui doivent être conservés de +2°C à +8°C. À ces températures, tous les réactifs sont stables jusqu'à la date indiquée sur le kit (avant et après l'ouverture des flacons).

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

2-6 MODE OPÉRATOIRE

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

Pour le traitement automatique du protocole de purification, veuillez consulter les manuels d'utilisation des systèmes TeSeE™ Key 1 et TeSeE™ Key 2.

Protocole manuel :

1. Échantillonnage :

Pour les tissus périphériques (amygdales, iléon, ganglions lymphatiques, paupière, rate,...) une bille de taille moyenne ("Medium bead", Réf. : 355 1171) doit être placée dans le tube de broyage, avant d'ajouter l'échantillon.

Prélever une masse de 350 ± 40 mg de tissu nerveux (de préférence au niveau de l'obex) ou $200 \text{ mg} \pm 20$ mg de tissu périphérique.

Déposer l'échantillon dans le tube de broyage, bien le fermer et passer à l'étape de broyage dans l'homogénéiseur (systèmes Ribolyser[®], TeSeE[™] Precess 24[™] ou TeSeE[™] PRECESS 48[™]).

2. Broyage des échantillons :

Placer les tubes dans la couronne de l'homogénéiseur (systèmes Ribolyser[®], TeSeE[™] Precess 24[™] ou TeSeE[™] PRECESS 48[™]). Effectuer un cycle d'agitation avec les paramètres suivants :

	Ribolyser [®]		TeSeE [™] 48 [™]	
	Tissus nerveux	Tissus périphériques	Tissus nerveux	Tissus périphériques
Temps (seconde)	45	2 x 45*	–	–
Vitesse	6,5	6,5	–	–
Programme	–	–	Programme 1	Programme 2

* Attendre 5 minutes entre les 2 cycles de broyage.

Lorsque le broyage est insuffisant, 1 ou 2 autres cycles d'agitation peuvent être effectués, en s'assurant que la température du tube revient à température ambiante ($+18^{\circ}\text{C}$ à $+30^{\circ}\text{C}$) entre chaque cycle (au moyen de glace pilée, par exemple).

3. Calibration des échantillons :

Retirer les tubes de broyage de l'homogénéiseur. Remettre en suspension l'homogénat en retournant les tubes avant de les ouvrir. Prélever 250 μl avec la seringue de calibration (Réf. : 355 1120 ou Réf. : 355 1174), en prenant soin de plonger l'aiguille dans le culot de billes pour éviter de prélever des fragments de tissus.

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

Remarque :

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

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

4. Traitement par la PK :

Répartir 250 μl ($\pm 5\%$) de solution de protéinase K diluée (voir paragraphe 2.4) dans chaque micro-tube, homogénéiser et incubé à $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dans un bloc chauffant pendant 10 ± 1 minute. Préparer des séries de plusieurs micro-tubes et adapter le nombre de micro-tubes au matériel utilisé (pipette automatique/portoirs) pour éviter de dépasser un intervalle de 5 minutes pour la répartition de la protéinase K reconstituée entre le premier et le dernier micro-tube. Ne pas dépasser 2 minutes entre l'homogénéisation et l'incubation à 37°C . Mélanger immédiatement après avoir ajouté la protéinase K.

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

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

Sortir les micro-tubes du bloc chauffant, les ouvrir et ajouter 250 µl (± 5%) de réactif 2 dans chaque micro-tube. Homogénéiser jusqu'à obtenir une couleur bleue uniforme. Respecter le même ordre de répartition que dans l'étape 4.

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

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

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

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

7. Clarification des échantillons :

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

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

Ajouter 25 µl (± 5%) de réactif 3 dans chaque micro-tube.

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

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

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

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

Consultez la notice du kit de détection TeSeE™ sheep/goat (Réf. : 355 1166) pour plus de détails sur le protocole du test de détection.

2-7 LIMITES DU PROTOCOLE DE PURIFICATION

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

Attendre 5 minutes entre 2 cycles d'agitation.

TeSeE™ sheep/goat KIT DE DÉTECTION

192 TESTS

355 1166

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

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

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

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

L'essai comprend les étapes réactionnelles suivantes :

1. Distribution des contrôles négatifs (R3) et positifs (R4) et des échantillons préparés avec les réactifs du kit de purification TeSeE™ sheep/goat (Réf. : 355 1165) dans les micropuits sensibilisés avec le premier anticorps monoclonal. Cette distribution peut être contrôlée visuellement car il existe une nette différence de coloration entre un puits vide et un puits contenant un échantillon.
2. Incubation.
3. Lavage, puis distribution de l'anticorps marqué à la peroxydase. Cette distribution peut également être contrôlée visuellement par la différence de coloration entre un puits vide et un puits contenant la solution de conjugué.
4. Incubation.
5. Lavage, puis révélation de l'activité enzymatique liée à la phase solide par addition du substrat.
6. Arrêt de la révélation, lecture des densités optiques en bichromatisme à 450 nm - 620 nm et interprétation des résultats.

3-2 ÉCHANTILLONS

Le test ne peut être réalisé que sur des échantillons obtenus à partir de tissus préparés avec les réactifs et dans les conditions d'emploi du kit de purification TeSeE™ sheep/goat (Réf. : 355 1165).

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

3-3 COMPOSITION DU KIT

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

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

3-4 PRÉPARATION DES RÉACTIFS

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

1- Réactifs prêts à l'emploi

Microplaques (R1) :

Avant ouverture du sachet sous vide, laisser la microplaque revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) dans son emballage protecteur, afin d'éviter toute condensation d'eau dans les puits. Ouvrir au point de soudure et remettre immédiatement les barrettes inutilisées dans le sachet. Refermer hermétiquement le sachet après avoir pris soin de chasser l'air. Conserver de +2°C à +8°C.

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

2- Réactifs à reconstituer

Solution de lavage (R2) :

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

Contrôle positif (R4) :

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

Conjugué (R7) :

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

Solution de développement enzymatique (R8 + R9) :

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

3-5 CONSERVATION, VALIDITÉ

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

Après préparation, les réactifs ont les stabilités suivantes :

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

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

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

3-7 MODE OPÉRATOIRE

Pour le traitement automatique du test de détection, voir le manuel d'utilisation du système TeSeE™ Key 2.

Protocole manuel :

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

Paramètres de lavage des microplaques

NOM : TSE 3

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CKCS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	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	.	.	.

NOM : TSE 5

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CKCS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	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	.	.	.

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

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

3-8 CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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

DO R3 = moyenne des 4 DO des contrôles négatifs (R3)

2) Calcul de la valeur seuil

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

Exemple

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

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

3) Conditions de validation du test

• Contrôle négatif (R3) :

a) Validation des valeurs individuelles du contrôle négatif :

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

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

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

b) Homogénéité des valeurs de contrôle négatif :

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

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

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

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

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

• Contrôle positif (R4) :

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

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

4) Interprétation des résultats

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

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

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

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

Les échantillons retestés en duplicats et trouvés négatifs avec le test de détection TeSeE™ sheep/goat, mais pour lesquels une des deux valeurs est proche de la valeur seuil (valeur seuil - 10%) doivent être interprétés avec prudence.

3-9 LIMITES DU TEST

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

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

4 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

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

Étape de purification :

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

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

Pour la purification automatique de l'échantillon : systèmes TeSeE™ Key 1 et TeSeE™ Key 2.

Étape de détection :

- Pipettes fixes ou réglables, automatiques ou semi-automatiques, pouvant distribuer des volumes de 50, 100, 200 et 1000 µl.
- Tubes à essais gradués de 10 ml, 20 ml et 100 ml.
- Conteneurs pour déchets contaminés.
- Incubateur pour microplaques thermostaté à 37°C ± 2°C.
- Chambre froide de +2°C à +8°C.
- Laveur* de microplaques, automatique ou semi-automatique.
- Lecteur de microplaques* (muni de filtres 450 nm et 620 nm).

Pour la détection automatique de l'échantillon : systèmes TeSeE™ Key 1 et TeSeE™ Key 2.

* Contactez-nous pour plus de détails sur les appareils Bio-Rad validés par nos services techniques.

5 - PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

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

- Les réactifs doivent être conservés à une température de +2°C à +8°C (les tampons 2, 3 et les tubes de broyage doivent être conservés de +2°C à +25°C).
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de la date de péremption.
- La solution de protéinase K reconstituée et conservée à température ambiante (+18°C à +30°C) doit être utilisée dans les 6 heures.

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

6 - CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

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

- Tous les réactifs du kit sont exclusivement destinés au diagnostic *in vitro*.
- Porter des gants à usage unique pendant la manipulation des réactifs et des échantillons et se laver les mains soigneusement après la manipulation.
- Ne jamais pipetter à la bouche.
- Utiliser des récipients en polypropylène pour éviter les risques de blessure en cas de bris de verre.
- Tous les matériels entrant en contact avec les échantillons et les solutions de lavage doivent être considérés comme contaminés.
- Éviter d'éclabousser les échantillons ou les solutions contenant des échantillons.
- Les surfaces contaminées doivent être nettoyées avec de l'hypochlorite de sodium (Eau de Javel) à 20 000 ppm. Lorsque le liquide contaminant est un acide, les surfaces contaminées doivent d'abord être neutralisées avec de la soude avant d'utiliser l'hypochlorite de sodium à 20 000 ppm. Les surfaces seront rincées à l'eau distillée, séchées avec de l'éthanol et

essuyées avec du papier absorbant. Le matériel utilisé pour le nettoyage doit être jeté dans un récipient spécial pour déchets contaminés.

- Les échantillons, le matériel et les produits contaminés doivent être éliminés après décontamination :
 - par trempage dans de la soude 1M (concentration finale) pendant 1 heure à température ambiante (+18°C à +30°C).
 - ou par trempage dans de l'hypochlorite de sodium (Eau de Javel) à 20 000 ppm pendant 1 heure à température ambiante (+18°C à +30°C).
 - ou par autoclavage à 134°C minimum pendant au moins 18 minutes, à 3 bars de pression.

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

- Toutes les opérations relatives à la réalisation des tests de dépistage d'une encéphalopathie spongiforme transmissible (EST) font l'objet d'une réglementation et doivent être conduites dans un laboratoire isolé, réservé exclusivement à cet usage et dont l'accès est limité et contrôlé. L'opérateur doit porter une combinaison, des surbottes, des gants et un masque à visière ou un masque simple avec des lunettes de sécurité.
- Les opérateurs doivent recevoir une formation spécifique concernant les risques liés aux agents des EST ou prions et aux modes de décontamination validés pour les agents infectieux "non conventionnels". Les mesures de sécurité biologique doivent être conformes aux recommandations des autorités réglementaires nationales.
- Éviter tout contact du tampon du substrat, du chromogène et de la solution d'arrêt avec la peau et les muqueuses.
- Avant élimination, neutraliser et/ou autoclaver toutes les solutions de lavage ou eaux usées de lavage ou tout liquide contenant des échantillons biologiques.
- Le réactif 2 est classé comme substance dangereuse, au sens de la réglementation européenne.



(Alcool > 25%)

R : 10-22-37/38-41-67 Inflammable. Nocif en cas d'ingestion. Irritant pour le système respiratoire et la peau. Risque de sérieuses lésions en cas de contact avec les yeux. L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges.

S : 7/9-13-26-37/39-46 Conserver le récipient bien fermé et dans un endroit bien ventilé. Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Porter des gants appropriés et un appareil de protection des yeux/du visage. En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

- Les tampons 1 et 3 contiennent des détergents et des agents chaotropiques. Utiliser des dispositifs de prélèvement appropriés pour éviter tout contact avec la peau ou les muqueuses.

7 - BIBLIOGRAPHIE

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

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