

TeSeE™ REINIGUNGS-KIT (192 Tests) **Best.-Nr. 355-1144**
NACHWEIS-KIT (192 Tests) - Schnelles Protokoll **Best.-Nr. 355-1194**

KITS MIT REAGENZIEN FÜR DIE *IN VITRO* REINIGUNG UND DEN *IN VITRO* NACHWEIS VON PrP^{Sc}

Die Deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17c TierSG 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.

Gebrauchsinformation

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.

BIO-RAD

INHALTSVERZEICHNIS

- 1 - ALLGEMEINE INFORMATION
- 2 - TeSeE™ REINIGUNGS-KIT
 - 2 - 1 Prinzip der Reinigung von PrP^{Sc}
 - 2 - 2 Proben
 - 2 - 3 Zusammensetzung des TeSeE™ Reinigungs-Kits
 - 2 - 4 Vorbereitung der Reagenzien
 - 2 - 5 Lagerung, Haltbarkeit
 - 2 - 6 Testdurchführung
 - 2 - 7 Verfahrensgrenzen des Reinigungsprotokolls
- 3 - TeSeE™ NACHWEIS-KIT SCHNELLES PROTOKOLL
 - 3 - 1 Prinzip der Bestimmung von PrP^{Sc} mittels EIA
 - 3 - 2 Proben
 - 3 - 3 Zusammensetzung des TeSeE™ Nachweis-Kit Schnelles Protokoll
 - 3 - 4 Vorbereitung der Reagenzien
 - 3 - 5 Lagerung, Haltbarkeit
 - 3 - 6 Vorbereitung der Proben für die Bestimmung von PrP^{Sc} mittels EIA
 - 3 - 7 Testdurchführung
 - 3 - 8 Berechnung und Auswertung der Ergebnisse
 - 3 - 9 Verfahrensgrenzen
- 4 - ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN
- 5 - VORSICHTSMASSNAHMEN
- 6 - HYGIENE- UND SICHERHEITSVORKEHRUNGEN
- 7 - 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 Rotwild und Elchen (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 anomalen 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 Rotwild und Elchen mit CWD und bei Patienten mit vCJD wurde anomales 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.

Die Bestimmung umfaßt die folgenden Reaktionsschritte:

○ **Reinigung von PrP^{Sc} (192 Tests)**

Dieser Schritt erfolgt unter Verwendung folgender Reagenzien und folgenden Zubehörs:

- | | |
|---|--|
| - TeSeE™ Reinigungs-Kit (192 Tests) | Best.-Nr. 355-1144 |
| - Spritze und Nadel für die Kalibration (x 200)
oder Filterplatte (x 50) | Best.-Nr. 355-1174
Best.-Nr. 355-1179 |
| - Deepwell-Platte (x 50) | Best.-Nr. 359-0132 |
| - Medium beads (x 2000) | Best.-Nr. 355-1171 |

○ **Nachweis von PrP^{Sc} (192 Tests)**

Dieser Schritt erfolgt unter Verwendung folgender Reagenzien:

- | | |
|---|--------------------|
| - TeSeE™ Nachweis-Kit (192 Tests) - Schnelles Protokoll | Best.-Nr. 355-1194 |
|---|--------------------|

TeSeE™ REINIGUNGS-KIT

192 TESTS

355-1144

KIT MIT REAGENZIEN FÜR DIE *IN VITRO* REINIGUNG VON PrP^{Sc}

Gebrauchsinformation

BIO-RAD

2-1 PRINZIP DER REINIGUNG VON PrP^{Sc}

Mit den Reagenzien des TeSeE™ Reinigungs-Kits ist die Reinigung, die Konzentrierung und das Solubilisieren von PrP^{Sc} aus Proben von infizierten Tieren möglich.

Die Behandlung der Proben umfasst die folgenden Schritte:

- Homogenisieren der Proben
- Behandlung der Proben mit Proteinase K
- Konzentrierung des PrP^{Sc} durch Ausfällung
- Solubilisierung des PrP^{Sc} für den enzym-immunologische Assay mit den Reagenzien aus dem TeSeE™ Nachweis-Kit Schnelles Protokoll (Best.-Nr. 355-1194).

2-2 PROBEN

Rinder: die Reinigung von PrP^{Sc} erfolgt an Hand von Proben aus dem Zentralnervensystem (ZNS). Der Probenentnahmefläß für BSE (Best.-Nr. 355-1130) 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. 355-1175) 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 Probenentnahme wird auf das Protokoll zur Probenentnahme verwiesen.

Kleine Wiederkäuer und Rotwild/Elchen: die Reinigung von PrP^{Sc} erfolgt an Hand von Proben aus dem Zentralnervensystem oder aus peripherem Gewebe (Lymphknoten, Milz,...). Der Probenentnahmefläß für Kleine Wiederkäuer (Best.-Nr. 355-1184) 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 (Ileum), Augenlid) können ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet werden.

Die Proben werden bei +2°C bis +8°C gelagert, wenn die Aufreinigung innerhalb von 24 Stunden 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 DES TeSeE™ REINIGUNGS-KITS

BEZEICHNUNG	ART DER REAGENZIEN	MENGE	LAGERUNG
Probenröhrchen	Probenröhrchen mit Keramikperlen in einer Pufferlösung Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	2 Beutel (2 x 96 Probenröhrchen)	+2°C bis +25°C
Reagenz A	Denaturierungspuffer	1 Flasche (55 ml)	+2°C bis +8°C
Reagenz B	Fällungspuffer Farbstoff: Bromphenolblau	1 Flasche (55 ml)	+2°C bis +8°C
Reagenz C	Solubilisierungspuffer Farbstoff: Malachitgrün	1 Flasche (7 ml)	+2°C bis +8°C
PK	Proteinase K Farbstoff: Phenolrot	1 Flasche (0,5 ml)	+2°C bis +8°C

Bei dem Reagenz A, dem Reagenz B und den Probenröhrchen handelt es sich um generische Komponenten. Diese können in allen Chargen des TeSeE™ Reinigungs-Kits verwendet werden.

2-4 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Mit Ausnahme von Proteinase K sind sämtliche in dem TeSeE™ Reinigungs-Kit enthaltenen Reagenzien gebrauchsfertig. 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/Dispensieren ausspülen.

Nach der Herstellung die Lösung durch mehrmaliges Umdrehen des Probenröhrchens homogenisieren, bis eine gleichmäßig rötliche Lösung entstanden ist.

2-5 LAGERUNG, HALTBARKEIT

Das TeSeE™ Reinigungs-Kit (Best.-Nr. 355-1144) bei +2°C bis +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°C bis +30°C) aufbewahrt, muß sie innerhalb von 6 Std. verbraucht werden.

2-6 TESTDURCHFÜHRUNG

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

Ablauf der manuellen Durchführung:

1. Probenentnahme:

Für die Probenentnahme aus peripherem Gewebe (Mandeln, Dünndarm, Lymphknoten, Augenlid, Milz,...) : eine Keramikperle mittlerere Größe ("Medium bead", Ref. : 355-1171) vor Zugabe der Probe in das Probenröhrchen geben.

Eine Masse von 350 mg ± 40 mg Nervengewebe bevorzugt aus dem Hirnstamm im Bereich des Obex entnehmen oder 200 mg ± 20 mg des peripheren Gewebes.

Die Proben in Probenröhrchen geben, fest verschließen und den Schritt des Zermahlens im Homogenisator (Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ oder TeSeE™ PRECESS 48™ Systeme) durchführen.

2. Zermahlen der Proben:

Die Probenröhrchen in den Aufsatz des Homogenisators (Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ oder TeSeE™ PRECESS 48™ Systeme) setzen. Einen Schüttelzyklus mit folgenden Geräteeinstellungen durchführen:

	Ribolyser®		TeSeE™ PRECESS 24™ oder 48™	
	Nervengewebe	Peripheres Lymphgewebe	Nervengewebe	Peripheres Lymphgewebe
Zeit (Sek.)	45	2 x 45*	-	-
Geschwindigkeit	6.5	6.5	-	-
Programm	-	-	Programm 1	Programm 2

* Zwischen 2 Schüttelzyklen, 5 Minuten warten.

Würden die Proben nicht gründlich genug zermahlen, können 1 oder 2 weitere Schüttelzyklen durchgeführt werden, wobei sicher gestellt sein muß, daß die Temperatur der Probenröhrchen zwischen den Zyklen wieder auf Raumtemperatur (+18°C bis +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. 355-1174) entnehmen, wobei die Nadel in das Perlenbett einzutuchen 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. 359-0132) überführt.

• Durch Verwendung der Filterplatte:

Der Transfer und die Filtration werden separat voneinander durch Verwendung einer Filterplatte (Best.-Nr. 355-1179) und einer Deepwell-Platte (Best.-Nr. 359-0132) durch eine der beiden nachfolgenden Filtrationstechniken durchgeführt:

- Vakuum-Technik:

Die Deepwell-Platte (Best.-Nr. 359-0132) (sog. Masterplatte) in die untere Einheit des Vakuum-Manifolds setzen, den Deckel des Manifolds und anschließend die Filterplatte (Best.-Nr. 355-1179) einsetzen. Mindestens 400 µl (≤ 1000 µl) mit einer 1000 µl Spitze entnehmen und in ein Well der Filterplatte (Best.-Nr. 355-1179) überführen, dabei die ersten 6 Positionen (von A1 bis F1) freilassen. Die Filterplatte oben mit einer Plastikfolie verschließen. Die Vakuumpumpe (Best.-Nr. 359-0350) 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 Minute ± 6 Sek. 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. 355-1179) 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. 359-0136); für die 5804R Eppendorf Zentrifuge (Best.-Nr. 359-1396) 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°C bis +30°C) für eine Dauer von 8 Stunden	Bei +2°C bis +8°C (im Eisbad oder im Kühlschrank) für eine Dauer von 15 Stunden	Bei -20°C für 1 Jahr*
Probenröhrchen und Mikroreagenzröhrchen	Ja	Ja	Ja
Deepwell-Platte	Ja	Ja	Nein

* Gefrorene Proben müssen bei Raumtemperatur (+18°C bis +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 Minuten nicht überschreiten. Die Inkubation erfolgt bei 37°C ± 2°C in einem Heizblockinkubator für die Dauer von 10 ± 1 Min. Hinweis:

Wird eine Deepwell-Platte verwendet, muss der Heizblock mit dem entsprechenden Deepwell-Rack-Adaptor (Best.-Nr. 90 134) 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 Minuten, 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	4

Hinweis:

Für Deepwell-Platte 5 Minuten bei 37°C oder 10 Minuten bei Raumtemperatur (+18°C bis +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. 359-0137) 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 Waschschrift durch Umdrehen auf saugfähiges Papier für eine Dauer von 5 Min. getrocknet werden.

25 µl ($\pm 10\%$) 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 $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 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 dem entsprechenden Deepwell-Rack-Adaptor (Best.-Nr. 90 134) ausgestattet sein.

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

Die Proben in Mikroreagenzröhrchen oder in Deepwell-Platte können für eine Dauer von 5 Stunden bei $+2^{\circ}\text{C}$ bis $+8^{\circ}\text{C}$ oder gefroren für eine Dauer von 72 Stunden bei -20°C aufbewahrt werden. Eingefrorenen Proben müssen vor Weiterverwendung bei Raumtemperatur ($+18^{\circ}\text{C}$ bis $+30^{\circ}\text{C}$) aufgetaut und anschließend erneut mittels Vortex (5 Sek. ± 2 Sek.).

Das genaue Verfahren für den Nachweistest bitte der Packungsbeilage im TeSeE™ Nachweis-Kit Schnelles Protokoll (Best.-Nr. 355-1194) entnehmen.

2-7 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.

TeSeE™ NACHWEIS-KIT - Schnelles Protokoll

192 TESTS

355-1194

**KIT MIT REAGENZIEN FÜR DEN *IN VITRO* NACHWEIS VON PrP^{Sc}
NACH AUFREINIGUNG**

Gebrauchsinformation

BIO-RAD

3-1 PRINZIP DER BESTIMMUNG VON PrP^{Sc} MITTELS EIA

Bei dem TeSeE™ Nachweis-Kit Schnelles Protokoll 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.

Die Bestimmung umfasst folgende Reaktionsschritte:

1. Verteilung der negativen (R3) und positiven (R4) Kontrollen und der, mit den Reagenzien aus dem TeSeE™ Reinigungs-Kit (Best.-Nr. 355-1144) vorbereiteten Proben in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Diese Verteilung kann durch Sichtkontrolle überprüft werden, denn der Farbunterschied zwischen einer leeren Vertiefung und einer Vertiefung mit Probe ist deutlich erkennbar.
2. Inkubation.
3. Waschen, dann Zugabe des Peroxidase-markierten Antikörpers. Diese Verteilung kann ebenfalls aufgrund des Farbunterschiedes zwischen einer leeren Vertiefung und einer Vertiefung mit Konjugatlösung einer Sichtkontrolle unterzogen werden.
4. Inkubation.
5. Waschen, dann Entwickeln der enzymatischen Aktivität der Festphase durch Zugabe von Substrat.
6. Stoppen der Enzymaktivität, Bestimmung der Extinktion bei 450 nm - 620 nm (bichromatischer Modus) und Auswertung der Ergebnisse.

3-2 PROBEN

Der Test kann nur an Proben durchgeführt werden, die aus den entnommenen Geweben stammen welche mit den Reagenzien aus dem TeSeE™ Reinigungs-Kit (Best.-Nr. 355-1144) unter Beachtung der Gebrauchsinformation vorbereitet wurden.

Die gereinigten Proben müssen mit Reagenz R6 aus dem TeSeE™ Nachweis-Kit Schnelles Protokoll verdünnt werden.

3-3 ZUSAMMENSETZUNG DES TeSeE™ NACHWEIS-KITS

BEZEICHNUNG	ART DER REAGENZIEN	MENGE
R1	Mikrotiterplatte: 12 Streifen mit 8 mit einem monoklonalen Anti-PrP-Antikörper beschichteten Vertiefungen	2 Platten
R2	Waschlösung: Tris-NaCl-Puffer pH 7,4 in 10-facher Konzentrierung Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,01%)	1 Flasche (250 ml)
R3	Negativkontrolle: PBS-Puffer pH 7,2, mit BSA supplementiert. Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	1 Flasche (4 ml)
R4	Positivkontrolle: PBS-Puffer pH 7,4, mit nicht-infektiösen synthetischen Peptiden versetzt. Lyophilisiert. Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	1 Flasche
R6	Probenverdünnungsmittel: PBS-Puffer pH 7,2, mit BSA und Phenolrot versetzt. Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	1 Flasche (35 ml)
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)
R8	Peroxidase-Substratpuffer: Lösung aus Zitronensäure und Natriumacetat pH 4,0 mit 0,015% H ₂ O ₂ und 4% Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 Flasche (60 ml)
R9	Chromogen: Tetramethylbenzidinlösung (TMB)	1 Flasche (5 ml)
R10	Stopplösung: Schwefelsäure, 1N	1 Flasche (28 ml)
	Klebefolien	8

Bei den nachfolgenden Reagenzien handelt es sich um generische Komponenten: Probenverdünnungsmittel (R6), Waschlösung (R2), Peroxidase-Substratpuffer (R8), Chromogen (R9) und Stopplösung (R10). Diese können in allen Chargen des TeSeE™ Nachweis-Kits Schnelles Protokoll verwendet werden.

3-4 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Die Reagenzien aus dem TeSeE™ Nachweis-Kit Schnelles Protokoll vor Gebrauch über einen Zeitraum von 30 Min. auf Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) erwärmen lassen.

1- Gebrauchsfertige Reagenzien

Mikrotiterplatten (R1):

Vor dem Öffnen des Beutels, die Mikrotiterplatte in ihrer Schutzpackung mit das Trockenmittel auf Raumtemperatur (+18°C bis +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°C bis +8°C aufbewahren.

Die Negativkontrolle (R3), die Probenverdünnungslösung (R6) und die Stopplösung (R10) sind gebrauchsfertig.

2- Herzustellende Reagenzien

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.

3-5 LAGERUNG, HALTBARKEIT

Das Kit bei +2°C bis +8°C aufbewahren; bei dieser Temperatur sind sämtliche Reagenzien bis zu dem auf dem Kit angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Nach der Zubereitung haben die Reagenzien die folgende Haltbarkeit:

BEZEICHNUNG	ART DER REAGENZIEN	HALTBARKEIT
R1	Mikrotiterplatte in fest verschlossener Verpackung	1 Monat bei +2°C bis +8°C
R2	Verdünnte Waschlösung	24 Stunden bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) 2 Wochen bei +2°C bis +8°C
R4	Verdünnte Positivkontrolle	2 Stunden bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) 4 Stunden bei +2°C bis +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 Stunden bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C)
R8 + R9	Entwicklungslösung	6 Stunden bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) unbedingt im Dunkeln lagern

3-6 VORBEREITUNG DER PROBEN FÜR DIE BESTIMMUNG VON PrP^{Sc} MITTELS EIA

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 Sek. ± 2 Sek.) durchmischen.

3-7 TESTDURCHFÜHRUNG

TeSeE™ Nachweis-Kit - Schnelles Protokoll (Best.-Nr. 355-1194) Testdurchführung

Ablauf der manuellen Durchführung:

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 3.4.2. 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 ProbeAlle Proben werden in Einfachbestimmung untersucht.
4. Mit Klebefolie abdecken und für eine Dauer von 30 Min. ± 2 Min. bei 37°C ± 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 Min. ± 2 Min. bei +2°C bis +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°C bis +30°C) für eine Dauer von 30 Min. ± 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).

Waschparameter für Mikrofilterplatten

NAME: TSE 3

EDIT mode function	RATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CKCS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Ni-OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Ni-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	WT 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	RATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CKCS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Ni-OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Ni-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	WT 0 (PW40/1575) 5 (PW41)	5	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	.	.
Method 2	.	.	.	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0,3	1	.	1	0	.	.	.

PLATTENNAME: 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

3-8 BERECHNUNG UND AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

1) Berechnung der mittleren Extinktion (DE) der negativen Kontrollen:

OD R3 = Mittelwert der 4 Extinktionswerte der Vertiefungen R3 (OD = optische Dichte)

2) Berechnung des Grenzwerts:

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

Beispiel:

OD R3 = 0,020

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

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 ($\overline{\text{OD R3}} + 40\%$) 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™ Nachweis-Kits Schnelles Protokoll.

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™ Nachweis-Kits Schnelles Protokoll und sollten, ausgehend vom ursprünglichen Homogenat im Doppelansatz erneut getestet werden.

Nach Wiederholung des Tests gilt eine Probe als positiv im Sinne des TeSeE™ Nachweis-Kits Schnelles Protokoll, wenn mindestens eine der beiden Messungen positiv ist (größer oder gleich dem Grenzwert).

Die Probe gilt als negativ im Sinne des TeSeE™ Nachweis-Kits Schnelles Protokoll, wenn die beiden Werte niedriger als der Grenzwert sind.

Im Doppelansatz getestete Proben, die im Sinne des TeSeE™ Nachweis-Kits Schnelles Protokoll als negativ gelten, für die aber einer der 2 Werte nahe an dem Grenzwert liegt (Grenzwert minus 10%), sind mit Vorsicht auszuwerten.

3-9 VERFAHRENSGRENZEN

Ein negatives Ergebnis bedeutet, daß die getestete Probe keine durch das TeSeE™ Nachweis-Kit Schnelles Protokoll 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 Referenzlabor für TSEs oder in Ausnahmefällen im Referenzlabor der EU bestätigt werden.

4 - 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 Verschußkappen und einem entsprechenden Röhrchenständer.
 - Automatisch oder halbautomatisch einstellbare Pipetten, mit denen sich Volumen zwischen 20 µl und 500 µl verteilen lassen.
 - Gewebehomogenisator: Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ oder TeSeE™ PRECESS 48™.*
 - Zentrifuge*, passend für die 2 ml-Röhrchen.
 - Einen Inkubator* für 2 ml-Röhrchen mit einem auf 37°C ± 2°C eingestellten Thermostat und einen Inkubator* für 2 ml-Röhrchen mit einem auf 100°C ± 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°C ± 2°C eingestellten Thermostat*.
- Kühlzelle mit +2°C bis +8°C.
- Automatisches und halbautomatisches Waschsysteem für Mikrotiterplatten*.
- 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.

5 - VORSICHTSMASSNAHMEN

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

- Reagenzien bei +2°C bis +8°C lagern.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Die rekonstituierte und bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) aufbewahrte Proteinase K im Zeitraum von 6 Stunden verwenden.
- Reagenzien von 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™ und TeSeE™ sheep/goat).
- Reagenzien vor Gebrauch über einen Zeitraum von 30 Min. auf Raumtemperatur (+18°C bis +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 Minuten 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.

6 - 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°C bis +30°C),
 - oder durch Einweichen in 20 000 ppm Natriumhypochlorit-Lösung für eine Dauer von 1 h bei Raumtemperatur (+18°C bis +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
- Reagenz B gilt als Gefahrensubstanz, das gemäß der Europäischen Gesetzgebung als "Gesundheitsschädlich" (> 25% Alkohol) klassifiziert wird.
- Reagenzien, die 0,1 % ProClin™ 300 enthalten, werden gemäß der Europäischen Gesetzgebung als "Reizend" klassifiziert.



Xn
(Alkohol > 25%)
(0,1% ProClin™ 300)

R : 10-22-37/38-41-43-67 Brennbar. Gefahr bei Verschlucken. Reizt Atemwege und Haut. Gefahr schwerwiegender Augenverletzungen. Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich. Die Einatmung von Dämpfen kann zu Benommenheit und Schwindel führen.

S : 7/9-13-26-28-37/39-46 Behälter fest verschlossen halten und an einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Nicht in der Nähe von Nahrungsmitteln, Getränken oder Futtermitteln aufbewahren. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser ausspülen und den Arzt aufsuchen. Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser. Angemessene Schutzkleidung, Handschuhe und Augenschutz / Gesichtsschutz tragen. Bei Verschlucken sofort den Arzt aufsuchen und ihm den Behälter oder das Symbol zeigen.

7 - 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 postmortem 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 Medicine (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

**PROBENENTNAHMEMETHODE FÜR DIE BIO-RAD
TSE-SCREENINGTESTS (PLATELIA® UND TeSeE™ SCHNELLES
PROTOKOLL)**

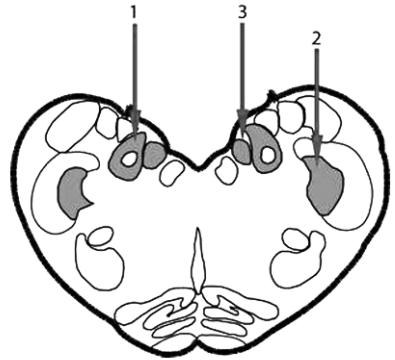
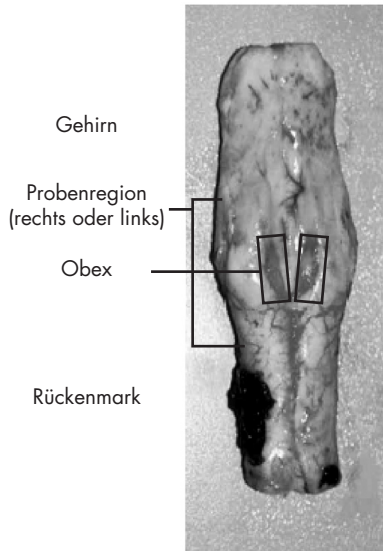
Bitte beachten Sie, dass in Deutschland bei Tätigkeiten mit Transmissibler Spongiformer Enzephalopathie (TSE) die Empfehlungen des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) zu beachten sind. Die Schutzmaßnahmen des Beschlusses 603 können von den Vorgaben dieser Gebrauchsinformation abweichen.

INHALTSVERZEICHNIS

- 1 - ALLGEMEINE INFORMATION
 - 1 - 1 Probenentnahme im Schlachthof
 - 1 - 2 Weiterverarbeitung der Proben im Labor
- 2 - BIO-RAD PROBENSPRITZE
- 3 - FÜR DEN TEST BENÖTIGTE PROBENMENGE
- 4 - BEDIENUNGSANLEITUNG
- 5 - VORSICHTSMAßNAHMEN/HINWEISE
- 6 - GESUNDHEITS- & SICHERHEITSINSTRUKTIONEN

1 - ALLGEMEINE INFORMATION

Die Bio-Rad TSE-Screeningtests 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 immunohistochemische Diagnostik von BSE (Nucleus solitarius [1] und Trigeminskern V [2]) und von Scrapie (dorsaler Vagus Kern [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 Probenentnahmeföbel einfach und schnell entnommen werden. Die Entnahme erfolgt über das Foramen occipitale ohne Öffnung der Schädelhöhle.



Probenentnahme mit dem Bio-Rad-Probenentnahmeföbel

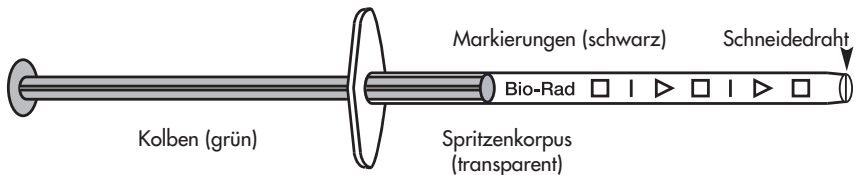
1 - 2 Weiterverarbeitung der Proben im Labor

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 (Skalpelli, Klinge, ...) oder mit der **Bio-Rad-Probenspritze (Bestell-Nr.: 355-1175)** 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.

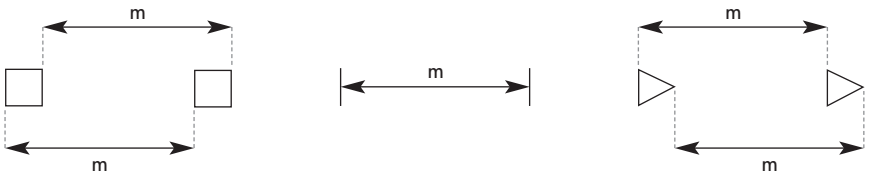
2 - BIO-RAD-PROBENSPRITZE

Die Bio-Rad-Probenspritze besteht aus einem grünen Kolben und einem transparenten Spritzenkorpus. Der Spritzenkorpus ist mit einer Reihe geometrischer Formen markiert. (\square \triangleright |)



3 - FÜR DEN TEST BENÖTIGTE PROBENMENGE

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



4 - BEDIENUNGSANLEITUNG

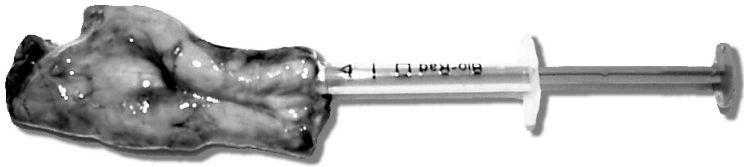
- Probenspritze zur Hand nehmen und den grünen Kolben ungefähr 1 cm aus seiner Ausgangsposition herausziehen und danach wieder in die Ausgangsposition drücken.
- Den Hirnstamm fest in eine Hand nehmen und dabei einen Einmalschutz (Plastiktüte, Handschuh usw.) verwenden, um eine mögliche Kreuzkontamination 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, indem 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°C bis +30°C).
 - durch Einlegen in 20 000 ppm Natriumhypochlorit-Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C).
 - durch Autoklavieren bei einer Temperatur von mindestens 134°C für mindestens 18 Minuten 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.

Group Headquarters

Bio-Rad Laboratories
2000 Alfred Nobel Drive
Hercules California 94547
Phone: (510) 741-1000
Toll-Free Phone:
1-(800) 424-6723
Fax: (510) 741-5800

Subsidiaries of Bio-Rad Laboratories:

Australia

Bio-Rad Laboratories Pty., Ltd.
PO Box 210 Regents Park
Block Y, Unit 1
Regents Park Industrial Estate
393 Park Road
Regents Park, New South Wales
2143
Phone: 02 9914 2800
Toll Free: 1800-224 354 (within
Australia only)
Fax: 02 9914 2889
email: sales_australia@bio-rad.com

Austria

Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H.
Hummelgasse 88/3-6,
A-1130 Wien
Phone: (01) 877 89 01
Fax: (01) 876 56 29

Belgium

Bio-Rad Laboratories S.A.-N.V.
Begoniastraat 5
B-9810 Nazareth EKE
Phone: 09-385 55 11
Toll-Free Phone: 0800/97032
Fax: 09-385 65 54
email: techsupport@bio-rad.com

Brazil

Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda
Av. Padre Antônio José dos Santos,
449 / 5º andar
Brooklin - São Paulo - SP
CEP.: 04563-011
Brazil
Phone: (55) 11 5044 5699
Fax: (55) 11 5543 4383
Praia de Botafogo
440 / 3º andar
Botafogo - Rio de Janeiro - RJ
CEP: 22250-040
Phone: (55) 21 3237 9400
Fax: (55) 21 2527 3099

Canada

Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd.
5671 McAdam Road
Mississauga, Ontario L4Z 1N9
Phone: (905) 712-2771
Toll-Free Phone: 1-(800) 268-0213
Fax: (905) 712-2990

Czech Republic

Bio-Rad s.r.o.
nad ostrovem 1119/7
147 00, Praha 4
Czech Republic
Phone: 420 242 430 532
Fax: 420 242 431 642
email: bio-rad@bio-rad.cz

People's Republic of China

HuiZhong Bio-Rad Technologies Ltd.
Beijing Office
14 Zhi Chun Road, Hai Dian District
Beijing 100 008
Phone: 86-10-62051850
and 86-10-6204662 ext 3401-06
Fax: 86-10-62051876

Bio-Rad Technologies (Shanghai) Ltd.
10/F Ascendas Building,
333 Tian Yao Qiao Road,
Shanghai, 200030
Phone: 86-21-6305-2255
Fax: 86-21-5396-4775

Denmark

Bio-Rad Laboratories
Generatorvej 8 C
2730 Herlev
Phone: 44 52 10 00
Fax: 44 52 10 01
email: nordic_helpdesk@bio-rad.com

Finland

Bio-Rad Laboratories
Pihatörmä 1A
Fin-02240 Espoo
Phone: 09 804 22 00
Fax: 09 804 22 00
email: nordic_helpdesk@bio-rad.com

France

Bio-Rad S.A.
3 Boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette
Phone: 01 47 95 60 00
Fax: 01 47 95 61 81

Germany

Bio-Rad Laboratories GmbH
Heidemannstraße 164
D-80939 München
Postfach 45 01 33
D-80901 München
Phone: 49 89 318 84-0
Fax: 49 89 318 84-123

Greece

Bio-Rad Laboratories EPE
24 Mesogion Ave. (Athens Tower)
155 27 Ampelokipi - Athens
Phone: 0030 210 7774396 -
7774345
Fax: 0030 210 7774376

Hong Kong

Bio-Rad Pacific Ltd.
Unit 1101, 11/F,
DCH Commercial Center,
25 Westlands, Quarry Bay,
Hong Kong
Phone : 852-2789-3300
Fax : 852-2789-1257

Hungary

Bio-Rad Hungary Ltd.
Tuzolto u. 59.
H-1094 Budapest
Phone: (361) 455 8800
Fax: (361) 455 8809
e-mail: biorad@bio-rad.hu

India

Bio-Rad Laboratories (India) Pvt. Ltd.
B&B-1, Enkay Towers, Vanija Nikunj
Udyog Vihar, Phase V
Gurgaon 122016
Phone: 91-124-
2398112/113/114,
91-124-5018111
91-124-2398115, 2450095
email: sales.india@bio-rad.com

Israel

Bio-Rad Laboratories Ltd
14 Homa Street
PO Box 5044
Rishon Le Zion 75150
Phone: 03 951 4127
Fax: 03 951 4129
email: israel_sales@bio-rad.com

Italy

Bio-Rad Laboratories S.r.l.
Via Cellini, 18/A
20090 Segrate - Milano
Phone: 39-02-21609-1
Fax: 39-02-21609-399

Japan

Nippon Bio-Rad Laboratories
7-18 Hogashi Nippori 5-Chome,
Arakawa-ku, Tokyo 116-0014
Phone: 03-5811-6270
Fax: 03-5811-6272

Korea

Bio-Rad Korea Ltd.
10F, Hyunjuk BLDG,
832-41 Yeoksam dong Gangnam
gu, Seoul 135-080
Phone: 82-2-3473-4460
Fax: 82-2-3472-7003

Latin America

Bio-Rad Latin America
14100 Palmetto Frontage Road
Suite 101
Miami Lakes, Florida 33016
Phone: (305) 894-5950
Fax: (305) 894-5960
Web address: latinamerica.bio-
rad.com

Mexico

Bio-Rad, S.A.
Adolfo Prieto No. 1653
Col. del Valle
México, DF C.P. 03100
Phone: 525-55-200-0520
Fax 525-55-524-7940

Netherlands

Bio-Rad Laboratories B.V.
Fokkerstraat 2-8
3905 KV Veenendaal
Phone: 31 318-540 666
Fax: 31 318-542 216
email: techsupport.holland@bio-
rad.com

New Zealand

Bio-Rad Laboratories Pty Ltd.
PO Box 300-571
Albany, Auckland
Phone: 64 9 415 2280
Toll Free: 0508 805 500 (within
New Zealand only)
Fax: 64 9 443 3097
email: auckland@bio-rad.com

Norway

Bio-Rad Laboratories
Johan Scharffenbergs vei 91
N-0694 Oslo
Phone: 23 38 41 30
Fax: 23 38 41 39
email: nordic_helpdesk@bio-rad.com

Poland

Bio-Rad Polska Sp. zo.o.
ul. Nakielska 3
01-106 Warszawa
Phone: 48 22 331 99 99
Fax: 48 22 331 99 88
email: biorad@bio-rad.com.pl

Portugal

Bio-Rad Laboratories Lda
Rua do Entrepasto Industrial,
N3-1 Esq
2724-513 Amadora
Phone: 351 21 472.7700
Fax: 351 21 472.7777

Romania

Bio-Rad Laboratories
52, Spatarului St.
020776 Bucharest 2
Romania
Phone: (4021) 210 1703
Fax: (4021) 210 1507
email: office@bio-rad.ro

Russia

Bio-Rad Laboratorii
Leningradsky Prospect, 37A, Bld.14
RF 125167 Moscow
Phone: 7-095-721-14-04
Fax: 7-095-721-14-12
email: postmaster@bio-rad.ru

Singapore

Bio-Rad Laboratories Singapore
Pte Ltd.
27 International Business Park
#01-02 Singapore 609924
Phone: (65) 6415 3188
Fax: (65) 6415 3189
email: sales.singapore@bio-rad.com

South Africa

Bio-Rad Laboratories Ltd.
34 Bolton Road, Rosebank
Johannesburg 2195
Phone: 00 27 11 4428508
Fax: 00 27 11 4428525
email: safrica_helpdesk@bio-rad.com

Spain

Bio-Rad Laboratories S.A.
Edificio "M", Miniparc II
C/Caléndula, 95
El Soto de La Moraleja
28109 - Madrid
Phone: 34 91 590 52 22
Fax: 34 91 590 52 17

Sweden

Bio-Rad Laboratories AB
Ekensbergsvägen 128,
Box 1097
S-172 22 Sundbyberg
Phone: 46 8 555 12700
Fax: 46 8 555 12780
email: nordic_helpdesk@bio-rad.com

Switzerland

Bio-Rad Laboratories AG
Nenzlingerweg 2 - Postfach
CH-4153 Reinach
Phone: 01-809 55 55
Fax: 01-809 55 00
email: swiss@bio-rad.com

Taiwan

Bio-Rad Laboratories (Taiwan) Ltd.
3/F-A2, No. 126 Nan King Road,
Section 4,
Taipei 10567, Taiwan
Republic of Taiwan
Phone: 886-2-2578-7189
Fax: 886-2-2578-6890
email: sales.taiwan@bio-rad.com

Thailand

Bio-Rad Laboratories Ltd.
1st, and 2nd Floor, Lumpini I Building
239/2, Rajdamri Road, Lumpini,
Pathumwan, Bangkok 10330
Phone: (662) 6518311
Fax: (662) 6518312

United Kingdom

Bio-Rad Laboratories Ltd.
Bio-Rad House
Maylands Avenue
Hemel Hempstead
Hertfordshire HP2 7TD
Phone: 44 20 8328 2000
Fax: 44 20 8328 2550
Freephone: 0 800 181134
email: uk.lsg.marketing@bio-rad.com

Vietnam

Bio-Rad Laboratories Vietnam
Room B, 3rd Floor, Mansion Pasteur
180 Pasteur Street, District 1,
Ho Chi Minh City
Vietnam
Phone: (848) 8236757
Fax: (848) 8236755
email: thai_thuy@bio-rad.com

Bio-Rad

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

Tel.: +33 1 47 95 60 00

Fax.: +33 1 47 41 91 33



Rev. A - 01/2009
Code: 862193