

# Prionics®-Check WESTERN

Ensayo para la detección *in vitro* de la PrP<sup>Sc</sup> relacionada con las EETs

Dentro de la Unión Europea, este ensayo está aprobado como test rápido para el programa de detección de la EEB en vacuno, el cual ha sido establecido de acuerdo al Reglamento (CE) No 999/2001.

Kit para 100 muestras  
(Determinaciones por duplicado)  
©Prionics AG

Versión 12.0\_es

## Instrucciones de uso

Sólo para uso diagnóstico veterinario *in vitro*.  
Almacenar a 5±3°C  
Producto n°: 12000

Los productores de tests rápidos de TSE deben tener establecido un sistema de control de calidad aprobado por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EURL), el cual asegure que el protocolo de trabajo del test no es modificado. Los métodos de toma de muestras así como las posibles modificaciones del test rápido o del protocolo del mismo (incluida la toma de muestras) deben llevarse a cabo solamente tras notificación preliminar al EURL y sólo se concederá a condición de que el EURL concluya que dicha modificación no reduce la sensibilidad, la especificidad o la fiabilidad del ensayo rápido. Una vez obtenida la aprobación del EURL, los detalles de la modificación deberán ser comunicados a la Comisión y a los Laboratorios Nacionales de Referencia de la Unión Europea.

## Introducción

Hay distintos tejidos de un animal infectado con priones que contienen una forma modificada, patológica, de la proteína priónica, PrP.

La forma alterada de la proteína priónica, asociada a la enfermedad, se denomina PrP<sup>Sc</sup> (isoforma específica del scrapie de la PrP), o bien PrP<sup>EEB</sup>. La isoforma normal de la PrP se denomina PrP<sup>C</sup> (forma celular de la PrP).

La PrP<sup>Sc</sup> y la PrP<sup>EEB</sup> se diferencian de la PrP normal en su resistencia a las proteasas. Con el tratamiento con Proteinasa K se degrada la forma normal de la PrP, mientras que la PrP<sup>Sc</sup> o bien la PrP<sup>EEB</sup> ven reducido su tamaño original de 32-35 kD a 27-30 kD. El fragmento aún existente resistente a la proteasa PrP<sup>Sc</sup>/PrP<sup>EEB</sup> se llama PrP 27-30.

El test Prionics®-Check WESTERN alcanza su alta precisión y fiabilidad, debido a que considera tres criterios analíticos independientes: resistencia a la proteasa, patrón de glicosilación y el menor peso molecular del fragmento resistente a la proteasa PrP<sup>Sc</sup> (27-30 kD) en comparación con la PrP no digerida.

Debido a las características específicas de las soluciones tampón y a la alta afinidad del anticuerpo, el test puede llevarse a cabo directamente con homogeneizados de tejidos y combina la fiabilidad del método Western-Blot con una corta duración del test, necesaria en caso de un muestreo en masa.

El Prionics®-Check WESTERN fue el primer test rápido para EEB aprobado en 1998 por las autoridades suizas. En 1999 fue oficialmente reconocido por la UE como el único test con el 100% de sensibilidad y el 100% de especificidad sin necesidad de otro ensayo confirmatorio.

En el estudio de sensibilidad analítica realizado en 2009 por el Laboratorio Central de Referencia (CRL), se concluyó que Prionics®-Check WESTERN funciona en un rango de inferioridad máximo de 2log<sub>10</sub> cuando se compara con el test más sensible.

El ensayo ha sido validado y certificado como APTO por la OIE, tras el análisis de expertos, para los siguientes fines:

APTO para diagnóstico post-mortem de la encefalopatía espongiiforme bovina en ganado vacuno para:

1. Confirmación de animales sospechosos o casos clínicos (incluye confirmación de positivos en screening)
2. Estimación de la prevalencia de infección para análisis de riesgo (sondeos/ sistemas de salud en rebaños/ control de enfermedad, ej. vigilancia, ejecución de medidas de control de la enfermedad) y para asistencia en la demostración de la eficiencia de políticas de control;
3. Confirmación de resultados no negativos obtenidos con diferentes tipos de ensayos en programas de vigilancia activos.

## Principio del ensayo

### 1. TOMA DE MUESTRAS + HOMOGENEIZACIÓN



### 2. CONTROL EET SANO



### 3. DIGESTIÓN



### 4. ELECTROFORESIS EN GEL



### 5. DETECCIÓN



Tras la toma y registro de las muestras, éstas se analizan con el ensayo inmunocromatográfico Prionics®-Check WESTERN. El Prionics®-Check WESTERN sigue un protocolo de 5 pasos, consistentes en la homogeneización, la digestión con la proteasa, la electroforesis en gel, transferencia y la detección inmunológica. Una sola persona puede procesar 100 muestras en duplicado en 6-8 horas.

Se toma una muestra de la médula oblongada de la región del óxex en el tronco cerebral, se registra y se homogeneiza. El tratamiento con proteinasa K destruye por completo la PrP<sup>C</sup> mientras que la PrP<sup>Sc</sup> se ve reducida al fragmento 27 – 30 kD. Se interrumpe la reacción proteolítica y la PrP<sup>Sc</sup> se detecta mediante el ensayo Prionics®-Check WESTERN.

Los homogeneizados digeridos se corren en un gel de electroforesis y se transfieren a una membrana. Posteriormente, se incuba dicha membrana con un anticuerpo monoclonal - de elevada afinidad por la PrP - para la detección de la PrP<sup>Sc</sup> resistente a la proteasa. La señal se visualiza mediante un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (FA).

## Componentes del kit

La caducidad de todos los componentes no abiertos es de 1 año a partir de la fecha de fabricación. La fecha concreta de caducidad se indica en la etiqueta de cada kit. La estabilidad de los componentes diluidos, abiertos o reconstituidos se indica más abajo. Los datos relativos a los riesgos químicos están disponibles en la sección «Normas de seguridad y declaraciones R&S» (apéndice V).

### Componente 1

#### Tampón de homogeneización (5x)

(Concentrado 5x, diluir antes del uso) Un frasco, con 200 ml de tampón de homogeneización concentrado 5x. Preparar la solución de trabajo de homogeneización 1x mezclando una parte del tampón de homogeneización (5x) con 4 partes de agua purificada. Caducidad de la solución de trabajo de homogeneización: 1 semana a 5±3°C.

### Componente 2

#### Tampón de digestión (1x) (listo para usar)

Un frasco con 4 ml de tampón de digestión. Color del tapón: amarillo

### Componente 3

#### Proteinasa K (lista para usar)

Un frasco con 4 ml de proteinasa K para la digestión de la PrP<sup>C</sup> normal durante la digestión con proteasa. Color del tapón: blanco

### Componente 4

#### Solución de parada de la digestión (1x) (lista para usar)

Un frasco con 4 ml de inhibidor de la proteinasa K para interrumpir la actividad proteolítica de la proteinasa K. Caducidad: 12 meses a 5±3°C. Color del tapón: rojo.

### Componente 5

#### Muestra de control (lista para usar)

Un frasquito contiene 200 µl de una mezcla de Control funcional (PrP<sup>C</sup> normal sin digerir) y marcadores de peso molecular (97/66/45/30/20/14 kD) en tampón de muestra PAGE. Mezclar antes de usar, por ejemplo dando ligeros golpes al tubo.

### Componente 6

#### Tampón para muestras PAGE (1x) (listo para usar).

Un frasco con 25 ml de tampón para muestras para la electroforesis en gel de poliácridamida (SDS-PAGE). (Contiene 2-mercaptoetanol. Los frascos abiertos liberan un mal olor. Sin embargo, si 100 frasquitos son abiertos simultáneamente en una sala aireada normalmente, la concentración en el aire no alcanza el límite de 0,65 mg/m<sup>3</sup> de exposición ambiental en el lugar de trabajo definido por la Asociación Americana de Higiene Industrial).

### Componente 7

#### Tampón de bloqueo PVDF concentrado (5x)

(Concentrado 5x, diluir antes de usar). Un frasco con 100 ml de tampón de bloqueo concentrado 5x para bloquear sitios de unión inespecíficos. Diluir con agua purificada hasta un volumen final de 500 ml.

### Componente 8

#### 1. Anticuerpo 6H4

Un frasco con 30 µl de anticuerpo monoclonal 6H4 anti-PrP (IgG<sub>1</sub> anti-PrP de ratón). Dilución de trabajo: 1:5000. (Si no se halla todo el líquido en la base del envase, puede centrifugarse).

### Componente 9

#### 2. Anticuerpo FA

Un frasco con 30 µl de anticuerpo cabra-anti IgG de ratón-FA (un anticuerpo contra IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina). Dilución de trabajo: 1:5000.

(Si no se halla todo el líquido en la base del envase, puede centrifugarse).

## Componente 10

### Tampón de luminiscencia concentrado (10x)

(Concentrado 10x, diluir antes de usar). Un frasco contiene 27 ml de tampón de luminiscencia concentrado 10x. Antes de usar diluir con agua purificada hasta 270 ml.

### Contenido adicional del kit:

- Instrucciones de uso del kit.
- Etiquetas adicionales para la solución de trabajo

## Material adicional necesario

Los puntos marcados en **negrita** han sido validados para su uso con Prionics®-Check WESTERN. El empleo de elementos diferentes cae bajo la responsabilidad del usuario.

### General:

Equipos de laboratorio acordes con las normativas de seguridad de cada país.

- Agua purificada; equivalente, al menos, al agua de grado 3 según lo definido por la norma ISO 3696: 19877 (E).
- Pipeta monocal (1 - 100 µl)
- Pipeta monocal (10 - 100 µl)
- Pipeta monocal (100 - 1000 µl)
- Pipeta monocal (1 - 5 ml)
- Pipeta multicanal (5 - 50 µl)
- Pipeta multicanal (50 - 300 µl)
- Puntas de pipeta (según la recomendación del fabricante de las pipetas)
- Reservorios para reactivos
- Tubos cónicos de 15 ml
- Tubos cónicos de 50 ml
- Vórtex

### Homogeneización:

- Bisturís y pinzas
- Balanza
- Dispensador para la solución de trabajo de homogeneización.
- Microplaca de 96 pocillos de 1,2 ml (empleada como placa madre de las muestras homogeneizadas).
- **PrioGENIZER™** (equipo de homogeneización con seis racks y una bandeja; Prionics AG, producto n.º 10000) y recipientes de homogeneización **PrioCLIP™** (Prionics AG, producto n.º 10010).

o bien

Equipo de homogeneización **FASTH/FASTH2/MediFASTH** (Cónsul AR S.A., n.º de producto: 80040, 82040, 80020) y recipientes de homogeneización **Prypcons** (Consul, n.º de producto: 80300)

o bien

Sistema de homogeneización **Omnisystem** (Omni International Inc., n.º de producto TH220P) y puntas de homogeneización **Omni tips** (Omni International Inc., n.º de producto: 32750)

### Digestión:

- Microplacas de 96 pocillos (pocillos 0,2 ml; se utilizan como placas de digestión).
- Tapas Selladoras
- Incubador de microplacas (debe alcanzar al menos 100°C).

### Electroforesis en gel:

- **Geles NuPAGE al 12% (17 pocillos)** (Invitrogen™, n.º de producto: NP0349BOX)
- **NuPAGE MOPS/SDS Running Buffer** (Invitrogen™, 500 ml: n.º de producto: NP0001; 5 l: n.º de producto: NP0001-02)
- **NuPAGE Antioxidant** (Invitrogen™, n.º de producto: NP0005)

### Transferencia:

- **Membrana PVDF, Immobilon-P 0,45 µm** (Millipore, n.º de producto: IPVH 00010)
- Metanol (aprox. 98%)
- Tampón de transferencia (10x): 30,28 g Tris base/144,13 g Glycine/ agregar agua purificada hasta 1 l.

### Detección inmunológica:

- Solución salina tamponada con Tris (TBS, pH 7,4): 8 g NaCl/ 0,2 g KCl/ 3 g Tris base. agregar H<sub>2</sub>O purificada hasta 1 l, ajustar con HCl a un pH de 7,4.
- Solución salina tamponada con Tris y con Tween (TBST): TBS con 0,05% (v/v) Tween-20
- Ponceau S (20x): 0,5% (w/v) Ponceau S/ 5% (v/v) Ácido acético. antes de usar diluir con TBST a una solución 1x
- CDP-Star Concentrado (Sustrato de fosfatasa alcalina (APS)) (Applied Biosystems, 12,5 mM; Cat No. MSC050) o Roche Diagnostics GmbH, (25 mM; Cat No. 1759051) o bien CDP-Star, lista pare su uso (Roche Diagnostics; Cat No. 2041677)
- Film para rayos-X

## Protocolo del test

### Precauciones

Se deben seguir estrictamente las normas de cada país para el trabajo con priones (ver también la sección «Normas de seguridad y declaraciones R&S» apéndice V). El Prionics®-Check WESTERN debe ser llevado a cabo en laboratorios adecuados para este propósito. El personal que lleva a cabo el test debe haber sido entrenado en el trabajo general con priones y en el uso específico del Prionics®-Check WESTERN.

Las muestras deben considerarse como potencialmente infecciosas y todo el material que entre en contacto con las muestras como potencialmente contaminado.

En la sección «Normas de seguridad y declaraciones R&S» (apéndice V) están disponibles los datos sobre los riesgos químicos.

### Notas

Para obtener resultados óptimos con el Prionics®-Check WESTERN deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos:

- **Hay que seguir estrictamente al protocolo del test.**
- Se deben cambiar las puntas de las pipetas tras cada pipeteo.
- Es muy recomendable usar puntas de pipeta con filtro o pipetas diferentes para los sucesivos pasos de pipeteo. Además, se debe calibrar periódicamente la precisión de las pipetas.
- Se deben utilizar reservorios diferentes para cada uno de los reactivos.
- Los componentes del kit no deben ser utilizados tras la fecha de caducidad o si se observan cambios en su aspecto.
- No deben utilizarse juntos componentes de kits con números de lote diferentes.
- Las pinzas y los bisturís no desechables deben ser descontaminados de acuerdo con las directrices de las autoridades y la normativa de cada país.
- Cuando se utilice el equipo PrioGENIZER™ para la homogeneización, solamente se debe utilizar el programa P0 PRIONICS TSE.

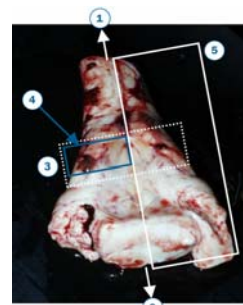
## TOMA DE MUESTRAS Y HOMOGENEIZACIÓN

- Cortar con un bisturí 0,45-0,70 g de tejido nervioso del área definida de la parte izquierda **o bien** de la parte derecha del tronco cerebral.

La toma de muestras y los ensayos de laboratorio deben seguir el Reglamento (CE) n.º 999/2001 capítulo C que, en lo que se refiere a la toma de muestras, hace referencia al «Manual de los estándares para las pruebas de diagnóstico y vacunas de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE)» que establece que: «La muestra preferida para el inmunoensayo debe ser tomada del mismo óbex o lo más cercanamente posible a él, pero no más de 1,5 cm antes del mismo». La figura muestra el área de la toma de la muestra dentro del recuadro.

### Médula oblongada (región del óbex)

La muestra consiste en un trozo del tronco cerebral / médula espinal cervical de unos 8 cm de largo. (Para más detalles de la toma de muestras, contactar con [info@prionics.com](mailto:info@prionics.com))



- 1) Médula espinal
- 2) Cerebro
- 3) Región del óbex
- 4) Área a utilizar para el test Prionics®-Check WESTERN
- 5) Área a utilizar por el Laboratorio Nacional de Referencia de la EET

Nota: para ensayos posteriores de confirmación, tras la toma de la muestra debe quedar disponible una hemisección completa del tronco cerebral con su región del óbex intacta.

### HOMOGENEIZACIÓN:

#### Pasos previos

- Diluir el tampón de homogeneización 5x con agua ultrapura para preparar la solución de trabajo de homogeneización (apéndice I).

#### Homogeneización

- Transferir la muestra al equipo de homogeneización y determinar su peso con una balanza (0,45-0,70 g).
- Añadir diez volúmenes de solución de trabajo de homogeneización (p/v; p.ej. 5 ml para 0,50 g de tejido cerebral de la región del óbex) y homogeneizar la muestra mediante el equipo de homogeneización PrioGENIZER™ o FASTH/FASTH2/MediFASTH (45 s ± 5 s, a 20.000 ± 1.000 rpm) u Omnisystem (60 ± 10 s a máxima velocidad).
- Almacenar 2 alícuotas de 1 ml por cada homogeneizado en una placa madre de 96 pocillos (de ahora en adelante, cada paso se realiza en duplicado – dos muestras por cada homogeneizado –).
- Los recipientes de homogeneización PrioCLIP™ y Prypcon con muestras que den resultado «TSE negativo» pueden lavarse para ser reutilizados (ver protocolo de lavado de los PrioCLIP™/Prypcon, Apéndice IV).

## DIGESTIÓN CON PROTEASA

Las siguientes indicaciones se refieren a 48 muestras (ver el apéndice II para los volúmenes necesarios para otro número de muestras).

#### Pasos previos

- Ajustar la temperatura del incubador de microplacas a 48±1°C aproximadamente 1 hora antes de su uso.
- Añadir 10 µl de tampón de digestión (componente 2) a cada pocillo de la placa de digestión de 96 pocillos.

#### Digestión con la proteasa

- Transferir 100 µl de cada homogeneizado (mezclar primero pipeteando arriba y abajo al menos tres veces) de la placa madre al pocillo correspondiente de la placa de digestión con pipeta multicanal. Seguidamente, la placa madre se puede cubrir y almacenar hasta 12 meses entre -20°C y -80°C.
- Añadir 10 µl de Proteinasa K (componente 3) y mezclar aspirando tres veces con la pipeta.
- Cubrir la placa de digestión con una tapa selladora.
- Digerir durante 40±1 min a 48±1°C.
- Parar la reacción añadiendo 10 µl de solución de parada (componente 4). Mezclar pipeteando arriba y abajo al menos tres veces.

## ELECTROFORESIS EN GEL

#### Pasos previos

- Preparar los geles NuPAGE al 12% de 17 pocillos. Extraer los geles del envoltorio de plástico y retirar el peine con cuidado. Retirar la lámina blanca en la parte inferior del gel.

- Calentar la muestra de control (componente 5) a 65±3°C durante 2 - 5 minutos.
- Ajustar la temperatura del incubador de microplacas a 98±4°C aproximadamente 1 hora antes de su uso.

#### Electroforesis en gel

- Añadir a cada muestra 100 µl de tampón de muestra PAGE (componente 6). Mezclar pipeteando arriba y abajo al menos tres veces.

- Calentar las muestras a 98±4°C durante 5 min±30s.
- La placa madre se puede cubrir y almacenar hasta 5 días entre -20°C y -80°C.
- Las muestras procesadas, que ya han sido desnaturalizadas una vez, es suficiente con calentarlas durante 2 - 5 minutos a 65±3°C antes de cargarlas en el gel.

### Carga de las muestras:

- Cargar 10 µl de muestra de control en el primer pocillo.
- Cargar 10 µl de cada muestra calentada en los pocillos correspondientes de cada gel.
- Rellenar las cámaras interna y externa con tampón de corrida NuPAGE MOPS/SDS 1x y añadir 500 µl de antioxidante sólo en la cámara interna.

### Electroforesis:

- Correr el gel a 200 V hasta que el frente del colorante esté a 1-2 cm del borde inferior del gel (aproximadamente 30 minutos).

## TRANSFERENCIA

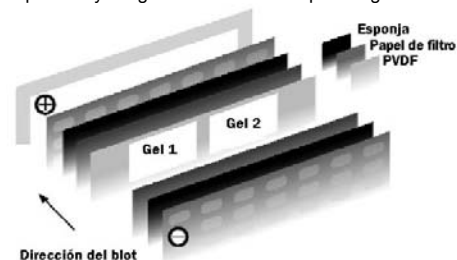
### Pasos previos

- Enjuagar la membrana PVDF (Millipore, Immobilon-P, 0,45 µm, 13 cm × 17 cm) en metanol (aproximadamente al 98%) durante pocos segundos y a continuación equilibrar de inmediato durante al menos 10 minutos en tampón de transferencia 1x (ver el apéndice II para los volúmenes necesarios para los diferentes números de muestras).
- Llenar el tanque de transferencia con tampón de transferencia 1x refrigerado (5±3°C).

### Blot

#### Composición del sándwich de transferencia

- Colocar la membrana equilibrada sobre un papel de Whatman humedecido con tampón de transferencia 1x o con agua purificada.
- Abrir los geles NuPAGE, recortar arriba el peine y abajo el margen azul y colocar los geles sobre la membrana (evitando la formación de burbujas). Se pueden colocar hasta 6 geles en una membrana del tamaño indicado arriba (ver apéndice III).
- Cubrir los geles con papel Whatman humedecido, colocar la esponja en la parte superior.
- Cerrar el sándwich y colocar en el tanque de transferencia. Las proteínas tienen carga negativa y se desplazan hacia el polo positivo (rojo). Por eso la membrana PVDF ha de estar más cerca del polo positivo y los geles más cerca del polo negativo.



- El tiempo de transferencia es de 60±2 min a 150 V y con refrigeración continua a 5±3°C.
- Sacar del sándwich la membrana con las proteínas adheridas y teñir con Ponceau S 1x. Señalar la posición de los marcadores de peso molecular con un lápiz de color y decolorar la membrana con TBST hasta que haya desaparecido el color rojo (aproximadamente 2 x 1 minuto).

## DETECCIÓN INMUNOLÓGICA

### Bloqueo:

- Colocar la membrana en una bandeja de plástico limpia e incubarla con 50 ml de tampón de bloqueo PVDF 1x durante 35±5 min en un agitador con movimiento suave a 22±3°C.

### 1<sup>er</sup> Anticuerpo 6H4:

- Diluir 10 µl del 1<sup>er</sup> Anticuerpo 6H4 en 50 ml de TBST (dilución 1:5000) e incubar la membrana durante 60±5 min a 22±3°C (o bien 12-18 h a 5±3°C) en un agitador con movimiento suave.
- Lavar la membrana 3 veces durante aproximadamente 5 minutos cada vez con TBST.

### 2<sup>do</sup> Anticuerpo-FA:

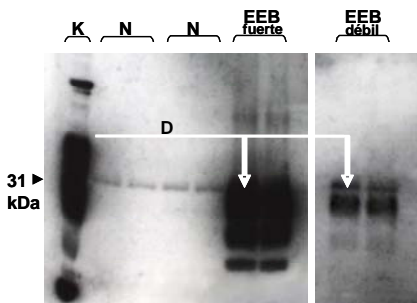
- Diluir 10 µl del 2<sup>do</sup> Anticuerpo-FA en 50±2 ml de TBST (dilución 1:5000) e incubar la membrana durante 30±1 min a 22±3°C en agitador con movimiento suave.
- Lavar la membrana 5 veces durante 5 minutos cada vez con TBST.

### Detección:

- Equilibrar la membrana durante 5 - 10 min en 50±2 ml de tampón de luminiscencia 1x (componente 10, ver Apéndice I para la tabla de diluciones).
- Diluir 100 µl de CDP-Star (12,5 mM, 50x) o bien 50 µl (25 mM, 100x) en 5 ml de tampón de luminiscencia 1x.
- Colocar la membrana sobre una placa de vidrio. Distribuir uniformemente el CDP-Star diluido (5 ml) uniformemente sobre la membrana e incubar 5±1 min a 22±3°C.
- Retirar el líquido sobrante. Secar la membrana suavemente con un pañuelo de papel y cubrir con un film transparente (Saran). Para hacer visible la quimioluminiscencia se expone una película Rayos X a oscuras hasta ver una señal intensa de la muestra de control así como, o bien una coloración de fondo, o bien la banda de Proteinasa K (aprox. 5-20 min). Para conseguir un resultado óptimo puede ser necesario escoger tiempos de revelado más cortos o más largos. Alternativamente pueden detectarse las señales de quimioluminiscencia con un sistema Lumilmager. (p. ej. FluorChem™, Alpha Innotech Corp.)

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La figura siguiente ilustra los resultados a esperar en muestras negativas y positivas para EEB y los de la muestra control. La muestra de control (K) contiene la isoforma normal de la proteína prión (PrP<sup>C</sup>), que es detectada inmunológicamente. De esto resulta una banda difusa en la zona de 25 - 35 kD (la proteína prión tiene distintas variantes de glicosilación, que conducen a una distribución heterogénea).



Las muestras negativas (N) no presentan ninguna señal específica. La banda a 31 kD, no siempre bien reconocible, se debe a una unión inespecífica del anticuerpo 2<sup>o</sup> a la Proteinasa K y puede servir de ayuda orientativa suplementaria.

En muestras positivas (EEB<sub>fuerte</sub>; EEB<sub>débil</sub>) es visible una señal, cuya banda superior (A) está a unos 30 kD. La intensidad en la señal de todas las bandas (en especial de las bandas inferiores B y C) puede ser más débil que en la figura, pero al menos ha de ser bien visible la banda superior (A). La flecha D indica la diferencia típica en el peso molecular de la proteína prión específica de la enfermedad tras la digestión con Proteinasa K en comparación con la PrP normal, no digerida.

Si el test ha de ser usado como prueba tamiz, una muestra reactiva en pruebas repetidas debe ser enviada al Laboratorio Nacional de Referencia para su confirmación usando un método confirmatorio adicional. Si el test ha de ser usado como confirmatorio, sólo será válido si se ajusta a las recomendaciones de la OIE/CRL.

## Observaciones generales

### Nota informativa

Este manual se considera completo y correcto en el momento de su publicación. Prionics SA no asume ninguna responsabi-

dad por daños fortuitos o consiguientes en relación con o tras el uso de este manual.

### Responsabilidad

Prionics SA garantiza que sus productos cumplen las correspondientes especificaciones publicadas, siempre que se usen de acuerdo con las instrucciones correspondientes que sean del caso y dentro de la fecha de caducidad de los productos. Prionics SA no da ninguna otra garantía, explícita o implícita. No hay ninguna garantía de comercialidad o idoneidad para un uso particular. La garantía aquí ofrecida y los datos, especificaciones y descripciones de los productos Prionics SA que aparecen en catálogos de Prionics SA impresos y en la literatura sobre los productos no pueden ser modificados salvo tras acuerdo escrito explícito firmado por un representante autorizado de Prionics SA. Cualquier representación oral o escrita en contradicción con esta garantía o con dichas publicaciones no está autorizada y, si ha sido dada no es de fiar. En caso de incumplimiento de la garantía susodicha, la única obligación de Prionics SA consistirá - a su elección - en reparar o reemplazar el producto en cuestión o parte del mismo, siempre que el cliente notifique el incumplimiento a Prionics SA sin demora. Si, tras esfuerzos razonables, Prionics SA resulta incapaz de reparar o reemplazar el producto o parte del mismo, entonces Prionics SA restituirá al cliente todos los efectivos pagados por el producto o la parte en cuestión.

Prionics SA no asume ninguna responsabilidad por daños indirectos fortuitos, consiguientes, especiales o de cualquier otro tipo que resulten de pérdidas económicas o daños a la propiedad sufridos por cualquier cliente como consecuencia del uso de sus productos.

Prionics SA es una empresa certificada ISO 9001:2000.

## Apéndice I

### Tabla para la preparación de la solución de trabajo

#### Solución de trabajo de homogeneización

Mezclar los volúmenes indicados de agua purificada y del tampón de homogeneización 5x (componente 1) para obtener el volumen deseado de solución de trabajo de homogeneización.

Caducidad de la solución de trabajo de homogeneización: 1 semana a 5±3°C.

Sol. de trabajo de homogeneización	Vol. de agua purificada	Vol. de tampón de homogeneización (5x) (componente 1)
250 ml	=	50 ml + 200 ml
500 ml	=	100 ml + 400 ml
1000 ml	=	200 ml + 800 ml

#### Tampón de bloqueo PVDF

Vol. de tampón de bloqueo (1x)	Vol. de agua purificada	Vol. de tampón de bloqueo (5x) (componente 7)
500 ml	=	100 ml + 400 ml

#### Tampón de luminiscencia

Mezclar los volúmenes indicados de agua ultrapura y tampón de luminiscencia 10x (Componente 10) para obtener el volumen deseado de tampón de luminiscencia 1x:

Vol. de tampón de luminiscencia (1x)	Vol. de agua purificada	Vol. de tampón de luminiscencia (10x) (componente 10)
270 ml	=	27 ml + 243 ml

#### Tampón de corrida NuPage SDS-MOPS

Vol. de tampón de corrida NuPage SDS-MOPS (1x)	Vol. de agua purificada	Vol. de tampón de corrida NuPage SDS-MOPS (10x)
1000 ml	=	50 ml + 950 ml

#### Tampón de transferencia

Vol. de tampón de transferencia (1x)	Vol. de agua purificada	Vol. de metanol (98%)
2000 ml	=	200 ml + 1600 ml + 200 ml

#### TBST

Vol. de TBST (1x)	Vol. de agua purificada	Vol. de TBS (20x)	Tween 20 al 50%
1000 ml	=	50 ml + 950 ml + 1 ml	

#### Ponceau S

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

**Apéndice II**

Volumenes necesarios para los diferentes números de muestras:

Nº. geles	Tamaño de bandeja (cm)	Tamaño de membrana	TBST	1er. Anticuerpo
6	Grande (22.4 x 15.6)	13 x 17 cm	50 ml	10 µl
4	Grande (22.4 x 15.6)	9 x 17 cm	50 ml	10 µl
3	Mediano (15 x 11.4)	13 x 8,5 cm	25 ml	5 µl
2	Mediano (15 x 11.4)	9 x 8,5 cm	25 ml	5 µl
1	Pequeño (5.5 x 9.5)	4,5 x 8,5 cm	10 ml	1 µl

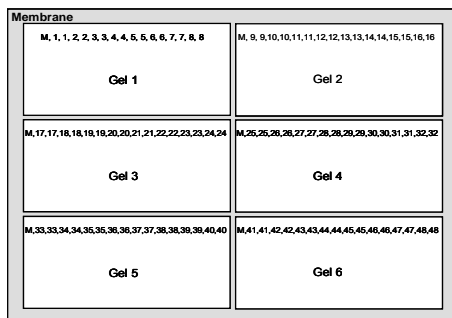
Tamaño de bandeja (cm)	TBST	2do. Anticuerpo	Tampón de luminiscencia	CDP-Star	
				12.5 mM	25 mM
Grande (22,4 x 15,6)	50 ml	10 µl	5 ml	100 µl	50 µl
Grande (22,4 x 15,6)	50 ml	10 µl	4 ml	80 µl	40 µl
Mediano (15 x 11,4)	25 ml	5 µl	3 ml	60 µl	30 µl
Mediano (15 x 11,4)	25 ml	5 µl	3 ml	60 µl	30 µl
Pequeño (5,5 x 9,5)	10 ml	2 µl	2 ml	40 µl	20 µl

**Apéndice III**

**Esquema para colocar los geles en la membrana**

Esquema recomendado para la colocación de los geles en la membrana de transferencia.

- Placa de 96 pocillos con 48 muestras por duplicado transferidas a 6 geles con 17 pocillos cada uno.
- 1-48 = Numeración de las muestras, (M = Marcadores de peso molecular con PrP<sup>C</sup> sin digerir).



**Apéndice IV**

**Protocolo de lavado de los PrioCLIP™/Prypcon**

**Instrucciones generales**

**Trazabilidad de la muestra:**

Para garantizar la trazabilidad de la muestra, los recipientes de homogeneización PrioCLIP™/Prypcon deben rotularse con el número de la muestra, usando p.ej. un rotulador o etiquetas resistentes al agua. La rotulación de los recipientes sólo puede eliminarse tras la comunicación de los resultados.

**Trazabilidad del uso:**

Los recipientes de homogeneización no deben usarse más de 5 veces. Tras cada uso, los PrioCLIP™/Prypcon deben marcarse con guiones o puntos mediante un rotulador resistente al agua.

**Para el lavado, no usar desinfectantes que contengan cloro.**

**Pasos preparatorios**

- Llenar dos recipientes con cantidades suficientes de agua desionizada (al menos 25 l) de modo que los PrioCLIP™/Prypcon se puedan sumergir completamente durante los pasos de lavado.

**Vaciado**

- Vaciar los recipientes con homogeneizado que han dado resultado «TSE negativo» en una botella termorresistente autoclavable o en un frasco o recipiente desechable.
- Los recipientes cuyo contenido ha sido identificado como «inicialmente reactivo» no deben usarse otra vez y deben ser eliminados según las normas nacionales de seguridad.

**Lavado**

- Sumergir el PrioCLIP™/Prypcon vacío en un recipiente con agua desionizada y enjuagar a fondo.
- Al transferir los recipientes de homogeneización del recipiente de lavado uno al dos, comprobar que no están dañados ni contienen restos de tejido. Desechar cualquier recipiente de homogeneización PrioCLIP™/Prypcon que esté dañado o contaminado.
- Sumergir los recipientes e incubarlos por lo menos durante 30 minutos a 22±3°C.

**Secado**

- Sacar los PrioCLIP™/Prypcon del recipiente de lavado, sacudirlos para eliminar restos de agua y dejarlos secar por completo a 22±3°C.
- Los PrioCLIP™/Prypcon también pueden secarse en una estufa de calentado o secado. Poner los recipientes sobre una superficie termorresistente, calentarlos durante 2 horas a 85±5°C y secarlos por la noche a 50°C en una estufa de secado. Repetir el paso de calentado (2 horas, 85±5°C).
- Controlar los PrioCLIP™/Prypcon visualmente. Desechar los recipientes dañados o que contienen restos líquidos o de tejidos.
- Los PrioCLIP™/Prypcon están ahora listos para ser reutilizados.

**Eliminación de desechos**

- Los homogeneizados y las soluciones de lavado deben eliminarse según las normas nacionales de seguridad.

Puede solicitarse un protocolo de lavado PrioCLIP™/Prypcon detallado (con ilustraciones) en: [info@prionics.com](mailto:info@prionics.com)

**Apéndice V**

**Normas de seguridad y declaraciones R&S**

**Normas de seguridad**

**1. Se deben seguir estrictamente las normas nacionales de seguridad.**

**2. Directivas ACDP**

Los laboratorios ESTÁN OBLIGADOS a seguir las normas nacionales de seguridad. La siguiente información –publicada por el Comité asesor en materia de patógenos peligrosos (ACDP)– está disponible como orientación: «Agentes de la encefalopatía espongiforme transmisible: seguridad en el trabajo y prevención de infecciones ("Transmissible spongiform encephalopathy agents: safe working and the prevention of infection")», Department of Health, London, UK (puede solicitarse en la oficina de papelería, ISBN 0113221665, teléfono +44 (20) 7873 9090). Una actualización está disponible en: [www.advisorybodies.doh.gov.uk/acdp/tseguidance/index.htm](http://www.advisorybodies.doh.gov.uk/acdp/tseguidance/index.htm)

**Declaraciones R&S**

**Componente 1**

**Tampón de homogeneización (5x)**

Código de riesgo: este producto no está clasificado según las directivas de la UE.



**Componente 2**

**Tampón de digestión**

Código de riesgo: R/22 Nocivo por ingestión.

R36/38 Irrita los ojos y la piel.

S23 No aspire el gas, humo, vapor o aerosol.

S26 En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acídase a un médico.

S35 Este material y su envase deben ser desechados de manera segura.

S36/37 Llevar ropa de protección apropiada y guantes.

**Componente 3**

**Proteinasa K**

Código de riesgo: este producto no está clasificado según las directivas de la UE.

**Componente 4**

**Solución de parada de la digestión (1x)**

Código de riesgo: este producto no está clasificado según las directivas de la UE.

**Componente 5**

**Muestra de control**

Código de riesgo: este producto no está clasificado según las directivas de la UE.

**Componente 6**

**Tampón para muestras PAGE**



C Corrosive

Código de riesgo: R21 Nocivo en contacto con la piel.

R34 Provoca quemaduras.

R52/53 Nocivo para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático

S26 En caso de contacto con los ojos, lavarlos inmediata y abundantemente con agua y acídase a un médico.

S35 Este material y su envase deben ser desechados de manera segura.

S36/37/39 Utilizar batas, guantes y protección para ojos y cara.

S45 En caso de accidente o si se siente mal, busque ayuda médica inmediatamente (mostrar la etiqueta siempre que sea posible).

**Componente 7**

**Tampón de bloqueo PVDF concentrado (5x)**

Código de riesgo: este producto no está clasificado según las directivas de la UE.

**Componente 8**

**1. Anticuerpo 6H4**

Código de riesgo: este producto no está clasificado según las directivas de la UE.

**Componente 9**

**2. Anticuerpo FA**

Código de riesgo: este producto no está clasificado según las directivas de la UE.

**Componente 10**

**Tampón de luminiscencia concentrado (10x)**

Código de riesgo: este producto no está clasificado según las directivas de la UE.

**Apéndice VI**

Certificación OIE: Resumen de los estudios de validación

**Características analíticas**

**Sensibilidad analítica**

- Durante el proceso de estudio de validación de la Unión Europea, se evaluaron diluciones seriadas. De 20 homogeneizados positivos evaluados a una dilución de 10<sup>-1</sup>, 15 mostraron un resultado positivo, dos , dudoso y tres negativo. En la dilución 10<sup>-1.5</sup>, tres muestras mostraron resultado dudoso y el resto, negativo. En la dilución de 10<sup>-2</sup>, dos muestras mostraron también un resultado dudoso, al igual que una muestra a dilución de 10<sup>-2.5</sup>. [Las muestras positivas fueron suministradas por el Central Veterinary Laboratory (CVL), Weybridge: las muestras de tronco encefálico y médula espinal se seleccionaron a partir de animales bovinos que mostraban signos clínicos de EEB, confirmados por el examen histológico.]

**Especificidad analítica**

- No se ha examinado específicamente. Sin embargo, algunos estudios de campo sobre muestras de ganado muerto (animales que sufrían trastornos que no eran EEB, p. ej. encefalitis, edema cerebral, rabia, listeriosis) han demostrado repetidamente que el kit Prionics AG-Check WESTERN tiene una buena especificidad analítica [ver Surveillance of BSE, D. Heim y cols., Arch Virol, Supl. 2000, (16):127-33].

## Datos de repetibilidad

- Los ensayos llevados a cabo entre 2002 y 2007 muestran que el kit pudo detectar una muestra positiva de EEB a una dilución 1/10.
- La repetibilidad también se estudió en pruebas comparativas de tres ensayos EEB (Enfer – Bio-Rad TeSeE – Prionics Check Western) llevados a cabo por el Laboratorio de Referencia de la UE para EET (VLA, Reino Unido). La coherencia entre las muestras duplicadas (n=277) fue alta, excepto en dos ocasiones, cuando el sobrante de un pocillo positivo dio como resultado una pequeña mancha no específica en uno de los pocillos adyacentes de una muestra negativa. Esto era claramente diferente de los resultados positivos, que tenían un tamaño y patrón de bandas característicos, y que estaban presentes en ambos pocillos duplicados.

## Características diagnósticas

### Determinación del umbral

Este ensayo no ofrece una lectura cuantitativa. La respuesta es cualitativa y se basa en los criterios de: presencia de señal y posición. Esto permite distinguir fácilmente entre positivos reales y (posibles) falsos positivos debido a la PRNP normal sin digerir.

### Estimaciones de la sensibilidad diagnóstica (SD) y la especificidad diagnóstica (ED)

Se han descrito tres estudios de evaluación externos para la estimación de la sensibilidad y la especificidad diagnósticas:

- Ensayos realizados en el laboratorio de referencia EEB suizo (Neurocenter/Universidad de Berna) en febrero de 2003 sobre 38 muestras positivas (18 homogeneizados y 20 muestras de tejido) del Reino Unido / 190 muestras negativas del programa de vigilancia de EEB suizo (muestras de tejido de ganado mayor de 30 meses que habían ofrecido un resultado negativo por histología/inmunohistoquímica).

	EEB positivo por IHQ	EEB negativo por IHQ
Ensayo positivo por Prionics Check-WESTERN	38	0
Ensayo negativo por Prionics Check-WESTERN	0	190
<b>Sensibilidad diagnóstica: 100%, IC [90,7 – 100%]</b>		
<b>Especificidad diagnóstica: 100%, IC [98,1 – 100%]</b>		

- Estudio de campo canadiense, 2003. Como seguimiento de la detección de un caso confirmado en mayo de 2003, se realizó un estudio de cohorte en el que se analizaron 2036 animales desde el nacimiento hasta cebo mediante inmunohistoquímica (IHQ) y el kit Check WESTERN. Este ensayo fue llevado a cabo por laboratorios de la Canadian Food Inspection Agency en Lethbridge, Winnipeg, Nepean y St-Hyacinthe.

	EEB positivo por IHQ	EEB negativo por IHQ
Ensayo positivo por Prionics Check-WESTERN	1	0
Ensayo negativo por Prionics Check-WESTERN	0	2036
<b>Especificidad diagnóstica: 100%, IC [99,8 – 100%]</b>		

- Evaluación de ensayos para el diagnóstico de la encefalopatía espongiiforme transmisible en animales bovinos para la Comisión Europea, 1999. Todas las muestras fueron preparadas por el Instituto para la Referencia de Materiales y Medidas (IRMM) de la UE en Geed, Bélgica, y presentadas para su análisis en un formato codificado «ciego» para los diferentes participantes (el kit Prionics AG-Check WESTERN fue uno de los cuatro kits seleccionados): Se analizaron un total de 300 muestras posi-

tivas (recogidas a partir de ganado que mostraba signos clínicos de EEB y confirmadas por examen histológico, suministradas por CVL Weybridge) y 1000 muestras negativas (recogidas en Nueva Zelanda a partir de ganado adulto sano de al menos 4 años de edad y negativas confirmadas por examen histológico).

	EEB positivo por histología	EEB negativo por histología
Ensayo positivo por Prionics Check-WESTERN	300	0
Ensayo negativo por Prionics Check-WESTERN	0	1000
<b>Sensibilidad diagnóstica: 100%, IC [98,8 – 100%]</b>		
<b>Especificidad diagnóstica: 100%, IC [99,6 – 100%]</b>		

### Concordancia entre ensayos

La concordancia del ensayo Prionics AG-Check WESTERN con el examen histológico y la IHQ es alta.

### Reproducibilidad

Durante la evaluación de campo de la UE de 2004, se analizaron muestras mediante Prionics AG-Check WESTERN. Estos resultados se compararon con los obtenidos con otros ensayos evaluados. Las muestras se dividieron en tres categorías: muestras positivas, muestras negativas y muestras de mala calidad.

- Se analizaron un total de 335 muestras positivas para EEB en tres laboratorios (VLA, Newcastle, Reino Unido - Analytico Food BV, Heerenveen, Países Bajos y Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, España).
- Se analizaron un total de 24.534 muestras negativas para EEB en ocho laboratorios (Analytico Food BV, Heerenveen, Países Bajos.; Institut für Veterinärmedizin, Mödling, Austria; Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid, Lelystad, Países Bajos; Laboratorio EET, León, España; Labor Dr. Guenteert, Lucerna, Suiza; Instituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Turin, Italia; Irish Equine Centre, Kildare, Irlanda; Arthus Biotech GmbH, Hamburgo, Alemania).
- Se analizaron 423 muestras de mala calidad en dos laboratorios (VLA, Newcastle, Reino Unido y NeuroCenter, Berna, Suiza).

Los resultados interlaboratoriales de todas las muestras analizadas fueron idénticos para el ensayo Prionics AG-Check WESTERN. La concordancia con otros ensayos evaluados fue muy alta, con la excepción de una muestra positiva débil detectada en el ensayo Prionics AG-Check WESTERN que no se identificó como positiva al utilizar el ensayo Ceditect.

Fuente: Informe: The Field Trial of Seven New Rapid Post Mortem Test for the Diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy in Bovines; IRMM; 12 de noviembre de 2004

### Aplicaciones

Prionics AG-Check WESTERN se emplea actualmente tanto en laboratorios de referencia como en laboratorios de rutina de todo el mundo. Los laboratorios de análisis deben participar en las pruebas de aptitud y los programas de formación organizados por los laboratorios de referencia de la OIE.

### Referencias:

- 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

- DOHERR MG, OESCH B, MOSER M, VANDELDELDE M, HEIM D.; Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy; Veterinary Record 1999 Dec 4; 145:672
- 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
- CALAVAS D, DUCROT C, BARON T, MORIGNAT E, VINARD JL, BIACABE AG, MADEC JY, BENCNIK 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
- D. HEIM, D AND WILESMITH, JW; Surveillance of BSE; Arch Virol, Suppl. 2000, (16):127-33
- Chapter 2.4.6., Bovine Spongiform Encephalopathy; *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2012, OIE
- 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

## Contacto

Prionics SA  
Wagistrasse 27a  
CH-8952 Schlieren-Zurich  
Suiza  
Tel. +41 44 200 2000  
Fax +41 44 200 2010  
www.prionics.com  
info@prionics.com

Consulte nuestra red de distribuidores en:  
[www.prionics.com](http://www.prionics.com)



Validado y certificado por la OIE como APTO para los fines definidos en este protocolo.  
Nº de Registro: 20080102.