

**TeSeE™** KIT DE PURIFICATION (768 tests) Réf.: 355-1181  
KIT DE DÉTECTION (768 tests) - Protocole rapide Réf.: 355-1182

---

**TROUSSES DE RÉACTIFS POUR LA PURIFICATION ET LA DÉTECTION  
IN VITRO DE LA PrP<sup>Sc</sup>**

---

Ce test est approuvé, au sein de la communauté Européenne, pour le dépistage de la BSE et de la scrapie chez les bovins, ovins et caprins, tel que défini dans l'Annexe III, chapitre A de la réglementation (CEE) No 999/2001.

**Notice d'utilisation**

**BIO-RAD**

## TABLE DES MATIÈRES

- 1 - GÉNÉRALITÉS
- 2 - KIT DE PURIFICATION TeSeE™
  - 2 - 1 Principe de purification de la PrP<sup>Sc</sup>
  - 2 - 2 Échantillons
  - 2 - 3 Composition du kit de purification TeSeE™
  - 2 - 4 Préparation des réactifs
  - 2 - 5 Conservation, validité
  - 2 - 6 Mode opératoire
  - 2 - 7 Limites du protocole de purification
- 3 - KIT DE DÉTECTION TeSeE™ Protocole rapide
  - 3 - 1 Principe de la détection de la PrP<sup>Sc</sup> par EIA
  - 3 - 2 Échantillons
  - 3 - 3 Composition du kit de détection TeSeE™ Protocole rapide
  - 3 - 4 Préparation des réactifs
  - 3 - 5 Conservation, validité
  - 3 - 6 Préparation des échantillons pour la détection de la PrP<sup>Sc</sup> par EIA
  - 3 - 7 Mode opératoire
  - 3 - 8 Calcul et interprétation des résultats
  - 3 - 9 Limites du test
- 4 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI
- 5 - PRECAUTIONS D'EMPLOI
- 6 - CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ
- 7 - BIBLIOGRAPHIE

# 1 - GÉNÉRALITÉS

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) sont des maladies dégénératives lentes du système nerveux central causées par des agents transmissibles atypiques (ATNC) couramment appelés prions.

Les EST sont généralement classées, selon leur étiologie, en EST iatrogènes, familiales et/ou sporadiques. La tremblante du mouton est connue depuis le 18<sup>e</sup> siècle et son caractère transmissible (y compris à la chèvre) est démontré. Toutefois, les modes de contamination au sein des troupeaux restent mal connus. Les EST ont également été décrites chez les cervidés (maladie chronique cachectisante, MCC), ainsi que chez les bovins (encéphalopathie spongiforme bovine, ESB).

L'espèce humaine est également sensible à certaines formes d'EST. Des éléments convaincants tendent à prouver que l'ESB est passée des bovins à l'homme, probablement par consommation de viande contaminée.

Outre cette variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJv), les autres formes humaines d'EST sont le Kuru et la maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène.

Les formes héréditaires pures (comme le syndrome de Gertsman-Straüssler [SGS]) et/ou la MCJ sporadique ont été démontrées chez l'homme, cependant leur incidence est faible. Nous ignorons si des cas similaires d'EST sporadique existent dans le monde animal.

Les principales caractéristiques de ces maladies sont les suivantes :

- évolution lente, mais toujours fatale,
- absence d'agents infectieux classiques,
- accumulation progressive, dans le système nerveux central, d'une isoforme anormale de la protéine prion naturelle (PrP) appelée PrP<sup>Sc</sup>. Cette isoforme se caractérise par des propriétés biochimiques particulières et, notamment, par une plus grande résistance aux protéases.

L'exceptionnelle longueur de la période d'incubation qui précède les symptômes neurologiques laisse penser que les événements importants de la pathogenèse des EST pourraient avoir lieu hors du système nerveux, en particulier dans les tissus lymphoïdes périphériques.

Malgré de nombreuses inconnues et/ou incertitudes, la détection d'une PrP<sup>Sc</sup> anormale est aujourd'hui le fondement de la confirmation d'un diagnostic d'EST. Cette détection s'effectue principalement dans les tissus nerveux prélevés post mortem.

De la PrP<sup>Sc</sup> anormale a également été détectée dans différents organes et tissus lymphoïdes : dans les centres germinatifs de la rate, les ganglions lymphatiques, les amygdales et/ou les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (mais à des fins expérimentales), dans des modèles animaux ou des moutons atteints de la tremblante, des cervidés atteints de MCC et des patients atteints de MCJv.

Le test conçu par le CEA (Commissariat à l'Énergie Atomique) développé, produit et commercialisé par Bio-Rad permet la détection de la PrP<sup>Sc</sup> dans des échantillons de tissus prélevés chez des animaux.

Ce dosage comprend les étapes réactionnelles suivantes :

○ **Purification de la PrP<sup>Sc</sup> (768 tests)**

Étape réalisée avec les réactifs et accessoires suivants :

- Kit de purification TeSeE™ (768 tests) Réf. : 355-1181
- Seringue et aiguille de calibration (x 200) Réf. : 355-1174
- ou Plaques filtrantes (x 50) Réf. : 355-1179
- Microplaques Deepwell (x 50) Réf. : 359-0132
- Medium beads (x 2000) Réf. : 355-1171

○ **Détection de la PrP<sup>Sc</sup> (768 tests)**

Étape réalisée avec les réactifs suivants :

- Kit de détection TeSeE™ (768 tests) - Protocole rapide Réf. : 355-1182

# TeSeE™ KIT DE PURIFICATION

768 TESTS

355-1181

---

**TROUSSE DE RÉACTIFS POUR LA PURIFICATION *IN VITRO* DE LA PrP<sup>Sc</sup>**

---

**Notice d'utilisation**

**BIO-RAD**

## 2-1 PRINCIPE DE PURIFICATION DE LA PrP<sup>Sc</sup>

Les réactifs du kit de purification TeSeE™, permettent de purifier, de concentrer et de solubiliser la PrP<sup>Sc</sup> dans les échantillons de tissus prélevés chez des animaux infectés.

Le traitement des échantillons comprend les étapes suivantes :

- Broyage des échantillons
- Traitement des échantillons par la protéinase K
- Concentration de la PrP<sup>Sc</sup> par précipitation
- Solubilisation de la PrP<sup>Sc</sup> pour dosage immuno-enzymatique avec les réactifs du kit de détection TeSeE™ Protocole rapide (Réf. : 355-1182).

## 2-2 ÉCHANTILLONS

**Bovins** : la purification de la PrP<sup>Sc</sup> est effectuée sur des échantillons de Système Nerveux Central (CNS). L'outil de prélèvement ESB (Réf. : 355-1130) peut être utilisé pour la collecte du tronc cérébral. Comme la distribution de la PrP<sup>Sc</sup> est hétérogène dans le système nerveux central, les prélèvements doivent être faits préférentiellement dans l'obex du tronc cérébral pour une détection optimale.

La seringue de prélèvement (Réf. : 355-1175) permet un prélèvement rapide et facile de l'obex, de manière sûre. Veuillez consulter le protocole de prélèvement pour une utilisation détaillée.

**Petits ruminants et cervidés** : la purification de la PrP<sup>Sc</sup> est effectuée sur des échantillons de Système Nerveux Central (CNS) ou de tissus périphériques (ganglions lymphatiques, rate,...). L'outil de prélèvement "Petits ruminants" (Réf. : 355-1184) peut être utilisé pour la collecte du tronc cérébral et du cerebellum.

Comme la distribution de la PrP<sup>Sc</sup> est hétérogène dans le système nerveux central, les prélèvements doivent être faits préférentiellement dans l'obex du tronc cérébral pour une détection optimale.

Les échantillons sont coupés et pesés individuellement.

*Remarque : Les autres tissus (amygdales, iléon, paupière...) ne peuvent être utilisés que pour la recherche.*

Les échantillons sont conservés à une température de +2°C à +8°C lorsque la purification est effectuée dans les 24 heures, ou congelés si l'on souhaite les conserver plusieurs mois. Ils ne doivent pas être soumis à plus de 3 cycles de congélation-décongélation. Si ces échantillons doivent être transportés, ils doivent être emballés conformément à la réglementation nationale en vigueur.

## 2-3 COMPOSITION DU KIT DE PURIFICATION TeSeE™

| DÉSIGNATION            | TYPES DE REACTIFS                                                                                     | PRESENTATION                | CONSERVATION |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------|
| <b>Tube de broyage</b> | Tube contenant des billes de céramique dans une solution tampon<br>Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%) | 8 sachets<br>(8 x 96 tubes) | +2°C à +25°C |
| <b>Réactif A</b>       | Solution de dénaturation                                                                              | 4 flacons<br>(55 ml)        | +2°C à +8°C  |
| <b>Réactif B</b>       | Solution clarifiante<br>Colorant : bleu de bromophénol                                                | 4 flacons<br>(55 ml)        | +2°C à +8°C  |
| <b>Réactif C</b>       | Tampon de solubilisation<br>Colorant : vert malachite                                                 | 4 flacons<br>(7 ml)         | +2°C à +8°C  |
| <b>PK</b>              | Protéinase K<br>Colorant : rouge de phénol                                                            | 4 flacons<br>(0,5 ml)       | +2°C à +8°C  |

Le réactif A, le réactif B et les tubes de broyage sont des composants génériques. Ils peuvent être utilisés avec tous les lots du Kit de purification TeSeE™.

## 2-4 PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Tous les réactifs du kit de purification TeSeE™, à l'exception de la protéinase K, sont prêts à l'emploi. Le réactif A est le tampon de dilution de la protéinase K.

La solution doit être préparée de la manière suivante (4 µl de protéinase K dans 1 ml de réactif A) :

| NOMBRE D'ÉCHANTILLONS | RÉACTIF A | PROTÉINASE 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        |

Les volumes indiqués doivent être mesurés avec exactitude. Rincer l'embout de la pipette contenant la PK par plusieurs cycles d'aspiration/distribution dans le réactif A.

Après reconstitution, homogénéiser la solution par des retournements successifs du flacon jusqu'à obtention d'une solution rouge uniforme.

## 2-5 CONSERVATION, VALIDITÉ

Le kit de purification TeSeE™ (Réf. : 355-1181) doit être conservé de +2°C à +8°C. À cette température, tous les réactifs sont stables jusqu'à la date indiquée sur le kit (avant et après l'ouverture des flacons).

Après reconstitution, la solution de protéinase K conservée à température ambiante (+18°C à +30°C) doit être utilisée dans les 6 heures qui suivent.

## 2-6 MODE OPÉRATOIRE

Pour le traitement semi-automatique du protocole de purification, veuillez consulter le manuel d'utilisation du système TeSeE™ NSP.

### Protocole manuel :

#### 1. Échantillonnage :

**Pour les tissus périphériques (ganglions lymphatiques, rate,...) une bille de taille moyenne ("Medium bead", Réf. : 355-1171) doit être placée dans le tube de broyage, avant d'ajouter l'échantillon.**

Prélever une masse de 350 ± 40 mg de tissu nerveux (de préférence au niveau de l'obex) ou 200 mg ± 20 mg de tissu périphérique.

Déposer les échantillons dans les tubes de broyage, bien les fermer et passer à l'étape de broyage dans l'homogénéiseur (systèmes Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ ou TeSeE™ PRECESS 48™).

## 2. Broyage des échantillons :

Placer les tubes dans la couronne de l'homogénéiseur (systèmes Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ ou TeSeE™ PRECESS 48™). Effectuer un cycle d'agitation avec les paramètres suivants :

|              | Ribolyser®     |                      | TeSeE™ PRECESS 24™ ou 48™ |                      |
|--------------|----------------|----------------------|---------------------------|----------------------|
|              | Tissus nerveux | Tissus périphériques | Tissus nerveux            | Tissus périphériques |
| Temps (sec.) | 45             | 2 x 45*              | -                         | -                    |
| Vitesse      | 6,5            | 6,5                  | -                         | -                    |
| Programme    | -              | -                    | Programme 1               | Programme 2          |

\* Attendre 5 minutes entre les 2 cycles de broyage.

Lorsque le broyage est insuffisant, 1 ou 2 autres cycles d'agitation peuvent être effectués, en s'assurant que la température du tube revient à température ambiante (+18°C à +30°C) entre chaque cycle (au moyen de glace pilée, par exemple).

## 3. Transfert d'échantillon :

Retirer les tubes de broyage de l'homogénéiseur. Remettre en suspension l'homogénat en retournant les tubes avant de les ouvrir.

Transférer l'homogénat avec une des méthodes suivantes :

### • Méthode seringue de calibration

Prélever 250 µl avec la seringue de calibration (Réf. : 355-1174), en prenant soin de plonger l'aiguille dans le culot de billes pour éviter de prélever des fragments de tissus mal homogénéisés. Transférer chaque échantillon de 250 µl dans un micro-tube type Eppendorf de 2 ml ou dans une Deepwell (Réf. : 359-0132).

### • Méthode plaque de filtration

Le transfert et la filtration sont effectués séparément à l'aide de la plaque de filtration (Réf. : 355-1179) et une plaque Deepwell (Réf. : 359-0132) en utilisant une des deux techniques suivantes :

- Technique du vide :

Ajuster la plaque Deepwell (Réf. : 359-0132) dans le fond du manifold, placer le couvercle du manifold et la plaque de filtration (Réf. : 355-1179). Prélever 400 µl au moins (≤ 1000 µl) à l'aide d'un cône de 1 000 µl et transférer dans chaque puits de la plaque de filtration (Réf. : 355-1179) en excluant les six premières positions (de A1 à F1). Placer un film plastic sur la plaque de filtration. Régler la consigne de la pompe (Réf. : 359-3350) à 25,4 cm Hg (± 2.5 %). Allumer l'appareil, vérifier le niveau de vide sur le manomètre, puis ouvrir la valve du manifold et appliquer ce vide pendant 1 minute ± 6s. Fermer la valve, éteindre la pompe et libérer le vide du manifold.

- Technique de la centrifugation :

Prélever 400 µl au moins (≤ 1000 µl) à l'aide d'un cône de 1 000 µl et transférer dans chaque puits de la plaque de filtration (Réf. : 355-1179) préalablement ajusté sur une plaque Deepwell (Réf. : 359-0132) (la plaque mère), exclure les 6 premières positions (de A1 à F1). Placer un film plastic sur la plaque de filtration.

Centrifuger le système plaque de filtration + plaque Deepwell pendant 1 min à 500 g, en s'assurant que la plaque de filtration et la Deepwell soient correctement assemblées.

*Remarque :*

La centrifugeuse doit être équipée d'un rotor de microplaque (Réf. : 359-0136) pour la centrifugeuse 5804R d'Eppendorf (Réf. : 359-1396).

Après l'une ou l'autre des techniques, éliminer la plaque de filtration et transférer 250 µl d'échantillon filtré dans une autre Deepwell (la plaque de purification) pour le protocole manuel ou placer directement la plaque mère à bord du NSP (cf le manuel utilisation du TeSeE™ NSP).

*Remarque :*

A ce stade, les tubes de broyage après homogénéisation, les micro-tubes et la plaque Deepwell après transfert peuvent également être conservés, fermés :

|                                    | A température ambiante<br>(+18°C à +30°C)<br>pendant 8 heures | A +2°C à 8°C<br>(dans de la glace ou<br>au réfrigérateur)<br>pendant 15 heures | A -20°C<br>pendant 1 an* |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Tubes de broyage et<br>micro-tubes | Oui                                                           | Oui                                                                            | Oui                      |
| Plaque Deepwell                    | Oui                                                           | Oui                                                                            | Non                      |

\* Les échantillons congelés doivent être décongelés à température ambiante (+18°C à +30°C). Les échantillons peuvent être soumis à 3 cycles de congélation/décongélation au maximum. Les échantillons doivent toujours être homogénéisés par retournements avant usage.

#### 4. Traitement par la PK :

Répartir 250 µl (± 10%) de solution de protéinase K diluée (voir paragraphe 2.4) dans chaque micro-tube ou puits de plaque Deepwell. Ne pas dépasser un intervalle de 5 minutes pour la répartition de la protéinase K reconstituée entre le premier et le dernier échantillon. Mélanger immédiatement après avoir ajouté la protéinase K. Les micro-tubes fermés et les plaques Deepwell recouvertes d'un film aluminium sont homogénéisés par retournements (10 fois). Ne pas dépasser 2 minutes entre l'homogénéisation et l'incubation à 37°C. Incuber à 37 ± 2°C dans un bloc chauffant pendant 10 ± 1 minute.

*Remarque :*

Pour l'incubation des Deepwell, le bloc chauffant doit être équipé d'un adaptateur (Réf : 359-0134).

#### 5. Précipitation de la PrP<sup>Sc</sup> avec le réactif B :

Sortir les micro-tubes ou les Deepwell du bloc chauffant, ouvrir les tubes et ajouter 250 µl (± 10%) de réactif B dans tous les micro-tubes ou puits de Deepwell. Respecter le même ordre de répartition que dans l'étape 4. Ne pas dépasser des intervalles de 2 minutes entre la sortie de l'incubateur et l'étape d'homogénéisation. L'homogénéisation est effectuée dans les mêmes conditions que dans l'étape 4.

#### 6. Concentration de la PrP<sup>Sc</sup> (centrifugation) :

Dans les 30 minutes qui suivent le mélange et la distribution du réactif B, centrifuger les micro-tubes ou la Deepwell comme suit :

| Centrifugation   | Micro-tubes |        | Plaque Deepwell |
|------------------|-------------|--------|-----------------|
| Vitesse (g)      | 20 000      | 15 000 | 2 000           |
| Temps (mm)       | 5           | 7      | 10              |
| Température (°C) | 20          | 20     | 4               |

*Remarque :*

Pour les plaques Deepwell effectuer un temps d'attente de 5 minutes à 37°C ou de 10 minutes à température ambiante (+18°C à +30°C) avant la centrifugation.

#### 7. Clarification des échantillons :

Au terme de la centrifugation, éliminer le surnageant par retournement au-dessus d'un récipient pour déchets biologiques. Sécher ensuite les micro-tubes en les retournant sur du papier absorbant pendant 5 minutes.

Ou disposer la plaque Deepwell sur un DW 40 (Réf : 359-0137). Sélectionner le programme 'TSE DW' et choisir le nombre de barrettes à traiter. A la suite de cette étape, les plaques Deepwell doivent être séchées en les retournant sur du papier absorbant pendant 5 minutes.

Ajouter 25 µl ( $\pm 10\%$ ) de réactif C dans tous les micro-tubes ou puits de Deepwell.

Ne pas dépasser un intervalle de 10 minutes entre la fin du séchage et la répartition du réactif C.

Incuber immédiatement pendant  $5 \pm 1$  minute à  $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Ne pas dépasser 2 minutes entre l'addition du réactif C et le début de l'incubation.

*Remarque :*

Pour l'incubation des Deepwell, le bloc chauffant doit être équipé d'un adaptateur (Réf : 359-0134).

Sortir les micro-tubes ou Deepwell de l'incubateur et les homogénéiser au vortex (5 sec.  $\pm 2$  sec.).

Les échantillons en micro-tubes ou en Deepwell peuvent être conservés 5 heures de  $+2^{\circ}\text{C}$  à  $+8^{\circ}\text{C}$  ou congelés 72 heures à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les échantillons congelés doivent être décongelés à température ambiante ( $+18^{\circ}\text{C}$  à  $+30^{\circ}\text{C}$ ), puis homogénéisés au vortex (5 sec.  $\pm 2$  sec.).

Consultez la notice du kit de détection TeSeE™ Protocole rapide (Réf. : 355-1182) pour plus de détails sur le protocole du test de détection.

## **2-7 LIMITES DU PROTOCOLE DE PURIFICATION**

Des difficultés peuvent être rencontrées pendant l'étape de broyage si l'on utilise des échantillons déshydratés ou des tissus périphériques. Le cas échéant, l'étape de broyage (étape n°2 du mode opératoire) pourra être répétée plusieurs fois pour ce type d'échantillons.

# **TeSeE™ KIT DE DÉTECTION - Protocole rapide**

768 TESTS

355-1182

---

**TROUSSE DE REACTIFS POUR LA DETECTION *IN VITRO* DE LA PrP<sup>sc</sup>  
APRÈS PURIFICATION**

---

**Notice d'utilisation**

**BIO-RAD**

### **3-1 PRINCIPE DE LA DETECTION DE LA PrP<sup>Sc</sup> PAR EIA**

Le kit de détection TeSeE™ Protocole rapide est une technique immuno-enzymatique (sandwich) utilisant 2 anticorps monoclonaux pour la détection de la protéine prion, résistante à la protéinase K, dans des tissus prélevés chez des animaux infectés. Le kit permet de réaliser 768 tests (contrôles inclus).

La phase solide est composée de 12 barrettes de 8 puits en polystyrène, dont les parois sont recouvertes du premier anticorps monoclonal. Le second anticorps monoclonal est marqué à la peroxydase.

L'essai comprend les étapes réactionnelles suivantes :

1. Distribution des contrôles négatifs (R3) et positifs (R4) et des échantillons préparés avec les réactifs du kit de purification TeSeE™ (Réf. : 355-1181) dans les micropuits sensibilisés avec le premier anticorps monoclonal. Cette distribution peut être contrôlée visuellement car il existe une nette différence de coloration entre un puits vide et un puits contenant un échantillon.
2. Incubation.
3. Lavage, puis distribution de l'anticorps marqué à la peroxydase. Cette distribution peut également être contrôlée visuellement par la différence de coloration entre un puits vide et un puits contenant la solution de conjugué.
4. Incubation.
5. Lavage, puis révélation de l'activité enzymatique liée à la phase solide par addition du substrat.
6. Arrêt de la révélation, lecture des densités optiques en bichromatisme à 450 nm - 620 nm et interprétation des résultats.

### **3-2 ECHANTILLONS**

Le test ne peut être réalisé que sur des échantillons obtenus à partir de tissus préparés avec les réactifs et dans les conditions d'emploi du kit de purification TeSeE™ (Réf. : 355-1181).

Les échantillons purifiés doivent être dilués avec le réactif R6 du kit de détection TeSeE™ Protocole rapide.

### 3-3 COMPOSITION DU KIT

| ÉTIQUETAGE | NATURE DES REACTIFS                                                                                                                                                                                      | PRÉSENTATION          |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| R1         | <b>Microplaque</b> : 12 barrettes de 8 puits sensibilisés avec un anticorps monoclonal anti-PrP                                                                                                          | 8 plaques             |
| R2         | <b>Solution de lavage</b> : Concentrée 10x Tampon Tris-NaCl pH 7,4<br>Conservateur : ProClin™ 300 (0,01%)                                                                                                | 4 flacons<br>(250 ml) |
| R3         | <b>Contrôle négatif</b> : Tampon PBS pH 7,2 additionné de BSA<br>Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)                                                                                                      | 4 flacons<br>(4 ml)   |
| R4         | <b>Contrôle positif</b> : Tampon PBS pH 7,4 additionné de peptide de synthèse non infectieux. Lyophilisé.<br>Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)                                                          | 4 flacons             |
| R6         | <b>Diluant échantillons</b> : Tampon PBS pH 7,2 additionné de BSA et de rouge de phénol<br>Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)                                                                            | 4 flacons<br>(35 ml)  |
| R7         | <b>Conjugué</b> : Solution 10x d'anticorps monoclonal anti-PrP marqué à la peroxydase, en tampon PBS pH 7,1 additionnée de protéines bovines et de rouge de phénol<br>Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%) | 4 flacons<br>(2.8 ml) |
| R8         | <b>Tampon substrat de la peroxydase</b> : Solution d'acide citrique et d'acétate de sodium pH 4,0 contenant 0,015 % d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et 4 % de diméthylsulfoxyde (DMSO)                   | 4 flacons<br>(60 ml)  |
| R9         | <b>Chromogène</b> : Solution de tétraméthylbenzidine (TMB)                                                                                                                                               | 4 flacons<br>(5 ml)   |
| R10        | <b>Solution d'arrêt</b> : Acide sulfurique 1 N                                                                                                                                                           | 4 flacons<br>(28 ml)  |
|            | <b>Films adhésifs</b>                                                                                                                                                                                    | 16                    |

Les réactifs suivants sont des composants génériques : diluant échantillons (R6), solution de lavage (R2), tampon substrat de la peroxydase (R8), chromogène (R9) et solution d'arrêt (R10). Ils peuvent être utilisés avec tous les lots du Kit de détection TeSeE™ Protocole rapide.

### 3-4 PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Avant utilisation, laisser les réactifs du kit de détection TeSeE™ Protocole rapide revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) pendant 30 minutes.

#### 1- Réactifs prêts à l'emploi

##### Microplaques (R1) :

Avant ouverture du sachet, laisser la microplaque revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) dans son emballage protecteur muni d'un dessiccant, afin d'éviter toute condensation d'eau dans les puits. Ouvrir au point de soudure et remettre immédiatement les barrettes inutilisées dans le sachet.

Refermer hermétiquement le sachet après avoir pris soin de chasser l'air. Conserver de +2°C à +8°C.

Le contrôle négatif (R3), le diluant des échantillons (R6) et la solution d'arrêt (R10) sont prêts à l'emploi.

## 2- Réactifs à reconstituer

### Solution de lavage (R2) :

Diluer la solution de lavage R2 au 1/10<sup>e</sup> dans de l'eau distillée ou ultrapure (par exemple 100 ml de réactif R2 dans 900 ml d'eau distillée).

### Contrôle positif (R4) :

Taper doucement le flacon de contrôle positif (R4) sur la paillasse pour détacher le produit adhérent éventuellement au bouchon de caoutchouc. Ouvrir le flacon et dissoudre son contenu dans 4 ml de diluant R6. Reboucher le flacon et laisser reposer pendant environ 1 minute en homogénéisant délicatement et régulièrement pour faciliter la dissolution.

### Conjugué (R7) :

Diluer le réactif R7 au 1/10<sup>e</sup> dans la solution de lavage fraîchement reconstituée (par exemple : 0,1 ml de réactif R7 dans 0,9 ml de solution de lavage reconstituée), sachant que 1 ml de conjugué est suffisant pour traiter 1 barrette. Homogénéiser délicatement. Ne pas mélanger au vortex.

### Solution de développement enzymatique (R8 + R9) :

Diluer le réactif R9 au 1/11<sup>e</sup> dans le réactif R8 (par exemple : 0,1 ml de réactif R9 dans 1 ml de réactif R8), sachant que 1,1 ml de solution de révélation enzymatique est suffisant pour 1 barrette. Homogénéiser délicatement. Ne pas mélanger au vortex.

## 3-5 CONSERVATION, VALIDITÉ

Conserver le kit de +2°C à +8°C avant utilisation ; à cette température, tous les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le kit.

Après préparation, les réactifs ont les stabilités suivantes :

| ÉTIQUETAGE | REACTIFS                                                 | VALIDITÉ                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| R1         | Microplaque en sachet hermétiquement fermé               | 1 mois de +2°C à +8°C                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| R2         | Solution de lavage diluée                                | 24 heures à température ambiante (+18°C à +30°C)<br>2 semaines de +2°C à +8°C                                                                                                                                                                                                                      |
| R4         | Contrôle positif reconstitué                             | 2 heures à température ambiante (+18°C à +30°C)<br>4 heures de +2°C à +8°C<br>6 mois à -20°C<br>Il est conseillé de fractionner la solution reconstituée en aliquots de 0,5 ml et de les congeler immédiatement à -20°C. Ne pas aller au-delà de 3 cycles de congélation-décongélation successifs. |
| R7         | Conjugué reconstitué (dans la solution de lavage diluée) | 8 heures à température ambiante (+18°C à +30°C)                                                                                                                                                                                                                                                    |
| R8 + R9    | Solution de révélation                                   | 6 heures à température ambiante (+18°C à +30°C), impérativement à l'obscurité.                                                                                                                                                                                                                     |

## 3-6 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LA DÉTECTION DE LA PrP<sup>Sc</sup> PAR EIA

Les échantillons purifiés (chapitre 2.6) doivent être dilués avec 125 µl (± 10%) de réactif R6. Homogénéiser les échantillons dilués au vortex (5 sec. ± 2 sec.) avant la distribution dans la plaque (R1).

## 3-7 MODE OPÉRATOIRE

### TeSeE™ Kit de Détection - Protocole rapide (Réf.: 355-1182) Mode Opérateur

#### Protocole manuel :

- Sortir de l'emballage protecteur le cadre support et le nombre de barrettes (R1) nécessaire. Remettre les barrettes non utilisées, avec le sachet de déshydratant, dans l'emballage et refermer celui-ci hermétiquement.
- Préparer le contrôle positif (R4), comme décrit au chapitre 3.4.2.
- Pour chaque série de tests et pour chaque plaque, remplir les puits de 100 µl (± 10%) de contrôle/échantillon dans l'ordre suivant :
  - Puits A1, B1, C1, D1 : contrôle négatif (R3)
  - Puits E1, F1 : de contrôle positif (R4)
  - Puits G1, H1, etc. : d'échantillon, dilué avec le réactif (R6).Chaque échantillon est déposé en un seul puits.
- Recouvrir d'un film adhésif et incuber pendant 30 min ± 2 min à 37°C ± 2°C.
- Préparer la solution de lavage (R2).
- Préparer la solution de conjugué (R7).
- Retirer le film adhésif et effectuer 3 cycles de lavage. Les conditions de lavage optimales sont obtenues avec les laveurs PW40, PW41 ou 1575 Bio-Rad, sur le programme TSE 3. Ne pas laisser la microplaque plus de 5 minutes après le dernier cycle de lavage. Sécher les barrettes par retournement sur du papier absorbant avant l'étape suivante.
- Ajouter 100 µl (± 10%) de solution de conjugué (R7) dans chaque puits.
- Recouvrir de film adhésif et incuber 30 min ± 2 min de +2°C à +8°C.
- Préparer la solution de révélation enzymatique (R8+R9).
- Retirer le film adhésif et effectuer 5 cycles de lavage. Les conditions de lavage optimales sont obtenues avec les laveurs PW40, PW41 ou 1575 Bio-Rad, sur le programme TSE 5. Ne pas laisser la microplaque plus de 5 minutes après le dernier cycle de lavage. Sécher les barrettes par retournement sur du papier absorbant avant l'étape suivante.
- Ajouter 100 µl (± 10%) de solution de révélation (R8+R9) dans chaque puits et placer la microplaque, pendant 30 min ± 2 min, à l'obscurité et à température ambiante (+18°C à +30°C). Ne pas utiliser de film adhésif pendant cette incubation.
- Ajouter 100 µl (± 10%) de solution d'arrêt (R10) dans chaque puits dans le même ordre et avec le même rythme de distribution que pour la solution de révélation.
- Essuyer soigneusement le dessous de la plaque et lire les densités optiques en bichromatisme à 450 nm - 620 nm dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction (les barrettes doivent toujours être protégées de la lumière avant la lecture).

## Paramètres de lavage des microplaques

### NOM : TSE 3

| EDIT mode function | PLATE                                 | Manifold                      | STRIPS                             | Met. (Method) | MODE  | CKCS SW ASP. | ASP. TIME | VOLUME | OVER FLOW | LIQUID | 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)<br>Flat 03 (1575) | 1*8 (PW40/1575)<br>2*8 (PW41) | 1,2,3,4,<br>5,6,7,8,9,<br>10,11,12 | .             | .     | .            | .         | .      | .         | .      | .                         | .                | .           | .                | .          | .            | .                           | .          | 1          | .         |
| Method 1           | .                                     | .                             | .                                  | WASH          | Plate | Yes          | 0,3       | 800    | 2,5       | WT     | 0 (PW40/1575)<br>5 (PW41) | .                | .           | .                | .          | 3            | 30 (PW41)<br>45 (PW40/1575) | 0          | .          | .         |
| Method 2           | .                                     | .                             | .                                  | BOTTOM ASP.   | Plate | Yes          | 0,3       | .      | .         | .      | .                         | .                | .           | 1                | .          | 1            | 0                           | .          | .          | .         |

### NOM : TSE 5

| EDIT mode function | PLATE                                 | Manifold                      | STRIPS                             | Met. (Method) | MODE  | CKCS SW ASP. | ASP. TIME | VOLUME | OVER FLOW | LIQUID | 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)<br>Flat 03 (1575) | 1*8 (PW40/1575)<br>2*8 (PW41) | 1,2,3,4,<br>5,6,7,8,9,<br>10,11,12 | .             | .     | .            | .         | .      | .         | .      | .                         | .                | .           | .                | .          | .            | .                           | .          | 1          | .         |
| Method 1           | .                                     | .                             | .                                  | WASH          | Plate | Yes          | 0,3       | 800    | 2,5       | WT     | 0 (PW40/1575)<br>5 (PW41) | .                | .           | .                | .          | 5            | 30 (PW41)<br>45 (PW40/1575) | 0          | .          | .         |
| Method 2           | .                                     | .                             | .                                  | BOTTOM ASP.   | Plate | Yes          | 0,3       | .      | .         | .      | .                         | .                | .           | 1                | .          | 1            | 0                           | .          | .          | .         |

### NOM DE LA PLAQUE : 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 CALCUL ET INTERPRETATION DES RÉSULTATS

### 1) Calcul de la densité optique (DO) moyenne du contrôle négatif

DO R3 = moyenne des 4 valeurs des puits R3

### 2) Calcul de la valeur seuil \_\_\_\_\_

La valeur seuil est égale à :  $\overline{\text{DO R3}} + 0,210$

#### Exemple

DO R3 = 0,020

Valeur seuil =  $0,020 + 0,210 = 0,230$

### 3) Conditions de validation du test

#### • Contrôle négatif (R3) :

##### a) Validation des valeurs individuelles du contrôle négatif :

La densité optique de chaque contrôle négatif doit être inférieure à 0,150.

Cependant, on peut éliminer au maximum une valeur aberrante lorsque sa densité optique est supérieure ou égale à 0,150.

Le test doit être répété si plus d'une valeur de contrôle négatif dépasse cette limite.

##### b) Homogénéité des valeurs de contrôle négatif :

Calculer la densité optique moyenne des contrôles négatifs sur les valeurs individuelles restantes.

Les valeurs au delà de la moyenne des contrôles négatifs + 40 % ( $\overline{\text{DO R3}} + 40\%$ ) doivent être éliminées.

- Si une valeur de contrôle négatif est éliminée en a), une seule valeur peut être éliminée en b).

- Si aucune valeur de contrôle négatif n'est éliminée en a), au maximum deux valeurs peuvent être éliminées en b).

Le test doit être répété si plus de deux valeurs de contrôle négatif sont éliminées [règles a)+b)].

#### • Contrôle positif (R4) :

La moyenne des densités optiques des contrôles positifs (DO R4) doit être supérieure ou égale à 1,000 DO.

Le test doit être répété si la moyenne des densités optiques des contrôles positifs (DO R4) est inférieure à cette limite.

### 4) Interprétation des résultats

Les échantillons dont la densité optique est inférieure à la valeur seuil sont considérés comme négatifs avec le test TeSeE™ Protocole rapide.

Toutefois, les résultats situés juste au-dessous de la valeur seuil (valeur seuil - 10%) doivent être interprétés avec prudence, et les échantillons correspondants doivent être retestés en duplicats à partir de l'homogénat initial.

Les échantillons dont la densité optique est supérieure ou égale à la valeur seuil sont considérés comme initialement réactifs avec le test TeSeE™ Protocole rapide et doivent être retestés en duplicats, à partir de l'homogénat initial, avant l'interprétation finale.

Après répétition de l'essai, l'échantillon est considéré comme positif avec le test TeSeE™ Protocole rapide lorsque au moins une des deux mesures est positive (DO supérieure ou égale à la valeur seuil). Il est considéré comme négatif avec le test TeSeE™ Protocole rapide lorsque les deux mesures sont inférieures à la valeur seuil.

Les échantillons retestés en duplicats et trouvés négatifs avec le test TeSeE™ Protocole rapide, mais pour lesquels une des deux valeurs est proche de la valeur seuil (valeur seuil - 10%) doivent être interprétés avec prudence.

### 3-9 LIMITES DU TEST

Un résultat négatif signifie que l'échantillon testé ne contient pas de PrP<sup>Sc</sup> détectable avec les réactifs du kit de détection TeSeE™ Protocole rapide. Toutefois, comme les taux très faibles de PrP<sup>Sc</sup> peuvent ne pas être détectés, un résultat négatif ne peut exclure absolument la possibilité d'une infection.

Tout échantillon donnant un résultat positif reproductible, suivant les critères d'interprétation du test, doit être confirmé par le laboratoire de référence national du pays pour les TSE, ou par le laboratoire de référence de la CEE dans des circonstances exceptionnelles.

### 4 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Eau distillée ou eau ultrapure.
- Eau de Javel à 20 000 ppm (concentration finale) et solution de soude 1 M (concentration finale).
- Papier absorbant.
- Gants à usage unique.
- Lunettes de sécurité ou masque à visière.

#### Étape de purification :

- Micro-tubes à essais de 2 ml en polypropylène avec capuchons et portoir approprié.
- Pipettes réglables, automatiques ou semi-automatiques, pouvant distribuer des volumes de 20 à 500 µl.
- Homogénéiseur de tissus : systèmes Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ ou TeSeE™ PRECESS 48™.\*
- Centrifugeuse\* adaptée aux micro-tubes à essais.
- Incubateur\* pour micro-tubes à essais thermostaté à 37°C ± 2°C et un autre thermostaté à 100°C ± 5°C.

Pour la purification semi-automatique de l'échantillon : système TeSeE™ NSP.

#### Étape de détection :

- Pipettes fixes ou réglables, automatiques ou semi-automatiques, pouvant distribuer des volumes de 50, 100, 200 et 1000 µl.
- Tubes à essais gradués de 10 ml, 20 ml et 100 ml.
- Conteneurs pour déchets contaminés.
- Incubateur pour microplaques thermostaté à 37°C ± 2°C.
- Chambre froide de +2°C à +8°C.
- Laveur\* de microplaques, automatique ou semi-automatique.
- Lecteur de microplaques\* (muni de filtres 450 nm et 620 nm).
- Système microplaque\* pour l'automatisation des étapes du protocole de test. Les performances du système devront être compatibles avec celles du protocole de test.

\* Contacter Bio-Rad pour obtenir la liste des appareils disponibles.

### 5 - PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

La qualité des résultats dépend de l'observation des bonnes pratiques de laboratoire suivantes :

- Les réactifs doivent être conservés à une température de +2°C à +8°C.
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de la date de péremption.
- La solution de protéinase K reconstituée et conservée à température ambiante (+18°C à +30°C) doit être utilisée dans les 6 heures.
- Ne pas mélanger, pendant la même manipulation, des réactifs provenant de différents lots de kits TeSeE™ Protocole rapide, à l'exception des réactifs génériques : solution de lavage (R2), diluant échantillons (R6), tampon substrat de la peroxydase (R8), chromogène (R9), solution d'arrêt (R10), tubes de broyage, réactif A et réactif B.

- Solution de lavage (R2), diluant échantillons (R6), tampon substrat de la peroxydase (R8), chromogène (R9), solution d'arrêt (R10), et les tubes de broyage peuvent être utilisés avec tous les kits de la gamme TeSeE™ (TeSeE™ et TeSeE™ sheep/goat).
- Laisser les réactifs revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) pendant 30 minutes avant utilisation.
- Reconstituer soigneusement les réactifs, en évitant toute contamination.
- Ne pas effectuer le test en présence de vapeurs réactives (acides, bases, aldéhydes) ou de poussières, car cela pourrait altérer l'activité enzymatique du conjugué.
- Utiliser uniquement des tubes en polypropylène.
- La verrerie doit être parfaitement lavée et rincée à l'eau distillée ou, de préférence, être constituée de produits à usage unique.
- Ne pas laisser plus de 5 minutes la microplaque entre la fin du lavage et la distribution des réactifs.
- La réaction enzymatique est très sensible à tous les métaux ou ions métalliques. En conséquence, aucun élément métallique ne doit entrer en contact avec les différentes solutions contenant le conjugué ou le substrat.
- La solution de révélation (tampon du substrat + chromogène) doit être incolore. L'apparition d'une coloration quelques minutes après la reconstitution est signe d'altération du réactif, qui ne doit donc pas être utilisé. La solution de révélation doit de préférence être préparée avec des récipients en plastique à usage unique et du matériel de distribution ou de la verrerie préalablement lavés avec de l'acide chlorhydrique 1 N, rincés à l'eau distillée et séchés. **Conserver cette solution à l'abri de la lumière.**
- Changer d'embout pour chaque échantillon.
- Le lavage des puits est une étape essentielle de la procédure : respecter le nombre de cycles de lavages recommandé et vérifier que tous les puits sont totalement remplis, puis totalement vidés. Un lavage mal effectué peut donner des résultats incorrects.
- Ne jamais utiliser le même récipient et la même pipette pour ajouter le conjugué et la solution de révélation.

## 6 - CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

D'une façon générale : les conditions d'hygiène, de sécurité et de bonnes pratiques de laboratoire devront être en accord avec la réglementation en vigueur.

- Tous les réactifs du kit sont exclusivement destinés au diagnostic *in vitro*.
- Porter des gants à usage unique pendant la manipulation des réactifs et des échantillons et se laver les mains soigneusement après la manipulation.
- Ne jamais pipetter à la bouche.
- Utiliser des récipients en polypropylène pour éviter les risques de blessure en cas de bris de verre.
- Tous les matériels entrant en contact avec les échantillons et les solutions de lavage doivent être considérés comme contaminés.
- Éviter d'éclabousser les échantillons ou les solutions contenant des échantillons.
- Les surfaces contaminées doivent être nettoyées avec de l'eau de Javel à 20 000 ppm. Lorsque le liquide contaminant est un acide, les surfaces contaminées doivent d'abord être neutralisées avec de la soude avant d'utiliser l'eau de Javel. Les surfaces seront rincées à l'eau distillée, séchées avec de l'éthanol et essuyées avec du papier absorbant. Le matériel utilisé pour le nettoyage doit être jeté dans un récipient spécial pour déchets contaminés.
- Les échantillons, le matériel et les produits contaminés doivent être éliminés après décontamination :
  - par trempage dans de la soude 1M (concentration finale) pendant 1 heure à température ambiante (+18°C à +30°C).
  - ou par trempage dans de l'eau de Javel à 20 000 ppm pendant 1 heure à température ambiante (+18°C à +30°C).

- ou par autoclavage à 134°C minimum pendant au moins 18 minutes, à 3 bars de pression.

**Remarque : ne jamais autoclaver de solutions contenant de l'eau de Javel ou le réactif B.**

- Toutes les opérations relatives à la réalisation des tests de dépistage d'une encéphalopathie spongiforme transmissible (EST) font l'objet d'une réglementation et doivent être conduites dans un laboratoire isolé, réservé exclusivement à cet usage et dont l'accès est limité et contrôlé. L'opérateur doit porter une combinaison, des surbottes, des gants et un masque à visière ou un masque simple avec des lunettes de sécurité.
- Les opérateurs doivent recevoir une formation spécifique concernant les risques liés aux agents des EST ou prions et aux modes de décontamination validés pour les agents infectieux "non conventionnels". Les mesures de sécurité biologique doivent être conformes aux recommandations des autorités réglementaires nationales.
- Éviter tout contact du tampon du substrat, du chromogène et de la solution d'arrêt avec la peau et les muqueuses.
- Avant élimination, neutraliser et/ou autoclaver toutes les solutions de lavage ou eaux usées de lavage ou tout liquide contenant des échantillons biologiques.
- Le réactif B est une substance dangereuse classée comme nocive (> 25% alcool), au sens de la réglementation européenne.
- Les réactifs contenant 0,1% de ProClin™ 300 sont classés comme préparations irritantes, au sens de la réglementation européenne.



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

**R : 10-22-37/38-41-43-67** Inflammable. Nocif en cas d'ingestion. Irritant pour le système respiratoire et la peau. Risque de sérieuses lésions en cas de contact avec les yeux. Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau. L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges.

**S : 7/9-13-26-28-37/39-46** Conserver le récipient bien fermé et dans un endroit bien ventilé. Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, consulter un spécialiste. Après contact avec la peau se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau. Porter des gants appropriés et un appareil de protection des yeux/du visage. En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

## 7 - BIBLIOGRAPHIE

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, UJ. 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

# Seringue de prélèvement 355-1175

---

**MODE DE PRÉLÈVEMENT POUR LES TESTS DE DÉPISTAGE DES EST  
BIO-RAD (PLATELIA® ET TeSeE™ PROTOCOLE RAPIDE)**

---

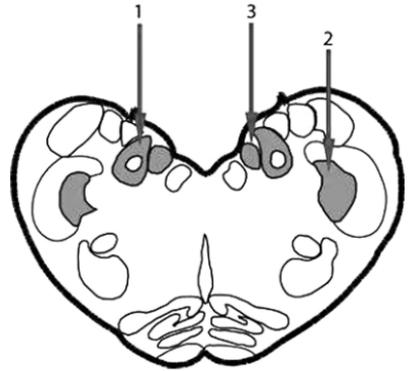
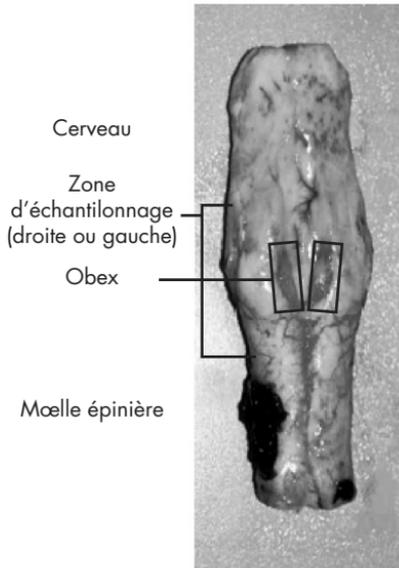
**BIO-RAD**

## TABLE DES MATIÈRES

- 1 - INFORMATIONS GÉNÉRALES
  - 1 - 1 Collecte de l'échantillon à l'abattoir
  - 1 - 2 Procédure de prélèvement au laboratoire
- 2 - SERINGUE DE PRÉLÈVEMENT BIO-RAD
- 3 - MASSE D'ÉCHANTILLON REQUISE POUR LE TEST
- 4 - MODE OPÉRATOIRE
- 5 - PRÉCAUTIONS/CONSEILS
- 6 - CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

# 1 - INFORMATIONS GENERALES

Les tests de dépistage des EST Bio-Rad sont réalisés sur un échantillon de  $350 \pm 40$  mg de système nerveux central (SNC). La région anatomique la plus favorable pour la détection de la PrP<sup>Sc</sup> chez les animaux infectés est le tronc cérébral, plus précisément dans la région du nerf vague, dans la région de l'obex. Cette région du tronc cérébral est celle où la PrP<sup>Sc</sup> est la plus concentrée.



*Coupe transversale, au niveau de l'obex, du tronc cérébral permettant d'identifier les régions cibles pour le diagnostic de l'ESB par histopathologie et immunohistochimie (noyau du tractus solitaire [1] et noyau du tractus trijumeau V [2]) et tremblante (noyau dorsal du nerf vague [3])*

(Source : OIE - Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres)

## 1 - 1 Collecte de l'échantillon à l'abattoir

Le tronc cérébral est facilement et rapidement prélevé avec un outil approprié ou une cuillère de prélèvement, via le foramen occipital, sans ouvrir la cavité crânienne.



Prélèvement de l'échantillon avec la cuillère de prélèvement Bio-Rad

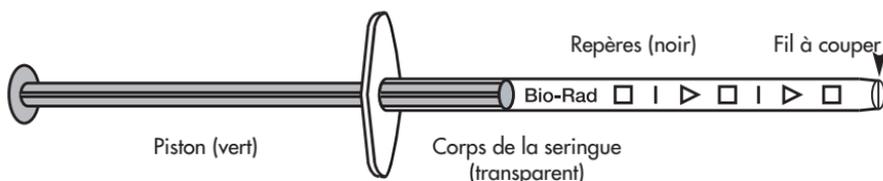
## 1 - 2 Procédure de prélèvement au laboratoire

L'échantillon complet de tronc cérébral doit être envoyé au laboratoire de dépistage en s'assurant que les mesures de sécurité recommandées par les autorités réglementaires nationales sont respectées. Au laboratoire, la quantité de matière cérébrale nécessaire est découpée à partir de la région de l'obex (à l'aide d'un scalpel, ...) ou collectée à l'aide de la **seringue de prélèvement Bio-Rad (Réf : 355-1175)**. La seringue de prélèvement permet d'extraire la quantité d'échantillon requise dans la zone appropriée rapidement et de façon sûre, en évitant tout risque de blessures.

La partie suivante décrit la procédure à suivre pour collecter efficacement l'échantillon dans la région de l'obex en utilisant la seringue de prélèvement Bio-Rad et sans détériorer le tissu.

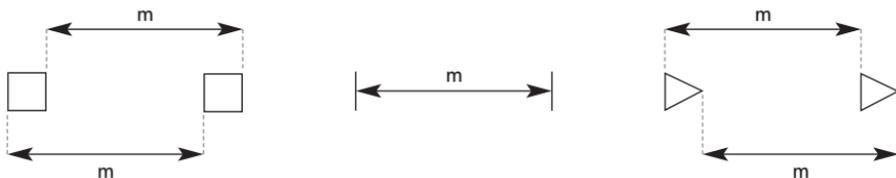
## 2 - SERINGUE DE PRELEVEMENT BIO-RAD

La seringue de prélèvement Bio-Rad est constituée d'un piston vert et d'un corps transparent. Le corps de la seringue est gradué par une série de repères géométriques. (□ ▷ |)



## 3 - MASSE D'ÉCHANTILLON REQUISE POUR LE TEST

La masse de l'échantillon doit occuper l'espace existant entre deux repères identiques, ce qui correspond à une masse (m) de 350 +/- 40 mg.



## 4 - MODE OPERATOIRE

- Prendre la seringue de prélèvement et tirer le piston vert sur approximativement 1 cm à partir de sa position initiale puis le ramener à sa position initiale.
- Tenir fermement le tronc cérébral dans une main en utilisant un emballage à usage unique (sac plastique, gant, etc.) pour éviter toute possibilité de contamination entre les échantillons. L'extrémité du tronc cérébral doit rester accessible. Si le tronc cérébral a une portion de moëlle épinière trop longue, il pourra être nécessaire de le couper. L'opérateur devra avoir reçu une formation appropriée pour localiser correctement la zone de prélèvement.
- De l'autre main positionner l'ouverture de la seringue de prélèvement à l'extrémité gauche ou droite du tronc cérébral.

**Note:** L'autre moitié de la région de l'obex doit rester intacte et disponible après le prélèvement de l'échantillon pour les tests de confirmation.



- Insérer le corps de la seringue progressivement dans le tronc cérébral tout en maintenant le piston vert immobile.

**Note: En collectant l'échantillon dans la région de l'obex, vérifier que le corps de la seringue reste positionné dans le canal sélectionné du tronc cérébral.**

- Arrêter ce mouvement lorsque l'extrémité de la seringue a atteint la limite supérieure de la zone de prélèvement.



- Découper l'échantillon du reste du tronc cérébral en faisant tourner le corps de la seringue sur un tour complet.
- Retirer délicatement la seringue de prélèvement du tronc cérébral en faisant attention à ne pas détériorer les tissus avoisinants. Le reste du tronc cérébral peut ensuite être replacé dans le conteneur d'origine de l'échantillon.
- S'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air dans l'échantillon collecté. Si besoin, compresser l'échantillon en bouchant l'extrémité de la seringue et en poussant le piston vert jusqu'à ce que l'air soit éliminé. Dans le même temps, s'assurer que les tissus à l'extrémité de la seringue soient retenus.
- **Tout en maintenant le corps de la seringue fixe, déplacer le piston vert jusqu'au repère le plus proche.**
- S'assurer que l'échantillon couvre au moins une zone du tube correspondant à "m", comme décrit dans le paragraphe précédent de ce document (masse de l'échantillon requise pour le test).
- Prendre un tube de broyage et retirer son bouchon. Repousser délicatement le piston vert de la seringue jusqu'au repère identique suivant afin de s'assurer que la masse correcte de tissu ("m") soit déposée dans le tube de broyage. Notez que vous devez déplacer le piston jusqu'au repère identique suivant comme indiqué dans le paragraphe "masse de l'échantillon requise pour le test".
- Détacher l'échantillon en appuyant l'extrémité de la seringue de prélèvement contre la paroi intérieure du tube de broyage.
- Les échantillons de très mauvaise qualité devront être soit disséqués, ou dans le cas d'une autolyse avancée, prélevés à la pipette.
- La partie inutilisée de l'échantillon peut être conservée en plaçant la seringue dans le conteneur d'origine avec le tronc cérébral restant.

## 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  
Pihätörmä 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, Vanijya 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: 862193GV