



BetaPrion[®] BSE EIA Test Kit

In-vitro-Test für die Reinigung und den Nachweis von BSE PrP^{res}.

Gebrauchsinformation

Innerhalb der Europäischen Union ist dieser Test als Schnelltest für das BSE-Testprogramm an Rindern in Übereinstimmung mit der Richtlinie Nr. 999/2001 der EU zugelassen.
Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17c TierSG zugelassen.

Version 3.2/2011

BetaPrion® BSE EIA Test Kit

Kat.Nr. 0104000102

Der BetaPrion® BSE EIA Test Kit besteht aus zwei Modulen, dem BetaPrion® BSE Reinigungskit und dem BetaPrion® BSE Nachweis Kit.

Der BetaPrion® BSE Reinigungskit erlaubt die Nutzung von 2 ml Röhrchen oder 96 Deep-well-Platten .

Ein BetaPrion® BSE EIA Test Kit enthält ausreichend Reagenzien zur Analyse von 90 bovinen Hirnproben.

Der Hersteller von Schnelltests muss ein vom Referenzlaboratorium der EU (CRL) genehmigtes Qualitätssicherungssystem haben, das die Qualität des hergestellten Testes garantiert. Der Hersteller muss dem CRL die Testprotokolle zur Verfügung stellen. Änderungen des Schnelltestes, der Probenentnahme oder des Testprotokolls (einschließlich der Probennahme) können nur nach deren Anmeldung beim CRL erfolgen und unter der Voraussetzung, dass das CRL feststellt, dass die Änderungen nicht die Empfindlichkeit, die Spezifität oder die Zuverlässigkeit des Schnelltestes beeinträchtigen. Diese Einschätzung muss der Europäischen Kommission und den nationalen Referenzlaboratorien (auf der Basis der Richtlinie (EC) 1053/2003, ergänzt durch die Richtlinie (EC) 999/2001) mitgeteilt werden.

Abbreviations:

BSE (bovine spongiforme Enzephalopathie), HRP (Meerrettichperoxidase), PrP (Prionenprotein)
RSA (Rinderserumalbumin), TMB (Tetramethylbenzidine); ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), RT (Raumtemperatur), PK (Proteinase K)

Inhalt

	Seite
1. Einleitung	3
1.1. Generelle Anmerkungen	3
1.2. Kurzbeschreibung des Testprinzips	3
1.2.1. Reinigung von PrP^{res}	3
1.2.2. Nachweis von PrP^{res}	3
2. Ergänzende Komponenten zum Kit	4
3. BetaPrion[®] BSE <i>Reinigungskit</i>	4
3.1. Probennahme	4
3.2. Kitbestandteile	5
3.3. Vorbereitung der Reagenzien	6
3.4. Testablauf	6
3.5. Lagerungsbedingungen und Haltbarkeit der Kitbestandteile	7
4. BetaPrion[®] BSE <i>Nachweiskit</i>	7
4.1. Kitbestandteile	7
4.2. Vorbereitung der Reagenzien	7
4.3. Immuntest	8
4.4. Lagerungsbedingungen und Haltbarkeit der Kitbestandteile	9
5. Interpretation der Ergebnisse	9
6. Vorsichtsmaßnahmen	9
7. Anhänge	10
8. Gewährleistung und ergänzende generelle Anmerkungen	10
9. Kommentare	11
10. Anleitung für die Probenentnahme unter Verwendung der AJ Roboscreen BSE-Probenentnahmespritze	12

1. Einleitung

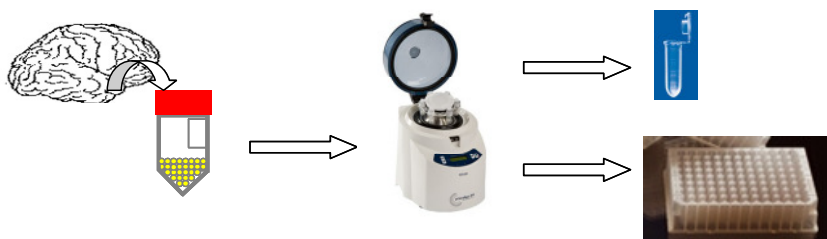
1.1. Generelle Anmerkungen

Prionenerkrankungen oder übertragbare spongiforme Enzephalopathien sind neurodegenerative Erkrankungen die Menschen und Tiere betreffen (Prusiner 1998). Alle Prionenerkrankungen beruhen auf demselben molekularen pathogenen Mechanismus, der die Umwandlung des normalen zellulären Prionenproteins (PrP^{sen}) in seine in nicht-ionischen Detergentien unlösliche und teilweise durch Protease nicht abbaubare Form bewirkt (PrP^{res} , Pan et al. 1993). Beide, PrP^{res} und PrP^{sen} , werden durch ein Exon eines chromosomalen Gens kodiert, das die Sequenz eines Proteins von ca. 250 Aminosäuren enthält (Basler et al. 1986). Viele Säugerprionenproteine besitzen eine N-terminale, aus 22 Aminosäuren bestehende Signalsequenz (Hope et al. 1986; Turk et al. 1988) und eine C-terminale aus 23 Aminosäuren bestehende Signalsequenz, die eine Bindung an eine Glycosylphosphatidyl-Inositol-Bindungsstelle kodiert (Stahl et al. 1987, 1990). Das fertige Protein von 209 Aminosäuren enthält eine Disulfidbrückenbindung (Turk et al. 1988) und hat zwei Asparagin-Glykosilierungsstellen (Endo et al. 1989; Oesch et al. 1995).

1.2. Kurzbeschreibung des Testprinzips

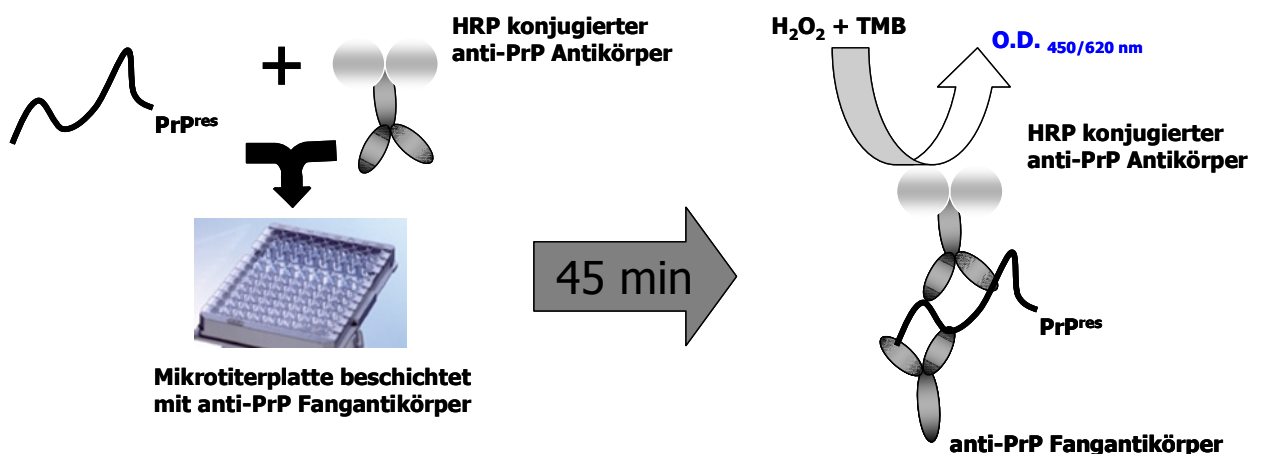
Der BetaPrion[®] BSE EIA Test Kit ist ein kontinuierlich über 100-110 min laufender Test für den Nachweis von PrP^{res} in Rinderhirnproben. Gewebeproben des Rinderhirns werden homogenisiert und mit Proteinase-K inkubiert. Solubilisiertes PrP^{res} wird durch einen spezifischen, monoklonalen Anti-PrP Antikörper an die Kavitäten von Mikrostrips gebunden. Das gebundene PrP^{res} wird mittels eines Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Anti-PrP Antikörper nachgewiesen. Die Kavitäten werden gewaschen und mit einer Substratlösung inkubiert. Die sich entwickelnde Färbung weist auf die Existenz von PrP^{res} in den Gewebeproben im Vergleich zur Negativ- und Positivkontrolle im Falle der Überschreitung des definierten Grenzwertes hin.

1.2.1. Reinigung von PrP^{res}



- Zugabe von PK-Lösung und Verdau.
- Zugabe von Fällungslösung und Konzentrierung von PrP^{res} durch Zentrifugation.
- Kochen von PrP^{res} zur Solubilisierung.

1.2.2. Nachweis von PrP^{res}



2. Ergänzende Komponenten zum Kit

Für den Reinigungskit

- Homogenisierungsgerät „Ribolyzer“, „FastPrep[®]“, „FastPrep[®] 24 System“ (MP Biomedicals, U.S.A.) oder Precellys[®]24 (Bertin, Frankreich)
- BSE-Probenentnahmespritze
- 15- or 50-ml-Röhrchen, z.B. Falcon-Röhrchen, für die Verdünnung von Proteinase-K
- 2-ml-Röhrchen, z.B. Eppendorf (Deutschland)
- 96 ml Deep-well-Platten, z.B. Brand (Deutschland)
- Ein-Kanal-Pipetten (justierbar, 100-1000 µl, 10-100 µl) und Spitzen
- Desktopzentrifuge (16000g oder 3200g), z.B. 5415D oder 5815 (Eppendorf Deutschland)
- Thermostate, z.B. Thermomixer comfort (Eppendorf Deutschland) und Heizblock für 96 Deep-well-Platten, z.B. AJ Cybertron GmbH (Deutschland)
- Spritzen, z.B. 1 ml und Blunt-end-Nadeln, 25Gx1.5” (z.B. Aagesa Deutschland)
- Vortex-Mixer, z.B. „Reax“ (VWR International, Dresden, Deutschland)
- Kühlschrank 4-8 °C

Für den Nachweiskit

- Ein-Kanal-Pipetten (justierbar, 100-1000 µl, 10-100 µl) und Spitzen
- 15-ml-Röhrchen, z.B. Falcon-Röhrchen für die Verdünnung der Reagenzien
- Mehrkanalpipette (justierbar, 30-300 µl)
- Mikroplatten-Reader „Anthos reader 2001“ (Anthos Labtec Instruments GmbH Österreich) oder „CM Sunrise reader“ (Tecan Deutschland GmbH Deutschland)
- Mikroplatten-Wascher, z.B. „CM Columbus washer“ (Tecan Deutschland GmbH Deutschland)

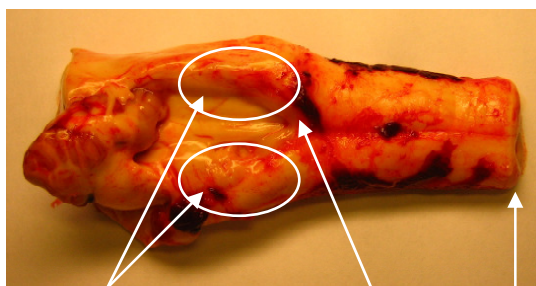
3. BetaPrion[®] BSE Reinigungskit

3.1. Probennahme

Rinderhirn aus der Obexregion (Abbildung 1) muß als Ausgangsmaterial für den BetaPrion[®] BSE EIA Test Kit verwendet werden.

Anmerkung: Nach der Probenentnahme muss eine komplette Hälfte des Stammhirns mit intaktem Obex für die Bestätigungstestung erhalten bleiben.

Probennahme und Labortestung müssen der EU-Richtlinie 999/2001, Kapitel C, entsprechen, die sich auf die Definition der Probennahme gemäß der neuesten Ausgabe des “Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines of the International Office of Epizootic Diseases (OIE)” bezieht und die besagt: “Bevorzugt sollte die Probe für einen Immunassay aus dem Obex oder so nah als möglich von dort, aber nicht weiter entfernt als 1,5 cm anterior entnommen werden.“ Abbildung 1 zeigt die Probenentnahmeregion innerhalb des Markierungsfeldes.



Probenentnahme- Obex Rückenmark
 gebiet

Abbildung 1: Probenentnahmegebiet

Möglichkeiten für die Probenentnahme:

- (1) 350 ± 50 mg Nervengewebe aus dieser Region von der linken **oder** der rechten Seite des Hirnstammes mit einem Skalpell schneiden und entnommene Probe zur Bestimmung des korrekten Gewichtes wiegen.
- (2) Probenentnahme unter Verwendung der AJ Roboscreen BSE-Probenentnahmespritze entsprechend der Anleitung (10) auf Seite 14.

3.2. Kitbestandteile

Kurzbezeichnung	Typ/Inhalt	Menge
Homogenisierungs- röhrchen	Transparente Röhrchen (2 ml) mit rotem Deckel, enthalten Homogenisierungspuffer (1,3 ml) und Keramikugeln. Gebrauchsfertig. Lagerung bei RT.	96 Röhrchen
P1	Proteinase-K-Puffer in einer transparenten Flasche mit rotem Punkt. Lagerung bei RT.	1 Flasche (24 ml)
P2	Proteinase-K-Lösung in einem transparenten Röhrchen mit gelbem Deckel. Lagerung bei 4-8°C.	1 Röhrchen (0,6 ml)
P3	Fällungslösung in einer braunen Flasche mit rotem Punkt, enthält Detergenzien. Gebrauchsfertig. Lagerung bei RT.	1 Flasche (45 ml)
P4	Solubilisierungspuffer in einer transparenten Flasche mit rotem Punkt, enthält Detergenzien. Gebrauchsfertig. Lagerung bei RT.	1 Flasche (4 ml)

3.3. Vorbereitung der Reagenzien

Gebrauchsfertige Reagenzien:

Die Homogenisierungsröhrchen, Fällungslösung (P3) und der Solubilisierungspuffer (P4) sind gebrauchsfertig

Vorzubereitende Reagenzien:

Der Proteinase-K-Puffer (P1) wird zur Verdünnung der Proteinase-K (P2) gemäß folgender Vorschrift verwendet:

Anzahl der Proben	2 ml Röhrchen Reinigung		96 Deep-well-Platten Reinigung	
	P1 Puffer (ml)	PK Lösung (µl)	P1 Puffer (ml)	PK Lösung (µl)
8	2,0 ± 0,20	50,0 ± 5,00	1,0 ± 0,10	50,0 ± 5,00
40	10,0 ± 1,00	250,0 ± 25,00	5,0 ± 0,50	250,0 ± 25,00
60	15,0 ± 1,50	375,0 ± 37,50	7,5 ± 0,75	375,0 ± 37,50
90	20,0 ± 2,00	500,0 ± 50,00	10,0 ± 1,00	500,0 ± 50,00

3.4. Testablauf

Die Hirnproben (350 ± 50 mg) in Homogenisierungsröhrchen geben und für 45 sec bei maximaler Geschwindigkeit (6,5) im FastPrep® bzw. bei 5500-5600 rpm im Precellys®24 homogenisieren. Die homogenisierten Hirnproben können bis 12 Monate bei -20 ± 2°C gelagert werden. Für die weitere Verwendung die Proben bei RT auftauen lassen und für 2 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit vortexen. Die Proben können maximal 3 mal eingefroren bzw. wieder aufgetaut werden.

2 ml Röhrchen Reinigung	96 Deep-well-Platten Reinigung
Übertragen von 200 ± 20 µl des Homogenats mit einer 1-ml Spritze und Blunt-end-Kanüle (25Gx1.5") in ein neues 2 ml Eppendorf Röhrchen.	Übertragen von 300 ± 30 µl des Homogenats mit einer 1-ml Spritze und Blunt-end-Kanüle (25Gx1.5") in 90 Kavitäten einer 96er Deep-well-Platte.
Zugabe von 200 ± 20 µl der hergestellten Proteinase K Lösung, mischen durch Vortexen (2 sec bei maximaler Geschwindigkeit) oder 3-6 Umschwenken.	Zugabe von 100 ± 10 µl der hergestellten Proteinase K Lösung, mischen durch Pipettieren oder 3 mal Umschwenken der zugeklebten Platten.
Inkubation bei 37 ± 1 °C für 15 ± 1,5 min unter kontinuierlichem Schütteln (750 rpm).	Inkubation bei 37 ± 1 °C für 15 ± 1,5 min unter kontinuierlichem Schütteln (300 rpm).
Zugabe von 400 ± 40 µl Fällungslösung, mischen durch Vortexen (2 sec bei maximaler Geschwindigkeit) oder 3-6 Umschwenken und Inkubation der Probe für 15 ± 1,5 min bei RT.	Zugabe von 400 ± 40 µl Fällungslösung, mischen durch Pipettieren oder 3 mal Umschwenken der zugeklebten Platten und Inkubation der Probe für 15 ± 1,5 min bei RT.
Zentrifugation bei 16000 ± 1600 g für 5 ± 0,5 min. Überstand vorsichtig verwerfen und zurücklaufende Flüssigkeit mit Zellstoff abtupfen.	Zentrifugation bei 3200 ± 320 g for 15 ± 1,5 min. Überstand vorsichtig verwerfen und zurücklaufende Flüssigkeit mit Zellstoff von der Platte abtupfen oder absaugen des Überstandes mit Pipettierhilfen.
Zugabe von 25 ± 2,5 µl Solubilisierungspuffer zum Pellet und kochen bei 99 ± 1°C for 7 ± 0,5 min mit Intervallschütteln (1200-1500 rpm). Abkühlen der Röhrchen für mindestens 5 min bei RT. Die Proben können bis 6 h bei 4-8°C oder RT gelagert werden.	Zugabe von 25 ± 2,5 µl Solubilisierungspuffer zum Pellet und kochen bei 99 ± 1°C for 7 ± 0,5 min mit Intervallschütteln (1200-1500 rpm). Abkühlen der Platte für mindestens 5 min bei RT. Die Proben können bis 6 h bei RT gelagert werden.

Analyse der Probe auf PrP^{res} Protein unter Verwendung des BetaPrion[®] BSE Nachweis Kits.

3.5. Lagerungsbedingungen und Haltbarkeit der Kitbestandteile

Alle Komponenten mit Ausnahme der Proteinase K werden bei Raumtemperatur (15-25°C) gelagert. Das Röhrchen mit Proteinase-K muss bei 4-8°C gelagert werden. Die Haltbarkeit der Reagenzien wird für 12 Monate garantiert.

Die vorbereitete Proteinase-K-Lösung ist bei Raumtemperatur bis zu 3 Stunden stabil bei 15-25 °C und bis zu 8 Stunden bei 4-8 °C.

4. BetaPrion[®] BSE Nachweiskit

4.1. Kitbestandteile

Kurzbezeichnung	Typ/Inhalt	Menge
D1	Immunstrips beschichtet mit einem monoklonalen Anti-PrP-Fang-Antikörper, stabilisiert. Gebrauchsfertig.	1 Platte (12 x 8 Kavitäten)
D2	Waschpuffer (10fach Konzentrat) in einer transparenten Flasche, enthält 0,01 % Na-Merthiolat als Konservierungsmittel.	1 Flasche (100 ml)
D3	Positivkontrolle in transparenten Röhrchen (2 ml) mit blauem Deckel, enthalten lyophilisiertes rekombinantes bovines Prionenprotein.	2 Röhrchen
D4	Negativkontrolle in transparenten Röhrchen mit weisser Kappe.	3 Röhrchen (3 x 0,1 ml)
D5	Meerettich-Peroxidase-Konjugat in einer gelbbraunen Flasche mit schwarzem Deckel, enthält konjugierten 8fach konzentrierten Anti-PrP-Antikörper und 0,1 % Proclin 300 als Konservierungsmittel.	1 Flasche (2,5 ml)
D6	Verdünnungspuffer in einer transparenten Flasche, enthält gepufferte Kochsalzlösung mit RSA und 0,1 % Proclin 300 als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.	1 Flasche (20 ml)
D7	Tetramethylbenzidinlösung (stabilisierte wässrige TMB-Lösung) in einer braunen Flasche mit rotem Deckel.	1 Flasche (1 ml)
D8	Wasserstoffperoxidlösung in einer braunen Flasche mit grünem Deckel.	1 Flasche (1 ml)
D9	Färbepuffer in einer transparenten Flasche, enthält gepufferte Kochsalzlösung.	1 Flasche (20 ml)
D10	Stopplösung in einer transparenten Flasche, enthält 1 M Schwefelsäure. Gebrauchsfertig.	1 Flasche (25 ml)
	Klebefolien	1 Folie

4.2. Vorbereitung der Reagenzien

Immunstrips, Waschpuffer, Verdünnungspuffer, Färbepuffer und Stopplösung vor Durchführung des Tests auf Raumtemperatur erwärmen lassen..

Gebrauchsfertige Reagenzien:

Nach dem Erwärmen der Immunstrips (D1) auf Raumtemperatur Tüte mit einer Schere öffnen und benötigte Immunstrips entnehmen. Der Verdünnungspuffer (D6) und die Stopplösung (D10) sind gebrauchsfertige Reagenzien.

Vorzubereitende Reagenzien:

Waschlösung (D2):

Vor dem ersten Waschschrift des Immuntestes Verdünnen des 10fach konzentrierten Waschpuffers mit destilliertem Wasser (Zugabe von 900 ml Aqua dest zu 100 ml Konzentrat).

Positivkontrolle (D3):

Zugeben von 0,5 ml verdünntes HRP-Konjugat zum Röhrchen mit der Positivkontrolle. Zu Beginn des Immuntestes für 2 Sekunden vortexen.

Negativkontrolle (D4):

Zugeben von 0,5 ml verdünntes HRP-Konjugat zum Röhrchen mit der Negativkontrolle. Zu Beginn des Immuntestes für 2 Sekunden vortexen.

Meerettich-Peroxidase-Konjugate (D5) :

Verdünnen von 8X Meerettich-Peroxidase-Konjugat mit Verdünnungspuffer (für eine Platte 14 ml Verdünnungspuffer zu 2 ml Konjugat geben) für verdünntes HRP-Konjugat.

Färbelösung (D7 + D8 + D9)

Während des Waschschriftes des Immuntestes 12 ml Färbepuffer (D9) mit 300 µl TMB-Lösung (D7) und 180 µl Wasserstoffperoxidlösung (D8) mischen.

4.3. Immuntest

Die Testvorschrift ist für die Verwendung von 1 Immunplatte (12x8 Immunstrips) kalkuliert. Wenn nur einzelne Immunstrips verwendet werden, ist das Volumen der Reagenzien dementsprechend zu kalkulieren. Zum Pipettieren der Kontrollen und der Proben auf die Kavitäten der Immunplatte kann das dargestellte Pipettierschema zur Aufteilung der Platte (Kapitel 7) verwendet werden.

1. Zugabe von $125 \pm 12,5$ µl verdünntem HRP-Konjugat zu der solubilisierten Probe aus dem BetaPrion[®] BSE Reinigungskit (Punkt 9) und mischen durch 3 x Pipettieren, Umschwenken oder für 2 Sekunden vortexen.
2. Pipettieren von jeweils $4 \times 100 \pm 10$ µl einer Negativkontrolle und $2 \times 100 \pm 10$ µl einer Positivkontrolle.
3. Pipettieren von 100 ± 10 µl der verdünnten Probe pro Kavität der beschichteten Immunstrips.
4. Verschließen der Strips mit Klebefolie und Inkubation für $45 \pm 4,5$ min bei Raumtemperatur.
5. Abziehen der Klebefolie. Strips 5x mit $200-300 \pm 20-30$ µl verdünntem Waschpuffer manuell oder unter Verwendung des "Columbus washers", Programm BSE-5*, waschen.
6. Herstellen der Färbelösung.
7. Pipettieren von 100 ± 10 µl der zubereiteten Färbelösung pro Kavität.
8. Für 10 ± 1 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren (bei diesem Schritt nicht mit Klebefolie verschließen).
9. Beenden der Reaktion durch Zugabe von 150 ± 15 µl Stopplösung pro Kavität.
10. Messung der O.D. bei 450 nm und 620 nm als Referenzwellenlänge am Mikroplatten-Reader innerhalb von 15 min nach Beenden der Reaktion.

*) Das Columbus-Washer-Programm BSE-5 ist ein Plattenwaschprogramm im Overflow-Modus mit 5 x 1000 µl Waschpuffer und einem Absaugzyklus am Ende des Programms.

4.4. Lagerungsbedingungen und Haltbarkeit der Bestandteile

Vorbereitete oder angerissene Reagenzien haben die folgenden Haltbarkeitszeiten:

Kurzbezeichnung	Reagenz	Haltbarkeitsdauer
D1	Beschichtete Immunstrips nach öffnen der Beutel.	1 Woche bei 4-8°C
D2	Gebrauchsfertige Waschlösung.	1 Woche bei RT
D5	Meerettich-Peroxidase-Konjugat in Verdünnungspuffer.	4 h bei 4-8°C
D8	Angesetzte Färbelösung.	2 h bei RT in dunklen Gefäßen

Alle Komponenten des Nachweiskits sind bei 4-8°C zu lagern. Die garantierte Haltbarkeit der unbenutzten Reagenzien beträgt 12 Monate.

5. Interpretation der Ergebnisse

Der Grenzwert ist als 0,2 optische Dichte OD_{450/620 nm} definiert und muss für die Unterscheidung zwischen BSE-positiven und –negativen Proben verwendet werden. Die Interpretation der Daten wird wie nachfolgend beschrieben durchgeführt:

- Alle Proben mit einer OD_{450/620 nm} unter 0,2 werden als BSE negativ beurteilt.
- Proben mit einer OD_{450/620 nm} >0,2 werden als initial reaktiv beurteilt und müssen in Zweifachansatz vom Originalhomogenat nachgetestet werden. Wenn einer der beiden Messwerte der Nachtestung eine OD_{450/620 nm} von >0,2 aufweist, ist die Probe als BSE-positiv zu bewerten und muss entsprechend der geltenden nationalen Bestimmungen behandelt werden.

Proben und das entsprechende Gewebe von positiven oder unklaren Schnelltestergebnissen sollten an das NRL zur Bestätigung gesendet werden.

Validierung des Testes

Der OD_{450/620 nm}-Wert der Positivkontrolle muss mindestens 1,0 betragen und der OD_{450/620 nm}-Wert der Negativkontrolle muss <0,1 betragen. Der Immuntest muss wiederholt werden, wenn 2 der Negativkontrollen einen OD_{450/620 nm}-Wert von >0,1 aufweisen.

6. Vorsichtsmaßnahmen

Prionen sind eine einzigartige Klasse von Pathogenen, die ungewöhnliche Resistenz gegenüber konventionellen chemischen und physikalischen Dekontaminierungsmethoden aufweist. Zur Untersuchung von BSE-Material ist ein Sicherheitslabor L3** erforderlich. Nationale gesetzliche Bestimmungen müssen beachtet werden. Die Qualität der Ergebnisse, die mit dem BetaPrion® BSE EIA Test Kit generiert werden, ist abhängig von der Einhaltung der Regeln der *Good Laboratory Practice* [Ordnungsgemäßen Labortätigkeit] (GLP).

Die Verwendung von Einmal-Verbrauchsmitteln ist in jedem möglichen Falle vorzusehen. Für die Dekontaminierung von BSE-positivem Material sollten Instrumente für mindestens 1 h in 2,5% Natriumhypochlorit oder in 1 M NaOH-Lösung getaucht und die kontaminierten Oberflächen ebenso inkubiert werden. Flüssigkeiten und Abfälle sollten durch Autoklavieren bei 134°C für 1 h inaktiviert werden.

7. Anhang

Pipettierschema für die beschichteten Mikrostrips

N	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
N	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
N	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
N	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
P	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
P	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

Anordnung der Kontrollen und Proben:

N = Negativkontrolle

P = Positivkontrolle

1-90 = Proben

Kontakt zu **aj Roboscreen**

Roboscreen kann über das Internet auf der homepage www.roboscreen.com oder wie folgt kontaktiert werden:

- E-mail: info@aj-roboscreen.com
- Telefon: +49-341-9897340
- Fax: +49-341-989734199

8. Gewährleistung und ergänzende generelle Anmerkungen

Während des Gewährleistungszeitraums ermöglicht der BetaPrion® BSE EIA Test Kit eine präzise und reproduzierbare Datenerhebung verbunden mit einer exzellenten Empfindlichkeit. Garantieansprüche gelten lediglich bei Beachtung der allgemeinen Grundsätze der *Good Laboratory Practice* [Ordnungsgemäßen Labortätigkeit (GLP)] und der Empfehlungen des Herstellers.

Sicherheitshinweise

- **Homogenisierungspuffer** muß nach RL 1999/45/EG nicht angegeben werden.
- **Puffer P1** enthält Natrium-Dodecylsulfat, welches nach RL 1999/45/EG als gesundheitsschädlich (Xn) einzuordnen ist. Die Risiko-(R) und Sicherheitssätze (S) sind nachfolgend aufgeführt:
S26 = Im Fall eines Kontaktes mit den Augen, diese unmittelbar mit reichlich Wasser spülen und einen Arzt konsultieren.
R22 = Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
R36/37/38 = augen-, atmungswege- und hautreizend.
S36 = Geeignete Schutzkleidung tragen.
- **Puffer P2** enthält Proteinase-K, welches nach RL 1999/45/EG als gesundheitsschädlich (Xn) einzuordnen ist. Die Risiko-(R) und Sicherheitssätze (S) sind nachfolgend aufgeführt:
R42 = Kann zur Sensibilisierung durch Einatmen führen.
R43 = Kann zur Sensibilisierung durch Hautkontakt führen.
- **Puffer P3** muß nach RL 1999/45/EG nicht angegeben werden.
- **Puffer P4** muß nach RL 1999/45/EG nicht angegeben werden.
- **Puffer D1** muß nach RL 1999/45/EG nicht angegeben werden.
- **Puffer D2** enthält Tris[hydroxymethyl]aminomethan, welches nach RL 1999/45/EG als Reizmittel (Xi) einzuordnen ist. Die Risiko-(R) und Sicherheitssätze (S) sind nachfolgend aufgeführt :
R36/38 = augen- und hautreizend.

- **Puffer D3** muß nach RL 1999/45/EG nicht angegeben werden.
- **Puffer D4** muß nach RL 1999/45/EG nicht angegeben werden.
- **Puffer D5** muß nach RL 1999/45/EG nicht angegeben werden.
- **Puffer D6** muß nach RL 1999/45/EG nicht angegeben werden.
- **Puffer D7** enthält Tetramethylbenzidin und organische Lösungen, welche nach RL 1999/45/EG als toxisch (T) und gesundheitsschädlich (Xn) einzuordnen sind. Die Risiko-(R) und Sicherheitssätze (S) sind nachfolgend aufgeführt:
 - S1 = Verschlotten halten.
 - S45 = Im Fall eines Unfalls oder bei Unwohlsein sofort einen Arzt konsultieren.
 - R25 = Toxisch bei Verschlucken.
 - R20/21 = Gesundheitsschädlich bei Einatmen und Hautkontakt.
 - R36 = Augenreizend.
 - S26 = Im Fall eines Kontaktes mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und einen Arzt konsultieren.
 - S28 = Nach Hautkontakt sofort mit reichlich Wasser waschen.
 - S36 = Geeignete Schutzkleidung tragen.
- **Puffer D8** enthält Peroxid, welche nach RL 1999/45/EG als ätzend (C) einzuordnen ist. Die Risiko-(R) und Sicherheitssätze (S) sind nachfolgend aufgeführt:
 - R34 = Verursacht Verbrennungen.
 - S3 = Kühl lagern.
 - S26 = Im Fall des Augenkontaktes sofort mit reichlich Wasser spülen und einen Arzt konsultieren.
 - S36/37/39 = Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe, Augen- und Gesichtsschutz tragen.
 - S45 = Im Fall eines Unfalls oder bei Unwohlsein sofort einen Arzt konsultieren.
- **Puffer D9** muß nach RL 1999/45/EG nicht angegeben werden.
- **Puffer D10** enthält Schwefelsäure, welche nach RL 1999/45/EG als ätzend (C) einzuordnen ist. Die Risiko-(R) und Sicherheitssätze (S) sind nachfolgend aufgeführt:
 - R35 = Verursacht schwere Verbrennungen.
 - S2 = Ausserhalb der Reichweite von Kindern lagern.
 - S26 = Im Fall des Augenkontaktes sofort mit reichlich Wasser spülen und einen Arzt konsultieren.
 - S30 = Niemals Wasser zu diesem Produkt hinzugeben.
 - S45 = Im Fall eines Unfalls oder bei Unwohlsein sofort einen Arzt konsultieren.

9. Kommentare

Alle Bestandteile des BetaPrion® BSE EIA Test Kit werden unter Beachtung der Qualitätsanforderungen aus der DIN EN ISO 9001:2008 hergestellt.

10. Anleitung für die Probenentnahme unter Verwendung der AJ Roboscreen BSE-Probenentnahmespritze.

Einleitung

AJ Roboscreen bietet eine Spritze zur Probenentnahme von 350 ± 50 mg aus der Obex-Region des Stammhirns zur Testung mit dem BetaPrion® BSE EIA Test Kit an.

Es wird empfohlen, diese Anleitung zur Entnahme der Obexprobe mit der Spritze zu verwenden. Die Probenentnahme muss durch ausgebildetes Personal erfolgen. Die Qualität des Personal muss in einer entsprechenden Anweisung des Labors dargestellt sein und professionelle Schulungen zur Anatomie des Hirnstammes und des Probeentnahmegebietes einschliessen.

Die Spritze ist einfach zu handhaben. Der Spritzenkörper ist markiert in 0,1-ml-Stufen (Abbildung 2). Jede 0,1 ml entsprechen 100 mg Gewebe. Die korrekte Menge Hirngewebe zur Entnahme aus dem Obex ist 350 ± 50 mg. Deshalb muss das Personal zwischen 0,3 and 0,4 ml Gewebe entnehmen.

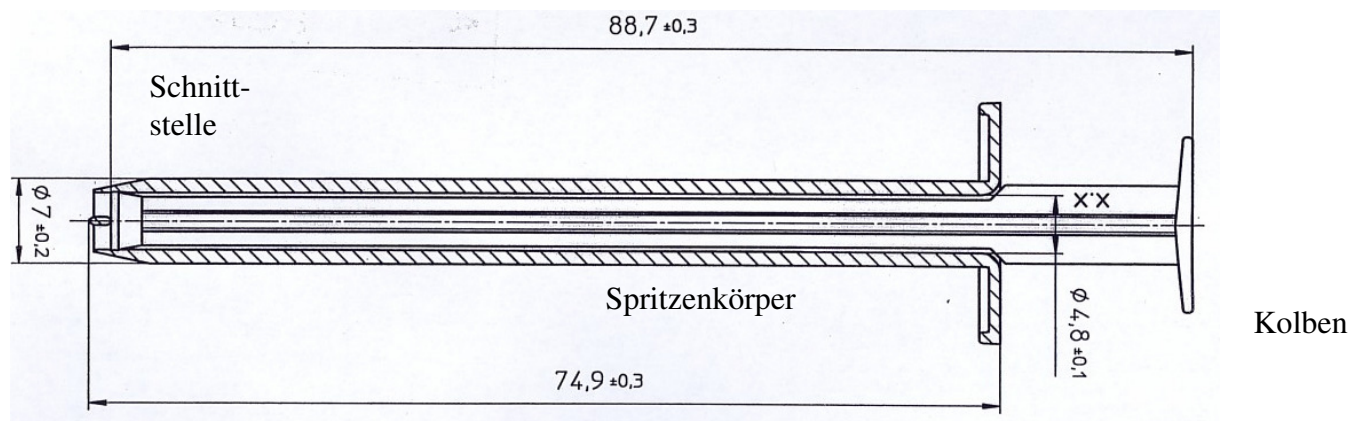


Figure 2: Schema der AJ Roboscreen BSE-Probenentnahmespritze

Histopathologische Beschreibung der Probenentnahmeregion

Die benötigte Probe sollte am oder innerhalb 1,5 cm anterior zum Obex genommen werden (Abbildung 3).

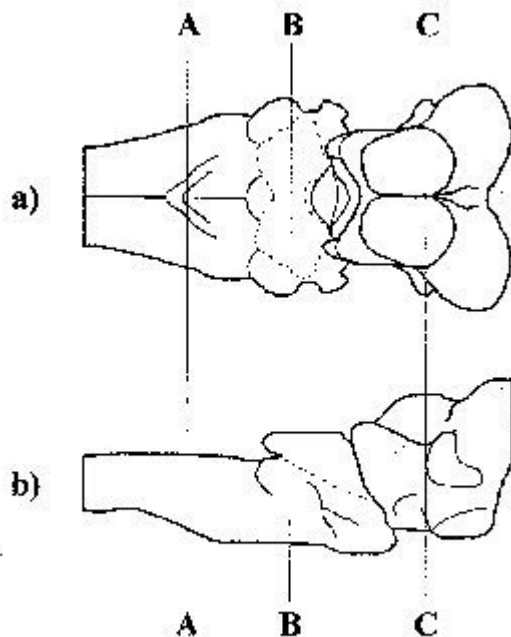


Abb. 3: Stammhirn nach Entfernung des Cerebellum, Von a) dorsal, und b) lateral. Empfohlene Ebenen, von denen Schnitte für histopathologische Untersuchungen genommen werden sollten (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals):
A-A = Medulla, am Obex
B-B = Medulla durch die caudal cerebellaren Peduncles
C-C = Mittelhirn durch rostrale Colliculi

Die Probenentnahme einseitig von der rostralen Medulla zur Schnelltestung darf nicht histologische bzw. immunhistologische Untersuchungen beeinträchtigen. Der Kern des Solitartraktes (das betroffene Gebiet beim Rind) ist klein und befindet sich in Nähe zur Mittellinie (Abbildung 4). Das andere betroffene Gebiet, der Kern des Spinaltraktes des Trigemiusnerves befindet sich mehr lateral.

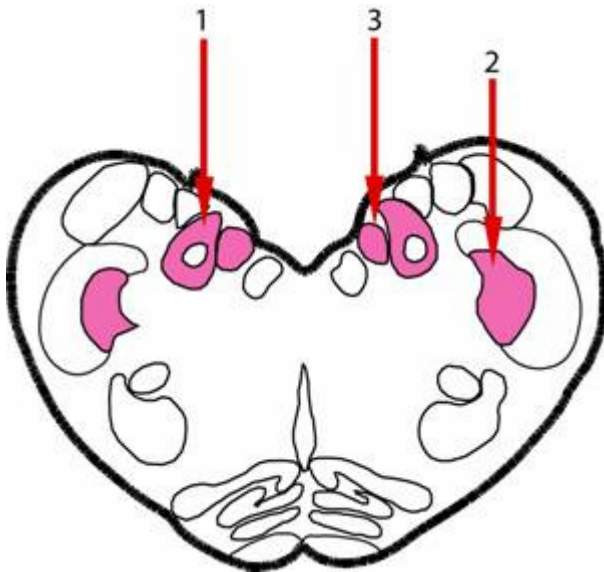


Abb. 4: Querschnitt des Stammhirns in Höhe des Obex zur Identifizierung der Hauptgebiete für die histopathologische bzw. Immunhistopathologische Diagnose von BSE (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals):

- Kern des Solitartraktes [1]
- Kern des Spinaltraktes des Trigemiusnerves (V) [2]
- Dorsaler Kern des Vagus [3]

Verwendung der Spritze

Die benötigte Probe sollte aus dem Obex oder innerhalb von 1,5 cm anterior zum Obex entnommen werden (Abbildung 5).

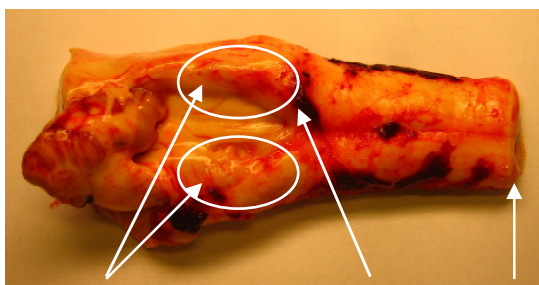


Abb. 5: Probenentnahmegebiet

Proben-
entnahmegebiet Obex Rückenmark

Vor der Probenentnahme muss die Länge des Stammhirns bestimmt werden, um sicher zu sein, dass die Probenentnahme mit der Spritze vom Obex erfolgen kann. In einigen Hirngewebsproben ist das Rückenmark länger als die Spritze. In diesem Fall ist das Rückenmark mit einem Skalpell abzuschneiden, damit die Spritze bis in das Probenentnahmegebiet reicht.

Die Spritze wird in eine Hand genommen und der Kolben vollständig in den Spritzenkörper gedrückt. Mit der anderen Hand wird das Stammhirn gehalten und auf Zellstoff fixiert. Das kaudale Ende des Stammhirns bzw. des Rückenmarks muss zugänglich sein.

Jetzt wird die Spritze in die linke oder die rechte Hälfte des Stammhirns hineingeschoben. Eine Seite des Stammhirns muss nach der Probenentnahme unbeschädigt bleiben. Das ist für einen Bestätigungstest erforderlich (Abbildung 6). Während des Einführens der Spritze in eine Seite des Stammhirns muss darauf geachtet werden, dass die Mittellinie nicht überschritten wird.

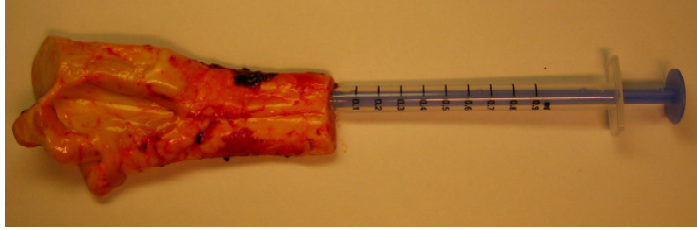


Abb. 6: Die Spritze vor Einführen in die rechte Seite des Stammhirns.

Gleichzeitig mit dem Einführen der Spritze in das Gewebe muss der Kolben herausgezogen werden, um ein Vakuum zu erzeugen. Dadurch gelangt das Hirngewebe in den Spritzenkörper. Die Probenentnahmestelle wird mit einem Finger der anderen Hand gepresst, die das Hirn festhält. Das Einführen wird beendet, wenn das Ende der Probenentnahmestelle anterior zum Obex erreicht ist (Abbildung 7).

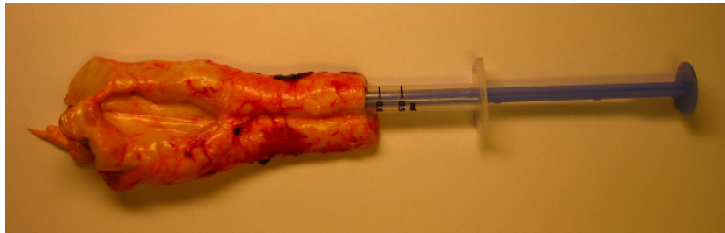


Abb. 7: Die Spritze hat das Ende der Probenentnahmestelle erreicht.

Die Probe wird abgeschnitten durch zweimaliges Drehen des Spritzenkörpers. Die Spritze wird langsam aus dem Stammhirn entfernt. Die Gewebeprobe muss sich im Spritzenkörper befinden.

Der Kolben wird gedrückt, um mögliche Luftblasen aus der Spitze der Spritze zu entfernen. Es ist darauf zu achten, dass die gesamte Probe im Spritzenkörper verbleibt. Durch Drücken des Kolbens wird die nächste Eichmarkierung an der Spritze eingestellt.

Von einem Homogenisierungsröhrchen wird der Deckel entfernt. Die Spritze wird an die Öffnung des Röhrchens gehalten.

Sorgfältig werden durch das Drücken des Kolbens in die Mitte zwischen 0,3 und 0,4 ml an Hirngewebe herausgedrückt, um 0,35 ml des Probenmaterials zu entnehmen. Die herausgedrückte Probe wird durch Drücken des Endes der Spritze an den Rand des Homogenisierungsröhrchens abgetrennt.

Vorsichtsmaßnahmen

Die Probenentnahmespritze ist ein Einmalartikel und darf nur einmal verwendet werden. Die benutzte Spritze muss dekontaminiert und entsorgt werden wie unten beschrieben.

Autolyseproben können mit der Spritze aus der Region entnommen, die als Obex identifiziert wird. Dazu sollten mit der Spritze bis 0,35 ml aufgezogen werden.

Beschädigte Proben sollten mit einem Skalpell entsprechend der BetaPrion-Gebrauchsanweisung entnommen werden.

Gesundheits- und Sicherheitshinweise

Für den Umgang mit Reagenzien und Proben von TSE-Risikomaterial sind Einmalhandschuhe zu benutzen.

Prionen sind eine besondere Klasse von Pathogenen, die eine ungewöhnliche Resistenz gegenüber konventionellen chemischen und physikalischen Dekontaminationsmethoden besitzen. Ein Sicherheitslabor Stufe 3** ist notwendig für den Umgang mit TSE-Material.

Einmalmaterial sollte wenn möglich verwendet werden. Für die Dekontaminierung von TSE-positivem Material wird empfohlen, Autoklavieren bei 134°C 1 Stunde lang durchzuführen.

Oberflächen, Geräte und Flüssigkeiten, die nicht autoklavierbar sind, müssen mit 2,5%igem Natriumhypochlorit oder 1 M NaOH mindestens 1 Stunde lang dekontaminiert werden.

Die Verbrennung des dekontaminierten Abfalls wird empfohlen.

Der Ausführende muss für den Umgang mit Risikomaterial und Prionen speziell geschult worden sein. Die Dekontaminierung von TSE-Risikomaterial und die Gesundheits- und Sicherheitshinweise müssen mit den entsprechenden nationalen Regelungen des betreffenden Landes in Einklang stehen.

aj ROBOSCREEN

Delitzscher Straße 135, Laborgebäude
D-04129 Leipzig (Deutschland)

Telefon	+49-341-9897340
Fax	+49-341-989734199
E-mail	info@aj-roboscreen.com
Internet	www.roboscreen.com