TeSeE SAP Combi Kit
Schnelles Protokoll

Σ 192	REF 3551186
Σ 384	REF 3551192
Σ 768	REF 3551191

KIT MIT REAGENZIEN FÜR DIE *IN VITRO* REINIGUNG UND DEN *IN VITRO* NACHWEIS VON PrP^{Sc} IN RINDERN, KLEINEN WIEDERKÄUERN UND HIRSCHARTIGEN

Die Deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 11 Absatz 2 TierGesG zugelassen. Innerhalb der Europäischen Union ist dieser Schnelltest für die BSE- und Scrapie-Testprogramme bei Rindern, Schafen und Ziegen zugelassen, welche gemäß Anhang III, Kapitel A der Verordnung der Europäischen Kommission (EC) Nr. 999/2001 durchgeführt werden.

Für den Nachweis von CWD in Hirschartigen empfehlen die aktuellen TSE EURL Richtlinien nur den Einsatz von validierten TSE Schnelltests die eine USDA und/oder CFIA Zulassung für die Verwendung von Hirschartigen erhalten haben. Für die EU-Mitgliedstaaten, die eine gezielte Überwachung von Hirschartigen durchführen, beachten Sie bitte die Richtlinien des Europäischen Referenzlabors (TSE EU Referenzlabor Richtlinien zum Nachweis von Chronic Wasting Disease in Hirschartigen, ftp://ftp.izsto.it/EURL%20TSE/RAPID%20TESTS/Test%20protocols/)
Dieser Testkit ist validiert und hat die USDA und CFIA Zulassung für die Verwendung von Hirschartigen zum Nachweis von CWD in Hirschartigen erhalten.

2020/06

Bitte beachten Sie, dass in Deutschland bei Tätigkeiten mit Transmissibler Spongiformer Enzephalopathie (TSE) die Empfehlungen des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) zu beachten sind. Die Schutzmaßnahmen des Beschlusses 603 können von den Vorgaben dieser Gebrauchsinformation abweichen.

Zul.-Nr. BFAV/BSE/1/2001

BIO-RAD

INHALTSVERZEICHNIS

1 - ALLGEMEINE INFORMATION

2 - TeSeE SAP Combi Kit
- 2-1 Prinzip
- 2-2 Proben
- 2-3 Zusammensetzung der TeSeE SAP Combi Kits
- 2-4 Vorbereitung der Reagenzien
- 2-5 Lagerung, Haltbarkeit
- 2-6 Testdurchführung
- 2-7 Berechnung und Auswertung der Ergebnisse
- 2-8 Verfahrensgrenzen

3 - ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN

4 - VORSICHTSMASSNAHMEN

5 - HYGIENE- UND SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

6 - LITERATUR

1 - ALLGEMEINE INFORMATION

Übertragbare spongiforme Enzephalopathien (Transmissible Spongiform Encephalopathies [TSEs]) sind langsam fortschreitende degenerative Erkrankungen des Zentralnervensystems, die von einem unkonventionellen, übertragbaren Krankheitserreger, (UTA´s) üblicherweise als Prion bezeichnet, verursacht werden.

Formen von TSE werden im Allgemeinen entsprechend ihrer Ätiologie in iatrogen, familiär und/oder sporadisch eingeteilt. Im 18. Jh. wurde die Scrapie beim Schaf beschrieben und deren Übertragung (einschließlich auf Ziegen) nachgewiesen. Allerdings bleiben die Ansteckungswege innerhalb von Herden unklar. Darüber hinaus wurden Formen von TSE bei Hirschartigen (Chronic Wasting Disease, CWD) und Rindern (Bovine Spongiforme Enzephalopathie, BSE) beschrieben.

Auch Menschen sind für bestimmte Formen von TSE anfällig. Es gibt zwingende Beweise dafür, dass die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) wahrscheinlich durch den Verzehr von infiziertem Fleisch vom Rind auf den Menschen übergegangen ist.

Zusätzlich zu dieser Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) sind beim Menschen weitere Formen bekannt, u.a. Kuru sowie die iatrogene Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit.

Rein erbliche Formen (wie z.B. das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom [GSS]) und/oder sporadisch auftretende CJD wurden beim Menschen nachgewiesen, aber ihre Inzidenz ist gering. Es ist nicht bekannt, ob es beim Tier vergleichbare sporadisch auftretende TSE gibt.

Die Hauptmerkmale dieser Krankheiten sind:

- ein langsam fortschreitender aber immer tödlich endender Verlauf,
- Fehlen von konventionellen Krankheitserregern,
- progressive Ansammlung einer anormalen Isoform des natürlichen Prionproteins (PrP), die als PrP^{Sc} bezeichnet wird, im Zentralnervensystem. Diese Isoform ist durch besondere biochemische Eigenschaften und vor allem durch eine gesteigerte Widerstandsfähigkeit gegen Proteasen gekennzeichnet.

Die erstaunlich lange Inkubationszeit, die dem Auftreten von neurologischen Symptomen vorausgeht, läßt darauf schließen, dass wichtige Abläufe in der Pathogenese der TSE wahrscheinlich außerhalb des Nervensystems und besonders im peripheren Lymphgewebe stattfinden.

Trotz zahlreicher unbekannter Faktoren und / oder Unsicherheiten ist der Nachweis von PrP^{Sc} jetzt als Verfahren zur Bestätigungen der Diagnose TSE anerkannt. Dieser Nachweis erfolgt hauptsächlich an Hand von post mortem gewonnen Proben von Nervengewebe.

Auch in zahlreichen Lymphgeweben und Organen, wie z.B. in den Keimzentren der Milz, der Lymphknoten, der Mandeln und / oder von Schleimhaut-nahen Lymphgeweben (aber im Forschungsbereich), im Tiermodell oder in an Scrapie erkrankten Schafen, bei Hirschartigen mit CWD und bei Patienten mit vCJD wurde anormales PrP^{Sc} nachgewiesen.

Die vom “Commissariat à l’Energie Atomique - CEA” (französische Behörde für Atomenergie) entwickelten Reagenzien, die von Bio-Rad weiterentwickelt, hergestellt und vertrieben werden, ermöglichen die Bestimmung von PrP^{Sc} in Nervengewebsproben von Tieren.

Dieser Schritt erfolgt unter Verwendung folgender Reagenzien und folgenden Zubehörs:

- TeSeE SAP Combi Kit (192 Tests)	Best.-Nr. 3551186
- TeSeE SAP Combi Kit (384 Tests)	Best.-Nr. 3551192
- TeSeE SAP Combi Kit (768 Tests)	Best.-Nr. 3551191
- Probenröhrchen (384 Probenröhrchen)	Best.-Nr. 3551139
- Probenröhrchen (768 Probenröhrchen)	Best.-Nr. 3551137
- Spritze und Nadel für die Kalibration (x 200)	Best.-Nr. 3551174
oder TSE Calibrat Syringe + Needle VITA (x 200)	Best.-Nr. 12007909
oder Filterplatte (x 50)	Best.-Nr. 3551179
- Deepwell-Platte (x 50)	Best.-Nr. 3590132
- Medium Beads (x 2000)	Best.-Nr. 3551171*

** Nur für peripheres Gewebe.*

2 -TeSeE SAP Combi Kit

2-1 Prinzip

Mit den Reagenzien des TeSeE SAP Combi Kit ist die Reinigung, die Konzentrierung und das Solubilisieren von PrP^{Sc} aus Proben von infizierten Tieren möglich.
Bei dem TeSeE SAP Test handelt es sich um eine enzymimmunologische Technik (nach der Sandwichmethode), für die 2 monoklonale Antikörper zum Nachweis des anormalen Prionenproteins verwendet werden, das gegen Proteinase K aus Proben von infizierten Tieren resistent ist. Ein Kit enthält ausreichend Reagenzien für 192 Tests (inkl. der Kontrollen).
Die Festphase besteht aus 12 Streifen mit 8 Vertiefungen aus Polystyrol, die mit dem ersten Antikörper beschichtet sind. Der zweite monoklonale Antikörper ist an Peroxidase gebunden.

2-2 Proben

- **Rinder :** die Reinigung von PrP^{Sc} erfolgt an Hand von Proben aus dem Zentralnervensystem (ZNS). Der Probenentnahmelöffel für BSE (Best.-Nr. 3551130) kann für die Entnahme sowohl von Hirnstamm als auch eingesetzt werden.
  Da PrP^{Sc} im Zentralnervensystem heterogen verteilt ist, müssen die Proben für einen optimalen Nachweis bevorzugt aus dem Bereich des Obex im Hirnstamm entnommen werden. Bei Rindern kann hierfür die Spritze zur Probenentnahme (Best.-Nr. 3551175) verwendet werden. Diese erlaubt auf sichere Weise eine leichte und schnelle Entnahme der Probe aus dem Bereich des Obex.
  Für die ausführliche Anleitung zur korrekten Vorgehensweise bei der Probennahme wird auf das Protokoll zur Probenentnahme verwiesen.

- **Kleine Wiederkäuer und Hirschartige :** die Reinigung von PrP^{Sc} erfolgt an Hand von Proben aus dem Zentralnervensystem und / oder aus peripherem Gewebe (Lymphknoten, Milz,…). Der Probenentnahmelöffel für Kleine Wiederkäuer (Best.-Nr. 3551184) kann für die Entnahme sowohl von Hirnstamm als auch von Cerebellum eingesetzt werden.
  Da PrP^{Sc} im Zentralnervensystem heterogen verteilt ist, müssen die Proben für einen optimalen Nachweis bevorzugt aus dem Bereich des Obex im Hirnstamm entnommen werden.
  Die Proben werden einzeln geschnitten und gewogen.
  Anmerkung: andere Gewebe (Mandeln, Dünndarm (Illeum), Augenlid) können ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet werden.
  Die Proben werden bei 2-8 °C gelagert, wenn die Aufreinigung innerhalb von 24 h erfolgt, oder sie lassen sich gefroren mehrere Monate aufbewahren. Sie können höchstens dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Bei einem eventuellen Transport müssen diese Proben entsprechend den aktuell geltenden, nationalen oder örtlichen, gesetzlichen Bestimmungen verpackt werden.

2-3 Zusammensetzung der TeSeE SAP Combi Kits

BEZEICHNUNG	ART DER REAGENZIEN	MENGE 3551186 (192 Tests)	MENGE 3551192 (384 Tests)	MENGE 3551191 (768 Tests)	LAGERUNG
Reagenz A	Denaturierungspuffer	1 Flasche (55 ml)	1 Flasche (120 ml)	1 Flasche (240 ml)	2-8 °C
Reagenz B	Fällungspuffer Farbstoff: Bromphenolblau	1 Flasche (55 ml)	1 Flasche (120 ml)	2 Flaschen (120 ml)	2-8 °C
Reagenz C	Solubilisierungspuffer Farbstoff: Malachitgrün	1 Flasche (7 ml)	1 Flasche (14 ml)	1 Flasche (28 ml)	2-8 °C
PK	Proteinase K Farbstoff: Phenolrot	1 Flasche (0,5 ml)	2 Flaschen (0,5 ml)	4 Flaschen (0,5 ml)	2-8 °C
R1	**Mikrotiterplatte:** 12 Streifen mit 8 mit einem monoklonalen Anti-PrP-Antikörper beschichteten Vertiefungen	2 Platten	4 Platten	8 Platten	2-8 °C
R2	**Waschlösung :** Tris-NaCl-Puffer pH 7,4 in 10-facher Konzentrierung Konservierungsmittel : ProClin 300 (0,01%)	1 Flasche (250 ml)	2 Flaschen (250 ml)	4 Flaschen (250 ml)	2-25 °C
R3	**Negativkontrolle :** PBS-Puffer pH 7,2, mit BSA supplementiert Konservierungsmittel: ProClin 300 (0,1%)	1 Flasche (4 ml)	2 Flaschen (4 ml)	4 Flaschen (4 ml)	2-8 °C
R4	**Positivkontrolle :** PBS-Puffer pH 7,4, mit nicht-infektiösen synthetischen Peptiden versetzt. Lyophilisiert Konservierungsmittel : ProClin 300 (0,1%)	1 Flasche (qsp 4 ml)	2 Flaschen (qsp 4 ml)	4 Flaschen (qsp 4 ml)	2-8 °C
R6	**Probenverdünnungsmittel :** PBS-Puffer pH 7,2, mit BSA und Phenolrot versetzt Konservierungsmittel: ProClin 300 (0,1%)	1 Flasche (35 ml)	1 Flasche (70 ml)	1 Flasche (140 ml)	2-8 °C
R7	**Konjugat :** Peroxidase-markierter monoklonaler Anti-PrP- Antikörper in 10-facher Konzentrierung in PBS-Puffer pH 7,1, mit bovinem Protein versetzt und mit Phenolrot gefärbt Konservierungsmittel: ProClin 300 (0,1%)	1 Flasche (2.8 ml)	2 Flaschen (2,8 ml)	4 Flaschen (2,8 ml)	2-8 °C
R8	**Peroxidase-Substratpuffer :** Lösung aus Zitronensäure und Natriumacetat pH 4,0 mit 0,015% H_2O_2 und 4% Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 Flasche (60 ml)	1 Flasche (120 ml)	2 Flaschen (120 ml)	2-8 °C
R9	**Chromogen :** Tetramethylbenzidinlösung (TMB)	1 Flasche (5 ml)	1 Flasche (10 ml)	1 Flasche (20 ml)	2-8 °C
R10	**Stopplösung :** Schwefelsäure, 1N	1 Flasche (28 ml)	1 Flasche (56 ml)	1 Flasche (112 ml)	2-8 °C
	Klebefolien	8	12	16	

Bei den nachfolgenden Reagenzien handelt es sich um generische Komponenten : Reagenz A, Reagenz B, Probenverdünnungsmittel (R6), Waschlösung (R2), Peroxidase-Substratpuffer (R8), Chromogen (R9) und Stopplösung (R10). Diese können in allen Chargen der TeSeE SAP Kits verwendet werden.

2-4 Vorbereitung der Reagenzien
Die Reagenzien aus der TeSeE SAP Combi Kits vor Gebrauch über einen Zeitraum von 30 min auf Raumtemperatur (18-30 °C) erwärmen lassen.

1 - Gebrauchsfertige Reagenzien
Die Reagenz A; die Reagenz B, die Reagenz C, die Negativkontrolle (R3), die Probenverdünnungslösung (R6) und die Stopplösung (R10) sind gebrauchsfertig.

Mikrotiterplatten (R1):
Vor dem Öffnen des Beutels, die Mikrotiterplatte in ihrer Schutzpackung mit das Trockenmittel auf Raumtemperatur (18-30 °C) erwärmen lassen, um eine Ansammlung von Kondenswasser in den Vertiefungen zu vermeiden. An der Schweißnaht öffnen, und die nicht gebrauchten Reihen sofort in die Verpackung zurückgeben.
Den Beutel nach Entfernen von Luft dicht verschließen und bei 2-8 °C aufbewahren.

2 - Herzustellende Reagenzien
Proteinase K:
Reagenz A ist der Verdünnungspuffer für die Proteinase K.
Die PK-Lösung ist auf folgende Weise herzustellen (4 µl Proteinase K in 1 ml Reagenz A) :

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

Exaktes Pipettieren ist essentiell. Reste aus der Pipettenspitze in Reagenz A durch mehrmaliges Ansaugen/Dispendieren ausspülen.
Nach der Herstellung die Lösung durch mehrmaliges Umdrehen des Probenröhrchens homogenisieren, bis eine gleichmäßig rötliche Lösung entstanden ist.

Waschlösung (R2):
Die Waschlösung R2 1 :10 mit destilliertem Wasser oder Aqua bidest. verdünnen (z.B. 100 ml Reagenz R2 in 900 ml destilliertem Wasser).

Positivkontrolle (R4):
Die Flasche mit der Positivkontrolle R4 behutsam auf die Arbeitsfläche klopfen, um jegliche an dem Gummistopfen hängende Substanz zu lösen. Die Flasche öffnen und den Inhalt in 4 ml Verdünnungslösung R6 auflösen. Die Flasche wieder verschließen und ca. 1 min stehen lassen, wobei der Inhalt gelegentlich behutsam durchmischt wird, um das Auflösen zu erleichtern.

Konjugat (R7):
Reagenz R7 im Verhältnis 1:10 in der frisch hergestellten Waschlösung verdünnen (z.B. 0,1 ml Reagenz R7 in 0,9 ml frisch hergestellter Waschlösung), und dabei beachten, dass für einen Streifen 1 ml gebrauchsfertiges Konjugat erforderlich und ausreichend ist. Behutsam durchmischen, den Einsatz eines Vortex®-Schüttlers vermeiden.

Enzymatische Entwicklungslösung (R8 + R9):
Reagenz R9 im Verhältnis 1:11 im Reagenz R8 verdünnen (z.B. 0,1 ml Reagenz R9 in 1 ml Reagenz R8), und dabei beachten, dass für einen Streifen 1,1 ml enzymatische Entwicklungslösung erforderlich und ausreichend ist. Behutsam durchmischen, den Einsatz eines Vortex®-Schüttlers vermeiden.

2-5 Lagerung, Haltbarkeit

Das TeSeE SAP Combi Kits bei 2-8 °C aufbewahren. Bei dieser Temperatur sind sämtliche Reagenzien bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatum haltbar (vor und nach dem Öffnen der Flaschen). Wird die rekonstituierte Proteinase-K-Lösung nach dem Verdünnen bei Raumtemperatur (18-30 °C) aufbewahrt, muß sie innerhalb von 6 h verbraucht werden.

Nach der Zubereitung haben die Reagenzien die folgende Haltbarkeit :

BEZEICHNUNG	ART DER REAGENZIEN	HALTBARKEIT
R1	Mikrotiterplatte in fest verschlossener Verpackung	1 Monat bei 2-8 °C
R2	Verdünnte Waschlösung	24 h bei Raumtemperatur (18-30 °C) 2 Wochen bei 2-8 °C
R4	Verdünnte Positivkontrolle	2 h bei Raumtemperatur (18-30 °C) 4 h bei 2-8 °C 6 Monate bei -20°C Es empfiehlt sich, die rekonstituierte Lösung in Aliquote zu je 0,5 ml aufzuteilen und diese umgehend bei -20°C zu lagern. Die Lösung kann max. dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden.
R7	Verdünnte Konjugatlösung (in verdünnter Waschlsg.)	8 h bei Raumtemperatur (18-30 °C)
R8 + R9	Entwicklungslösung	6 h bei Raumtemperatur (18-30 °C) unbedingt im Dunkeln lagern

2-6 Testdurchführung

Für die halbautomatische Durchführung des Reinigungsverfahrens siehe das Bedienungshandbuch für den TeSeE NSP.

Ablauf der manuellen Durchführung :

1. **Probenentnahme :**
   - Für Proben aus dem Bereich des Obex eine Menge von 350 ± 40 mg Nervengewebe entnehmen.
   - Für Proben aus den retropharyngealen Lymphknoten, eine Keramikperle mittlerer Größe (Ref.: 3551171) vor Zugabe der Probe in das Probenröhrchen geben. Eine Menge von 200 ± 20 mg Gewebe aus 2 - 3 unterschiedlichen Arealen des peripheren Gewebes oder der Lymphknoten entnehmen. Vor Zugabe der Proben in das Probenröhrchen das Gewebe in 2-3 kleinere Stücke schneiden.

Die Probenröhrchen fest verschließen und den Schritt des Zermahlens im Homogenisator (Ribolyser oder TeSeE Precess 24 oder TeSeE Precess 48 oder Precellys Evolution System) durchführen.
Anmerkung: Nach Schlussfolgerungen aus dem wissenschaftlichen Gutachten der EFSA zu Chronic Wasting Disease (CWD) (II), EFSA-Gremium für biologische Gefahren (BIOHAZ), EFSA Journal 2018; 16 (1): 5132, 59 pp., die aktuellen EURL-Richtlinien (TSE EU Referenz Labor Richtlinien zum Nachweis der Chronic Wasting Disease in Hirschartigen, ftp://ftp.izsto.it/EURL%20TSE/RAPID%20TESTS/Test%20protocols/) unterstützen die EFSA Empfehlungen zur parallelen Untersuchung von sowohl Obex- als auch Retropharyngeal-Lymphknoten zum Nachweis von CWD in Hirschartigen, um die Empfindlichkeit der Überwachung zu maximieren. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihr Nationales Referenzlabor.

Es ist zu beachten, dass in Deutschland beide Gewebe - Gehirn und Lymphknoten - einzeln untersucht werden müssen.

2. Zermahlen der Proben :

Anmerkung: Wenn Medium Beads zum Zermahlen der Proben verwendet werden, kann der TeSeE Precess 24 nicht eingesetzt werden, da es zu einem Flüssigkeitsaustritt kommen kann.

Die Probenröhrchen in den Aufsatz des Homogenisators setzen. Einen Schüttelzyklus mit folgenden Geräteeinstellungen durchführen :

	Obex Gewebe		Lymphknoten	
	Ribolyser	TeSeE Precess 48 TeSeE Precess 24 Precellys Evolution	Ribolyser	TeSeE Precess 48 Precellys Evolution
Zeit (sec.)	45	-	45	-
Geschwindigkeit	6.5	-	6.5	-
Schüttelzyklen	2	N/A	2	N/A
Programm	-	Programm 1 / TSE1	-	Programm 2 / TSE2

Zur Abkühlung des Homogenisators, sind zwischen den Schüttelzyklen 5 Minuten zu warten.
Wurden die Proben nicht gründlich genug zermahlen, können 1 oder 2 weitere Schüttelzyklen durchgeführt werden, wobei sichergestellt sein muss, dass die Temperatur der Probenröhrchen zwischen den Schüttelzyklen wieder auf Raumtemperatur (18-30°C) z.B. mit Hilfe von zerstoßenem Eis, sinkt.

3. Überführen der Probe :

Die Probenröhrchen aus dem Homogenisator entnehmen; das Homogenat vor dem Öffnen der Röhrchen durch Invertieren wieder in Suspension bringen.
Das Homogenat kann durch eine der nachfolgenden Methoden überführt werden :

- **Durch Verwendung der Kalibrationsspritze**
  250 µl mit der Kalibrationsspritze (Best.-Nr. 3551174 oder Best.-Nr. 12007909) entnehmen, wobei die Nadel in das Perlenbett einzutauchen ist, um zu verhindern, dass schlecht gemischte Gewebestücke entnommen werden.
  Von jeder Probe werden 250 µl in ein 2 ml-Mikroreagenzröhrchen vom Typ Eppendorf oder in eine Deepwell-Platte (Best.-Nr. 3590132) überführt.

- **Durch Verwendung der Filterplatte**
  Der Transfer und die Filtration werden separat voneinander durch Verwendung einer Filterplatte (Best.-Nr. 3551179) und einer Deepwell-Platte (Best.-Nr. 3590132) durch eine der beiden nachfolgenden Filtrationstechniken durchgeführt:

- Vakuum-Technik :
  Die Deepwell-Platte (Best.-Nr. 3590132) (sog. Masterplatte) in die untere Einheit des Vakuum-Manifolds setzen, den Deckel des Manifolds und anschließend die Filterplatte (Best.-Nr. 3551179) einsetzen. Mindestens 400 µl (≤ 1000 µl) mit einer 1000 µl Spitze entnehmen und in ein Well der Filterplatte (Best.-Nr. 3551179) überführen, dabei die ersten 6 Positionen (von A1 bis F1) freilassen. Die Filterplatte oben mit einer Plastikfolie verschließen. Die Vakuumpumpe (Best.-Nr. 3590350) auf 25,4 cm Hg (± 2.5%) einstellen. Die Vakuumpumpe anstellen und auf der Anzeige das korrekte Vakuum überprüfen; anschließend das Manifold-Ventil für 1 min ± 6 s öffnen. Das Ventil schließen, die Pumpe abstellen und das Vakuum im Manifold aufheben.

- Zentrifugations-Technik: :
  Mindestens 400 µl (≤ 1000 µl) mit einer 1000 µl Spitze entnehmen und in ein Well der Filterplatte (Best.-Nr. 3551179) überführen, die zuvor auf eine Deepwell-Platte gesetzt wurde (Best.-Nr. 359 0132) (sog. Masterplatte), dabei die ersten 6 Positionen (von A1 bis F1) freilassen. Die Filterplatte oben mit einer Plastikfolie verschließen.

Das komplette System (Filterplatte und Deepwell-Platte) für 1 min bei 500 g zentrifugieren. Es ist darauf zu achten, dass die Filterplatte fest in der Deepwell-Platte positioniert ist.
Hinweis : Die Zentrifuge muss dazu mit einem Deepwell-Rotor (Best.-Nr. 3590136); für die 5804R Eppendorf Zentrifuge (Best.-Nr. 3591396) ausgestattet sein.

Nach dem Filtrationsschritt die jeweilige Filterplatte verwerfen und für das manuelle Protokoll 250 µl der gefilterten Probe in eine weitere Deepwell-Platte (die Reinigungsplatte) überführen oder die Masterplatte direkt in den NSP stellen (siehe dazu das TeSeE NSP Handbuch).

Anmerkung: In diesem Stadium können sowohl die Probenröhrchen nach dem Homogenisieren als auch die Mikroreagenzröhrchen und Deepwell-Platte nach dem Probentransfer verschlossen wie folgt aufbewahrt werden :

	Bei Raumtemperatur (18-30 °C) für eine Dauer von 8 h	Bei 2-8 °C (im Eisbad oder im Kühlschrank) für eine Dauer von 15 h	Bei -20°C für 1 Jahr*
Probenröhrchen und Mikroreagenzröhrchen	Ja	Ja	Ja
Deepwell-Platte	Ja	Ja	Nein

* Gefrorene Proben müssen bei Raumtemperatur (18-30 °C) aufgetaut werden. Die Proben können höchstens dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Die Proben müssen vor Gebrauch stets durch Invertieren durchmischt werden.

4. PK-Aufbereitung :
250 µl (± 10%) der rekonstituierten Proteinase-K-Lösung (s. Abschnitt 2.4.) in jedes Mikroreagenzröhrchen bzw. in jedes Well der Reinigungsplatte verteilen. Das Zeitintervall für die Verteilung der rekonstituierten Proteinase-K-Lösung von der ersten bis zur letzten Probe darf 5 min nicht überschreiten. Umgehend die verschlossenen Röhrchen bzw. die mit Aluminiumfolie abgedichtete Deepwell-Platte durch mehrmaliges Invertieren (10x) durchmischen. Das Zeitintervall zwischen dem Durchmischen und dem Inkubieren bei 37°C darf 2 min nicht überschreiten.
Die Inkubation erfolgt bei 37 ± 2 °C in einem Heizblockinkubator für die Dauer von 10 ± 1 min
Hinweis: Wird eine Deepwell-Platte verwendet, muss der Heizblock mit einem entsprechenden Deepwell-Rack-Adaptor ausgestattet sein.

5. Ausfällen von PrP^{Sc} mit Reagenz B :
Die Mikroreagenzröhrchen bzw. die Deepwell-Platte aus dem Heizblockinkubator nehmen. Die Röhrchen öffnen und 250 µl (± 10%) Reagenz B in alle Röhrchen bzw. in alle Wells der Deepwell-Platte geben. Dieselbe Reihenfolge beim Verteilen einhalten wie unter Schritt 4. Das Zeitintervall zwischen der Entnahme aus dem Inkubator und dem Durchmischen darf 2 min nicht überschreiten. Das Durchmischen erfolgt unter denselben Bedingungen wie unter Schritt 4.

6. Konzentrierung von PrP^{Sc} (Zentrifugieren) :
Innerhalb von 30 min, nach Verteilen von Reagenz B und Durchmischen die Mikroreagenzröhrchen bzw. die Reinigungsplatte wie folgt zentrifugieren :

Zentrifugation	Mikroreagenzröhrchen		Deepwell-Platte
Geschwindigkeit (g)	20 000	15 000	2 000
Zeit (mm)	5	7	10
Temperatur (°C)	20	20	24

Hinweis : Für Deepwell-Platte 5 Minuten bei 37°C oder 10 min bei Raumtemperatur (18-30 °C) vorher Zentrifugieren warten.

7. Aufarbeitung des Niederschlages :

Den Überstand durch Invertieren der Mikroreagenzröhrchen über einem Abfallbehälter entfernen. Die Mikroreagenzröhrchen umgedreht für eine Dauer von 5 min auf saugfähiges Papier stellen und so trocknen.

Die Deepwell-Platte in einen DW40 Washer (Best.-Nr. 3590137) stellen. Das Programm „TSE DW» und die Anzahl an Streifen, die behandelt werden sollen, auswählen. Die Wells der Deepwell-Platte müssen im Anschluss an den DW40 Waschschritt durch Umdrehen auf saugfähiges Papier für eine Dauer von 5 min getrocknet werden.

25 µl (± 10%) Reagenz C in alle Mikroreagenzröhrchen oder in alle Wells der Deepwell- Platte geben. Das Zeitintervall zwischen dem Ende des Trocknungsvorgangs und der Zugabe von Reagenz C darf 10 min nicht überschreiten.

Umgehend für eine Dauer von 5 ± 1 min bei 100 ± 5 °C inkubieren. Das Zeitintervall zwischen der Zugabe von Reagenz C und dem Beginn der Inkubation darf 2 min nicht überschreiten. Die Deepwell-Platte während der Inkubation nicht verschließen.

Hinweis: Wird eine Deepwell-Platte verwendet, muss der Heizblock mit einem entsprechenden Deepwell-Rack-Adaptor ausgestattet sein.

Die Mikroreagenzröhrchen bzw. die Deepwell-Platte aus dem Inkubator nehmen; die Röhrchen mittels eines Mischgerätes vom Typ Vortex (5 ± 2 s).

Die Proben in Mikroreagenzröhrchen oder in Deepwell-Platte können für eine Dauer von 5 h bei 2-8 °C oder gefroren für eine Dauer von 72 h bei -20°C aufbewahrt werden. Eingefrorenen Proben müssen vor Weiterverwendung bei Raumtemperatur (18-30 °C) aufgetaut und anschließend erneut mittels Vortex (5 ± 2 s).

Die aufgereinigten Proben aus Schritt 2.6 müssen mit 125 µl (± 10%) Reagenz R6 verdünnt werden. Die verdünnte Probe unmittelbar vor dem Verteilen in die Platte (R1) mit einem Vortex- Schüttler (5 ± 2 s) durchmischen.

1. Den Ständer für die Mikrotiterplatte und die erforderliche Anzahl von Reihen (R1) aus der Schutzpackung entnehmen. Die nicht gebrauchten Reihen mit dem Trocknungsmittel zurück in die Verpackung der Mikrotiterplatte geben und diese fest verschließen.

2. Die Positivkontrolle (R4) gemäß 2.4.2. vorbereiten.

3. Für jede Testreihe und jede Platte entsprechend dem folgenden Schema,100 µl (± 10%) der Kontrollen/Proben in die Vertiefungen verteilen:
   - Vertiefung A1, B1, C1, D1 : Negativkontrolle (R3)
   - Vertiefung E1, F1 : Positivkontrolle (R4)
   - Vertiefung G1, H1, usw. : mit Reagenz (R6) verdünnte Probe

   Alle Proben werden in Einfachbestimmung untersucht.

4. Mit Klebefolie abdecken und für eine Dauer von 30 ± 2 min bei 37 ± 2 °C inkubieren.

5. Die Waschlösung (R2) vorbereiten.

6. Die Konjugatlösung vorbereiten (R7).

7. Die Klebefolie entfernen und 3 Waschzyklen durchführen.
   Optimale Waschbedingungen werden mit Bio-Rad Waschgeräten für Mikrotiterplatten vom Typ PW40, PW41 oder 1575 mit dem Programm TSE 3 erzielt.
   Die Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschzyklus nicht länger als 5 min stehen lassen. Vor dem nächsten Schritt durch Umdrehen auf saugfähigem Papier trocknen.

8. 100 µl (± 10%) Konjugatlösung (R7) in jede Vertiefung geben.

9. Mit Klebefolie abdecken und für eine Dauer von 30 ± 2 min bei 2-8 °C inkubieren.

10. Die enzymatische Entwicklungslösung (R8+R9) vorbereiten.

11. Die Klebefolie entfernen und 5 Waschzyklen unter denselben Bedingungen wie unter Schritt 7 beschrieben durchführen.
    Optimale Waschbedingungen werden mit Bio-Rad Waschgeräten für Mikrotiterplatten vom Typ PW40, PW41 oder 1575 mit dem Programm TSE 5 erzielt.
    Die Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschzyklus nicht länger als 5 min stehen lassen. Vor dem nächsten Schritt durch Umdrehen auf saugfähigem Papier trocknen.

12. 100 µl (± 10%) Entwicklungslösung (R8+R9) in jede Vertiefung geben und die Mikrotiterplatte im Dunkeln und bei Raumtemperatur (18-30 °C) für eine Dauer von 30 ± 2 min inkubieren. Während dieser Inkubation keine Klebefolie verwenden.

13. 100 µl (± 10%) Stopplösung (R10) in jede Vertiefung geben, und zwar nach demselben Schema und derselben Verteilungsgeschwindigkeit wie bei der Entwicklungslösung.

14. Den Boden der Mikrotiterplatte gründlich abwischen und die optische Dichte bei 450 nm - 620 nm (bichromatischer Modus) innerhalb von 30 min nach dem Stoppen der Reaktion bestimmen (die Reihe muß vor dem Ablesen ständig vor Licht geschützt bleiben).

Microplate washer parameters

NAME: TSE 3

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	1*8 (PW40/1575) 2*8 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0,3	800	2,5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	3	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0,3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NAME: TSE 5

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	1*8 (PW40/1575) 2*8 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0,3	800	2,5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	5	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0,3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

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

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

2-7 Berechnung und Auswertung der Ergebnisse

1) Berechnung der mittleren Extinktion (DE) der negativen

$\overline{OD\ R3}$ = Mittelwert der 4 Extinktionswerte der Vertiefungen R3 (OD = optische Dichte)

2) Berechnung des Grenzwerts

2.1 Proben von Rindern und kleinen Wiederkäuern.

Zum Mittelwert der R3 0,210 hinzufügen, um den Grenzwert zu erhalten.

Beispiel :

$\overline{OD\ R3}$ = 0,020

Grenzwert = 0,020 + 0,210 = 0,230

2.2 Proben von Hirschartigen

Zum Mittelwert der R3 0,110 hinzufügen, um den Grenzwert zu erhalten.

Beispiel :

$\overline{OD\ R3}$ = 0,020

Grenzwert = 0,020 + 0,110 = 0,130

3) Bedingungen für die Testvalidierung

- Negative Kontrollen (R3) :

a) Validierung der einzelnen Werte der negativen Kontrollen :

Der Wert jeder einzelnen negativen Kontrolle muss niedriger als 0,150 Extinktionseinheiten liegen. Allerdings kann höchstens ein einzelner abweichender Wert eliminiert werden, wenn sein Wert gleich oder höher ist als 0,150 Extinktionseinheiten.

Der Test muß wiederholt werden, wenn mehr als ein einzelner Wert für die negativen Kontrollen außerhalb dieses oben angegebenen Grenzwertes liegt.

b) Homogenität der Werte für die negativen Kontrollen :

Aus den verbleibenden einzelnen Werten für die negativen Kontrollen wird der Durchschnittswert berechnet.

Einzelne Werte größer + 40% im Vergleich zum Durchschnittswert der Werte ($\overline{OD\ R3}$ + 40%) müssen eliminiert werden.

- Falls ein einzelner Wert in a) eliminiert wurde, so kann ein weiterer Wert in b) eliminiert werden.
- Falls kein Wert für die negativen Kontrollen in a) eliminiert wurde, so dürfen höchstens zwei Werte in b) eliminiert werden.

Der Test muß wiederholt werden, wenn mehr als zwei Werte für die negativen Kontrollen eliminiert wurden [Kriterium a)+b)].

- Positive Kontrolle (R4) :

Der Mittelwert der optischen Dichten der beiden positiven Kontrollen (OD R4) muß höher oder gleich 1,0 sein. Der Test muß in jedem Fall wiederholt werden, wenn der Mittelwert der positiven Kontrollen unter diesem Grenzwert liegt.

4) Auswertung der Ergebnisse

Proben mit einer optischen Dichte unterhalb des Grenzwertes gelten als negativ im Sinne des TeSeE SAP Kit Instruktionen.

Allerdings sind Ergebnisse, die knapp unterhalb des Grenzwertes liegen (Grenzwert minus 10%) mit Vorsicht auszuwerten, und die entsprechenden Proben sollten, ausgehend vom ursprünglichen Homogenat im Doppelansatz erneut getestet werden.

Proben mit einer optischen Dichte oberhalb oder gleich dem Grenzwert gelten als ursprünglich reaktiv im Sinne des TeSeE SAP Kit Instruktionen und sollten, ausgehend vom ursprünglichen Homogenat im Doppelansatz erneut getestet werden.

Nach Wiederholung des Tests gilt eine Probe als positiv im Sinne des TeSeE SAP Kit Instruktionen,

wenn mindestens eine der beiden Messungen positiv ist (größer oder gleich dem Grenzwert).
Die Probe gilt als negativ im Sinne des TeSeE SAP Kit Instruktionen, wenn die beiden Werte niedriger als der Grenzwert sind.
Im Doppelansatz getestete Proben, die im Sinne des TeSeE SAP Kit Instruktionen als negativ gelten, für die aber einer der 2 Werte nahe an dem Grenzwert liegt (Grenzwert minus 10%), sind mit Vorsicht auszuwerten.

2-8 Verfahrensgrenzen

Beim Homogenisierungsschritt der Proben (2.6.2) können Schwierigkeiten auftreten, wenn getrocknete oder aus peripherem Gewebe entnommene Proben verwendet werden. Bei dieser Art von Proben muss der Homogenisierungsschritt ggf. mehrmals wiederholt werden.

Ein negatives Ergebnis bedeutet, dass die getestete Probe keine durch das TeSeE SAP Combi Kits nachweisbaren PrP^{Sc} enthält. Da sehr niedrige Konzentrationen an PrP^{Sc} allerdings dem Nachweis entgehen können, schließt ein solches negatives Ergebnis die Möglichkeit einer Infektion nicht aus.
Jede Probe, welche ein reproduzierbares, positives Ergebnis gemäß den Auswertekriterien des Tests aufweist, muß im jeweiligen Nationalen Refernzlabor für TSEs oder in Ausnahmafällen im Referenzlabor der EU bestätigt werden.

3 - ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN

- Destilliertes oder vollständig entionisiertes Wasser (ultrapur).
- 20 000 ppm (Endkonzentration) und 1M Natriumhydroxid (Endkonzentration).
- Saugfähiges Papier.
- Einmalhandschuhe.
- Schutzbrille oder Schutzmaske mit Visier.

Reinigungsschritt :

- 2 ml Mikro-Probenröhrchen vom Typ Eppendorf aus Polypropylen mit Verschlußkappen und einem entsprechenden Röhrchenständer.
- Automatisch oder halbautomatisch einstellbare Pipetten, mit denen sich Volumen zwischen 20 µl und 500 µl verteilen lassen.
- Gewebehomogenisator : Ribolyser oder TeSeE Precess 24 oder TeSeE Precess 48 oder Precellys Evolution System.*
- Zentrifuge*, passend für die 2 ml-Röhrchen.
- Einen Inkubator* für 2 ml-Röhrchen mit einem auf 37 ± 2 °C eingestellten Thermostat und einen Inkubator* für 2 ml-Röhrchen mit einem auf 100 ± 5 °C eingestellten Thermostat.

Für die halbautomatische Reinigung der Probe: System TeSeE NSP.

Nachweisschritt :

- Automatisch oder halbautomatisch einstellbare Pipetten, mit denen sich Volumen zwischen 50 µl, 100 µl , 200 µl und 1000 µl verteilen lassen.
- Messzylinder zu 10 ml, 20 ml und 100 ml.
- Behälter für infektiöse Abfälle
- Inkubator für Mikrotiterplatten mit einem auf 37 ± 2 °C eingestellten Thermostat*.
- Kühlzelle mit 2-8 °C.
- Automatisches und halbautomatisches Waschsystem für Mikortiterplatten*.
- Ablesegerät für Mikrotiterplatten (mit Filtern zu 450 nm und 620 nm ausgestattet)*.
- Mikrotiterplatten-System für die Automatisierung der einzelnen Abschnitte des Testprotokolls. Die Funktionsweise des Systems bei der Abarbeitung des Tests muß mit den Bedingungen des Testprotokolls übereinstimmen.*

** Bitte kontaktieren Sie Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung um eine Liste der verfügbaren Geräte zu erhalten.*

4 - VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Qualität der Ergebnisse hängt von der Einhaltung der folgenden Prinzipien der Guten Laborpraxis ab:

- Reagenzien bei 2-8 °C lagern.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Die rekonstituierte und bei Raumtemperatur (18-30 °C) aufbewahrte Proteinase K im Zeitraum von 6 h verwenden.
- Reagenzien von TeSeE SAP Kits mit unterschiedlichen Chargen-Nr. nicht für denselben Testansatz mischen, mit Ausnahme der generischen Bestandteile : Waschlösung (R2), Probenverdünnungsmittel (R6), Peroxidase-Substratpuffer (R8), Chromogen (R9), Stopplösung (R10), Probenröhrchen, Reagenz A und Reagenz B.
- Waschlösung (R2), Probenverdünnungsmittel (R6), Peroxidase-Substratpuffer (R8), Chromogen (R9), Stopplösung (R10) und Probenröhrchen können mit allen Kits der TeSeE Produktlinie verwendet werden (TeSeE, TeSeE SAP und TeSeE Sheep/Goat Tests).
- Reagenzien vor Gebrauch über einen Zeitraum von 30 min auf Raumtemperatur (18-30 °C) erwärmen lassen.
- Reagenzien sorgfältig ansetzen und dabei jegliche Verunreinigung vermeiden.
- Den Test nicht in Gegenwart von reaktiven Dämpfen (Säuren, Basen, Aldehyden) oder Staub, die die Enzymaktivität des Konjugats beeinträchtigen könnten, durchführen.
- Ausschließlich Probenröhrchen aus Polypropylen verwenden.
- Gründlich gewaschene und in destilliertem Wasser gereinigte Artikel aus Glas oder vorzugsweise Einmalmaterialien verwenden.
- Die Mikrotiterplatte zwischen dem Abschluß eines Waschvorgangs und der Verteilung der nächsten Reagenzien nicht länger als 5 min trocknen lassen.
- Die Enzymreaktion ist gegen Metalle und Metallionen jeglicher Art sehr empfindlich. Dementsprechend dürfen die verschiedenen Lösungen, die das Konjugat oder das Substrat enthalten, nicht in Kontakt mit Metallelementen gebracht werden.
- Die Entwicklungslösung (Substratpuffer und Farbbildner) müssen farblos sein. Tritt wenige Minuten nach der Herstellung der Entwicklungslösung eine Farbreaktion auf, bedeutet dies, dass das Reagenz nicht verwendet werden darf und durch ein neues Reagenz ersetzt werden muß. Die Entwicklungslösung sollte vorzugsweise in Plastikbehältern zum Einmalgebrauch oder in, zuvor in 1 N HCl gewaschenen und in destilliertem Wasser gereinigten und getrockneten Materialien oder Glasartikeln zubereitet werden. Diese Lösung unbedingt im Dunkeln aufbewahren.
- Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden.
- Das Waschen der Vertiefungen ist ein wesentlicher Schritt des Verfahrens: die empfohlene Anzahl von Waschzyklen einhalten und sicherstellen, dass die Vertiefungen zunächst vollständig gefüllt und anschließend vollständig geleert werden. Unkorrektes Waschen kann zu unkorrekten Ergebnissen führen.
- Für die Verteilung des Konjugats und der Entwicklungslösung niemals denselben Behälter und dieselbe Pipette verwenden.

5 - HYGIENE- UND SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

Die Maßnahmen zur biologischen Sicherheit, die Hygiene- und Sicherheitsvorkehrungen und die Regeln der Guten Laborpraxis müssen den jeweils geltenden Richtlinien der nationalen Behörden entsprechen.

- Sämtliche Reagenzien des Kits sind zum Gebrauch für die "*in vitro*" Diagnostik bestimmt.
- Bei der Handhabung der Reagenzien und der Proben Einmalhandschuhe tragen und anschließend die Hände gründlich waschen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Behälter aus Polypropylen verwenden, um Verletzungen durch zerbrochenes Glas vorzubeugen.
- Sämtliche Materialien, die in direkten Kontakt mit den Proben und den Waschlösungen kommen, gelten als kontaminiert.
- Das Verspritzen von Proben oder von Proben-haltigen Lösungen vermeiden.

- Kontaminierte Arbeitsflächen müssen mit 20 000 ppm Natriumhypochlorit-Lösung gereinigt werden. Handelt es sich bei der kontaminierenden Flüssigkeit um eine Säure, müssen die Arbeitsflächen zunächst mit Natriumhydroxid neutralisiert werden, bevor Bleiche verwendet wird. Arbeitsflächen sind mit destilliertem Wasser zu reinigen, mit Äthanol zu trocknen und mit saugfähigem Papier abzuwischen. Die für die Säuberung verwendeten Materialien müssen in einem speziellen Abfallbehälter als kontaminierte Abfälle entsorgt werden.
- Proben, Arbeitsmaterialien und kontaminierte Produkte sind zu entsorgen, nachdem sie wie folgt dekontaminiert wurden:
  - entweder durch Einweichen in 1 M (Endkonzentration) Natriumhydroxid für eine Dauer von 1 h bei Raumtemperatur (18-30 °C),
  - oder durch Einweichen in 20 000 ppm Natriumhypochlorit-Lösung für eine Dauer von 1 h bei Raumtemperatur (18-30 °C),
  - oder durch Behandlung im Autoklaven bei mindestens 134°C für eine Dauer von mindestens 18 min und mit einem Druck von 3 bar.

Anmerkung: Lösungen, die Natriumhypochlorit-Lösung oder Reagenz B enthalten, nie im Autoklaven behandeln.

- Sämtliche Aktivitäten im Zusammenhang mit Screeninguntersuchungen für die übertragbare spongiforme Enzephalopathie (TSE) unterliegen gesetzlichen Bestimmungen und sind in einem Labor mit einem isolierten Bereich mit begrenztem und kontrolliertem Zugang durchzuführen, der ausschließlich für diese Aktivitäten bestimmt ist. Für die Sicherheit des Bedienungspersonals sind Laborkittel, Überschuhe, Handschuhe, Schutzmaske mit Visier oder eine einfache Schutzmaske mit Sicherheitsglas zu tragen.
- Das Bedienungspersonal muß besonders im Hinblick auf die von den Krankheitserregern von TSE oder Prionen ausgehenden Gefahren sowie die anerkannten Verfahren zur Dekontaminierung von unkonventionellen Krankheitserregern geschult sein.
- Jeglichen Kontakt des Substratpuffers, des Farbbildners und der Stopplösung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- Sämtliche Waschlösungen, Waschrückstände oder andere Flüssigkeiten, die biologische Proben enthalten, vor deren Entsorgung neutralisieren und / oder im Autoklaven behandeln
- Bezüglich Empfehlungen zu Risiken und Vorsichtsmaßnahmen in Zusammenhang mit einigen Chemikalien in diesem Testkit sind das/die Piktogramm(e) auf den Etiketten und die Angaben am Ende der Gebrauchsanweisung zu beachten. Das Sicherheitsdatenblatt ist auf www.bio-rad.com erhältlich.

6 - LITERATUR

1. J. GRASSI, E. COMOY, S. SIMON, C. CREMINON, Y. FROBERT, S. TRAPMANN, H. SCHIMMEL, S.A.C. HAWKINS, J. MOYNAGH, JP DESLYS, G.A.H. WELLS (2001) Rapid Test for the preclinical postmorten diagnosis of BSE in central nervous system tissue. The Veterinary Record (149) 577-582.

2. JP. DESLYS, E. COMOY, S. HAWKINS, S. SIMON, H. SCHIMMEL, G. WELLS, J. GRASSI, J. MOYNAGH (2001) Screening slaughtered cattle for BSE - Nature (409) 476-477.

3. E. COMOY (2000) Contribution au développement d'un test de diagnostic post mortem des bovins atteints d'Encephalopathie Spongiforme Bovine. Thèse de doctorat vétérinaire (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort).

4. EUROPEAN COMMISSION Directorate General DG XXIV (1999). Preliminary Report : The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible Spongiform Encephalopathy in bovines.

5. JP. DESLYS (1999)
Prevention du risque d'Encephalopathie Spongiforme Subaiguë Trans-missible.
La Revue du Praticien (49) 966-970.

6. R. KNIGHT (1999)
The relationship between new variant Creutzfeldt-Jakob Disease and Bovine Spongiform Encephalopathy - Vox sanguinis (76) 203-208.

7. D. DORMONT (1997)
Les Agents Transmissibles Non Conventionnels ou prions - Virologie (1) 11-22

8. F. HILLA, M. DESBRULAIS, S. JOINER, KCL SIDLE, I. GOWLAND, J. COLLINGE, LJ. DOEY, P. LANTOS (1997)
The same prion strain causes CJ disease and BSE - Nature (389) 448-450.

9. CI. LASMEZAS, JP. DESLYS, O. ROBAIN, D. DORMONT (1997)
L'agent secret des maladies à prions - La Recherche 46-53.

10. AM. HAYWOOD (1997)
Transmissible Spongiform Encephalopathies.
The New England Journal of Medecine (337-25) 1821-1828.

11. J. COLLINGE, KC. SIDLE, J. MEADS, J. IRONSIDE, AF. HILL (1996)
Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of «new variant» CJD.
Nature (383) 685-690.

12. RG. WILL, J. IRONSIDE, M. ZEIDLER, SN. COUSENS, K. ESTIBEIRO, A. ALPEROVITCH, S. POSER, M. POCCHIARI, A. HOFMAN, PG. SMITH (1996)
A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the U.K. - Lancet (347) 911-925.

13. SB. PRUSINER & AL (1993)
Immunologic and molecular biologic studies of prion protein in Bovine Spongiform Encephalopathy.
The Journal of Infectious Diseases (167) 602-613

Probenspritze

REF 3551175

PROBENENTNAHMEMETHODE FUR DIE Bio-Rad TSE-SCREENINGTESTS

INHALTSVERZEICHNIS

1 - ALLGEMEINE INFORMATION
- 1-1 Probenentnahme im Schlachthof
- 1-2 Weiterverarbeitung der Proben im Labor

2 - Bio-Rad PROBENSPRITZE

3 - FUR DEN TEST BENOTIGTE PROBENMENGE

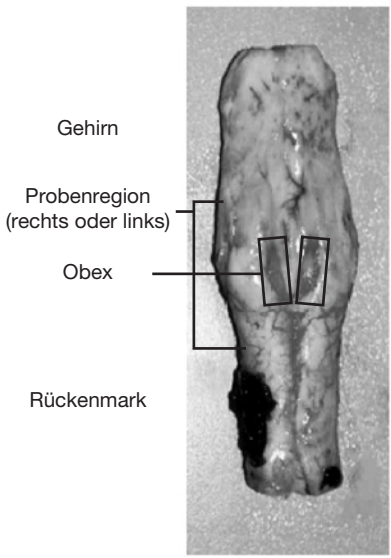
4 - BEDIENUNGSANLEITUNG

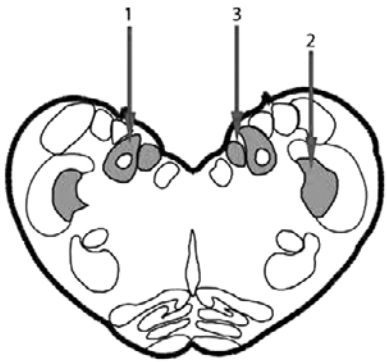
5 - VORSICHTSMASSNAHMEN/HINWEISE

6 - GESUNDHEITS- & SICHERHEITSINSTRUKTIONEN

1 - ALLGEMEINE INFORMATION

Die Bio-Rad TSE-Sreeningtests werden mit einer Gewebeprobe aus dem Zentralnervensystem (ZNS) von 350 ± 40 mg durchgeführt. Die spezifische anatomische Region zum Nachweis von PrP^{Sc} bei infizierten Tieren ist der Hirnstamm, noch präziser im Bereich des Nervus vagus-Kerns in der Obex- Region. In diesem Bereich des Hirnstamms ist die Konzentration von PrP^{Sc} am höchsten.



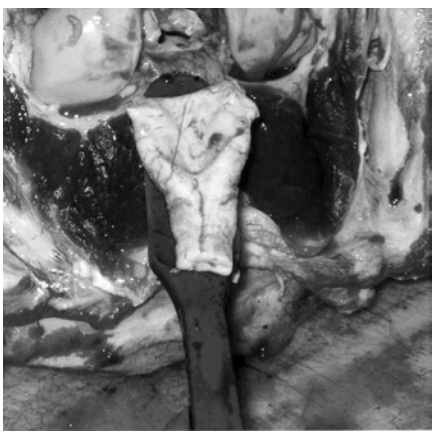


Querschnitt durch den Hirnstamm auf der Ebene des Obex, in dem die wichtigsten Zielstellen für eine histopathologische und immunhistochemische Diagnostik von BSE (Nucleus solitarius [1] und Trigeminuskern V [2]) und von Scrapie (dorsaler Vaguskern [3]) eingezeichnet sind.

(Quelle: OIE - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals)

1-1 Probenentnahme im Schlachthof

Der Hirnstamm kann mit einem geeigneten Instrument oder Probenentnahmelöffel einfach und schnell entnommen werden. Die Entnahme erfolgt über das Foramen occipitale ohne Öffnung der Schädelhöhle.



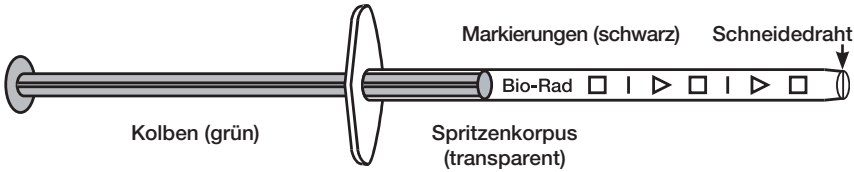
Probenentnahme mit dem Bio-Rad-Probenentnahmelöffel

1-2 Weiterverarbeitung der Proben im Labor
Die gesamte Hirnstammprobe wird an das Testlabor eingeschickt. Dabei ist sicherzustellen, dass die entsprechenden Maßnahmen zur Gewährleistung der biologischen Sicherheit eingehalten werden, die von den Behörden des betreffenden Landes empfohlen werden. Im Labor wird die entsprechende Menge Gehirnmaterial aus der Obex-Region geschnitten (Skalpell, Klinge, ...) oder mit der **Bio-Rad-Probenspritze (Bestell-Nr.: 3551175)** entnommen. Mit dieser Probenspritze kann die notwendige Menge aus dem richtigen anatomischen Bereich schnell und sicher und ohne Risiko von Schnittverletzungen entnommen werden.

Im Folgenden wird das richtige Vorgehen bei der Probenentnahme aus der Obex-Region mit der Bio-Rad-Probenspritze beschrieben, bei der eine Gewebeschädigung vermieden wird.

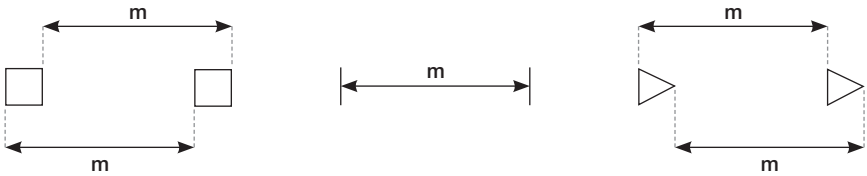
2 - Bio-Rad-PROBENSPRITZE

Die Bio-Rad-Probenspritze besteht aus einem grünen Kolben und einem transparenten Spritzenkorpus. Der Spritzenkorpus ist mit einer Reihe geometrischer Formen markiert. (□ ▷ I)



3 - FUR DEN TEST BENOTIGTE PROBENMENGE

Die Probenmenge sollte den Raum zwischen zwei Symbolen derselben Form einnehmen; dies entspricht einer Menge (m) von 350 +/- 40 mg.



4 - BEDIENUNGSANLEITUNG

- Probenspritze zur Hand nehmen und den grünen Kolben ungefähr 1 cm aus seiner Ausgangsposition herausziehen und danach wieder in die Ausgangsposition drücken.

- Den Hirnstamm fest in eine Hand nehmen und dabei einen Einmalschutz (Plastiktüte, Handschuh usw.) verwenden, um eine mögliche Kreuzkontamination zwischen den Proben zu vermeiden. Das Ende des Hirnstamms sollte zugänglich bleiben.

- Mit der anderen Hand das offene Ende der Probenspritze auf die rechte oder linke Seite am Ende des Hirnstamms aufsetzen.

Anmerkung: Nach der Probenentnahme muss ein vollständiger halber Querschnitt des Hirnstamms mit intakter Obex-Region verfügbar bleiben, damit ein Bestätigungstest durchgeführt werden kann.

- Den Spritzenkorpus langsam in den Hirnstamm einführen und dabei den grünen Kolben festhalten (verhältnismäßig zum Gehirnstamm).

Anmerkung: Bei der Entnahme der Probe aus der Obex-Region darauf achten, dass der Spritzenkorpus auf der ausgewählten Seite des Hirnstamms bleibt.

- Die Einführung des Spritzenkorpus wird beendet, wenn das vordere Ende des Spritzenkorpus die obere Grenze der Probenzone erreicht hat.

- Den Probenkern durch eine komplette Umdrehung des Spritzenkorpus abschneiden.

- Die Probenspritze langsam aus dem Hirnstamm herausziehen und darauf achten, dass die benachbarten Gewebe nicht beschädigt werden. Der restliche Hirnstamm kann in das ursprüngliche Probenbehältnis zurückgelegt werden.

- Die entnommene Probe auf Luftlöcher überprüfen. Nötigenfalls kann die Probe komprimiert werden, indem das vordere Ende des Spritzenkorpus verschlossen und der grüne Kolben solange heruntergedrückt wird, bis die Luftlöcher verschwunden sind. Dabei ist sicherzustellen, dass das Gewebe, das sich direkt an der Öffnung des Spritzenkorpus befindet, erhalten bleibt.

- **Das vordere Ende des Spritzenkorpus festhalten und den grünen Kolben bis zum nächsten Symbol bewegen.**

- Überprüfen, dass die Probe mindestens eine “m” entsprechende Zone einnimmt, wie dies im vorigen Abschnitt dieser Anleitung beschrieben wurde (für den Test benötigte Probenmenge).

- Von einem Homogenisierungsröhrchen den Deckel abnehmen. Den grünen Kolben der Probenspritze vorsichtig bis zum nächsten identischen Symbol herunterdrücken, um sicherzustellen, dass die richtige Gewebemenge (“m”) in das Homogenisierungsröhrchen gegeben wird. Dabei muss der Kolben wie unter “Für den Test benötigte Probenmenge” angegeben bis zur entsprechenden Position des nächsten Symbols gedrückt werden.

- Den Probenkern abschneiden, in dem das vordere Ende der Probenspritze gegen den Innenrand des Homogenisierungsröhrchens gedrückt wird.

- Der nicht verwendete Teil des Probenkerns kann aufbewahrt werden, indem die Probenspritze in das ursprüngliche Behältnis mit dem restlichen Teil des Hirnstamms gegeben wird.

5 - VORSICHTSMASSNAHMEN/HINWEISE

Wie für jedes Pipettiergerät empfiehlt Bio-Rad ein regelmäßiges Monitoring der Anwender, die die Probenspritze verwenden, anhand einer statistisch repräsentativen Anzahl von Proben, um sicherzustellen, dass das Gewicht der Proben im richtigen Bereich liegt.

Die Probenspritzen sind zur Einmalverwendung bestimmt und nach Gebrauch zu entsorgen, um eine Kreuzkontamination der Proben zu vermeiden.
Die Probe muss mit allen gebotenen Vorsichtsmaßnahmen entnommen werden, um das Kontaminationsrisiko für die Anwender so gering wie möglich zu halten.
Gebrauchte Spritzen sind nach Dekontamination zu entsorgen (siehe unter Gesundheits- & Sicherheitsinstruktionen).
Falls der Probenkern trotz korrekter Durchführung des Entnahmeverfahrens nicht den gesamten Spritzenkorpus ausfüllt, wird geraten, die Probe zu wiegen.

6 - GESUNDHEITS- & SICHERHEITSINSTRUKTIONEN

Die Hygienebedingungen, die Maßnahmen zur Sicherstellung der biologischen Sicherheit und die GLP-(Good Laboratory Practice)-Regeln müssen den gesetzlichen Bestimmungen des betreffenden Landes entsprechen.
Die Probenspritze ist nur zu Verwendung bei der *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.

Bei der Handhabung von Reagenzien und Proben Einmalhandschuhe tragen und nach der Handhabung Hände gründlich waschen.

Alle Materialien, die in direkten Kontakt mit den Proben gekommen sind, müssen als kontaminiert angesehen werden.

Kontaminierte Flächen müssen mit einer 20 000 ppm Natriumhypochlorit-Lösung gereinigt werden. Wenn die kontaminierende Flüssigkeit eine Säure ist, müssen kontaminierte Flächen zuerst mit Natriumhydroxid neutralisiert werden, bevor Natriumhypochlorit verwendet wird. Die Flächen müssen mit destilliertem Wasser gespült, mit Ethanol getrocknet und mit saugfähigem Papier abgewischt werden. Das zur Reinigung verwendete Material muss in ein für kontaminierten Abfall vorgesehenes Behältnis entsorgt werden.

Proben, Verbrauchsmaterialien und kontaminierte Produkte müssen nach der Dekontamination durch eine der folgenden Methoden entsorgt werden:

- durch Einlegen in 1 M Natriumhydroxid (Endkonzentration) für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-30 °C).
- durch Einlegen in 20 000 ppm Natriumhypochlorit-Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-30 °C).
- durch Autoklavieren bei einer Temperatur von mindestens 134°C für mindestens 18 min bei einem Druck von 3 bar.
- **Anmerkung: Bleichmittelhaltige Lösungen dürfen niemals autoklaviert werden.**

Alle Verfahren bei Screeningtests auf Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE) unterliegen örtlichen Sicherheitsbestimmungen und müssen in einem isolierten, räumlich abgegrenzten und Zugangskontrollen unterliegenden Labor durchgeführt werden, das ausschließlich für diese Tests verwendet wird. Um die Sicherheit der Anwender sicherzustellen, sind ein Labormantel oder Arbeitsoverall, Überschuhe, Handschuhe (2 Paar), eine Schutzmaske mit Visier oder eine einfache Schutzmaske mit Sicherheitsbrille erforderlich.
Die Anwender müssen eine spezielle Schulung über die Risiken durch TSE-Agenzien oder -prionen und die validierten Dekontaminationsmethoden für nicht konventionelle Agenzien erhalten. Die Maßnahmen zur Gewährleistung der biologischen Sicherheit müssen den gesetzlichen Richtlinien des betreffenden Landes entsprechen.

(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 • 本產品包含人/動物成分，請小心處理。

(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. Käsitseda 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 sudėtinių dalių. Elgtis atsargiai.

(MT) • Dan il-prodott fih komponenti umani jew tal-annimali. 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. Manevrați-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.

H226 - H314 - H317 - H334 - H412
P210 - P261 - P280
P305+P351+P338 - P302+P352
P333+P313 - P501

(BG)
опасно
Запалими течност и пари. Причинява тежки изгаряния на кожата и сериозно увреждане на очите. Може да причини алергична кожна реакция. 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. При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ. Да се избягва изпускане в околната среда. Изхвърлете съдържанието/контейнера в съответствие с местните/регионалните/националните/международните разпоредби.

(CN)
危险
易燃液体和蒸气. 引起严重的皮肤灼伤和眼睛损伤. 可能引起皮肤过敏性反应. 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。如戴隐型眼镜并可方便地取出，取出隐型眼镜。继续冲洗。 如皮肤沾染：用大量肥皂和水清洗。. 如发生皮肤刺激或皮疹：求医/就诊。. 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. 引起嚴重的皮膚灼傷和眼睛損傷 可能引起皮膚過敏性反應. 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，取出隱型眼鏡。繼續沖洗。如皮膚沾染：用大量肥皂和水清洗。. 如發生皮膚刺激或皮疹：求醫/就診。. 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。

(CZ)
Nebezpečí
Hořlavá kapalina a páry. Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Může vyvolat alergickou kožní reakci. 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. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla. Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Obsah/nádobu likvidujte v souladu s místními/regionálními/národními/mezinárodními předpisy.

(DE)
Gefahr
Flüssigkeit und Dampf entzündbar. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Kann allergische Hautreaktionen verursachen. 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. Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Entsorgung des Inhalts / des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen/ internationalen Vorschriften.

(DK)
Fare
Brandfarlig væske og damp. Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader. Kan forårsage allergisk hudreaktion. 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/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning. VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt sæbe og vand. Ved hudirritation eller udslet: Søg lægehjælp. Undgå udledning til miljøet. Bortskaffelse af indholdet/beholderen i henhold til de lokale/regionale/nationale/internationale forskrifter.

(EE)
Ettevaatust
Tuleohtlik vedelik ja aur. Põhjustab rasket nahasöövitust ja silmakahjustusi. Võib põhjustada allergilist nahareaktsiooni. Sissehingamisel võib põhjustada allergia- või astma sümptomeid või hingamisraskusi. Ohtlik veeorganismidele, pikaajaline toime.
Hoida eemal soojusallikast/sädemetest/leekidest/kuumadest pindadest. Mitte suitsetada. Vältida tolmu/suitsu/gaasi/udu/auru/pihustatud aine sissehingamist. Kanda kaitsekindaid/kaitserõivastust/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.

Nahaärrituse või _obe korral: pöörduda arsti poole. Vältida sattumist keskkonda. Sisu/konteineri käitlus vastavuses kohalike/regionaalsete/rahvuslike/rahvusvaheliste nõuetega.

(EN)
Danger
Flammable liquid and vapour. Causes severe skin burns and eye damage. May cause an allergic skin reaction. 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. If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. Avoid release to the environment. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

(ES)
Peligro
Líquidos y vapores inflamables. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. 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 aíslen 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. En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. Evitar su liberación al medio ambiente. Eliminar el contenido o el recipiente conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional.

(FI)
Vaara
Syttyvä neste ja höyry. Voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion. Voi aiheuttaa hengitettynä allergia- tai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Haitallista vesieliöille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia.
Suojaa lämmöltä/kipinöiltä/avotulelta/kuumilta pinnoilta. Tupakointi kielletty. Vältä pölyn/savun/kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta. 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. Jos ilmenee ihoärsytystä tai ihottumaa: Hakeudu lääkäriin. Vältettävä päästämistä ympäristöön. Säilytä säiliö(t) noudattaen paikallisia/alueellisia/kansallisia/kansainvälisiä määräyksiä.

(FR)
Danger
Liquide et vapeurs inflammables. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Peut provoquer une allergie 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. En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin. Éviter le rejet dans l'environnement. Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

(GR)
Κίνδυνος
Υγρό και ατμοί εύφλεκτα. Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση. 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/εκνεφώματα. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για ταμάτια/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. Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτεγιατρό. Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον. Απορρίψτε τα περιεχόμενα/δοχείο σύμφωνα με τους τοπικούς/εθνικούς/διεθνείς κανονισμούς.

(HR)
Opasnost
Zapaljiva tekućina i para. Uzrokuje teške opekline kože i ozljede oka. Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Ako se udiše može izazvati simptome alergije ili astme ili poteškoće s disanjem Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima.
Čuvati odvojeno od topline/iskre/otvorenog plamena/vrućih površina. – Ne pušiti. Izbjegavati udisanje prašine/dima/plina/magle/pare/aerosola. Nositi zaštitne rukavice/zaštitnu odijelo/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. U slučaju nadražaja ili osipa na koži: zatražiti savjet/pomoć liječnika. Izbjegavati ispuštanje u okoliš. Odložite sadržaje /spremnike u skladu s lokalnim/regionalnim/nacionalni/međunarodnim odredbama.

(HU)
Veszély
Tűzveszélyes folyadék és gőz. Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis. Allergiás bőrreakciót válthat ki. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.
Hőtől/szikrától/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. Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni. 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 ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Può provocare una reazione allergica 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. In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. 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. 重篤な皮膚の薬傷及び眼の損傷 アレルギー性皮膚反応を起こすおそれ. 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. 長期継続的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/スプレー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。. 皮膚刺激又は発しん(疹)が生じた場合: 医師の診断／手当てを受けること。. 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. 피부에 심한 화상과 눈에 손상을 일으킴 알레르기성 피부 반응을 일으킬 수 있음. 흡입시 알레르기성 반응, 천식 또는 호흡 곤란을 일으킬 수 있음. 장기적인 영향에 의해 수생생물에게 유해함.
열·스파크·화염·고열로부터 멀리하시오 – 금연. (본진·흄·가스·미스트·증기·스프레이)의 흡입을 피하시오. (보호장갑·보호의·보안경·안면보호구)를(을) 착용하시오. 눈에 묻으면 몇 분간 물로 조심해서 씻으시오.가능하면콘택트렌즈를 제거하시오. 계속 씻으시오. 피부에 묻으면 다량의 비누와 물로 씻으시오. 피부자극성 또는 홍반이 나타나면 의학적인 조치·조언을 구하시오. 환경으로 배출하지 마시오. 현지/지역/국가/국제규정에 따라서 내용물/용기 노출.

(LT)
Pavojinga
Degūs skystis ir garai. Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis. Gali sukelti alerginę odos reakciją. Įkvėpus gali sukelti alerginę reakciją, astmos simptomus arba apsunkinti 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. Jeigu sudirginama oda arba ją išberia: kreiptis į gydytoją. Saugoti, kad nepatektų į aplinką. Turinį/talpą išpilti (išmesti) - šalinti pagal vietines / regionines / nacionalines / tarptautines taisykles.

(NL)
Gevaar
Ontvlambare vloeistof en damp. Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. Kan een allergische huidreactie veroorzaken. 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/spuitnevel 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. Bij huidirritatie of uitslag: een arts raadplegen. Voorkom lozing in het milieu. De inhoud en de verpakking verwerken volgens de plaatselijke/regionale/nationale/internationale voorschriften.

(NO)
Fare
Brennbar væske og damp. Forårsaker alvorlige hudforbrenninger og øyeskader. Kan forårsake allergiske hudreaksjoner. 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/sprøytetåke/damp/aerosol. Bruk vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. VED KONTAKT MED ØYNENE: 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. Ved hudirritasjon eller -utslett: Kontakt / tilkall lege. 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 oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu . Może powodować reakcję alergiczną skóry. Może 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. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. Unikać uwolnienia do środowiska. Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z przepisami miejscowymi / regionalnymi / narodowymi / międzynarodowymi.

(PT)
Perigo
Líquido e vapor inflamáveis. Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Pode provocar uma reacção alérgica 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 faísca/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. Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. Evitar a libertação para o ambiente. Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com a legislação local/regional/nacional/internacional.

(RO)
Pericol
Lichid şi vapori inflamabili. Provoacă arsuri grave ale pielii şi lezarea ochilor. Poate provoca o reacţie alergică a pielii. Poate provoca simptome de alergie sau astm sau dificultăţi de respiraţie în caz de inhalare. Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung.
A se păstra departe de surse de căldură/scântei/flăcări deschise/suprafeţe încinse. Fumatul interzis. Evitaţi să inspiraţi praful/fumul/gazul/ceaţa/vaporii/spray-ul. Purtaţi mănuşi de protecţie/îmbrăcăminte de protecţie/echipament de protecţie a ochilor/ chipament de protecţie a feţei. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: clătiţi cu atenţie cu apă timp de mai multe minute. Scoateţi lentilele de contact, dacă este cazul şi dacă acest lucru se poate face cu uşurinţă. Continuaţi să clătiţi. ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: spălaţi cu multă apă şi săpun. În caz de iritare a pielii sau de erupţie cutanată: consultaţi medicul. Evitaţi dispersarea în mediu. Aruncaţi conţinutul/containerul în acord cu regulamentele locale/regionale/naţionale/internaţionale.

(SE)
Fara
Brandfarlig vätska och ånga. Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon. Kan orsaka allergisk hudreaktion. 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. Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp. Undvik utsläpp till miljön. Innehållet / behållaren avfallshanteras enligt lokala / regionala / nationella / internationella föreskrifter.

SI)
Nevarno
Vnetljiva tekočina in hlapi. Povzroča hude opekline kože in poškodbe oči. Lahko povzroči alergijski odziv 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/meglice/hlapov/razpršila. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito 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. Če nastopi draženje kože ali se pojavi izpuščaj: poiščite zdravniško pomoč/oskrbo. Preprečiti sproščanje v okolje. Vsebino/vsebnik odstranite v skladu z lokalnimi/regionalnimi/narodnimi/mednarodnimi predpisi.

(SK)
Nebezpečenstvo
Horľavá kvapalina a pary. Provoacă arsuri grave ale pielii şi lezarea ochilor. Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. 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. Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvoria vyrážky: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia. Zneškodnenie obsahu/obalu v súlade s miestnymi/oblastnými/národnými/medzinárodnými nariadeniami.

BIO-RAD ist eine Marke von Bio-Rad Laboratories, Inc.
TESEE, PRECESS 24 und PRECESS 48 sind in einigen Ländern eine Marke von Bio-Rad Europa, GmbH.
Alle hier verwendeten Warenzeichen sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

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

2020/06