

Prionics®-Check WESTERN

Test pour la détection *in vitro* de PrP^{Sc} liée aux EST

Au sein de l'Union Européenne, ce test est approuvé comme test rapide pour le programme de test de l'ESB chez les bovins mis en place conformément au Règlement (CE) No 999/2001

Kit pour 100 échantillons (analyses en double)
©Prionics AG

Version 12.0_f

Notice

Uniquement pour utilisation *in-vitro* en diagnostic vétérinaire
Conservation à 5±3°C
Produit No.: 12000

Les producteurs de tests rapides d'EST doivent avoir mis en place un système d'assurance qualité, reconnu par le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (EURL), qui garantit que les performances du test ne varient pas. Des modifications concernant les outils d'échantillonnage ainsi que du test rapide lui-même ou du protocole du test (y compris l'échantillonnage) peuvent seulement être apportées après notification préalable au Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (EURL) et ne seront accordées qu'à condition que l'EURL ait constaté que les modifications ne réduisent pas la sensibilité, la spécificité ou la fiabilité du test rapide. Après accord de l'EURL, les détails de la modification doivent être communiqués à la Commission et aux Laboratoires Nationaux de Référence de l'Union Européenne.

Introduction

Divers tissus d'un animal infecté par les prions contiennent une variante pathologique, spécifique de la maladie, de la protéine prion normale (PrP). La protéine prion modifiée est appelée PrP^{Sc}. L'isoforme normale de la PrP est appelée PrP^C (forme cellulaire de la PrP).

La PrP^{Sc} se distingue de la PrP^C normale par sa résistance aux protéases. Lors d'un traitement à la protéinase K, la PrP^C est dégradée, tandis que la PrP^{Sc} voit sa taille diminuer de 32 – 35 kD à 27 – 30 kD. Le fragment PrP^{Sc} résistant aux protéases est appelé PrP27 – 30.

Le test Prionics®-Check WESTERN doit sa précision et sa fiabilité élevées au fait qu'il vérifie trois paramètres importants: résistance aux protéases, patron de glycosylation et poids moléculaire plus bas du fragment PrP^{Sc} résistant aux protéases (27-30 kD) par rapport à la PrP normale non digérée.

Les propriétés uniques des solutions tampons utilisées dans le Prionics®-Check WESTERN et la haute affinité de l'anticorps permettent d'effectuer le test directement sur des homogénats de tissu et d'associer la fiabilité du Western blot à la rapidité requise pour un dépistage sur un grand nombre d'échantillons.

Le test Prionics®-Check WESTERN fut le premier kit de détection de l'ESB approuvé par les autorités suisses en 1998. En 1999, il fut officiellement validé par l'UE comme le seul test à démontrer 100% de sensibilité et 100% de spécificité sans répétition. Dans l'étude réalisée par le CRL (Laboratoire Central de Référence) en 2009 et portant sur la sensibilité analytique, il a été conclu que Prionics®-Check WESTERN avait une performance 100 fois supérieure au système de test le plus sensible.

Les données de validation de ce kit ont été certifiées par l'OIE, basée sur la révision d'experts, pour les objectifs suivants:

Prêt pour le diagnostic post-mortem de l'encéphalopathie spongiforme chez les bovins et pour les objectifs suivants:

1. Pour confirmer le diagnostic des cas suspects ou cliniques (inclut la confirmation d'un test de dépistage positif);
2. Pour estimer la prévalence de l'infection pour faciliter l'analyse des risques (les régimes de santé des enquêtes ou des troupeaux ou le contrôle des maladies, des enquêtes, par exemple, mise en œuvre des mesures de lutte contre les maladies) et d'aider à la démonstration de l'efficacité des politiques de contrôle;
3. Pour confirmer un résultat de test non négatif obtenu lors de la surveillance active avec un type de test différent.

Principe du test

1. PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON + HOMOGÉNÉISATION



2. CONTROLE EST SAIN



Après le prélèvement et l'enregistrement des échantillons, ceux-ci sont analysés avec le Prionics®-Check WESTERN. Le test Prionics®-Check WESTERN suit un protocole en cinq étapes, consistant en une homogénéisation, une digestion par une protéase, une électrophorèse en gel, un transfert et une détection. Immunologique. Une personne peut analyser 100 échantillons (en double) en 6-8 heures.

Les échantillons sont prélevés, enregistrés et un homogénat est préparé à partir d'un morceau de tissu cérébral bien défini. Un traitement à la protéinase K dégrade complètement la PrP^C tandis que la PrP^{Sc} est réduite à un fragment de 27 - 30 kD. La réaction protéolytique est arrêtée et la PrP^{Sc} est détectée par le test Prionics®-Check WESTERN.

Les homogénats digérés sont soumis à une électrophorèse en gel et à un Western blot. Les membranes sont incubées avec un anticorps monoclonal – possédant une haute affinité pour PrP – pour la détection de PrP^{Sc} résistant aux protéases. Le signal est visualisé au moyen du conjugué second anticorps-phosphatase alcaline (AP).

Contenu du kit

Tous les composants non ouverts ont une durée de conservation de 1 an après leur production s'ils sont conservés à 5±3°C. Voir l'étiquette du kit pour la date effective de péremption. Les stabilités des composants

dilués, ouverts ou reconstitués sont indiquées ci-dessous. Les données relatives au risque chimique se trouvent au chapitre "Règles de Sécurité et Classifications R&S" (Annexe V).

Composant 1

Concentré de tampon d'homogénéisation (5x)
(Concentration 5x, diluer avant utilisation). Une bouteille contenant 200 ml d'un tampon d'homogénéisation concentré 5x. Préparer la solution d'homogénéisation d'utilisation diluée 1x en mélangeant 1 volume de tampon d'homogénéisation (5x) et 4 volumes d'eau ultrapure.

Durée de conservation de la solution d'homogénéisation d'utilisation:
1 semaine à 5±3°C.

Composant 2

Tampon de digestion (1x) (prêt à l'emploi)
Un flacon contenant 4 ml de tampon de digestion.
Couleur du bouchon pour identification: jaune

Composant 3

Protéinase K (prêt à l'emploi)
Un flacon contenant 4 ml de protéinase K.
Couleur du bouchon pour identification: blanc

Composant 4

Solution d'arrêt de la digestion (1x) (prêt à l'emploi)
Un flacon contenant 4 ml d'inhibiteur de protéinase K pour l'arrêt de son activité protéolytique.
Couleur du bouchon pour identification: rouge

Composant 5

Echantillon de contrôle (prêt à l'emploi)
Un flacon contenant 200 µl d'un contrôle fonctionnel (PrP^C normale) et de marqueurs de poids moléculaire (97/66/45/30/20/14 kD) inclus dans du tampon de charge. Mélanger avant l'emploi, par exemple en donnant un petit coup sur le tube.

Composant 6

Tampon de charge (1x) (prêt à l'emploi)
Un flacon contenant 25 ml de tampon de charge pour électrophorèse en gel SDS de polyacrylamide (PAGE). (Contient du 2-mercapto-éthanol. Les flacons ouverts dégagent une mauvaise odeur. Toutefois, même si 100 flacons sont ouverts simultanément dans une pièce normalement aérée, les concentrations dans l'air n'atteignent pas le taux d'exposition à l'environnement sur la place de travail de 0.65 mg/m³ défini par l'American Industrial Hygiene Association.)

Composant 7

Concentré de tampon de blocage PVDF (5x)
(5x concentré, à diluer avant l'emploi). Un flacon contient 100 ml de tampon de blocage concentré qui bloque les sites non spécifiques. Diluer 100 ml de tampon de blocage avec de l'eau ultrapure dans un volume final de 0.5 litre.

Composant 8

1^{er} anticorps 6H4
Un tube contenant 30 µl d'anticorps monoclonal anti-PrP (IgG1 anti-PrP de souris). A diluer à 1:5000 (au cas où du liquide reste collé aux parois ou au bouchon, le tube peut être centrifugé).

Composant 9

2^{ème} anticorps-AP
Un tube contenant 30 µl d'IgG-AP de chèvre anti-souris, un anticorps dirigé contre l'IgG de souris et conjugué à la phosphatase alcaline. A diluer à 1:5000 (au cas où du liquide reste collé aux parois ou au bouchon, le tube peut être centrifugé).

Composant 10

Concentré de tampon de luminescence

(10x concentré, à diluer avant l'emploi). Un flacon contient 27 ml de tampon concentré de luminescence. Diluer ce tampon avec de l'eau ultrapure dans un volume final de 270 ml avant l'emploi.

Contenu supplémentaire du kit:

- Notice
- Etiquettes pour solutions diluées

Équipements additionnels nécessaires

Les équipements en gras ont été homologués pour une utilisation avec le test Prionics®-Check WESTERN. L'utilisateur assume sa responsabilité s'il emploie d'autres équipements. Veuillez également consulter notre liste "Matériel et équipements additionnels pour le test Prionics®-Check WESTERN" pour des informations plus détaillées (contactez votre distributeur local ou info@prionics.com).

Généralités:

Équipement de laboratoire correspondant aux directives nationales de sécurité.

- Eau ultrapure: au moins équivalente aux eaux de grade 3 comme défini par ISO 3696:1987 (E)
- Pipette monocanal (1 – 10 µl)
- Pipette monocanal (10 – 100 µl)
- Pipette monocanal (100 – 1000 µl)
- Pipette monocanal (1 – 5 ml)
- Pipette multicanaux (0.5 – 10 µl)
- Pipette multicanaux (10 – 100 µl)
- Embouts de pipette (tels que recommandés par le fabricant des pipettes)
- Réservoirs à solution
- Plateaux pour incubation
- Tubes coniques de 15 ml
- Tubes coniques de 50 ml

Homogénéisation:

- Outil de découpe et pincettes
- Balance
- Distributeur pour le tampon d'homogénéisation 1x
- Plaque à 96 puits de 1.2 ml (plaque matrice)
- **PrioGENIZER™**, appareil d'homogénéisation avec six racks et un plateau (Prionics AG, produit N° 10000) et flacons d'homogénéisation **PrioCLIP™** (Prionics AG, produit N° 10010)

ou

Homogénéisateur **FASTH/MediFASTH ou FASTH2** (Consul AR S.A., produit N° 80040, 82040, 80020) et flacon d'homogénéisation **Prypcon** (Consul AR S.A., produit N° 80300)

ou

Homogénéisateur **Omnisystem** (Omni International Inc., produit No: TH220P) et **Omni tips** (Omni International Inc., produit No: 32750)

Digestion par la protéase:

- Plaques à 96 puits (puits de 0.2 ml; utilisées comme plaques de digestion)
- Film adhésif
- Incubateur pour plaques de microtitrage (montant jusqu'à 100°C au moins).

Electrophorèse en gel:

- **Gels NuPAGE 12% (17 puits)** (Invitrogen™, produit No: NP0349BOX)
- **Solution tampon de migration pour NuPAGE MOPS/SDS** (Invitrogen™, 500 ml; produit No: NP0001; 5 l; produit No: NP0001-02)
- **Antioxydant pour NuPAGE** (Invitrogen™, produit No. NP0005)

Transfert:

- **Membrane PVDF, Immobilon-P 0.45 µm** (Millipore, produit No: IPVH 00010)
- Méthanol (approx. 98%)
- Tampon de transfert (10x): 30.28 g Tris base/144.13 g glycine/ compléter à 1000 ml avec de l'eau ultrapure.

Détection immunologique:

- Solution saline tampon Tris (TBS, pH 7.4): 8 g NaCl/ 0.2 g KCl/ 3 g Tris base. Compléter à 1000

ml avec de l'eau ultrapure, ajuster le pH à 7.4 avec HCl.

- Solution saline tampon Tris avec Tween (TBST): TBS avec 0.05% (v/v) Tween-20
- Ponceau S (20x): 0.5% (w/v) Ponceau S/ 5% (v/v) acide acétique. Diluer à 1x avec TBST avant l'emploi
- Concentré CDP-Star (= substrat de la phosphatase alcaline) (Applied Biosystems, 12.5 mM; No. cat. MSC050) ou Roche Diagnostics GmbH, (25 mM; No. cat 1759051) ou CDP-Star, prêt à l'emploi (Roche Diagnostics; No. cat 2041677)
- Hyperfilm ECL

Déroulement du test

Mesures de précaution

Il convient de respecter rigoureusement les directives nationales concernant la manipulation des prions (voir aussi le chapitre "Règles de Sécurité et Classifications R&S", Annexe V). Le test Prionics®-Check WESTERN ne doit être pratiqué que dans des laboratoires spécialement équipés à cet effet.

De plus, le test Prionics®-Check WESTERN ne peut être exécuté que par des personnes ayant une formation générale sur le travail avec les prions et ayant suivi en particulier une formation à l'utilisation du test Prionics®-Check WESTERN.

Les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux et tous les objets en contact avec les échantillons doivent être considérés comme potentiellement contaminés.

Les données relatives au risque chimique se trouvent à l'Annexe V "Règles de Sécurité et Classifications R&S".

Commentaires

Pour obtenir des résultats optimaux avec le test Prionics®-Check WESTERN, il est recommandé de respecter les aspects suivants:

- **Respecter rigoureusement le mode opératoire.**
- Les embouts de pipettes doivent être remplacés pour chaque opération de pipetage
- Il est fortement recommandé d'utiliser des embouts-filtres pour les pipettes ou des pipettes distinctes pour les différentes étapes. En outre, la précision du volume de pipetage doit être contrôlée périodiquement. Les directives nationales s'appliquent.
- Utiliser un réservoir distinct pour chaque réactif
- Les composants du kit ne doivent pas être utilisés au-delà de leur date de péremption ou si leur aspect a changé.
- Il ne faut pas utiliser en combinaison des composants de kits provenant de lots ayant des numéros différents.
- Les instruments servant à couper et les pincettes qui seront réutilisés doivent être décontaminés selon les protocoles définies par les autorités nationales.
- Lorsque le PrioGENIZER™ est utilisé pour l'homogénéisation, n'utiliser que le programme P0 PRIONICS TSE.

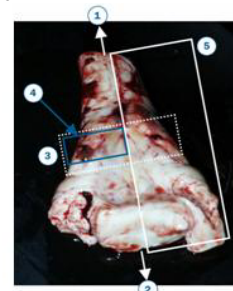
PRÉLEVEMENT D'ÉCHANTILLONS ET HOMOGENISATION

- Couper 0.45-0.70 g de tissu nerveux de la zone de préférence, du côté gauche **ou** du côté droit du tronc cérébral, par exemple avec un scalpel.

Le prélèvement d'échantillons et les tests en laboratoire doivent respecter la Réglementation (CE) No 999/2001, chapitre C, qui renvoie, pour ce qui est de la récolte des échantillons, à la dernière édition de "Manual Standards for Diagnostic Test and Vaccines of the International Office of Epizootic Diseases (OIE)" stipulant que: "Le prélèvement de choix pour un test immunologique devrait se situer sur l'obex ou aussi près que possible de celui-ci mais ne devrait pas se trouver à plus de 1.5 cm devant l'obex". La figure ci-dessous montre, encadrée en 4, la zone de prélèvement d'échantillons.

Medulla oblongata

L'échantillon est un morceau de tronc cérébral / moelle épinière cervicale d'une longueur approximative de 8 cm.



- 1) moelle épinière
- 2) cerveau
- 3) région de l'obex
- 4) zone à utiliser pour le test Prionics®-Check WESTERN
- 5) zone à utiliser par le Centre de Référence de l'ESB

Remarque: après le prélèvement des échantillons, une semi-section complète du tronc cérébral avec une région de l'obex intacte doit rester disponible pour d'éventuels tests confirmatifs.

HOMOGENÉISATION:

Préparation

- Pour obtenir la solution d'utilisation du tampon d'homogénéisation, diluer le tampon d'homogénéisation concentré 5x (composant 1) avec de l'eau ultrapure (Annexe I)

Homogénéisation

- Transférer l'échantillon dans un récipient d'homogénéisation et peser sur la balance (0,45 - 0,70 g).
- Ajouter dix fois le volume du tampon d'homogénéisation dilué 1x (m/v; par exemple 5 ml pour 0,50 g de tissu cérébral) et homogénéiser l'échantillon en utilisant l'appareil d'homogénéisation PrioGENIZER™ (programme P0 PRIONICS TSE), ou FASTH/MediFASTH/ FASTH2 (45 ± 5 s, 20'000 ± 1'000 rpm) ou l'appareil d'homogénéisation Omnisystem (60 ± 10 sec à vitesse maximale).
- Conserver **deux** échantillons de 1 ml par homogénéat dans une plaque matrice de 96 puits (à partir d'ici, chaque étape se fera avec deux échantillons pour chaque homogénéat original).
- Les flacons d'homogénéisation PrioCLIP™ et Prypcon des échantillons testés "TSE négatifs" peuvent être lavés pour être réutilisés (voir protocole de lavage des flacons PrioCLIP™ et Prypcon, Annexe IV).

DIGESTION PAR UNE PROTEASE

Les quantités suivantes sont données pour 48 échantillons (voir Annexe II pour les volumes requis pour un nombre d'échantillons différent de 48.)

Préparation

- Ajuster la température de l'incubateur de la plaque de microtitrage à 48±1°C approximativement 1 heure avant utilisation.
- Ajouter 10 µl de tampon de digestion (composant 2) dans chaque puits de la plaque de digestion.

Digestion par une protéase

- Transférer 100 µl (mélanger d'abord en aspirant et en évacuant au moins trois fois avec la pipette) de chaque homogénéat de la plaque matrice dans le puits correspondant de la plaque de digestion, avec une pipette multicanal. La plaque matrice peut ensuite être recouverte et conservée jusqu'à 12 mois de -20°C à -80°C.
- Ajouter 10 µl de protéinase K (composant 3) à chaque puits de la plaque de digestion et mélanger en aspirant / évacuant à la pipette au moins trois fois.
- Placer un film de scellement sur la plaque de digestion.
- Digérer pendant 40±1 min à 48±1°C.
- Interrompre la réaction en ajoutant 10 µl de la solution d'arrêt de la digestion (composant 4). Mélanger par pipetage au moins trois fois.

ELECTROPHORESE EN GEL

Préparation

- Préparation des gels NuPAGE 12% à 17 puits: enlever délicatement le peigne et la bande

adhésive blanche au bas du gel.

- Chauffer l'échantillon de contrôle (composant 5) à 65±3°C pendant 2 - 5 min.
- Régler la température de l'incubateur pour plaque de microtitrage à 98±4°C, environ 1 heure avant l'utilisation.

Electrophorèse en gel

- Ajouter 100 µl de tampon de charge (composant 6) à l'homogénéat digéré dans la plaque de digestion et mélanger en pipetant au moins trois fois.
- Faire bouillir les échantillons à 98±4°C pendant 5 min ± 30 s.
- La plaque de digestion peut être recouverte avec un film de scellément et conservée jusqu'à 5 jours de -20°C à -80°C.
- Les échantillons préparés précédemment sont chauffés à to 65±3°C pendant 2 - 5 min avant d'être déposés.

Dépôt des échantillons:

- Déposer 10 µl de l'échantillon de contrôle dans le premier puits.
- Déposer 10 µl des échantillons chauffés par puits.
- Remplir la cuve intérieure et extérieure avec la solution tampon pour électrophorèse 1x NuPAGE SDS-MOPS et ajouter 500 µl d'antioxydant NuPAGE uniquement dans la cuve intérieure.

Electrophorèse:

- Faire migrer sous une tension de 200 V jusqu'à ce que le front de migration se trouve à 1-2 cm du bas du gel (environ 30 min).

TRANSFERT

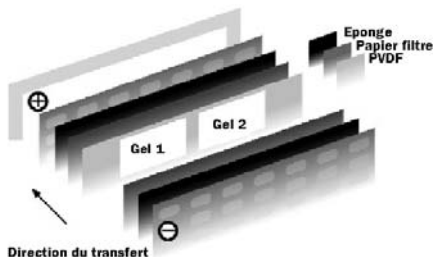
Préparation

- Laver la membrane PVDF (Millipore, Immobilon-P, 0.45 µm, 13 x 17 cm) dans du méthanol (environ 98%) pendant quelques secondes. L'équilibrer pendant au moins 10 min dans le tampon de transfert 1x (pour les volumes requis, voir Annexe II).
- Remplir la cuve de transfert avec le tampon de transfert 1x refroidi (5±3°C).

Transfert

Réalisation du sandwich de transfert

- Placer la membrane sur du papier Whatman imbibé de tampon de transfert 1x ou d'eau ultrapure.
- Casser le carde en plastique du gel NuPAGE. Enlever le haut du gel contenant les puits et le bas au-dessous du front coloré. Placer le reste du gel sur la membrane (éviter les bulles d'air). On peut placer jusqu'à 6 gels sur une même membrane de la taille ci-dessus (voir Annexe III).
- Recouvrir les gels avec du papier Whatman imbibé, puis avec la deuxième éponge.
- Fermer la cassette de transfert et la placer dans la cuve de transfert. Les protéines ont une charge négative et migrent vers le pôle positif (rouge) de la cuve de transfert. S'assurer que la cassette est insérée avec la membrane PVDF faisant face au pôle positif et les gels faisant face au pôle négatif.



- Transférer à 150 V pendant 60±2 min à 5±3°C sous refroidissement continu.
- Retirer la membrane et colorer les protéines présentes sur la membrane au Rouge Ponteau S. Repérer la position des marqueurs moléculaires. La décoloration se fait avec du TBST jusqu'à ce que la coloration rouge ait disparu (environ 2x1 min).

DETECTION IMMUNOLOGIQUE

Blocage:

- Incuber la membrane dans un bac d'incubation en plastique avec 50±2 ml de tampon de blocage PVDF 1x (composant 7 ; voir Annexe I pour le schéma de dilution) pendant 35±5 min à 22±3°C sur un agitateur basculant avec agitation douce.

1^{er} anticorps:

- Diluer 10 µl du premier anticorps 6H4 (composant 8) dans 50±2 ml de TBST (dilution 1 :5000), y incuber la membrane pendant 60±5 min à 22±3°C (ou pendant 12-18 h à 5±3°C) sous agitation douce sur un agitateur basculant.
- Rincer 3x les membranes pendant environ 5 min avec du TBST.

2^{ème} anticorps :

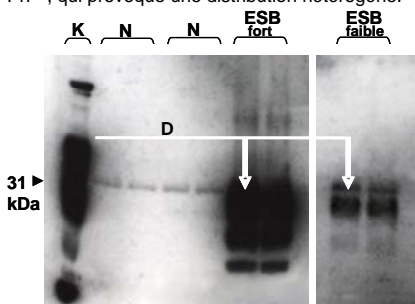
- Diluer 10 µl du deuxième anticorps-AP (composant 9) dans 50±2 ml de TBST (dilution 1 :5000). Incuber pendant 30±1 min à 22±3°C sous agitation douce.
- Rincer 5x les membranes pendant environ 5 min avec du TBST.

Détection:

- Equilibrer la membrane pendant 5 - 10 min dans 50±2 ml de solution tampon de luminescence 1x (composant 10 ; voir Annexe I pour le tableau de dilution).
- Diluer 100 µl de CDP-Star (12.5 mM ; 50x) ou 50 µl (25 mM ; 100x) dans 5 ml de tampon de luminescence 1x.
- Placer la membrane sur une plaque de verre. Répartir uniformément 5 ml de la solution CDP-Star diluée ou 5 ml de la solution prête à l'emploi sur la membrane et incuber pendant 5±1 min à 22±3°C.
- Enlever l'excès de liquide restant sur la membrane avec un papier absorbant doux et recouvrir immédiatement la membrane avec du cellophane. Exposer la membrane à un film Hyperfilm ECL jusqu'à ce que le signal du contrôle positif soit intense et que le bruit de fond ou la bande de la protéinase K apparaisse (environ 5 à 20 min). Exposer plus longtemps ou moins longtemps pour obtenir un signal optimal. Alternativement, un système de détection par caméra CCD peut être utilisé (par ex. FluorChem™, Alpha Innotech Corp.).

INTERPRETATION DES RESULTATS

La figure ci-dessous montre les résultats attendus pour des échantillons négatifs pour l'EBS, positifs pour l'EBS, positifs pour la tremblante et des échantillons témoins. L'échantillon témoin (K) contient l'isoforme normale de la protéine prion (PrP^C), visualisée via la détection immunologique. La bande diffuse correspondante de 25-35 kD est due à la glycosylation de PrP^C, qui provoque une distribution hétérogène.



Les échantillons négatifs (N) ne donnent pas de signal spécifique. La bande à 31 kDa (qui n'est pas toujours visible) résulte d'une fixation non spécifique de l'anticorps secondaire à la protéinase K et elle peut servir de marqueur additionnel pour l'orientation.

Les échantillons positifs (ESB_{fort} ; ESB_{faible}) donnent des signaux en trois bandes, la bande du haut (A) correspond à une protéine de poids moléculaire d'environ 30 kD. L'intensité du signal de toutes les bandes (en particulier celle des bandes du bas B et C) peut être plus faible que ce qui apparaît sur cette figure mais la bande du haut (A) devrait toujours être clairement visible. La flèche (D) illustre la différence de

poids moléculaire entre la protéine prion pathogène digérée et la protéine normale non digérée.

Si ce test est destiné à être utilisé pour le dépistage, un échantillon répété réactif doit être confirmé par le laboratoire national de référence en utilisant une méthode de confirmation supplémentaire. Si il est utilisé pour confirmation, ce test ne peut être utilisé qu'en conjonction avec les recommandations de l'OIE / LCR.

Remarques générales

Remarque

La présente notice est considérée comme complète et exacte à la date de sa publication. Prionics AG n'assume aucune responsabilité de quelque nature que ce soit pour les dommages annexes ou indirects, liés ou consécutifs à l'utilisation de cette notice.

Responsabilité

Prionics AG garantit que ses produits satisfont, tout au long de leur durée de vie telle qu'indiquée, aux exigences publiées et utilisables, dans la mesure où ils sont utilisés conformément aux instructions. Prionics AG ne fait aucune autre promesse, explicite ou implicite. Elle ne donne aucune garantie relative à la facilité d'écoulement sur le marché ou à une quelconque qualification pour une application particulière. La garantie donnée dans le présent document et les indications, spécifications et descriptions des produits de Prionics AG, telles qu'elles apparaissent dans les catalogues et informations sur les produits, publiés par Prionics AG, ne peuvent être modifiées sans l'autorisation écrite expresse d'un représentant de Prionics AG. Toute promesse, orale ou écrite, allant à l'encontre de cette garantie ou des publications, est interdite, et, si elle est faite, est considérée comme n'ayant aucun caractère obligatoire.

En cas d'infraction à la garantie ci-dessus, la seule obligation de Prionics AG réside, à sa discrétion, dans la réparation ou le remplacement du produit considéré ou d'une partie de ce dernier, du moment que le client de Prionics AG a notifié l'infraction en temps voulu. Si, après avoir fait tous les efforts raisonnables, Prionics AG est dans l'impossibilité de réparer ou de remplacer le produit ou la partie de ce dernier, Prionics AG rembourse au client toutes les dépenses exposées par ce dernier pour le produit considéré ou la partie de ce dernier. Prionics AG n'assume aucune responsabilité pour les dommages consécutifs, accessoires, spéciaux ou autres dommages indirects qui découlent d'une perte économique ou de dommages matériels subis par un client en conséquence de l'utilisation de ses produits.

Prionics AG est une compagnie certifiée ISO 9001:2000.

Annexe I

Schémas pour la préparation des solutions diluées

Solution d'homogénéisation 1x

Mélanger les volumes indiqués d'eau ultra pure et de tampon d'homogénéisation 5x (composant 1) pour obtenir le volume désiré de solution d'homogénéisation 1x:

Durée de conservation de la solution d'homogénéisation 1x: 1 semaine à 5±3°C

Vol. du tampon d'homogénéisation (1x)		Volume du tampon d'homogénéisation concentré (5x) (composant 1)		Volume d'eau ultrapure
250 ml	=	50 ml	+	200 ml
500 ml	=	100 ml	+	400 ml
1000 ml	=	200 ml	+	800 ml

Tampon de blocage PVDF

Vol. De tampon blocage PVDF (1x)		Vol. de tampon de blocage PVDF (5x) (composant 7)		Vol. d'eau ultrapure
500 ml	=	100 ml	+	400 ml

Tampon de luminescence

Mélanger les volumes indiqués d'eau ultra pure et de tampon de luminescence (composant 10) pour obtenir le volume désiré de tampon de luminescence (1x):

Vol. de tampon de luminescence (1x)		Vol. de tampon de luminescence (10x) (composant 10)		Vol. d'eau ultrapure
270 ml	=	27 ml	+	243 ml

Tampon de migration pour NuPage SDS-MOPS 1x

Vol. de tampon de migration NuPage SDS-MOPS (1x)		Vol. de tampon de migration NuPage SDS-MOPS (10x)		Vol. d'eau ultrapure
1000 ml	=	50 ml	+	950 ml

Tampon de transfert

Vol. de tampon de transfert (1x)	Vol. de tampon de transfert (10x)	Vol. d'eau ultrapure	Vol. de méthanol (98%)
2000 ml	= 200 ml	+ 1600 ml	+ 200 ml

TBST

Vol. de TBST (1x)	Vol. de TBS (20x)	Vol. d'eau ultrapure	50% Tween 20
1000 ml	= 50 ml	+ 950 ml	+ 1 ml

Ponceau S

Vol. De Ponceau S (1x)	Vol. De Ponceau S (20x)	Vol. de TBST (1x)
1000 ml	= 50 ml	+ 950 ml

Annexe II

Volumes requis pour divers nombres d'échantillons

No. de gels	Taille du plateau (cm)	Taille de la membrane	TBST	1er anticorps
6	Grand (22.4 x 15.6)	13 x 17 cm	50 ml	10 µl
4	Grand (22.4 x 15.6)	9 x 17 cm	50 ml	10 µl
3	Moyen (15 x 11.4)	13 x 8.5 cm	25 ml	5 µl
2	Moyen (15 x 11.4)	9 x 8.5 cm	25 ml	5 µl
1	Petit (5.5 x 9.5)	4.5 x 8.5 cm	10 ml	1 µl

Taille du plateau (cm)	TBST	2 ^{ème} anticorps	Tampon de luminescence	CDP-Star	
				12.5 mM	25 mM
Grand (22.4 x 15.6)	50 ml	10 µl	5 ml	100 µl	50 µl
Grand (22.4 x 15.6)	50 ml	10 µl	4 ml	80 µl	40 µl
Moyen (15 x 11.4)	25 ml	5 µl	3 ml	60 µl	30 µl
Moyen (15 x 11.4)	25 ml	5 µl	3 ml	60 µl	30 µl
Petit (5.5 x 9.5)	10 ml	2 µl	2 ml	40 µl	20 µl

Annexe III

Schéma de placement de gels sur la membrane de transfert

Schéma recommandé pour le placement de gels sur la membrane de transfert.

- Plaquette de 96 puits avec 48 échantillons en double, transférés sur six gels à 17 puits.
- Les numéros indiquent les échantillons 1 - 48 (M=marqueur moléculaire avec PrP^C non digérée).

Membrane	
M. 1, 1, 2, 2, 3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8	M. 9, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 12, 13, 13, 14, 14, 15, 15, 16, 16
Gel 1	Gel 2
M. 17, 17, 18, 18, 19, 19, 20, 20, 21, 21, 22, 22, 23, 23, 24, 24	M. 25, 25, 26, 26, 27, 27, 28, 28, 29, 29, 30, 30, 31, 31, 32, 32
Gel 3	Gel 4
M. 33, 33, 34, 34, 35, 35, 36, 36, 37, 37, 38, 38, 39, 39, 40, 40	M. 41, 41, 42, 42, 43, 43, 44, 44, 45, 45, 46, 46, 47, 47, 48, 48
Gel 5	Gel 6

Annexe IV

Protocole de lavage des flacons PrioCLIP™ /Prypcon

Instructions générales

Traçabilité de l'échantillon

Les flacons d'homogénéisation PrioCLIP™ /Prypcon doivent porter le numéro de l'échantillon – apposé, par ex. à l'aide d'un marqueur ou d'étiquettes résistants à l'eau – afin de garantir la traçabilité de l'échantillon. Le

marquage des flacons ne peut être ôté qu'après la remise des résultats.

Traçabilité de l'utilisation des PrioCLIP™ /Prypcon
Les flacons d'homogénéisation ne doivent pas être utilisés plus de 5 fois. Les flacons PrioCLIP™/Prypcon doivent être marqués d'un trait ou d'un point à l'aide d'un marqueur résistant à l'eau après chaque utilisation.

Ne pas utiliser de désinfectants à base d'hypochlorite pour le lavage.

Préparation

- Remplir deux récipients d'une quantité suffisante d'eau désionisée (au moins 25 l), afin de permettre l'immersion complète des flacons PrioCLIP™ /Prypcon durant les étapes du lavage.

Egouttement

- Vider les flacons contenant des homogénats "TSE négatifs" dans une bouteille autoclavable thermo-résistante ou dans une boîte/flacon jetable.
- Les flacons dont le contenu a été identifié comme « initialement réactif » ne doivent pas être réutilisés et doivent être éliminés conformément aux directives nationales de sécurité.**

Lavage

- Immerger les flacons PrioCLIP™ /Prypcon vides dans un récipient contenant de l'eau désionisée, rincer abondamment
- Inspecter visuellement les flacons d'homogénéisation en cherchant des détériorations éventuelles et une possible contamination par du tissu, lors du transfert du premier récipient au second récipient. Éliminer tout flacon d'homogénéisation PrioCLIP™ /Prypcon abîmé ou contaminé.
- Immerger les flacons et les incubé pendant au moins 30 min à 22±3°C.

Séchage

- Sortir les flacons PrioCLIP™ /Prypcon du récipient, secouer pour éliminer l'eau résiduelle et les laisser sécher complètement à 22±3°C.
- Il est également possible de faire sécher les flacons PrioCLIP™ /Prypcon dans une étuve de séchage. Placer les flacons sur une surface résistante à la chaleur, les chauffer pendant 2 h à 85±5°C et faire sécher pendant une nuit à 50°C dans une étuve de séchage. Répéter l'étape de chauffage (2 h, 85±5°C).
- Contrôler visuellement les flacons PrioCLIP™ /Prypcon. Éliminer les flacons qui sont abîmés ou contiennent des résidus de liquide ou de tissu.
- Les flacons PrioCLIP™ /Prypcon sont maintenant prêts à être réutilisés.

Élimination des déchets

- Les homogénats et les solutions de lavage doivent être éliminés conformément aux directives nationales de sécurité.

Un protocole de lavage détaillé pour PrioCLIP™ /Prypcon (avec illustrations) peut être demandé à l'adresse info@prionics.com

Annexe V

Règles de sécurité et classifications R&S

Règles de sécurité

1. Les règles correspondant aux consignes nationales de sécurité doivent être rigoureusement respectées.

2. Règles de sécurité ACDP

Les laboratoires sont tenus de se conformer aux Consignes Nationales de Sécurité. Pour orientation, une directive de sécurité concernant la manipulation des protéines prions a été publiée par l'ACDP (Advisory Committee on Dangerous Pathogens): "Transmissible spongiform encephalopathy agents: safe working and the prevention of infection", Department of Health, London, Grande-Bretagne (on peut se le procurer à l'adresse suivante: Stationery Office, ISBN 0113221665, Téléphone +44 (20) 7873 9090. (www.advisorybodies.doh.gov.uk/acdp/tseguidance/index.htm))

Classification R&S

Composant 1

Tampon d'homogénéisation (5x)
Non classifié selon les directives UE

Composant 2

Tampon de digestion (1x)  Xn Nocif

R22: Nocif en cas d'ingestion.

R36/38: Irritant pour les yeux et la peau.

S23: Ne pas respirer les gaz / fumées / vapeurs / aérosols.

S26: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S35: Le produit et son récipient doivent être éliminés de façon sûre.

S36/37: Porter des vêtements de protection, des gants appropriés.

Composant 3

Protéinase K

Non classifié selon les directives UE.

Composant 4

Interrupteur de digestion (1x)

Non classifié selon les directives UE.

Composant 5

Echantillon de contrôle

Non classifié selon les directives UE.

Composant 6

Tampon de charge pour PAGE 

R21: Nocif par contact avec la peau.

R34: Provoque des brûlures.

R52/53: Nocif pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

S26: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste

S35: Le produit et son récipient doivent être éliminés de façon sûre.

S36/37/39: Porter des vêtements de protection, des gants appropriés et un appareil de protection des yeux/du visage.

S45: En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette si possible).

Composant 7

Tampon de blocage PVDF concentré (5x)

Non classifié selon les directives UE.

Composant 8

1^{er} anticorps 6H4

Non classifié selon les directives UE.

Composant 9

2^{ème} anticorps-AP

Non classifié selon les directives UE.

Composant 10

Tampon de luminescence concentré (10x)

Non classifié selon les directives UE.

Annexe VI

Certification par l'OIE: résumé des études de validation

Caractéristiques analytiques

Sensibilité analytique

- Des séries de dilution furent testées dans le cadre de l'étude de validation de l'Union Européenne. Sur 20 homogénats positifs testés à une dilution de 10⁻¹, 15 s'avèrent positifs, deux douteux et trois négatifs. Deux échantillons s'avèrent également douteux à 10⁻² et un seul échantillon à une dilution de 10^{-2.5}. [Les échantillons positifs furent fournis par le Central Veterinary Laboratory (CVL), Weybridge : des échantillons de tronc cérébral et de moëlle épinière furent sélectionnés à partir de bovins présentant des signes cliniques d'ESB confirmés par un examen histologique.]

Spécificité analytique

▪ Ceci n'a pas été spécifiquement examiné. Cependant, certaines études de terrain, utilisant des échantillons prélevés sur des animaux trouvés morts (animaux souffrant de troubles autres que l'ESB, par ex. encéphalite, œdème cérébral, rage, listériose), ont constamment montré que le kit Prionics AG-Check WESTERN dispose d'une bonne spécificité analytique [cf. Surveillance de l'ESB, D. Heim et al, Arch Virol, Suppl. 2000, (16):127-33].

Données de répétabilité

▪ Les tests effectués sur une période allant de 2002 à 2007 indiquent que le kit pourrait détecter un échantillon positif pour l'ESB à une dilution de 1/10.

▪ La répétabilité fut également étudiée lors d'un essai comparatif de trois tests ESB (Enfer – Bio-Rad Te SeE – Prionics Check Western), réalisé par le Laboratoire de Référence Européen de l'ESB (VLA, Royaume-Uni). La cohérence entre les échantillons dupliqués (n=277) était élevée, à l'exception de deux cas où le report d'un puits positif adjacent entraînera une petite bavure non spécifique dans l'un des puits adjacents d'un échantillon négatif. Ceci était clairement différent des résultats positifs, qui étaient de taille caractéristique, en forme de bandes et présentes à la fois dans les deux puits dupliqués.

Caractéristiques du diagnostic

Détermination du seuil

Ce test ne donne pas de lecture quantitative. La réponse est qualitative et est basée sur les deux critères de présence du signal et de sa position. Ceci permet une discrimination aisée entre les vrais positifs et les (potentiellement) faux positifs par suite de la PrP normale non digérée.

Estimations de la sensibilité diagnostique (SeD) et de la spécificité diagnostique (SpD)

Trois études d'évaluation externes ont été décrites pour l'estimation de la sensibilité et de la spécificité diagnostiques:

▪ Tests réalisés au Laboratoire de Référence Suisse de l'ESB (NeuroCentre / Université de Berne) en février 2003 sur 38 échantillons positifs (18 homogénats & 20 échantillons tissulaires) du RU / 190 échantillons négatifs du programme de surveillance Suisse de l'ESB (échantillons tissulaires de bovins de plus de 30 mois qui avaient été testés négatifs par histologie / immunohistochimie).

	ESB positif par IHC	ESB négatif par IHC
Test Positif par Prionics Check-WESTERN	38	0
Test Négatif par Prionics Check-WESTERN	0	190
Sensibilité diagnostique : 100%, CI [90.7 – 100.0%] Spécificité diagnostique : 100%, CI [98.1 – 100.0%]		

▪ Etude de terrain canadienne, 2003. Faisant suite à la détection du cas référencé en mai 2003, 2036 cohortes de naissance et d'alimentation furent testées par immunohistochimie (IHC) et par le kit Check WESTERN. Ce travail fut réalisé par les laboratoires de l'Agence d'Inspection Alimentaire Canadienne à Lethbridge, Winnipeg, Nepean et St-Hyacinthe.

	ESB positif par IHC	ESB négatif par IHC
Test Positif par Prionics Check WESTERN	1	0
Test Négatif par Prionics Check WESTERN	0	2036
Spécificité diagnostique : 100%, CI [99.8 – 100.0%]		

▪ Evaluation des tests pour le diagnostic de l'Encéphalopathie Spongiforme Transmissible chez les bovins pour la Commission Européenne, 1999. Tous les échantillons furent préparés par l'Institut européen des mesures et matériaux de référence (IRMM) à Geed, Belgique et présentés à l'analyse dans un format codé « aveugle » aux différents participants (le kit Prionics AG-Check WESTERN était l'un des quatre kits sélectionnés) : un total de 300 échantillons positifs (prélevés à partir de bovins montrant des signes cliniques d'ESB et confirmés par examen histologique – fournis par CVL Weybridge) et de 100 échantillons négatifs (prélevés en Nouvelle Zélande à partir de bovins adultes sains âgés d'au moins 4 ans et confirmés négatifs par examen histologique).

	ESB positif par histologie	ESB négatif par histologie
Test Positif par Prionics Check-WESTERN	300	0
Test Négatif par Prionics Check-WESTERN	0	1000
Sensibilité diagnostique : 100%, CI [98.8 – 100.0%] Spécificité diagnostique : 100%, CI [99.6 – 100.0%]		

Concordance entre les tests

La concordance entre le test Prionics AG-Check WESTERN avec l'examen histologique et l'IHC est élevée.

Reproductibilité

Durant l'évaluation de terrain de l'Union Européenne en 2004, des échantillons furent testés à l'aide du Prionics AG-Check WESTERN. Ces résultats furent comparés avec les résultats atteints avec d'autres tests en cours d'évaluation. Les échantillons furent divisés en trois catégories : échantillons positifs, échantillons négatifs et échantillons de faible qualité.

▪ Un total de 335 échantillons positifs à l'ESB fut testé dans trois laboratoires (VLA, Newcastle, RU - Analytico Food BV, Heerenveen, Pays-Bas et Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, Espagne).
 ▪ Un total de 24.534 échantillons négatifs à l'ESB fut testé dans huit laboratoires (Analytico Food BV, Heerenveen, Pays-Bas; Institut für Veterinärmedizin, Mödling, Autriche; Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid, Lelystad, Pays-Bas; Laboratorio EET, Leon, Espagne; Labor Dr. Guenteert, Luzern, Suisse; Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Turin, Italie; Irish Equine Centre, Kildare, Irlande; Arthus Biotech GmbH, Hamburg, Allemagne).

▪ En plus, 423 échantillons de faible qualité furent testés dans deux laboratoires (VLA, Newcastle, RU et NeuroCentre, Berne, Suisse).

Les résultats inter-laboratoires de tous les échantillons testés furent identiques pour le Prionics AG-Check WESTERN. Les concordances avec les autres tests en cours d'évaluation furent très élevées, à l'exception d'un échantillon faiblement positif détecté par le test Prionics AG-Check WESTERN et qui n'avait pas été identifié comme positif lors de l'utilisation du test Ceditect.

Source: Rapport: The Field Trial of Seven New Rapid Post Mortem Test for the Diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy in Bovines; IRMM; 12 Novembre 2004

Applications

Prionics AG-Check WESTERN est actuellement utilisé à la fois par les Laboratoires de Référence et de routine à travers le monde entier.

Les laboratoires d'essai devraient participer à des essais d'aptitude et des programmes de formation des laborantins organisés par les Laboratoires de Référence de l'OIE.

Référence:

1. OESCH B, DOHERR M, HEIM D, FISCHER K, EGLI S, BOLLIGER S, BIFFIGER K, SCHALLER O, VANDELDELDE M, MOSER M.; Application of Prionics Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs; Arch Virol 2000; Suppl 16:189-195
2. DOHERR MG, OESCH B, MOSER M, VANDELDELDE M, HEIM D.; Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy; Veterinary Record 1999 Dec 4; 145:672
3. SCHALLER O, FATZER R, STACK M, CLARK J, COOLEY W, BIFFIGER K, EGLI S, DOHERR M, VANDELDELDE M, HEIM D, OESCH B, MOSER M.; Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE); Acta Neuropathol (Berl). 1999 Nov;98(5):437-43
4. CALAVAS D, DUCROT C, BARON T, MORIGNAT E, VINARD JL, BIACABE AG, MADEC JY, BENCSIK A, DEBEER S, ELIAZSEWICZ M.; Prevalence of BSE in western France by screening cattle at risk: preliminary results of a pilot study; Vet Rec 2001 Jul 14;149:55-56
5. D. HEIM, D AND WILESMITH, JW; Surveillance of BSE; Arch Virol, Suppl. 2000, (16):127-33
6. Chapter 2.4.6., Bovine Spongiform Encephalopathy; *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2012, OIE
7. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, Scientific Opinion on Analytical sensitivity of approved TSE rapid test, EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), EFSA Journal 2009; 7(12):1436

Contact

Prionics AG
Wagistrasse 27a
CH-8952 Schlieren-Zurich
Switzerland

Tél. +41 44 200 2000
Fax +41 44 200 2010
www.prionics.com
info@prionics.com

Pour notre réseau de distribution, prière de se référer à la page web www.prionics.com



Validé et certifié par l'OIE comme étant propres aux fins définies dans la présente notice
Numéro d'enregistrement:20080102