

TeSeE™ WESTERN BLOT


▽ 32

REF 3551169

REACTIVOS PARA LA CONFIRMACIÓN *IN VITRO* DE LAS
MUESTRAS SOSPECHOSAS POSITIVAS EET



Validado y certificado por la OIE como apto para las finalidades definidas en este folleto. Número de registro: 20090105

 16005959 - 2018/06

BIO-RAD

ÍNDICE

- 1 - INFORMACIÓN GENERAL
- 2 - PRINCIPIO DE LA PRUEBA
- 3 - COMPOSICIÓN DEL KIT
- 4 - MUESTRAS
- 5 - PROCEDIMIENTO CON EL GEL MINI BLOT™
 - 5.1 Reactivos y material suplementario
 - 5.2 Preparación de los reactivos
 - 5.3 Purificación de las muestras
 - 5.4 Electroforesis
 - 5.5 Transferencia de proteínas
 - 5.6 Inmunoblotting
- 6 - PROCEDIMIENTO CON EL GEL CRITERION™ XT
 - 6.1 Reactivos y material suplementario
 - 6.2 Preparación de los reactivos
 - 6.3 Purificación de las muestras
 - 6.4 Electroforesis
 - 6.5 Transferencia de proteínas
 - 6.6 Inmunoblotting
- 7 - INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS
- 8 - PRECAUCIONES
- 9 - RECOMENDACIONES DE HIGIENE Y SEGURIDAD
- 10 - BIBLIOGRAFÍA

1 - INFORMACIÓN GENERAL

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) se describieron por primera vez en el siglo XVIII en el cordero (tembladera) y, más recientemente, en los cérvidos como el ciervo y el alce (enfermedad debilitante crónica, EDC) y en los bovinos (encefalopatía espongiforme bovina, EEB). El hombre también es sensible a ciertas formas de EETs como el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJv) o el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS). En el caso del hombre, la aparición de una nueva forma de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, llamada variante (vCJD), se debe en gran medida al consumo alimentario de carne o productos cárnicos infectados por el agente de la EEB.

Una de las características principales de la encefalopatía espongiforme transmisible (EETs) es la acumulación progresiva, en el sistema nervioso central, de una isoforma anormal de la proteína prión natural o celular (PrP^c), denominada PrP^{res}. Esta proteína PrP^{res} específica de la enfermedad se caracteriza por una mayor resistencia a las proteasas. TeSeE™ WESTERN BLOT permite la identificación cualitativa de la proteína PrP^{res}, tras un tratamiento proteolítico con el que se obtiene un fragmento de reducido peso molecular tras la ruptura en el extremo N-terminal.

Programas de control activo/passivo se han realizado en el mundo entero para la detección de la EEB, tembladera o EDC in los animales infectados. Estos programas han tenido como resultado la identificación de un mayor número de casos de EET positivos en los laboratorios de detección. Las muestras positivas (animales sospechosos) identificadas durante estos programas de control son sistemáticamente confirmadas como “infectadas por EET” mediante la demostración de cambios espongiformes típicos por histopatología o mediante la detección de la PrP anormal mediante inmunohistoquímica (ICH) o de fibrillas asociadas al scrapie (SAF) por microscopía electrónica. Estas técnicas de confirmación requieren experiencia técnica para la interpretación de los resultados, requieren mucho tiempo y son costosas. La técnica western blot (inmunotransferencia) también se puede considerar como un método alternativo para la confirmación de muestras sospechosas de EET.

Los datos de validaciones de este kit han sido certificados por la OIE sobre la base de una revisión de expertos como son validados y aptos para una finalidad de detección post mortem de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) en bovinos (encefalopatía espongiforme bovina, EEB), en ovinos y caprinos (EEB y prurigo lumbar), y en cérvidos (caquexia crónica), con las siguientes finalidades:

1. Confirmar muestras positivas sospechosas de EET detectadas en los laboratorios de criba en países con programas de vigilancia activa/pasiva. Toda muestra que dé un resultado negativo según los criterios de interpretación del TeSeE™ WESTERN BLOT, tras un resultado positivo en una prueba rápida, debe ser sometida a otro método de confirmación certificado por la OIE: inmunohistoquímica (IHC) o inmunotransferencia de SAF;
2. Confirmar la prevalencia de la infección con uno de los agentes asociados a las EET (EEB, prurigo lumbar, caquexia crónica) en el contexto de una encuesta epidemiológica en un país de baja prevalencia;
3. Calcular la prevalencia de la infección para facilitar el análisis de riesgos (encuestas, aplicación de medidas de control sanitario) y ayudar a demostrar la eficiencia de las políticas de erradicación.

El test TeSeE™ WESTERN BLOT utiliza el mismo principio de ensayo que el test rápido de Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat), que incluye la etapa de purificación preliminar y concentración de la PrP^{res}, seguida de inmunotransferencia. Este test se puede utilizar de manera eficaz para la confirmación de la EET en animales sospechosos y para la tipificación de la cepa de EET en las ovejas.

2 - PRINCIPIO DE LA PRUEBA

TeSeE™ WESTERN BLOT permite la detección de la PrP^{res} en las muestras de tejidos nerviosos (bóvidos, ovejas, cabras, cérvidos...) y periféricos (cérvidos) obtenidos de animales infectadas.

El procedimiento se inicia con la digestión de la proteína prión celular (PrP^c), seguida de la purificación y concentración de la proteína prión PrP^{res} específica de la enfermedad. La detección de la PrP^{res} se realiza por electroforesis seguida de una técnica de inmunoblotting en la que se utiliza un anticuerpo monoclonal altamente específico de la PrP^{res}.

El procedimiento incluye las siguientes etapas:

- Homogeneización de la muestra
- Digestión de la PrP^c con la proteinasa K
- Purificación y concentración de la PrP^{res}
- Electroforesis y transferencia sobre la membrana
- Inmunoblotting

3 - COMPOSICIÓN DEL KIT

Denominación	Tipos de reactivos	Presentación	Conservación
Grinding Tubes	Tubos de trituración que contienen bolas de cerámica en una solución tampón ⁽¹⁾	1 sobre (35 tubos)	+2°C a +25°C
A	Solución desnaturalizante Lista para usar	1 frasco (20 ml)	+2°C a +25°C
B	Solución clarificante Colorante: azul de bromofenol Lista para usar	1 frasco (20 ml)	+2°C a +25°C
PK	Proteinasa K Colorante: rojo fenol	1 frasco (0.5 ml)	+2°C a +8°C
Ab I	Anticuerpo primario ⁽¹⁾ : Anticuerpo monoclonale anti-PrP (10x)	1 frasco (8 ml)	+2°C a +8°C
Ab II	Anticuerpo secundario ⁽¹⁾ : IgG de oveja anti-ratón (H+L)-HRP (10x)	1 frasco (10 ml)	+2°C a +8°C
BI	Solución de saturación ⁽¹⁾ (10 x)	1 frasco (10 ml)	+2°C a +8°C

⁽¹⁾Estos reactivos contienen 0,1% de ProClin™ 300 (conservante).

4 - MUESTRAS

El test TeSeE™ WESTERN BLOT conviene para la detección del EET en los bovinos (Encefalopatía Espongiforme Bovina, EEB), en las ovejas y caprinos (EEB y tembladera), y en los cervidos (Enfermedad Debilitante Crónica, EDC).

Puede utilizarse directamente a partir de la misma muestra homogenizada (tubo de trituración) para las pruebas rápidas Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat).

Bovinos: la purificación de la PrP^{res} se realiza en muestras del Sistema Nervioso Central (SNC). Como la distribución de la PrP^{res} en el sistema nervioso central es heterogénea, se debe tomar preferentemente una

muestra en el área del obex del tronco cerebral para una detección óptima.

La jeringa de toma de muestras (Ref.: 3551175) permite un muestreo fácil, rápido y seguro en el área del obex. Es necesario, revisar el protocolo de toma de muestras para obtener instrucciones detalladas sobre el procedimiento de toma de muestras.

Pequeños ruminantes: la purificación de la PrP^{res} se realiza en muestras del Sistema Nervioso Central (SNC).

Las muestras se cortan y se pesan individualmente.

Cérvidos: la purificación de la PrP^{res} se realiza en muestras del Sistema Nervioso Central (SNC) o tejidos periféricos (nódulos linfáticos).

Las muestras se cortan y se pesan individualmente.

5 - PROCEDIMIENTO CON EL GEL MINI BLOT™

5.1 - REACTIVOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

5.1.1 - REACTIVO Y CONSUMIBLES

Pipetas graduadas (5, 10, 25 ml), tubos cónicos (50 ml), microtubos (2 ml) de polipropileno con tapón.

Película protectora PARAFILM® M.

Purificación de las muestras

Tampón Laemmli	30 ml	Bio-Rad, Ref. 1610737
2-Mercaptoethanol	25 ml	Bio-Rad, Ref. 1610710
SDS	100 g	Bio-Rad, Ref. 1610301
Jeringas de calibración	200	Bio-Rad, Ref. 3551174

Electroforesis

Acrilamida 40% 29:1	500 ml	Bio-Rad, Ref. 1610146
Tris-HCl 0,5 M pH 6.8	1 L	Bio-Rad, Ref. 1610799
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1 L	Bio-Rad, Ref. 1610798
Azul de bromofenol	10 g	Bio-Rad, Ref. 1610404
Sacarosa	1 kg	Bio-Rad, Discontinuado
Persulfato de amonio	10 g	Bio-Rad, Ref. 1610700
TEMED	5 ml	Bio-Rad, Ref. 1610800
Tris/Glicina/SDS (tampón de electroforesis) (10x)	1 L	Bio-Rad, Ref. 1610732
Marcador preteñido Kaleidoscope™	500 µl	Bio-Rad, Ref. 1610375

MagicMark™ XP Western Standard (marcador de peso molecular)	250 µl	Invitrogen, Ref. LC5602
--	--------	-------------------------

Immunoblotting

Ethanol (Normapur)	1L	VWR, Ref. 20821-296
Tris/CAPS (tampón de transferencia) (10x)	1L	Bio-Rad, Ref. 1610778
Papel de filtro (papel de transferencia para geles Mini Blot™)	50 hojas	Bio-Rad, Ref. 1703932
Membrana PVDF (0,2 µm)	10 hojas	Bio-Rad, Ref. 1620175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, Ref. 1706531
PBS (tampón de lavado) (10x)	1 L	Bio-Rad, Ref. 1610780
ECL (sustrato para conjugado)	125 ml	Amersham, Ref. RPN2109
Hyperfilms ECL (18 x 24 cm)	25 películas	Amersham, Ref. RPN2103K
Sobre de revelado	30 sobres	Applied Biosystems, cat Nr. T2258
Solución de revelado Kodak LX24	csp 20 L	VWR o Kodak
Solución de fijador Kodak AL4	csp 20 L	VWR o Kodak

5.1.2 - MATERIAL

Pipetas regulables (10, 40, 200, 1000 µl),
 Probetas graduadas (1 L y 2 L), pinzas de plástico, cubetas, Vortex®.
 Cassette de exposición con luz roja para el revelado de las películas.

Purificación de las muestras

TeSeE™ Precess 48™	Bio-Rad, Ref. 3590200
TeSeE™ Precess 24™	Bio-Rad, Ref. 3591070
Calefactor de bloque	Bio-Rad, Ref. 3589057
Adaptador para calefactor de bloque - 20 tubos	Bio-Rad, Ref. 3589072
Centrifuga - 220/240 V	Bio-Rad, Ref. 3591396
Rotor tambor	Bio-Rad, Ref. 3589189
Adaptadores para rotor - (x6)	Bio-Rad, Ref. 3589191

Electroforesis

Mini-PROTEAN® Tetra Cell, electrophoresis module	Bio-Rad, Ref. 1658007
5 spacer plates	Bio-Rad, Ref. 1653312
Generador PowerPac™ HC: 100/120 V - 220/240 V	Bio-Rad, Ref. 1645052

Transferencia

Trans-Blot® Cell

Bio-Rad, Ref. 1703946

Immunoblotting

Western Processor base

Bio-Rad, Discontinuado

Cubetas Western Processor para geles Mini Blot™

Bio-Rad, Discontinuado

5.2 - PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

5.2.1 - PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

• **Proteínasa K**

Solución de proteínasa K diluida en reactivo A:

- ▶ 1 ml de reactivo A
- ▶ 20 µl de proteínasa K

Mezclar bien por inversión del tubo hasta obtener una solución homogénea. Tras la reconstitución, la solución diluida de proteínasa K es estable 10 horas si se conserva a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

• **Solución de Laemmli**

Solución de SDS + 2-Mercaptoetanol + Laemmli sample buffer:

- ▶ 0,6 g de SDS
- ▶ 1,5 ml de 2-Mercaptoetanol

Mezclar por inversión del tubo.

- ▶ 28,5 ml de Laemmli sample buffer

La solución se reparte en alícuotas de 4 ml y se conserva a -20°C. Las alícuotas descongeladas pueden volverse a congelar.

Nota: Se recomienda preparar la solución de Laemmli una hora antes de su uso para que el SDS se disuelva completamente.

5.2.2 - ELECTROFORESIS

• **Gel discontinuo de acrilamida, vertido manualmente**

El gel tendrá un espesor de 1,5 mm.

Con el módulo de vaciado Mini Blot™ (casting module), echar en primer lugar el gel inferior (acrilamida 13,5%, pH 8,8); cuando el gel inferior haya polimerizado, añadir el gel superior (acrilamida 3% pH 6,8).

Gel inferior (1 gel)

- ▶ 2,8 ml de acrilamida 40%, 29:1
- ▶ 1,7 ml de tampón Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8 / SDS (1)

- ▶ 1,3 ml de solución de sacarosa al 50% (2)
- ▶ 2,5 ml de agua destilada

Mezclar por inversión del tubo.

- ▶ 43 μ l de persulfato de amonio 10% (3)
- ▶ 9 μ l de TEMED

Verter 7 ml de la solución en las placas y guardar el resto de solución como control de polimerización. Añadir con cuidado 1 ml de tampón Tris-HCl 0,3 M pH 8,8 / SDS (4) hasta arriba para que la superficie del gel no se seque.

Dejar que el gel polimerice durante 15-20 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C). Comprobar que el resto de solución ha polimerizado. Dar la vuelta al sistema para eliminar el exceso de tampón.

Gel superior (1 gel)

- ▶ 4 ml de acrilamida 3% (7)
- ▶ 28 μ l de persulfato de amonio al 10% (3)
- ▶ 6 μ l de TEMED

Mezclar por inversión del tubo.

Añadir suavemente el gel inferior sobre el gel superior y guardar el resto de solución como control de polimerización. Colocar el peine, evitando la formación de burbujas en las posiciones de los pocillos. Dejar que el gel polimerice durante 5-10 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

Comprobar que el resto de solución ha polimerizado.

(1) Solución de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 / SDS

- ▶ 0,2 g de SDS
- ▶ 50 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8

La solución se puede conservar de +2°C a +8°C durante 2 semanas.

(2) Solución de sacarosa 50%

- ▶ 25 g de sacarosa
- ▶ csp 50 ml de agua destilada

La solución de sacarosa se puede conservar de +2°C a +8°C, durante 2 semanas.

(3) Solución de persulfato de amonio al 10%

- ▶ 5 g de persulfato de amonio
- ▶ csp 50 ml de agua destilada

La solución de persulfato de amonio se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C . La solución descongelada se puede conservar de $+2^{\circ}\text{C}$ a $+8^{\circ}\text{C}$, durante 2 semanas.

(4) Solución de tampón Tris-HCl 0,3 M, pH 8,8 / SDS

- ▶ 40 ml de agua destilada
- ▶ 10 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 / SDS

La solución se conserva de $+2^{\circ}\text{C}$ a $+8^{\circ}\text{C}$, durante 2 semanas.

(5) Solución de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 / SDS

- ▶ 0,2 g de SDS
- ▶ 50 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8

La solución se conserva de $+2^{\circ}\text{C}$ a $+8^{\circ}\text{C}$, durante 2 semanas.

(6) Solución de azul de bromofenol al 1%

- ▶ 0,5 g de azul de bromofenol
- ▶ 50 ml de agua destilada

La solución de azul de bromofenol se conserva a temperatura ambiente ($+18^{\circ}\text{C}$ a $+30^{\circ}\text{C}$), durante 6 meses.

(7) Solución de acrilamida al 3%

- ▶ 3,8 ml de acrilamida al 40%, 29:1
- ▶ 10 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 / SDS (5)
- ▶ 6 ml de sacarosa 50% (2)
- ▶ 500 μl de azul de bromofenol 1% (6)
- ▶ csp 50 ml de agua destilada

La solución se conserva de $+2^{\circ}\text{C}$ a $+8^{\circ}\text{C}$, durante 2 semanas.

• Marcador Kaleidoscope™

El marcador Kaleidoscope™ se prepara durante la desnaturalización de la muestra antes de la carga en el gel de acrilamida.

Preparar una dilución 1/12 en solución de Laemmli, por ejemplo 10 μl del marcador Kaleidoscope™ + 110 μl de solución de Laemmli.

Consultar en el prospecto del marcador Kaleidoscope™ las condiciones de conservación.

• Marcador MagicMark™ XP

El marcador de peso molecular MagicMark™ XP se prepara durante la desnaturalización de la muestra, antes de depositarla sobre el gel de acrilamida. Preparar una dilución 1/12 en solución de Laemmli, por ejemplo, 10 µl de MagicMark™ XP + 110 µl de solución de Laemmli. Consultar el manual de instrucciones del MagicMark™ XP sobre las condiciones de conservación.

• Tampón de migración Mini Blot™

Solución de Tris-Glicina-SDS (1x).

Preparar una dilución 1/10. Para 1 cubeta se necesita 1 L de tampón diluido:

- ▶ 100 ml de tampón Tris-Glicina-SDS (10x)
- ▶ 900 ml de agua destilada

Homogeneizar. Esta solución no se puede guardar.

5.2.3 - TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

• Tampón de transferencia

Solución de Tris/CAPS-etanol 15%. **Para 1 cubeta de transferencia se necesitan 2,5 L.**

- ▶ 750 ml de agua destilada
- ▶ 150 ml de etanol puro
- ▶ 100 ml de Tris/CAPS (10x)

Homogeneizar. Esta solución no se puede guardar.

5.2.4 - INMUNOBLOTTING

• Solución de lavado 1

Solución de PBS (1x) + 0,1% Tween® 20. **Para el tratamiento completo de una membrana se necesitan unos 500 ml.**

- ▶ 900 ml de agua destilada
- ▶ 100 ml de PBS (10x)
- ▶ 1 ml de Tween® 20

Homogeneizar bien. La solución se puede conservar una noche de +2°C a +8°C.

• Solución de lavado 2

Solución de PBS (1x). **Para el tratamiento completo de una membrana se necesitan unos 100 ml.**

- ▶ 900 ml de agua destilada
- ▶ 100 ml de PBS (10x)

La solución se puede conservar una noche a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

• Solución de saturación

Durante la etapa de transferencia, diluir la solución de saturación (B1) 1/10 en la solución de lavado 1. **Se necesitan 20 ml de solución de saturación diluida (1x) para 1 membrana.**

- ▶ 18 ml de solución de lavado 1
- ▶ 2 ml de solución de saturación (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

• Anticuerpo primario diluido

Justo antes de usar, diluir la mezcla de anticuerpo primario a 1/10 en la solución de lavado 1. **Para 1 membrana se necesitan 15 ml de anticuerpo diluido.**

- ▶ 13,5 ml de solución de lavado 1
- ▶ 1,5 ml de anticuerpo primario (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

• Anticuerpo secundario diluido (conjugado)

Justo antes de usar, diluir el anticuerpo secundario a 1/10 en solución de lavado 1. **Para 1 membrana se necesitan 20 ml de conjugado diluido.**

- ▶ 18 ml de solución de lavado 1
- ▶ 2 ml de anticuerpo secundario (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

• ECL

El sustrato (ECL) se debe preparar justo antes de usar. El sustrato (ECL) se debe preparar justo antes de usar. **Para 1 membrana se necesita 1 ml de sustrato.**

- ▶ 0,5 ml de reactivo 1
- ▶ 0,5 ml de reactivo 2

Homogeneizar la solución.

• Solución de revelado

- ▶ 800 ml de agua destilada
- ▶ 200 ml de producto de revelado

La solución se puede conservar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), en cámara oscura, durante un máximo de 15 días.

- Solución de fijación
 - ▶ 800 ml de agua destilada
 - ▶ 200 ml de producto fijador

La solución se puede conservar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), en cámara oscura, durante un máximo de 15 días.

5.3 - PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

El test TeSeE™ WESTERN BLOT se puede utilizar directamente a partir de la misma muestra homogenizada (tubo de trituración) para las pruebas rápidas Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat).

Obtención

Para tejidos periféricos (ganglios linfáticos) inserte una bolita media (Medium Bead, ref.: 3551171) en el tubo de trituración antes de añadir la muestra.

Coja una masa de 350 mg ± 40 mg de tejido nervioso (preferiblemente del área del obex) o 200 mg ± 20 mg de tejido periférico. Depositar la muestra en un tubo de trituración, cerrar herméticamente y realizar la trituración en el homogeneizador (Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 48™ o TeSeE™ PRECESS 24).

Trituración de la muestra

Colocar los tubos en el homogeneizador.

Efectuar un ciclo de agitación con los siguientes parámetros:

	Ribolyser®		TeSeE™ PRECESS 48™ o TeSeE™ PRECESS 24™	
	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos
Tiempo (seg.)	45	2 x 45 ⁽¹⁾	-	-
Velocidad	6,5	6,5	-	-
Programa	-	-	Programa 1	Programa 2

Si la trituración es insuficiente, se pueden efectuar 1 o 2 ciclos de agitación más⁽²⁾.

⁽¹⁾ ⁽²⁾ Esperar durante 5 minutos entre 2 ciclos de trituración.

Calibración de la muestra

Retirar los tubos de trituración del homogeneizador, resuspender el homogeneizado por inversión antes de abrirlos y aspirar 500 µl con la jeringa de calibración, teniendo cuidado de introducir la aguja por debajo del nivel de las bolas de cerámica para evitar coger fragmentos de tejido.

Transferir cada muestra de 500 µl a un microtubo Eppendorf de 2 ml.

Nota: En esta etapa, los tubos de trituración tras la homogeneización y los microtubos tras la calibración de la muestra se pueden conservar cerrados:

- A temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 15 horas.
- De +2°C a +8°C durante 72 horas.
- A -20°C durante 1 año. Las muestras congeladas deben descongelarse a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

Las muestras pueden someterse a un máximo de 3 ciclos de congelación/ descongelación. Las muestras siempre deben homogeneizarse por inversión antes de usar.

Tratamiento con la proteinasa K

Distribuir 500 µl de solución de proteinasa K reconstituida (ver apartado 5.2.1) en cada microtubo.

Homogeneizar los tubos cerrados por inversión (10 veces) e incubar a 37°C ± 2°C en una estufa durante 10 minutos.

Precipitación de la PrP^{res} con el reactivo B

Sacar los tubos del incubador. Abrirlos y distribuir 500 µl de reactivo B en cada tubo. Homogeneizar por inversión hasta obtener un color homogéneo.

Concentración de la PrP^{res} por centrifugación

Centrifugar los tubos durante 7 minutos a 15.000 g a 20°C.

Aclaración de la muestra

Desechar el sobrenadante en un recipiente para residuos. A continuación, secar los tubos dándoles la vuelta sobre papel absorbente durante 5 minutos.

Distribuir 100 µl de solución de Laemmli (ver apartado 5.2.1) en cada microtubo. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

Volver a solubilizar completamente el precipitado por aspiración/

dispensación con una pipeta.

Incubar durante 5 minutos a $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ en una estufa.

Sacar los tubos del incubador, homogeneizar con el vórtex.

Centrifugar los tubos durante 15 minutos a 15000 g a 20°C .

Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo. Desechar el tubo que contiene el precipitado.

En esta etapa, el sobrenadante se puede conservar congelado a -20°C durante 24 horas; las muestras se deben descongelar a temperatura ambiente ($+18^{\circ}\text{C}$ a $+30^{\circ}\text{C}$) antes de usar.

5.4 - ELECTROFORESIS

El test TeSeE™ WESTERN BLOT se puede utilizar tanto para la confirmación de muestras sospechosas de infección por EET como para el tipificado de la cepa en las ovejas.

El siguiente procedimiento es aplicable para la confirmación de muestras sospechosas de infección por EET.

En el caso de la aplicación del tipificado, póngase en contacto con su representante de Bio-Rad para solicitar el protocolo de instrucciones.

Preparación del gel

Colocar los geles de acrilamida (ver apartado 5.2.2) en la cubeta de migración. Añadir el tampón de migración (ver apartado 5.2.2) en las cubetas a cada lado

de los geles hasta por encima de los pocillos y en la cubeta de electroforesis. Retirar con cuidado los peines y aclarar cada pocillo con tampón de migración utilizando una pipeta.

Depósito de las muestras

Calentar las muestras durante 4 minutos a $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ justo antes de depositar 15 μl /pocillo.

Depositar 15 μl del marcador Kaleidoscope™ diluido y 15 μl de MagicMark™ XP diluido (ver apartado 5.2.2).

Nota: en el caso en el que se traten varios geles a la vez, depositar los marcadores en diferentes pocillos para facilitar la identificación.

Migración diferencial de las muestras

Realizar la migración a temperatura ambiente ($+18^{\circ}\text{C}$ a $+30^{\circ}\text{C}$) durante 90 minutos a 150 V. La línea azul debe estar fuera del gel.

5.5 - TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS

El tampón de transferencia debe prepararse antes de que finalice la migración de las muestras (ver apartado 5.2.3).

Preparación de la transferencia de las proteínas

Cortar la membrana con las mismas dimensiones del gel. La membrana siempre se debe manipular con pinzas.

Sumergir la membrana en etanol puro durante 15 segundos, aclarar en agua destilada durante 5 minutos y posteriormente en el tampón de transferencia durante 10 minutos.

Separar con cuidado el gel de las placas de vidrio y dejar que se equilibre durante 10 minutos en el tampón de transferencia.

Preparación del sandwich

Empapar los papeles de filtro y las almohadillas de fibras en el tampón de transferencia. Abrir el cassette de transferencia, con el lado transparente a la izquierda. Colocar sobre el lado transparente, siguiendo este orden, una almohadilla de fibras, un papel de filtro, la membrana* y el gel*. Completar con un papel de filtro y una almohadilla de fibras y cerrar el cassette.

Sumergir el cassette en la cubeta de transferencia, previamente llena con el tampón de transferencia hasta el límite indicado.

*Eliminar las posibles burbujas de aire que se hayan formado.

Nota: en el caso de que se traten varias membranas a la vez, identificar cada membrana marcando en una esquina.

Transferencia sobre la membrana PVDF

Transferir durante 60 minutos a 115 V, sobre agitación (barra magnética).

5.6 - INMUNOBLOTTING

a) Al finalizar la transferencia de las proteínas, abrir el cassette y sacar la membrana para revelarla. Sumergir rápidamente la membrana en la solución de lavado 2 (ver apartado 5.2.4) y posteriormente ponerla en etanol durante 10 segundos antes de aclarar durante 5 minutos en agua destilada.

Nota: En este paso, la membrana se puede conservar durante la noche en agua destilada en +2°C a +8°C. Deje la membrana ajustar a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) antes de comenzar inmunoblotting.

- b) Eliminar el agua destilada e incubar la membrana durante 30 minutos en la solución de saturación (ver apartado 5.2.4). Incubar con agitación moderada.

Para 1 membrana se necesitan 20 ml de solución de saturación.

Nota: desde esta etapa hasta la etapa g), en las etapas de agitación y de lavado se puede utilizar el Western Processor Bio-Rad (ver el manual para los parámetros).

- c) Eliminar la solución de saturación e incubar la membrana en el anticuerpo primario diluido (ver apartado 5.2.4) durante 30 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) con agitación moderada.

Para 1 membrana se necesitan 15 ml de anticuerpo primario diluido.

- d) Eliminar la solución de anticuerpo primario y aclarar rápidamente la membrana con la solución de lavado 1 y a continuación lavar dos veces durante 5 y 10 minutos respectivamente con agitación rápida.

Para cada ciclo y para 1 membrana se necesitan 50 ml de solución de lavado 1.

- e) Eliminar la solución de lavado 1 e incubar la membrana durante 20 minutos en el anticuerpo secundario diluido (ver apartado 5.2.4) a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) con agitación moderada.

Para 1 membrana se necesitan 20 ml de anticuerpo secundario diluido.

- f) Eliminar la solución de anticuerpo secundario y aclarar rápidamente con la solución de lavado 1 y a continuación lavar durante 5, 10 y 10 minutos respectivamente con agitación rápida.

Para cada ciclo y para 1 membrana se necesitan 50 ml de solución de lavado 1.

- g) Colocar la membrana en 50 ml de la solución de lavado 2 con agitación lenta. h) Dejar escurrir la membrana sosteniéndola encima del papel absorbente y evitando el contacto directo y colocar la membrana en el sobre de plástico.

- i) Añadir el reactivo ECL (ver apartado 5.2.4). Eliminar el exceso de reactivo y las burbujas de aire utilizando papel absorbente. Colocar en el cassette de exposición.

- j) En una cámara oscura, cubrir el sobre con una película y exponer durante 15 minutos. Este tiempo de exposición de la película se puede variar para obtener una señal óptima.
- k) Sumergir la película en la solución de revelado durante 45 segundos (ver apartado 5.2.4). Aclarar en agua destilada. Sumergir la película en el fijador hasta que la película se vuelva totalmente transparente.
- l) Lavar con agua destilada y dejar secar la película.

6 - PROCEDIMIENTO CON EL GEL CRITERION™ XT

6.1 - REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIO

6.1.1 - REACTIVOS Y CONSUMIBLES

Pipetas graduadas (5, 10, 25 ml), tubos cónicos (50 ml), microtubos (2 ml) de polipropileno con tapón.

Película protectora PARAFILM® M.

Purificación de las muestras

Tampón Laemmli	30 ml	Bio-Rad, Ref. 1610737
2-Mercaptoethanol	25 ml	Bio-Rad, Ref. 1610710
SDS	100 g	Bio-Rad, Ref. 1610301
Jeringas de calibración	200	Bio-Rad, Ref. 3551174

Electroforesis

Criterion™ XT 12 % Bis-Tris 1 gel - 18 pocillos		Bio-Rad, Ref. 3450118
XT-MOPS (tampón de electroforesis) (20 x)	500 ml	Bio-Rad, Ref. 1610788
Marcador preteñido Kaleidoscope™	500 µl	Bio-Rad, Ref. 1610375
MagicMark™ XP Western Standard (marcador de peso molecular)	250 µl	Invitrogen, Ref. LC5602

Immunoblotting

Ethanol (Normapur)	1L	VWR, Ref. 20821-296
Tris/CAPS ((tampón de transferencia) (10x)	1L	Bio-Rad, Ref. 1610778
Papel de filtro (papel de transferencia para geles Criterion™ XT)	50 hojas	Bio-Rad, Ref. 1704085
Membrana PVDF (0.2 µm)	10 hojas	Bio-Rad, Ref. 1620175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, Ref. 1706531
PBS (tampón de lavado)(10x)	1 L	Bio-Rad, Ref. 1610780
ECL (sustrato para conjugado)	125 ml	Amersham, Ref. RPN2109

Hyperfilms ECL (18 x 24 cm)	25 películas	Amersham, Ref. RPN2103K
Sobres de revelado	30 sobres	Applied Biosystems, Ref. T2258
Solución de revelado Kodak LX24	csp 20 L	VWR o Kodak
Solución de fijador Kodak AL4	csp20 L	VWR o Kodak

6.1.2 - MATERIAL

Pipetas regulables (10, 40, 200, 1000 µl),
 Probetas graduadas (1 L y 2 L), pinzas de plástico, cubetas, vortex.
 Cassette de exposición con luz roja para el revelado de las películas.

Purificación de las muestras

TeSeE™ Precess 48™	Bio-Rad, Ref. 3590200
TeSeE™ Precess 24™	Bio-Rad, Ref. 3591070
Calefactor de bloque	Bio-Rad, Ref. 3589057
Adaptador para calefactor de bloque - 20 tubos	Bio-Rad, Ref. 3589072
Centrifuga - 220/240 V	Bio-Rad, Ref. 3591396
Rotor tambor	Bio-Rad, Ref. 3589189
Adaptadores para rotor - (x6)	Bio-Rad, Ref. 3589191

ElectroForesis

Cubeta Criterion™ XT	Bio-Rad, Ref. 1656001
Generator PowerPac™ HC: 100/120 V - 220/240 V	Bio-Rad, Ref. 1645052

Transferencia

Criterion™ XT blotter	Bio-Rad, Ref. 1704070
-----------------------	-----------------------

Immunoblotting

Western Processor base	Bio-Rad, Discontinuado
Cubeta Western Processor para geles Criterion™ XT	Bio-Rad, Discontinuado

6.2 - PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

6.2.1 - PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

• **Proteinasa K**

Solución de proteinasa K diluida en reactivo A:

- ▶ 1 ml de reactivo A
- ▶ 20 µl de proteinasa K

Mezclar bien por inversión del tubo hasta obtener una solución homogénea. Tras la reconstitución, la solución diluida de proteinasa K es estable 10 horas si se conserva a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

• **Solución de Laemmli**

Solución de SDS + 2-Mercaptoetanol + Laemmli sample buffer:

- ▶ 0,6 g de SDS
- ▶ 1,5 ml de 2-Mercaptoetanol

Mezclar por inversión del tubo.

- ▶ 28,5 ml de Laemmli sample buffer

La solución se reparte en alícuotas de 4 ml y se conserva a -20°C. Las alícuotas descongeladas pueden volverse a congelar.

Nota: Se recomienda preparar la solución de Laemmli una hora antes de su uso para que el SDS se disuelva completamente.

6.2.2 - ELECTROFORESIS

• **Marcador Kaleidoscope™**

El marcador Kaleidoscope™ se prepara durante la desnaturalización de la muestra antes de la carga en el gel de acrilamida.

Preparar una dilución 1/12 en solución de Laemmli, por ejemplo 10 µl del marcador Kaleidoscope™ + 110 µl de solución de Laemmli.

Consultar en el prospecto del marcador Kaleidoscope™ las condiciones de conservación.

• **Marcador MagicMark™ XP**

El marcador de peso molecular MagicMark™ XP se prepara durante la desnaturalización de la muestra, antes de depositarla sobre el gel de acrilamida.

Preparar una dilución 1/12 en solución de Laemmli, por ejemplo, 10 µl de MagicMark™ XP + 110 µl de solución de Laemmli.

Consultar el manual de instrucciones del MagicMark™ XP sobre las condiciones de conservación.

• **Tampón de migración Criterion™ XT**

Solución de MOPS (1x).

Preparar una dilución 1/20. **Para 1 cubeta se necesita 1 L de tampón diluido:**

- ▶ 950 ml de agua destilada
- ▶ 50 ml de tampón MOPS (20x)

Homogeneizar. Esta solución no se puede guardar.

6.2.3 - TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

• **Tampón de transferencia**

Solución de Tris/CAPS-Etanol 15%. **Para 1 cubeta de transferencia se necesitan unos 2 L.**

- ▶ 750 ml de agua destilada
- ▶ 150 ml de etanol puro
- ▶ 100 ml de Tris/CAPS (10x)

Homogeneizar. Esta solución no se puede guardar.

6.2.4 - INMUNOBLOTTING

• **Solución de lavado 1**

Solución de PBS (1x) + 0,1% Tween® 20. **Para el tratamiento completo de una membrana se necesitan unos 1 L.**

- ▶ 900 ml de agua destilada
- ▶ 100 ml de PBS (10x)
- ▶ 1 ml de Tween® 20

Homogeneizar bien. La solución se puede conservar una noche de +2°C a +8°C.

• **Solución de lavado 2**

Solución de PBS (1x). **Para el tratamiento completo de una membrana se necesitan unos 200 ml.**

- ▶ 900 ml de agua destilada
- ▶ 100 ml de PBS (10x)

La solución se puede conservar una noche a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

• **Solución de saturación**

Durante la etapa de transferencia, diluir la solución de saturación (B1) 1/10 en la solución de lavado 1. **Se necesitan 40 ml de solución de saturación diluida (1x) para 1 membrana.**

- ▶ 36 ml de solución de lavado 1
- ▶ 4 ml de solución de saturación (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

• **Anticuerpo primario diluido**

Justo antes de usar, diluir el anticuerpo primario a 1/10 en la solución de lavado 1. **Para 1 membrana se necesitan 30 ml de anticuerpo primario diluido.**

- ▶ 27 ml de la solución de lavado 1
- ▶ 3 ml de anticuerpo primario (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

• **Anticuerpo secundario diluido (conjugado)**

Justo antes de usar, diluir el anticuerpo secundario a 1/10 en la solución de lavado 1. **Para 1 membrana se necesitan 40 ml de conjugado diluido.**

- ▶ 36 ml de la solución de lavado 1
- ▶ 4 ml de anticuerpo secundario (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

• **ECL**

El sustrato (ECL) se debe preparar justo antes de usar. **Para 1 membrana se necesitan 2 ml de sustrato.**

- ▶ 1 ml de reactivo 1
- ▶ 1 ml de reactivo 2

Homogeneizar la solución.

• **Solución de revelado**

- ▶ 800 ml de agua destilada
- ▶ 200 ml de producto de revelado

La solución se puede conservar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), en cámara oscura, durante un máximo de 15 días.

• **Solución de fijación**

- ▶ 800 ml de agua destilada
- ▶ 200 ml de producto fijador

La solución se puede conservar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), en cámara oscura, durante un máximo de 15 días.

6.3 - PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

El test TeSeE™ WESTERN BLOT se puede utilizar directamente a partir de la misma muestra homogenizada (tubo de trituración) para las pruebas rápidas Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat).

Obtención

Para tejidos periféricos (ganglios linfáticos) inserte una bolita media (Medium Bead, ref.: 3551171) en el tubo de trituración antes de añadir la muestra.

Coja una masa de 350 mg ± 40 mg de tejido nervioso (preferiblemente del área del obex) o 200 mg ± 20 mg de tejido periférico. Depositar la muestra en un tubo de trituración, cerrar herméticamente y realizar la trituración en el homogeneizador (Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 48™ o TeSeE™ PRECESS 24™).

Trituración de la muestra

Colocar los tubos en el homogeneizador.

Efectuar un ciclo de agitación con los siguientes parámetros:

	Ribolyser®		TeSeE™ PRECESS 48™ o TeSeE™ PRECESS 24™	
	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos
Tiempo (seg.)	45	2 x 45 ⁽¹⁾	-	-
Velocidad	6,5	6,5	-	-
Program	-	-	Programa 1	Programa 2

Si la trituración es insuficiente, se pueden efectuar 1 o 2 ciclos de agitación más⁽²⁾.

⁽¹⁾⁽²⁾ Esperar durante 5 minutos entre 2 ciclos de trituración.

Calibración de la muestra

Retirar los tubos de trituración del homogeneizador, resuspender el homogeneizado por inversión antes de abrirlos y aspirar 500 µl con la jeringa de calibración, teniendo cuidado de introducir la aguja por debajo del nivel de las bolas de cerámica para evitar coger fragmentos de tejido. Transferir cada muestra de 500 µl a un microtubo Eppendorf de 2 ml.

Nota: En esta etapa, los tubos de trituración tras la homogeneización y los microtubos tras la calibración de la muestra se pueden conservar cerrados:

- A temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 15 horas.
- De +2°C a +8°C durante 72 horas.
- A -20°C durante 1 año. Las muestras congeladas deben descongelarse a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

Las muestras pueden someterse a un máximo de 3 ciclos de congelación/ descongelación. Las muestras siempre deben homogeneizarse por inversión antes de usar.

Tratamiento con la proteinasa K

Distribuir 500 µl de solución de proteinasa K reconstituida (ver apartado 6.2.1) en cada microtubo.

Homogeneizar los tubos cerrados por inversión (10 veces) e incubar a 37°C ± 2°C en una estufa durante 10 minutos.

Precipitación de la PrP^{res} con el reactivo B

Sacar los tubos del incubador. Abrirlos y distribuir 500 µl de reactivo B en cada tubo. Homogeneizar por inversión hasta obtener un color homogéneo.

Concentración de la PrP^{res} por centrifugación

Centrifugar los tubos durante 7 minutos a 15.000 g a 20°C.

Aclaración de la muestra

Desechar el sobrenadante en un recipiente para residuos. A continuación, secar los tubos dándoles la vuelta sobre papel absorbente durante 5 minutos.

Distribuir 100 µl de solución de Laemmli (ver apartado 6.2.1) en cada microtubo. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

Volver a solubilizar completamente el precipitado por aspiración/ dispensación con una pipeta.

Incubar durante 5 minutos a 100°C ± 5°C en una estufa.

Sacar los tubos del incubador, homogeneizar con el vórtex.

Centrifugar los tubos durante 15 minutos a 15000 g a 20°C.

Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo. Desechar el tubo que contiene el precipitado.

En esta etapa, el sobrenadante se puede conservar congelado a -20°C durante 24 horas; las muestras se deben descongelar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) antes de usar.

6.4 - ELECTROFORESIS

El test TeSeE™ WESTERN BLOT se puede utilizar tanto para la confirmación de muestras sospechosas de infección por EET como para el tipificado de la cepa en las ovejas.

El siguiente procedimiento es aplicable para la confirmación de muestras sospechosas de infección por EET.

En el caso de la aplicación del tipificado, póngase en contacto con su representante de Bio-Rad para solicitar el protocolo de instrucciones.

Preparación del gel

Retirar la tira de plástico de la parte inferior de la placa de plástico e introducir los geles de acrilamida (ver apartado 6.2.2) en la cubeta de migración. Añadir el tampón de migración (ver apartado 6.2.2) en las cubetas a cada lado de los geles hasta por encima de los pocillos y en la cubeta de electroforesis. Retirar con cuidado los peines y aclarar cada pocillo con tampón de migración utilizando una pipeta.

Depósito de las muestras

Calentar las muestras durante 4 minutos a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ justo antes de depositar 15 μl /pocillo.

Depositar 15 μl del marcador Kaleidoscope™ diluido y 15 μl de MagicMark™ XP diluido (ver apartado 6.2.2).

Nota: en el caso en el que se traten varios geles a la vez, depositar los marcadores en diferentes pocillos para facilitar la identificación.

Migración diferencial de las muestras

Realizar la migración a temperatura ambiente ($+18^{\circ}\text{C}$ a $+30^{\circ}\text{C}$) durante 50 minutos a 200 V.

6.5 - TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS

El tampón de transferencia debe prepararse antes de que finalice la migración de las muestras (ver apartado 6.2.3).

Preparación de la transferencia de las proteínas

Cortar la membrana con las mismas dimensiones del gel. La membrana siempre se debe manipular con pinzas.

Sumergir la membrana en etanol puro durante 15 segundos, aclarar en agua destilada durante 5 minutos, y posteriormente en el tampón de transferencia durante 10 minutos.

Separar con cuidado el gel de las placas plástico y dejar que se equilibre durante 10 minutos en el tampón de transferencia.

Preparación del sandwich

Empapar los papeles de filtro y las almohadillas de fibras en el tampón de transferencia. Abrir el cassette de transferencia, con el lado rojo a la izquierda. Colocar sobre el lado rojo, siguiendo este orden, una almohadilla de fibras, un papel de filtro, la membrana* y el gel*.

Completar con un papel de filtro y una almohadilla de fibras y cerrar el cassette. Sumergir el cassette en la cubeta de transferencia, previamente llena con el

tampón de transferencia hasta el límite indicado. Añadir hielo antes de llenar la cubeta.

* Eliminar las posibles burbujas de aire que se hayan formado.

Nota: en el caso de que se traten varias membranas a la vez, identificar cada membrana marcando en una esquina.

Transferencia sobre la membrana PVDF

Transferir durante 60 minutos a 115 V, sobre agitación (barra magnética).

6.6 - INMUNOBLOTTING

a) Al finalizar la transferencia de las proteínas, abrir el cassette y sacar la membrana para revelarla. Sumergir rápidamente la membrana en la solución de lavado 2 (ver apartado 6.2.4) y posteriormente ponerla en etanol durante 10 segundos antes de aclarar durante 5 minutos en agua destilada.

Nota: En este paso, la membrana se puede conservar durante la noche en agua destilada en +2°C a +8°C. Deje la membrana ajustar a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) antes de comenzar inmunoblotting.

b) Eliminar el agua destilada e incubar la membrana durante 30 minutos en la solución de saturación (ver apartado 6.2.4). Incubar con agitación moderada.

Para 1 membrana se necesitan 40 ml de solución de saturación.

Nota: desde esta etapa hasta la etapa g), en las etapas de agitación y de lavado se puede utilizar el Western Processor Bio-Rad (ver el manual para los parámetros).

c) Eliminar la solución de saturación e incubar la membrana en el

anticuerpo primario diluido (ver apartado 6.2.4) durante 30 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) con agitación moderada.

Para 1 membrana se necesitan 30 ml de anticuerpo primario diluido.

- d) Eliminar la solución de anticuerpo primario y aclarar rápidamente la membrana con la solución de lavado 1 y a continuación lavar dos veces durante 5 y 10 minutos respectivamente con agitación rápida.

Para cada ciclo y para 1 membrana se necesitan 100 ml de solución de lavado 1.

- e) Eliminar la solución de lavado 1 e incubar la membrana durante 20 minutos en el **anticuerpo secundario** diluido (ver apartado 6.2.4) a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) con agitación moderada.

Para 1 membrana se necesitan 40 ml de anticuerpo secundario diluido.

- f) Eliminar la solución de anticuerpo secundario y aclarar rápidamente con la solución de lavado 1 y a continuación lavar durante 5, 10 y 10 minutos respectivamente con agitación rápida.

Para cada ciclo y para 1 membrana se necesitan 100 ml de solución de lavado 1.

- g) Colocar la membrana en 100 ml de la solución de lavado 2 con agitación lenta. h) Dejar escurrir la membrana sosteniéndola encima del papel absorbente y evitando el contacto directo y colocar la membrana en el sobre de plástico.

- i) Añadir el reactivo ECL (ver apartado 6.2.4). Eliminar el exceso de reactivo y las burbujas de aire utilizando papel absorbente. Colocar en el cassette de exposición.

- j) En una cámara oscura, cubrir el sobre con una película y exponer durante 15 minutos. Este tiempo de exposición de la película se puede variar para obtener una señal óptima.

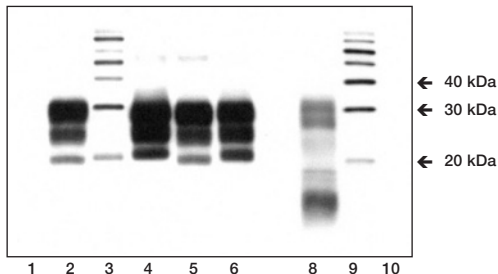
- k) Sumergir la película en la solución de revelado durante 45 segundos (ver apartado 6.2.4). Aclarar en agua destilada. Sumergir la película en el fijador hasta que la película se vuelva totalmente transparente.

- l) Lavar con agua destilada y dejar secar la película.

7 - INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La Figura 1 muestra los patrones de banda esperados para la muestra negativa, muestras positivas para EET, en varias especies animales y control de peso molecular (posiciones 3 y 9).

Figure 1



Las muestras negativas (posiciones 1 y 10) se trataron con proteínasa K. Éstas no mostraron ninguna señal puesto que la PrP^c había sido digerida totalmente.

Las muestras positivas también se trataron con proteínasa K.

La muestra bovina positiva para la EEB (posición 2), **la muestra positiva para el scrapie clásica** (posición 6) y **la muestra positiva para el EDC** (posición 4) mostraron el patrón típico de 3 bandas, lo que demuestra la digestión de la PrP^c y la transformación de la proteína priónica específica de la enfermedad en un fragmento central resistente a la proteínasa con una menor masa molecular tras la eliminación de la parte N terminal de la proteína. Las dos bandas superiores corresponden a las formas mono y diglicosiladas (27-30 kDa), mientras que la banda inferior corresponde a la forma no glicosilada.

La muestra de ovino infectado experimentalmente con EEB

(posición 5) presenta una señal superior en la banda diglicosilada que en la banda monoglicosilada. No obstante, este perfil de glicosilación típico no se puede considerar como prueba suficiente de la infección del animal con EEB. Conforme a las recomendaciones del Laboratorio de Referencia de la Comunidad Europea (CRL), en este tipo de muestra deberá realizarse un ensayo de diferenciación para discernir entre scrapie y EEB. Para más informaciones sobre el test de diferenciación puede contactar Bio-Rad.

La muestra infectado por scrapie atípico (ex. Nor98)

(posición 8) presenta un perfil de glicosilación atípico. A aproximadamente 12 kDa se observa una banda más baja, mientras que las otras bandas superiores no están localizadas en las mismas posiciones equivalentes a las de los casos “típicos” de scrapie. La señal también es más fuerte en la banda más inferior que en la banda superior.

La lectura del gel deberá interpretarse con cautela puesto que una muestra fuertemente positiva detectada con el test TeSeE™ WESTERN BLOT puede ocultar la muestra negativa más próxima o una muestra positiva baja.

Límites de la prueba:

Un resultado negativo implica que la muestra ensayada no contiene una cantidad medible de PrP^{res} con el método TeSeE™ WESTERN BLOT. No obstante, como no puede detectarse la presencia de muy bajas cantidades de PrP^{res}, un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección.

Cualquier muestra interpretada negativamente según de los criterios d'interpretación de la prueba TeSeE™ WESTERN BLOT, y que se volvió anteriormente positivo répétable por una prueba de detección rápida, tendrá que ser probado con uno de los otros métodos de confirmación certificada por l' OIE como la Immuno-Histo Química (IHC) o el método SAF-Immunoblot.

Todas las muestras con un resultado positivo reproducible según los criterios de interpretación de la prueba deben verificarse en conformidad con las disposiciones legales en vigor.

8 - PRECAUCIONES

La calidad de los resultados depende del cumplimiento de las siguientes buenas prácticas de laboratorio:

- Conservar los reactivos a la temperatura adecuada (ver las indicaciones de los fabricantes).
- No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad.
- La solución de proteinasa K reconstituida y conservada a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) debe utilizarse en un plazo de 10 horas.
- No mezclar ni combinar reactivos procedentes de diferentes lotes de TeSeE™ WESTERN BLOT durante el proceso, con la excepción de tubos de trituración, reactivo A, reactivo B y proteinasa K.
- Antes de la utilización, esperar 30 minutos para que los reactivos y los tampones se estabilicen a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).
- Reconstituir cuidadosamente los reactivos evitando toda contaminación.
- No realizar la prueba en presencia de reactivos que produzcan vapores (ácidos, alcalinos, aldehídos) o polvos que puedan alterar la actividad enzimática del conjugado.
- La reacción enzimática es muy sensible a todos los metales o iones metálicos. Por tanto, ningún elemento metálico debe entrar en contacto con el conjugado.
- Utilizar únicamente tubos de polipropileno.
- Utilizar preferentemente material de uso único. En su defecto, utilizar una cristalería perfectamente lavada y enjuagada con agua destilada.
- Utilizar una punta de pipeta desechable para cada muestra.
- Antes de empezar la electroforesis y la transferencia, comprobar que los 2 electrodos están en contacto con el tampón.
- Deben respetarse escrupulosamente todos los tiempos de aclarado para evitar un ruido de fondo excesivo durante la tinción final con el reactivo ECL.

9 - RECOMENDACIONES DE HIGIENE Y SEGURIDAD

De manera general, las condiciones de higiene, las medidas de seguridad biológica y las buenas prácticas de laboratorio deben cumplir las recomendaciones de las autoridades reglamentarias nacionales.

- Todos los reactivos del kit están destinados para uso exclusivo de diagnóstico "*in vitro*".
- Utilizar guantes de un solo uso durante la manipulación de los reactivos y de las muestras y lavar cuidadosamente las manos tras la manipulación.

- No pipetear con la boca.
- Utilizar recipientes de polipropileno para evitar vidrios rotos.
- Considerar el material directamente en contacto con las muestras y las soluciones de lavado, como productos contaminados.
- Evitar las salpicaduras de muestras o de soluciones que las contengan.
- Limpiar las superficies manchadas con una solución de 20.000 p.p.m. de hipoclorito de sodio (lejía). Si el líquido contaminante es un ácido, neutralizar previamente las superficies manchadas con hidróxido de sodio (sosa), y después limpiar con lejía. Las superficies deben aclararse con agua destilada, secarse con etanol y papel absorbente. El material utilizado para la limpieza deberá ser desechado en un contenedor especial para residuos contaminados.
- Eliminar las muestras así como el material y los productos contaminados después de su descontaminación:
 - ya sea sumergiéndolos en una solución de hidróxido de sodio 1 M (concentración final) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente (+18°C a +30°C),
 - ya sea sumergiéndolos en una solución de 20.000 p.p.m. de hipoclorito de sodio durante al menos 1 hora a temperatura ambiente (+18°C a +30°C),
 - o bien por calentamiento en autoclave a 134°C mínimo durante al menos 18 minutos, con una presión de 3 bares.

Atención: no introducir en el autoclave soluciones que contengan lejía o el reactivo B.

- Todas las operaciones referentes a la realización de los tests de despistaje de una encefalopatía espongiforme transmisible (EST) son objeto de una reglamentación y deben efectuarse en un laboratorio aislado, reservado exclusivamente a este fin y, por tanto, con un acceso limitado y controlado.
El operador debe utilizar una bata cerrada, protector de calzado, guantes y una máscara con visera o una mascarilla simple con gafas de seguridad.
- Los operadores deben recibir una formación específica sobre los riesgos que conllevan los agentes de las EETs o priones y sobre los modos de descontaminación validados para los agentes infecciosos “no convencionales”.
Las medidas de seguridad biológica deben estar en conformidad con las recomendaciones de las autoridades reglamentarias nacionales.

- Antes de su eliminación, neutralizar y/o autoclavar todas las soluciones de lavado, el agua de lavado y cualquier líquido que contenga muestras biológicas.
- Para más información acerca de las recomendaciones relacionadas con algunos componentes químicos de este kit de prueba, consultar los pictograma(s) de las etiquetas y la información proporcionada al final de las instrucciones de uso. Podrá consultar la Hoja de datos de seguridad de materiales en www.bio-rad.com.

10 - BIBLIOGRAFÍA

1. S.B. PRUSINER (1991)
Molecular biology of prion diseases - *Science* 252:1515-1522.
2. J.B. KATZ, J.G. PEDERSEN, A.L. JENNY and W.D. TAYLOR (1992)
Assessment of Western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE) - *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, 4, 447-449.
3. G.A.H. WELLS, Y.I. SPENCER and M. HARITANI (1994)
Configuration and topographic distribution of PrP in the central nervous system in bovine spongiform encephalopathy: an immunohistochemical study. In: *Slow Infections of the Central Nervous System*, J. BJORNSSON, R.I. CARP, A. LOVE and M. WISNIEWSKI - Eds The New York Academy of Sciences, pp 350-352.
4. J.P. DESLYS, E. COMOY, S. HAWKINS, S. SIMON, H. SCHIMMEL, G. WELLS, J. GRASSI and J. MOYNAGH (2001)
Screening slaughtered cattle for BSE - *Nature*: 409; 476-477.
5. S. BENESTAD, P. SARRADIN, B. THU, J. SCHÖNHEIT, M. TRANULIS and B. BRATBERG (2003)
Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of new type, Nor98. *Veterinary Record* 153, 202-208.
6. A. BUSCHMANN, G. LÜHKEN, J. SCHULTZ, G. ERHARDT and M.-H. GROSCHUP (2004)
Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *Journal of General Virology* 85, 2727-2733.

7. L. ORGE, A.GALO, C.MACHADO, C. LIMA, C. OCHOA, J. SILVA, M. RAMOS and J.-P. SIMAS (2004)
Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *Journal of General Virology* 85, 3487-3491.
8. A. BUSCHMANN, A.-G. BIACABE, U. ZIEGLER, A. BENCSIK, J.-Y. MADEC, G. ERHARDT, G. LÜHKEN, T. BARON and M.-H. GROSCHUP (2004)
Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *Journal of Virological Methods* 117, 27-36.
9. H. DE BOSSCHERE, S. ROELS, S. BENESTAD, E. VANOPDENBOSCH (2004). Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Veterinary Record* 155, 707-708.
10. H. ONNASCH, H. M. GUNN, B.J. BRADSHAW, S. BENESTAD, H.F. BASSETT (2004). Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Veterinary Record* 155, 636-637.
11. S. BENESTAD, P. SARRADIN, J.-M. BILHEUDE, J. GRASSI , H. LAUDE, O. ANDREOLETTI, T. MOLDAL and B. BRATBERG. Are there gold standard methods for the diagnosis of TSE ? Nor98 scrapie cases: atypical cases and their challenging diagnosis. Second International Chronic Wasting Disease Symposium, Madison - Wisconsin, USA.
12. BIACABE, A-G., LAPLANCHE, J-L., RYDER,S. AND BARON, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases, *EMBO Reports* 5, 110-114.
13. CASALONE, C., ZANUSSO, G., ACUTIS, P., FERRARI, S., CAPUCCI, I., TAGLIAVINI, F., MONACO, S. and CARAMELLI, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *PNAS* 101, 3065-70.

14. BUSCHMANN A; GRETZSCHEL A; BIACABE A-G; SCHIEBEL K; CORONA C; HOFFMANN C; EIDEN M; BARON T; CASALONE C; GROSCHUP M H (2006).
Atypical BSE in Germany-proof of transmissibility and biochemical characterization. *Veterinary microbiology* 2006;117(2-4):103-16.
15. ARSAC, J.-N., ANDREOLETTI, O., BILHEUDE, J.-M., LACROUX, C., BENESTAD, S. L., AND BAARON, T. (2007). Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerging Infectious Diseases* 13(1), 58-65.
16. E. URO-COSTE, H CASSARD, S. SIMON, S. LUGAN, J.-M. BILHEUDE, A. PERRETLIAUDET, J.-W. IRONSIDE, S. HAIK, C. BASSET-LEOBON, C. LACROUX, K. PEOCH, N. STREICHENBERGER, J. LANGEVELD, M.-W. HEAD, J. GRASSI, J.-J. HAUW, F. SCHELCHER, M.-B. DELISLE, O. ANDREOLETTI (2008) Beyond PrP^{res} Type 1/Type 2 Dichotomy in Creutzfeldt-Jakob disease. *Plos Pathogens* volume 4, issue 2, e1000029.

- (BG)** • Този продукт съдържа човешки или животински компоненти. Бъдете внимателни при работа с него.
- (CN)** • 本产品包含人/动物成分，请小心处理。
- (CN) Traditional** • 本产品包含人/动物成分，请小心处理。
- (CZ)** • Tento výrobek obsahuje lidské nebo zvířecí komponenty. Zacházejte s ním opatrně.
- (DE)** • Dieses Produkt enthält Bestandteile menschlichen oder tierischen Ursprungs. Vorsichtig handhaben.
- (DK)** • Dette produkt indeholder humane og animalske komponenter. Skal behandles med forsigtighed.
- (EE)** • Käesolev toode sisaldab inim-või loomseid komponente. Käsitseta ettevaatlikult.
- (EN)** • This product contains human or animal components. Handle with care.
- (ES)** • Este producto contiene componentes humanos o animales. Manejar con cuidado.
- (FI)** • Tässä tuotteessa on ihmisestä tai eläimistä peräisin olevia osia. Käsittele varovasti.
- (FR)** • Ce produit contient des composants d'origine humaine ou animale. Manipuler avec précaution.
- (GR)** • Αυτό το προϊόν περιέχει ανθρώπινα ή ζωικά στοιχεία. Χειριστείτε το με προσοχή.
- (HR)** • Ovaj proizvod sadrži ljudske ili životinjske sastojke. Pažljivo rukovati.
- (HU)** • A készítmény emberi vagy állati eredetű összetevőket tartalmaz. Óvatosan kezelendő.
- (IT)** • Questo prodotto contiene componenti umane o animali. Maneggiare con cura.
- (JP)** • 本製品にはヒトまたは動物由来の構成成分が含まれます。取り扱いにご注意下さい。
- (KR)** • 본 제품은 사람 또는 동물유래의 성분이 포함되어 있습니다. 취급에 주의하시기 바랍니다.
- (LT)** • Šiame produkte yra žmogiškosios arba gyvūninės kilmės sudėtinųjų dalių. Elgtis atsargiai.
- (MT)** • Dan il-prodott fih komponenti umani jew tal-animali. Uża b'attenzjoni.
- (NL)** • Dit product bevat menselijke of dierlijke bestanddelen. Breekbaar.
- (NO)** • Dette produktet inneholder humane eller animalske komponenter. Håndteres med forsiktighet.
- (PL)** • Niniejszy produkt zawiera składniki pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego. Należy obchodzić się z nim ostrożnie.
- (PT)** • Este medicamento contém componentes de origem humana ou animal. Manuseie com cuidado.
- (RO)** • Acest produs conține materiale de origine umană sau animală. Manevați-l cu grijă.
- (SE)** • Denna produkt innehåller beståndsdelar från människa eller djur. Hantera produkten varsamt.
- (SI)** • Izdelek vsebuje človeške ali živalske sestavine. Rokujte previdno.
- (SK)** • Tento výrobok obsahuje ľudské alebo zvieracie zložky. Narábajte s ním opatrne.



隱型眼鏡。繼續沖洗。如皮膚沾染：用大量肥皂和水清洗。避免釋放到環境中。按照本地/地區/國家/國際規例處理內含物/容器。

H226 - H318 - H315 - H334 - H412
P210 - P261 - P280
P305+P351+P338
P302+P352 - P273 - P501

(BG)

опасно

Запалими течност и пари. Предизвиква сериозно увреждане на очите. Предизвиква дразнене на кожата. Може да причини алергични или астматични симптоми или затруднения в дишането при вдишване. Вреден за водните организми, с дълготраен ефект.

Да се пази от топлина. Тютюнопушенето забранено. Избягвайте вдишване на прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължавайте да промивате. ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно със сапун и вода. Да се избягва изпускане в околната среда. Изхвърлете съдържанието/контейнера в съответствие с местните/регионалните/националните/международните разпоредби.

(CN)

危險

易燃液体和蒸气。引起严重的眼睛损伤。

引起皮肤刺激

吸入可能引起过敏或哮喘症状或呼吸困难。对水生生物有害并且有长期持续影响。远离热源/火花/明火/热表面。禁止吸烟。避免吸入粉尘/烟/气体/烟雾/蒸气/喷雾。戴防护手套/穿防护服/戴防护眼罩/戴防护面具。如进入眼睛：用水小心冲洗几分钟。如戴隐形眼镜并可方便地取出，取出隐形眼镜。继续冲洗。如皮肤沾染：用大量肥皂和水清洗。避免释放到环境中。按照本地/地区/国家/国际规例处理内含物/容器。

(CN) Traditional

危險

易燃液體和蒸氣。引起嚴重的眼睛損傷。

引起皮膚刺激。吸入可能引起過敏或哮喘症狀或呼吸困難。對水生生物有害並且有長期持續影響。遠離熱源/火花/明火/熱表面。禁止吸煙。避免吸入粉塵/煙/氣體/煙霧/蒸氣/噴霧。戴防護手套/穿防護服/戴防護眼罩/戴防護面具。如進入眼睛：用水小心沖洗幾分鐘。如戴隱型眼鏡並可方便地取出，取出

(CZ)

Nebezpečí

Hořlavá kapalina a páry. Způsobuje vážné poškození očí. Dráždí kůži. Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže. Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.

Chraňte před teplem/jiskrami/otevřeným plamenem/horkými povrchy. Zákaz kouření. Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů. Použijte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyměňte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vylučování. PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla. Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Obsah/nádobu likvidujte v souladu s místními/regionálními/národními/mezinárodními předpisy.

(DE)

Gefahr

Flüssigkeit und Dampf entzündbar. Verursacht schwere Augenschäden. Verursacht Hautreizungen. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Entsorgung des Inhalts / des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen / internationalen Vorschriften.

(DK)

Fare

Brandfarlig væske og damp. Forårsager alvorlig øjenskade. Forårsager hudirritation. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger. Holdes væk fra varme/gnister/åben ild/varme overflader. Rygning forbudt. Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenskyttelse/ansigtsskyttelse VED KONTAKT MED ØJENENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skyllning. VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt sæbe og vand. Undgå udledning til miljøet. Bortskaffelse af indholdet/beholderen i henhold til de lokale/regionale/nationale/internationale forskrifter.

(EE)

Ettevaatus

Tuleohhtlik vedelik ja aur. Põhjustab raskeid silmakahjustusi. Põhjustab nahaärritust. Sissehingamisel võib põhjustada allergia- või astma sümptomeid või hingamisraskusi. Ohtlik veorganismidele, pikaajaline toime.

Hoida eemal soojusallikast/sädemetest/leekidest/kuumadest pindadest. Mitte suitsetada. Vältida tolmu/suitsu/gaasi/udu/auru/pihustatud aine sissehingamist. Kanda kaitsekindaid/kaitseõivastust/kaitseprille/kaitsemaski. SILMA SATTUMISE KORRAL: loputada mitme minuti jooksul ettevaatlikult veega. Eemaldada kontaktläätsed, kui neid kasutatakse ja kui neid on kerge eemaldada. Loputada veel kord. NAHALE SATTUMISE KORRAL: pesta rohke vee ja seebiga. Vältida sattumist keskkonda. Sisukonteineri käitus vastavuses kohalike/regionaalsete/rahvuslike/rahvusvaheliste nõuetega.

(EN)

Danger

Flammable liquid and vapour. Causes serious eye damage. Causes skin irritation. May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled. Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. No smoking. Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. Avoid release to the environment. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

(ES)

Peligro

Líquidos y vapores inflamables. Provoca lesiones oculares graves. Provoca irritación cutánea. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Mantener alejado de fuentes de calor/chispas/llama abierta/superficies calientes. No fumar. Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. Llevar guantes que aislen del frío/gafas/máscara. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. Evitar su liberación al medio ambiente. Eliminar el contenido o el recipiente conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional.

(FI)

Vaara

Syttynyt neste ja höyry. Vaurioittaa vakavasti silmiä. Ärsyttää ihoa. Voi aiheuttaa hengitettynä allergiatai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Haitallista vesielioille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. Suojaa lämmöltä/kipinöiltä/avotulelta/kuumilta pinoilta. Tupakointi kielletty. Vältä pölyn/savun/kaasun/sunun/höyryn/suihkeen hengittämistä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvosuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhdo huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, _edical voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista. JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE: Pese runsaalla vedellä ja saippualla. Vältettävä päästämistä ympäristöön. Säilytä säiliö(t) noudattaen paikallisia/alueellisia/kansallisia/kansainvälisiä määräyksiä.

(FR)

Danger

Liquide et vapeurs inflammables. Provoque des lésions oculaires graves. Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon. Éviter le rejet dans l'environnement. Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

(GR)

Κίνδυνος

Υγρό και ατμού εύφλεκτα. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής. Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις. Μακριά από θερμότητα/σπινθήρες/γυμνές φλόγες/θερμές επιφάνειες. Μην καπνίζετε. Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνευρώματα. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για ταμάτι/πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό και σαπούνι. Να αποφεύγετε τη λευθέρωση στο περιβάλλον. Απορρίψτε τα περιεχόμενα/δοχείο σύμφωνα με τους τοπικούς/εθνικούς/διεθνείς κανονισμούς.

(HR)**Opasnost**

Zapaljiva tekućina i para. Uzrokuje teške ozljede oka. Nadražuje kožu. Ako se udiše može izazvati simptome alergije ili astme ili poteškoće s disanjem. Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. Čuvati odvojeno od topline/iskrre/otvorenog plamena/vrućih površina. – Ne pušiti. Izbjegavati udisanje prašine/dima/plina/magle/pare/aerosola. Nositi zaštitne rukavice/zaštitnu odjelelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ukoliko ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. U SLUČAJU DODIRA S KOŽOM: oprati velikom količinom sapuna i vode. Izbjegavati ispuštanje u okoliš. Odložite sadržaje /spremnike u skladu s lokalnim/regionalnim/nacionalni/međunarodnim odredbama.

(HU)**Veszély**

Tűzveszélyes folyadék és gőz. Súlyos szemkárosodást okoz. Bőrirritáló hatással. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Ártalmas a vízi élővilágra, hosszán tartó károsodást okoz. Hőtől/szikkától/nyílt lángtól/forró felületektől távol tartandó. Tilos a dohányzás. Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő szappanos vízzel. Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását. Az edény tartalmát / a tartályt a helyi/regionális/nemzeti/nemzetközi szabályozásoknak megfelelően kell hulladékként elhelyezni.

(IT)**Pericolo**

Liquido e vapori infiammabili. Provoca gravi lesioni oculari. Provoca irritazione cutanea. Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Tenere lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici riscaldate. Non fumare. Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone. Non disperdere nell'ambiente. Smaltire il prodotto/recipiente in conformità con le disposizioni locali / regionali / nazionali / internazionali.

(JP)**危険**

引火性液体及び蒸気。重篤な眼の損傷。皮膚刺激。吸入するとアレルギー、ぜん（喘）息又は呼吸困難を起こすおそれ。長期継続の影響によって水生生物に有害。熱 / 火花 / 裸火 / 高温のもののような着火源から遠ざけること。-禁煙。粉じん/煙/ガス/ミスト/蒸気/スプレアの吸入を避けること。保護手袋/保護衣/保護眼鏡/顔保護面の着用。眼に入った場合: 水で数分間注意深く洗うこと。次にコンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は外すこと。その後も洗浄を続けること。皮膚に付着した場合: 多量の水と石けん(鹸)で洗うこと。環境への放出を避けること。現地/地域/国/国際規定に従い内容物・容器の露出。

(KR)**위험**

인화성 액체 및 증기. 눈에 심한 손상을 일으킴. 피부에 자극을 일으킴. 흡입시 알레르기성 반응, 천식 또는 호흡 곤란을 일으킬 수 있음. 장기적인 영향에 의해 수생생물에게 유해함. 열·스파크·화염·고열로부터 멀리하십시오 - 금연. (분진·흙·가스·미스트·증기·스프레이)의 흡입을 피하십시오. (보호장갑·보호의·보안경·안면보호구)를(을) 착용하십시오. 눈에 물이면 몇 분간 물로 조심해서 씻으십시오. 가능하면 콘택트렌즈를 제거하십시오. 계속 씻으십시오. 피부에 묻으면 다량의 비누와 물로 씻으십시오. 환경으로 배출하지 마십시오. 현지/지역/국가/국제규정에 따라서 내용물/용기 노출.

(LT)**Pavojinga**

Degūs skystis ir garai. Smarkiai pažeidžia akis. Dirgina odą. Įkvėpus gali sukelti alerginę reakciją, astmos simptomus arba apsunskinti kvėpavimą. Kenksminga vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus. Laikyti atokiau nuo šilumos šaltinių/žiežirbų/atviros liepsnos/karštų paviršių. Nerūkyti. Stengtis neįkvėpti dulkių/dūmų/dujų/rūko/garų/aerozolio. Mūvėti apsaugines pirštines/dėvėti apsauginius drabužius/naudoti akių (veido) apsaugos priemones. PATEKUS Į AKIS: Kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. PATEKUS ANT ODOS: Nuplauti dideliu kiekiu muilo ir vandens. Saugoti, kad nepatektų į aplinką. Turinį/talpa išplinti (išmesti) - šalinti pagal vietines / regionines / nacionalines / tarptautines taisykles.

(NL)**Gevaar**

Ontvlambare vloeistof en damp. Veroorzaakt ernstig oogletsel. Veroorzaakt huidirritatie. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Schadelijk voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen. Verwijderd houden van warmte/vonken/open vuur/hete oppervlakken. Niet roken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitsnevel vermijden. Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming

dragen. BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen. BIJ CONTACT MET DE HUID: met veel water en zeep wassen. Voorkom lozing in het milieu. De inhoud en de verpakking verwerken volgens de plaatselijke/regionale/nationale/internationale voorschriften.

(NO)

Fare

Brandbar væske og damp. Forårsaker alvorlige øyeskader. Irriterer huden. Kan forårsake allergi, astmalignende symptomer eller pusteproblemer ved innånding. Skadelig for vannlevende organismer, langtidsvirkning. Holdes adskilt fra varme. Ikke røyk. Unngå innånding av støv/røyk/gass/sprayetåke/damp/aerosol. Bruk vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. VED KONTAKT MED ØYNE: Skyll forsiktig med vann i opptil flere minutter. Fjern evt. kontaktlinser såfremt dette er lett mulig. Fortsett skyllingen. VED HUDKONTAKT: Vask med store mengder vann og såpe. Unngå utslipp til miljøet. Innholdet / emballasjen skal avhendes i henhold til de lokale / regionale / nasjonale / internasjonale forskrifter.

(PL)

Niebezpieczeństwo

Łatwopalna ciecz i pary. Powoduje poważne uszkodzenie oczu. Działa drażniąco na skórę. Moze powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. Przechowywać z dala od źródeł ciepła/iskrzenia/otwartego ognia/gorących powierzchni. Palenie wzbronione. Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody z mydłem. Unikać uwolnienia do środowiska. Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z przepisami miejscowymi / regionalnymi / narodowymi / międzynarodowymi.

(PT)

Perigo

Líquido e vapor inflamáveis. Provoca lesões oculares graves. Provoca irritação cutânea. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Manter afastado do calor/da fumaça/da chama aberta/das superfícies quentes. Não fumar. Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.

SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. Evitar a libertação para o ambiente. Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com a legislação local/regional/nacional/internacional.

(RO)

Pericol

Lichid și vapori inflamabili. Provoacă leziuni oculare grave. Provoacă iritarea pielii. Poate provoca simptome de alergie sau astm sau dificultăți de respirație în caz de inhalare. Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung. A se păstra departe de surse de căldură/scântei/flăcări deschise/suprafețe încinse. Fumatul interzis. Evitați să inspirați în praful/fumul/gazul/cea a/vaporii/spray-ul. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/ chipament de protecție a feței. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCII: clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: spălați cu multă apă și săpun. Evitați dispersarea în mediu. Aruncați conținutul/containerul în acord cu regulamentele locale/regionale/naționale/internationale.

(SE)

Fara

Brandfarlig vätska och ånga. Orsakar allvarliga ögonskador. Irriterar huden. Kan orsaka allergi eller astmasymtom eller andningssvårigheter vid inandning. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Får inte utsättas för värme/gnistor/öppen låga/heta ytor. Rökning förbjuden. Undvik att inandas damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten. Undvik utsläpp till miljön. Innehållet / behållaren avfallshanteras enligt lokala / regionala / nationella / internationella föreskrifter.

(SI)

Nevarno

Vnetljiva tekočina in hlapl. Povzročča hude poškodbe oči. Povzročča draženje kože. Lahko povzroči simptome alergije ali astme ali težave z dihanjem pri vdihavanju. Škodljivo za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki. Hraniti ločeno od vročine/isker/odprtega ognja/vročih površin. Kajenje prepovedano. Ne vdihavati prahu/dima/plina/meglíce/hlapov/razpršila. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščitno za oči/zaščitno za obraz. PRI STIKU Z OČMI: previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. PRI STIKU S KOŽO: umiti z veliko mila in vode. Preprečiti sproščanje v okolje. Vsebino/vsebnik odstranite v skladu z lokalnimi/regionalnimi/narodnimi/mednarodnimi predpisi.

(SK)

Nebezpečenstvo

Horľavá kvapalina a pary. Spôsobuje vážne poškodenie očí. Dráždi kožu. Pri vdýchnutí môže vyvolať alergiu alebo príznaky astmy, alebo dýchacie ťažkosti. Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami. Uchovávajte mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite. Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. PO ZASIAHNUTÍ

OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom vody a mydla. Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia. Zneškodnenie obsahu/obalu v súlade s miestnymi/oblastnými/národnými/medzinárodnými nariadeniami.

Purchase of Criterion XT Bis-Tris gels and XT MOPS running buffer is accompanied by a limited license under U.S. Patent Numbers 6,143,154; 6,096,182; 6,059,948; 5,578,180; 5,922,185; 6,162,338; and 6,783,651, and corresponding foreign patents.

ECL is a trademark of GE Healthcare. Eppendorf is a trademark of Eppendorf AG. Kodak is a trademark of Eastman Kodak Company.

Bio-Rad

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

Tel.: +33 (0)1 47 95 60 00

Fax: +33 (0)1 47 41 91 33

www.bio-rad.com



2018/06
16005959