

**TeSeE™** **KIT DE PURIFICACIÓN** (192 pruebas) **Ref.: 355-1144**  
**KIT DE DETECCIÓN** (192 pruebas) - Protocolo rápido **Ref.: 355-1194**

---

## **KITS DE REACTIVOS PARA LA PURIFICACIÓN Y DETECCIÓN IN VITRO DE LA PrP<sup>sc</sup>**

---

En la unión Europea este test se ha aprobado como un test rápido para los programas de detección de la encefalopatía espongiforme y la tembladera (scrapie) en los bovinos, ovejas y cabras.

Estos programas se han establecido conforme al anexo 3, capítulo A de la regulación (CE) n° 999/2001.

### **Manual de instrucciones**

**BIO-RAD**

## ÍNDICE

- 1 - INFORMACIONES GENERALES
- 2 - KIT DE PURIFICACIÓN TeSeE™
  - 2 - 1 Principio de la purificación de la PrP<sup>Sc</sup>
  - 2 - 2 Muestras
  - 2 - 3 Composición del Kit de purificación TeSeE™
  - 2 - 4 Preparación de los reactivos
  - 2 - 5 Conservación, caducidad
  - 2 - 6 Procedimiento
  - 2 - 7 Límites del protocolo
- 3 - KIT DE DETECCIÓN TeSeE™ Protocolo rápido
  - 3 - 1 Principio de la detección de la PrP<sup>Sc</sup> por el método EIA
  - 3 - 2 Muestras
  - 3 - 3 Composición del Kit de detección TeSeE™ Protocolo rápido
  - 3 - 4 Preparación de los reactivos
  - 3 - 5 Conservación, caducidad
  - 3 - 6 Preparación de las muestras para la detección de la PrP<sup>Sc</sup> por el método EIA
  - 3 - 7 Procedimiento
  - 3 - 8 Cálculo e interpretación de los resultados
  - 3 - 9 Límites de la prueba
- 4 - MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO
- 5 - PRECAUCIONES
- 6 - NORMAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD
- 7 - BIBLIOGRAFÍA

## 1 - INFORMACIONES GENERALES

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) son enfermedades degenerativas lentas del sistema nervioso central producidas por agentes transmisibles no convencionales (ATNC), llamados priones.

Las EET se suelen clasificar, según su causa, como iatrogénicas, familiares o esporádicas. En el siglo XVIII se describió la tembladera (scrapie) y se demostró su transmisión (incluida a cabras). Sin embargo, los mecanismos de contaminación dentro de los rebaños siguen estando poco claros. Las EETs también se describieron en el visón, en el ciervo y en el alce (enfermedad debilitante crónica, EDC) y en la vaca (encefalopatía espongiforme bovina, EEB).

Los seres humanos son también susceptibles a determinadas formas infecciosas de EETs. Hay pruebas convincentes que indican que la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) ha pasado de los bovinos al ser humano, probablemente debido al consumo de carne contaminada.

Además de esta forma variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJv), otras formas en los seres humanos son el kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica.

Se han demostrado formas hereditarias puras (como el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker [GSS]) y la ECJ esporádica en seres humanos, pero sus incidencias son muy bajas. No sabemos si existen casos esporádicos similares de EETs en animales.

Las principales características de estas enfermedades son:

- una evolución lenta y progresiva pero siempre mortal,
- ausencia de un agente infeccioso convencional,
- acumulación progresiva en el sistema nervioso central de una isoforma anormal de una proteína prión natural (PrP) denominada PrP<sup>Sc</sup>. Esta isoforma se caracteriza por unas propiedades bioquímicas particulares y especialmente, por un aumento de la resistencia a las proteasas.

El período de incubación significativamente largo que precede a los síntomas neurológicos sugiere que los acontecimientos importantes en la patogenia de la EET podrían tener lugar en localizaciones extranerviosas y especialmente en tejidos linfoides periféricos.

A pesar del desconocimiento existente en muchas áreas, la detección de la PrP<sup>Sc</sup> anormal se ha establecido como el método para confirmar el diagnóstico de EET. Esta detección se consigue fundamentalmente en tejidos nerviosos recogidos en autopsias.

También se ha detectado la PrP<sup>Sc</sup> anormal en diversos tejidos y órganos linfoides: en los centros germinales del bazo, los ganglios linfáticos, las amígdalas y/o en el tejido linfoide asociado a las mucosas (a nivel de investigación), en modelos animales o en ovejas con tembladera, ciervos o alces con EDC y en pacientes con ECJv.

El test diseñado por el "Commissariat à l'Énergie Atomique - CEA" (la comisión francesa sobre energía atómica), desarrollado, elaborado y comercializado por Bio-Rad, permite la detección de la PrP<sup>Sc</sup> en muestras de tejidos nerviosos tomadas de animales.

Esta determinación comprende los siguientes pasos:

○ **Purificación de la PrP<sup>Sc</sup> (192 pruebas)**

Paso realizado con los siguientes reactivos y accesorios

- Kit de purificación TeSeE™ (192 pruebas) Ref.: 355-1144
- Jeringa de calibración y aguja (x 200) Ref.: 355-1174
  - o Placas de filtración (x 50) Ref.: 355-1179
- Placas Deepwell (x 50) Ref.: 359-0132
- Medium beads (x 2000) Ref.: 355-1171

○ **Detección de la PrP<sup>Sc</sup> (192 pruebas)**

Paso realizado con los siguientes reactivos:

- Kit de detección TeSeE™ (192 pruebas) - Protocolo rápido Ref.: 355-1194

# TeSeE™ KIT DE PURIFICACIÓN

192 PRUEBAS

355-1144

---

**KIT DE REACTIVOS PARA LA PURIFICACIÓN *IN VITRO* DE LA PrP<sup>Sc</sup>**

---

**Manual de instrucciones**

**BIO-RAD**

## 2-1 PRINCIPIO DE LA PURIFICACIÓN DE LA PrP<sup>Sc</sup>

Los reactivos del kit de purificación TeSeE™ permiten la purificación, la concentración y la solubilización de la PrP<sup>Sc</sup> a partir de muestras de tejidos obtenidas de animales infectados.

El procesamiento de las muestras comprende los siguientes pasos:

- Trituración de las muestras
- Tratamiento de las muestras con proteinasa K
- Concentración de la PrP<sup>Sc</sup> por precipitación
- Solubilización de la PrP<sup>Sc</sup> para el ensayo inmunoenzimático usando los reactivos del kit de detección TeSeE™ Protocolo rápido (Ref.: 355-1194).

## 2-2 MUESTRAS

**Bovinos:** la purificación de la PrP<sup>Sc</sup> se realiza en muestras del Sistema Nervioso Central (SNC). El utensilio de extracción EEB (Ref.: 355-1130) puede utilizarse para extraer tronco cerebral.

Como la distribución de la PrP<sup>Sc</sup> en el sistema nervioso central es heterogénea, se debe tomar preferentemente una muestra en el área del obex del tronco cerebral para una detección óptima. La jeringa de toma de muestras (Ref.: 355-1175) permite un muestreo fácil, rápido y seguro en el área del obex.

Por favor, revise el protocolo de toma de muestras para obtener instrucciones detalladas sobre el procedimiento de toma de muestras.

**Pequeños ruminantes y cérvidos:** la purificación de la PrP<sup>Sc</sup> se realiza en muestras del Sistema Nervioso Central (SNC) o tejidos periféricos (nódulos linfáticos, bazo,...). El utensilio de extracción de los pequeños ruminantes (Ref.: 355-1184) puede utilizarse para extraer tanto tronco cerebral como cerebelo.

Como la distribución de la PrP<sup>Sc</sup> en el sistema nervioso central es heterogénea, se debe tomar preferentemente una muestra en área del obex del tronco cerebral para una detección óptima.

Las muestras se cortan y se pesan individualmente.

*Nota: otros tejidos (amígdalas, ileon, párpados...) sólo pueden ser usados con fines de investigación.*

Las muestras se mantienen de +2°C a +8°C cuando se realiza la purificación en 24 horas o se pueden conservar congeladas durante varios meses. Sólo se deben someter a 3 ciclos de congelación/descongelación. Si se tienen que transportar las muestras, se deben acondicionar de acuerdo con las leyes locales.

## 2-3 COMPOSICIÓN DEL KIT DE PURIFICACIÓN TeSeE™

ETIQUETADO	TIPO DE REACTIVOS	PRESENTACIÓN	CONSERVACIÓN
<b>Tubo de trituración</b>	Tubo de trituración que contiene bolitas de cerámica en una solución tampón Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	2 bolsas (2 x 96 tubos)	+2°C a +25°C
<b>Reactivo A</b>	Solución de desnaturalización	1 frasco (55 ml)	+2°C a +8°C
<b>Reactivo B</b>	Solución de precipitación Colorante: azul de bromofenol	1 frasco (55 ml)	+2°C a +8°C
<b>Reactivo C</b>	Tampón de solubilización Colorante : verde malaquita	1 frasco (7 ml)	+2°C a +8°C
<b>PK</b>	Proteinasa K Colorante: rojo de fenol	1 frasco (0,5 ml)	+2°C a +8°C

El reactivo A, el reactivo B y los tubos de trituración son componentes genéricos. Pueden ser utilizados con cualquier lote del Kit de purificación TeSeE™.

## 2-4 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos del kit de purificación TeSeE™ excepto la proteinasa K están listos para su uso.

El reactivo A es el tampón de dilución de la proteinasa K.

La solución se debe preparar de siguiente manera (4 µl de proteinasa K en 1 ml de reactivo A):

NÚMERO DE MUESTRAS	REACTIVO A	PROTEINASA 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

Los volúmenes se deben medir con una pipeta de forma precisa. La punta de pipeta conteniendo la PK se debe aclarar mediante ciclos sucesivos de aspiración/distribución en el reactivo A.

Después de su reconstitución, homogeneizar la solución mediante inversiones sucesivas hasta obtener una solución homogénea roja.

## 2-5 CONSERVACIÓN, CADUCIDAD

Conservar el Kit de Purificación TeSeE™ (Ref.: 355-1144) de +2°C a +8°C. Todos los reactivos son estables a esta temperatura hasta la fecha de caducidad indicada en el kit (antes y después de abrir los frascos).

Después de la dilución, la solución reconstituida de proteinasa K a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) se debe usar en 6 horas.

## 2-6 PROCEDIMIENTO

Para el procesamiento semiautomático del protocolo de purificación, consultar el manual del operador de TeSeE™ NSP.

### Protocolo manual:

#### 1. Muestras:

**Para los tejidos periféricos (ganglios linfáticos, bazo) se tiene que añadir una bolita de tamaño medio ("Medium bead", Ref.: 355-1171) en el tubo de trituración antes de poner la muestra.**

Tomar una masa de 350 mg ± 40 mg de tejido nervioso del tronco cerebral, de preferencia en el área del obex o 200 mg ± 20 mg de tejido periférico.

Depositar las muestras en los tubos de trituración, cerrar firmemente y proceder a la trituración en el homogeneizador (systemas Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ o TeSeE™ PRECESS 48™).

## 2. Trituración de la muestra:

Colocar los tubos en la corona del homogeneizador (systemas Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ o TeSeE™ PRECESS 48™). Realizar un ciclo de agitación con los siguientes parámetros del instrumento:

	Ribolyser®		TeSeE™ PRECESS 24™ o 48™	
	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos
Tiempo (seg.)	45	2 x 45*	-	-
Velocidad	6,5	6,5	-	-
Programa	-	-	Programa 1	Programa 2

\* Esperar 5 minutos entre 2 ciclos de trituración.

Si la trituración es insuficiente, se pueden realizar hasta 2 ciclos más de agitación, asegurando que la temperatura del tubo vuelve a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) entre cada ciclo (usando hielo machacado, por ejemplo).

## 3. Transferencia de la muestra:

Sacar los tubos de trituración del homogeneizador, resuspender el homogenizado por inversión antes de abrir los tubos.

Transferir el homogenizado con uno de los siguientes métodos:

### • Método de jeringa de calibración

Coger 250 µl con la jeringa de calibración (Ref.: 355-1174) poniendo especial atención en sumergir la aguja en el fondo de las bolitas para evitar coger fragmentos de tejido poco homogenizados.

Transferir los 250 µl de muestra en un tubo Eppendorf de 2 ml o en una placa Deepwell (Ref.: 359-0132).

### • Método de placa de filtración

La transferencia y la filtración se hacen en distintas fases usando una placa de filtración (Ref.: 355-1179) y una placa Deepwell (Ref.: 359-0132), con una de las siguientes técnicas de filtración.

- Vacío:

Encajar la placa Deepwell (Ref.: 359-0132) (la placa madre) en el fondo del sistema de vacío, poner la tapa y seguidamente la placa de filtración (Ref.: 355-1179). Coger al menos 400 µl ( $\leq 1000 \mu\text{l}$ ) con una punta de 1000 µl y transferir a los pocillos de la placa de filtración (Ref.: 355-1179), excluyendo las 6 primeras posiciones (desde A1 a F1). Poner un film de plástico sobre la placa de filtración. Poner el indicador de vacío de la bomba (Ref.: 359-0350) a 25,4 cm Hg ( $\pm 2.5\%$ ). Encender la bomba y chequear que el indicador marca el vacío correcto, abrir entonces la válvula del colector durante 1 minuto  $\pm 6$  s. Cerrar la válvula, apagar la bomba y liberar el vacío del colector.

- Centrifugación:

Coger al menos 400 µl ( $\leq 1000 \mu\text{l}$ ) con una punta de 1000 µl y transferir a los pocillos de la placa de filtración (Ref.: 355-1179) antes de encajarla en la placa Deepwell (Ref.: 359-0132) (la placa madre), excluyendo las 6 primeras posiciones (desde A1 a F1). Poner un film de plástico sobre la placa de filtración.

Centrifugar el sistema completo (placa de filtración y placa Deepwell) durante 1 min a 500 g. Tener cuidado de mantener la placa de filtración de forma segura en posición sobre la placa Deepwell.

*Nota:*

La centrifuga debe estar equipada con el rotor de microplacas Deepwell (Ref.: 359-0136), para la centrifuga Eppendorf 5804R (Ref.: 359-1396).

Independientemente de la técnica utilizada, descartar la placa de filtración y transferir 250 µl de muestra filtrada a otra placa Deepwell (la placa de purificación) para el protocolo manual o colocar directamente la placa madre en el NSP (véase el manual de operador del TeSeE™ NSP).

*Nota :*

En este paso, los tubos de trituración tras la homogenización, los tubos Eppendorf y la placa Deepwell después de la transferencia de la muestra pueden guardarse, cerrados:

	A temperatura ambiente (+18°C a +30°C) por 8 horas	A +2°C a 8°C (en hielo o en la nevera) por 15 horas	A -20°C por 1 año*
Tubos de trituración y los tubos Eppendorf	Sí	Sí	Sí
Placa Deepwell	Sí	Sí	No

\* Las muestras congeladas se dejarán descongelar a T° ambiente (+18°C a +30°C). Se pueden someter a un máximo de 3 ciclos de congelación/descongelación. Se deben homogenizar siempre por inversión antes de su uso.

#### 4. Tratamiento con PK:

Distribuir 250 µl (± 10%) de solución de proteinasa K reconstituida [ver párrafo 2.4] en cada tubo o en cada pocillo de la placa de Purificación. No exceder intervalos de 5 minutos en la distribución de la proteinasa K reconstituida entre la primera y la última muestra. Homogenizar inmediatamente por inversión 10 veces los tubos cerrados o la placa Deepwell sellada con film de aluminio. No exceder los 2 minutos entre la homogenización y la incubación a 37°C. Incubar a 37°C ± 2°C en un termobloque durante 10 ± 1 minuto.

*Nota :*

Si se usa la placa Deepwell, el termobloque debe estar equipado con un adaptador especial para dicha placa (Ref.: 359-0134).

#### 5. Precipitación de la PrP<sup>Sc</sup> con reactivo B:

Retirar los tubos o la placa Deepwell del termobloque. Abrir los tubos y distribuir 250 µl (± 10%) de reactivo B en todos los tubos o en cada pocillo de la placa Deepwell. Seguir el mismo orden de distribución que el descrito en el paso 4. No exceder intervalos de 2 minutos entre la retirada del termobloque y la homogenización. Dicha homogenización se realizará en las mismas condiciones que en el paso 4.

#### 6. Concentración de la PrP<sup>Sc</sup> (centrifugación):

Dentro de los 30 minutos siguientes a la distribución del reactivo B y el mezclado: centrifugar los tubos o la placa de purificación en las siguientes condiciones:

Centrifugación	Tubos		Placa Deepwell
Velocidad (g)	20 000	15 000	2 000
Tiempo (mm)	5	7	10
Temperatura (°C)	20	20	4

*Nota:*

Para la placa Deepwell esperar 5 minutos a 37°C o 10 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) antes de centrifugar.

#### 7. Aclarado de la muestra:

Descartar el sobrenadante invirtiendo los tubos en un contenedor de desechos. Secar los tubos mediante inversión en un papel absorbente durante 5 minutos.

O poner la placa Deepwell en el aspirador DW40 (Ref.: 359-0137). Seleccionar el programa 'TSE DW' y el número de tiras a utilizar. Los pocillos de la placa Deepwell deben quedar secos al final del proceso de aspiración mediante la inversión de la placa sobre papel absorbente durante 5 minutos.

Distribuir 25  $\mu$ l ( $\pm$  10%) de reactivo C en todos los tubos o pocillo de la placa Deepwell. No exceder un intervalo de 10 minutos entre el final de la operación de secado y la distribución del reactivo C.

Incubar inmediatamente durante  $5 \pm 1$  minuto a  $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . No exceder los 2 minutos entre la distribución del reactivo C y el comienzo de la incubación. No sellar la placa Deepwell durante la incubación.

*Nota :*

Si se usa la placa Deepwell, el termobloque debe estar equipado con un adaptador especial para dicha placa (Ref.: 359-0134).

Retirar los tubos o la placa Deepwell del incubador y homogenizar los tubos con un vórtex ( $5 \pm 2$  segundos).

Las muestras en tubos o Deepwell pueden ser almacenadas durante 5 horas a  $+2^{\circ}\text{C}$  a  $+8^{\circ}\text{C}$  o congeladas durante 72 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las muestras congeladas deben ser descongeladas a temperatura ambiente ( $+18^{\circ}\text{C}$  a  $+30^{\circ}\text{C}$ ) y homogenizadas con un vortex ( $5 \pm 2$  segundos).

Por favor, siga la información del protocolo incluido en el kit TeSeE Detección Protocolo rápido (Ref.: 355-1194) para un protocolo detallado del ensayo de detección.

## **2-7 LÍMITES DEL PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN**

Pueden encontrarse dificultades durante el paso de trituración cuando se usan muestras deshidratadas o tejidos periféricos. Si es necesario, se puede repetir el paso de trituración (paso No.2 del procedimiento) varias veces con este tipo de muestras.

# **TeSeE™ KIT DE DETECCIÓN - Protocolo rápido**

192 PRUEBAS

355-1194

---

**KIT DE REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN *IN VITRO* DE LA PrP<sup>sc</sup>  
DESPUES DE LA PURIFICACIÓN**

---

**Manual de instrucciones**

**BIO-RAD**

### **3-1 PRINCIPIO DE LA DETECCIÓN DE LA PrP<sup>Sc</sup> POR EL MÉTODO EIA**

El kit de detección TeSeE™ Protocolo rápido es una técnica inmunoenzimática (formato “sandwich”) en la que se usan dos anticuerpos monoclonales para la detección de la proteína priónica anormal, resistente a la proteinasa K, en los tejidos obtenidas de animales infectados. El kit contiene suficientes reactivos para realizar 192 ensayos (incluyendo controles).

La fase sólida se compone de 12 tiras de 8 pocillos de poliestireno recubiertos con el primer anticuerpo monoclonal. El segundo anticuerpo monoclonal está unido a la peroxidasa.

El ensayo consta de los siguientes pasos:

1. Distribución de los controles negativos (R3), positivos (R4) y de las muestras preparadas con los reactivos del Kit de Purificación TeSeE™ (Ref.: 355-1144) en los pocillos de la microplaca recubiertos con el primer anticuerpo monoclonal. Se puede controlar visualmente la distribución, puesto que hay una notable diferencia de color entre un pocillo vacío y un pocillo que contiene una muestra.
2. Incubación.
3. Lavado y posterior distribución del anticuerpo marcado con peroxidasa. Esta distribución también se puede controlar visualmente por la diferencia de color entre un pocillo vacío y un pocillo que contiene la solución conjugada.
4. Incubación.
5. Lavado y posterior revelado de la actividad enzimática unida a la fase sólida por adición del sustrato.
6. Parada del revelado del color, determinación de la densidad óptica a 450 nm - 620 nm (modo bicromático) e interpretación de los resultados.

### **3-2 MUESTRAS**

El ensayo sólo se puede realizar en muestras obtenidas de tejidos tratados con los reactivos y en las condiciones de uso del Kit de Purificación TeSeE™ (Ref.: 355-1144).

Las muestras purificadas se deben diluir con el reactivo R6 del Kit de Detección TeSeE™ Protocolo rápido.

### 3-3 COMPOSICIÓN DEL KIT

ETIQUETADO	TIPO DE REACTIVO	PRESENTACIÓN
R1	<b>Microplaca:</b> 12 tiras de 8 pocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-PrP	2 placas
R2	<b>Solución de lavado:</b> Concentrada 10x Tampón Tris-NaCl pH 7,4 Conservante: ProClin™ 300 (0,01%)	1 frasco (250 ml)
R3	<b>Control negativo:</b> Tampón PBS pH 7,2 suplementado con BSA Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco (4 ml)
R4	<b>Control positivo:</b> Tampón PBS pH 7,4 suplementado con un péptido sintético no infeccioso. Liofilizado. Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco
R6	<b>Diluyente de las muestras:</b> Tampón PBS pH 7,2 suplementado con BSA y rojo fenol Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco (35 ml)
R7	<b>Conjugado:</b> concentrado 10 veces del anticuerpo monoclonal anti-PrP marcado con peroxidasa en un tampón PBS pH 7,1 suplementada con proteínas bovinas y coloreada con rojo fenol Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco (2.8 ml)
R8	<b>Tampón sustrato de la peroxidasa:</b> Solución de ácido cítrico y acetato de sodio pH 4,0 con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 0,015% y dimetilsulfóxido al 4% (DMSO)	1 frasco (60 ml)
R9	<b>Cromógeno:</b> Solución de tetrametilbenzidina (TMB)	1 frasco (5 ml)
R10	<b>Solución de parada:</b> Ácido sulfúrico 1 N	1 frasco (28 ml)
	<b>Películas adhesivas</b>	8

Los siguientes reactivos son componentes genéricos. diluyente de las muestras (R6), solución de lavado (R2), tampón sustrato de la peroxidasa (R8), cromógeno (R9) y solución de parada (R10). Pueden ser utilizados con cualquier lote del Kit de detección TeSeE™ Protocolo rápido.

### 3-4 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Antes de usar, permitir que los reactivos del Kit de detección TeSeE™ Protocolo rápido alcancen la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 30 minutos.

#### 1- Reactivos listos para usar

##### Microplacas (R1):

Antes de abrir la bolsa cerrada, hay que dejar que la microplaca se ajuste a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) en su envase protector con una bolsa desecante para evitar que se produzca condensación de agua en los pocillos. Abrir en el punto de soldadura y volver a meter inmediatamente las tiras no usadas en la bolsa.

Cerrar herméticamente la bolsa después de expulsar el aire que pudiese quedar y conservar de +2°C a +8°C.

El control negativo (R3), la solución de dilución de la muestra (R6) y la solución de parada (R10) están listos para usar.

## 2- Reactivos a reconstituir

### Solución de lavado (R2):

Diluir la solución de lavado R2 hasta 1/10 en agua destilada o ultra pura (por ejemplo, 100 ml del reactivo R2 en 900 ml de agua destilada).

### Control positivo (R4):

Golpear muy suavemente el frasco del control positivo (R4) en la poyata de laboratorio para desprender cualquier sustancia que se haya adherido al tapón de goma. Abrir el frasco y disolver el contenido en 4 ml del diluyente R6. Tapar y mantener en reposo aproximadamente 1 minuto, agitando suavemente de vez en cuando para facilitar la disolución.

### Conjugado (R7):

Diluir el reactivo R7 hasta 1/10 en la solución de lavado recientemente reconstituida (por ejemplo, 0,1 ml del reactivo R7 en 0,9 ml de la solución de lavado reconstituida) teniendo en cuenta que es necesario 1 ml del conjugado preparado para completar 1 tira. Homogeneizar suavemente sin utilizar un agitador Vortex®.

### Solución de revelado enzimático (R8 + R9):

Diluir el reactivo R9 a 1/11 en el reactivo R8 (por ejemplo, 0,1 ml del reactivo R9 en 1 ml del reactivo R8) teniendo en cuenta que 1,1 ml de solución de revelado enzimática es necesario para completar 1 tira. Homogeneizar suavemente sin utilizar un agitador Vortex®.

## 3-5 CONSERVACIÓN, CADUCIDAD

Mantener el kit de +2°C a +8°C antes de su uso; todos los reactivos son estables a esta temperatura hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

Las caducidades de los reactivos después de la preparación son las siguientes:

ETIQUETADO	REACTIVOS	CADUCIDAD
R1	Microplaca en bolsa cerrada herméticamente	1 mes de +2°C a +8°C
R2	Solución de lavado reconstituida	24 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) 2 semanas de +2°C a +8°C
R4	Control positivo reconstituido	2 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) 4 horas de +2°C a +8°C 6 meses a -20°C Se recomienda dividir la solución reconstituida en alícuotas de 0,5 ml y guardarlas inmediatamente a -20°C. Se pueden someter a 3 ciclos consecutivos de congelación/descongelación.
R7	Solución conjugada reconstituida (con la solución de lavado diluida)	8 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C)
R8 + R9	Solución de revelado	6 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), siempre protegida de la luz

## 3-6 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA DETECCIÓN DE LA PrP<sup>Sc</sup> POR EL METODO EIA

Deben diluirse las muestras purificadas (capítulo 2.6) con 125 µl (± 10%) del reactivo R6. Homogeneizar las muestras con Vortex® (5 ± 2 segundos) justo antes de distribuir las en la microplaca (R1).

## 3-7 PROCEDIMIENTO

### TeSeE™ Kit de Detección - Protocolo rápido (Ref.: 355-1194) Procedimiento

#### Protocolo manual:

1. Retirar el soporte de microplacas y el número de tiras necesarias (R1) del envase protector. Guardar las tiras no usadas junto con la bolsa desecante en el envase de la microplaca y cerrarla herméticamente.
2. Preparar el control positivo (R4), según lo descrito en el capítulo 3.4.2.
3. Para cada serie de pruebas y para cada placa, distribuir 100 µl ( $\pm 10\%$ ) de control/muestra en los pocillos en el siguiente orden:
  - Pocillos A1, B1, C1, D1: control negativo (R3)
  - Pocillos E1, F1: control positivo (R4)
  - Pocillos G1, H1, etc... muestra diluida con el reactivo (R6)Cada muestra se deposita en un solo pocillo.
4. Cubrir con película adhesiva e incubar durante 30 minutos  $\pm 2$  minutos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
5. Preparar la solución de lavado (R2).
6. Preparar la solución del conjugado (R7).
7. Retirar la película adhesiva y realizar 3 ciclos de lavado. Se obtienen condiciones óptimas de lavado con lavadores de placas PW40, PW41 o 1575 Bio-Rad con el programa TSE 3. No dejar que la microplaca se quede al aire durante más de 5 minutos después del último ciclo de lavado. Secar por inversión en papel absorbente antes del siguiente paso.
8. Distribuir 100 µl ( $\pm 10\%$ ) de solución del conjugado (R7) en cada pocillo.
9. Tapar con una película adhesiva e incubar 30 minutos  $\pm 2$  minutos de  $+2^{\circ}\text{C}$  a  $+8^{\circ}\text{C}$ .
10. Preparar la solución de revelado enzimático (R8+R9).
11. Retirar la película adhesiva y realizar cinco ciclos de lavado. Se obtienen condiciones óptimas de lavado con lavadores de placas PW40, PW41 o 1575 Bio-Rad con el programa TSE 5. No dejar que la microplaca se quede al aire durante más de 5 minutos después del último ciclo de lavado. Secar por inversión en papel absorbente antes del siguiente paso.
12. Distribuir 100 µl ( $\pm 10\%$ ) de solución de revelado (R8+R9) en cada pocillo e incubar la placa en la oscuridad y a temperatura ambiente ( $+18^{\circ}\text{C}$  a  $+30^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos  $\pm 2$  minutos. No usar la película adhesiva durante esta incubación.
13. Añadir 100 µl ( $\pm 10\%$ ) de solución de parada (R10) a cada pocillo de acuerdo con la misma secuencia y el mismo orden utilizado en la distribución de la solución de revelado.
14. Limpiar cuidadosamente la cara inferior de la placa y determinar la densidad óptica a 450 nm - 620 nm (modo bicromático) en un máximo de 30 minutos después de parar la reacción (las tiras deben mantenerse siempre protegidas de la luz antes de la lectura).

## Parámetros del lavador de microplacas

### NOMBRE: TSE 3

EDIT mode function	PLATE	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	.	.	.

### NOMBRE: TSE 5

EDIT mode function	PLATE	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	.	.	.

### NOMBRE DE LA PLACA: 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 CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 1) Cálculo de la densidad óptica (DO) media del control negativo

DO R3 = media de los 4 valores de DO de los pocillos R3

### 2) Cálculo del valor umbral \_\_\_\_\_

El valor umbral es igual a:  $\overline{DO\ R3} + 0.210$

#### Ejemplo

DO R3 = 0,020

Valor umbral = 0,020 + 0,210 = 0,230

### 3) Condición de validación de la prueba

#### • Control negativo (R3) :

##### a) Validación de los valores individuales del control negativo:

Todos los valores para el control negativo deben ser inferiores a 0,150 unidades de densidad óptica.

Se puede eliminar como máximo un valor individual si la densidad óptica es superior o igual a 0,150.

Se repite la prueba si más de 1 valor del control negativo sobrepasa 0,150.

##### b) Homogeneidad de los valores del control negativo:

Calcular la media de los valores de la densidad óptica de los controles negativos que quedan.

Las densidades ópticas cuyos valores son superiores al valor de la media de las densidades ópticas de los controles negativos más 40% ( $\overline{DO\ R3} + 40\%$ ) se deben eliminar.

- Si un valor está eliminado en la parte a), solamente se puede descartar un valor en la parte b).

- Si ninguno de los valores está eliminado en la parte a), se pueden eliminar como máximo dos valores en la parte b).

La prueba se debe repetir si más de dos valores de los controles negativos están descartados [sección a)+b)].

#### • Control positivo (R4):

La media de las densidades ópticas de los controles positivos (DO R4) tiene que ser superior o igual a 1.00 (DO).

Se debe repetir la prueba si la media de las densidades ópticas de los controles positivos (DO R4) es menor de 1.00 (DO).

### 4) Interpretación de los resultados

Las muestras cuya densidad óptica sean inferior al valor umbral se consideran negativas según el kit de detección TeSeE™ Protocolo rápido.

Sin embargo, los resultados situados justo por debajo del valor umbral (valor umbral - 10%) deben interpretarse con cuidado y se deben volver a estudiar las muestras correspondientes por duplicado a partir del homogeneizado inicial.

Las muestras cuya densidad óptica sean mayor o igual al valor umbral se consideran inicialmente reactivas según el kit de detección TeSeE™ Protocolo rápido y se deben volver a estudiar por duplicado, a partir del homogeneizado inicial, antes de la interpretación final.

Después de repetir la prueba, se considera que la prueba es positiva según el kit de detección TeSeE™ Protocolo rápido cuando al menos una de las 2 medidas es positiva (mayor que o igual al valor umbral). Se considera que la prueba es negativa según el kit de detección TeSeE™ Protocolo rápido cuando estos dos valores son menores que el valor umbral.

Las muestras repetidas por duplicado y que resulten negativas según el kit de detección TeSeE™ Protocolo rápido, pero en las que uno de los 2 valores está próximo al valor umbral (valor umbral - 10%) deben interpretarse con cuidado.

### 3-9 LÍMITES DE LA PRUEBA

Un resultado negativo significa que la muestra analizada no contiene ninguna PrP<sup>Sc</sup> detectable por el kit de detección TeSeE™ Protocolo rápido. Sin embargo, como los niveles muy bajos de PrP<sup>Sc</sup> no pueden ser detectados, un resultado negativo no descarta la posibilidad de infección.

Cualquier muestra con un resultado positivo reproducible según los criterios de interpretación de la prueba tiene que estar confirmada de acuerdo con en el laboratorio de referencia nacional del país para las EETs, o el laboratorio de referencia de la Comunidad Europea en casos excepcionales.

### 4 - MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Agua destilada o agua ultra pura.
- Soluciones de hipoclorito de sodio 20 000 ppm (concentración final) e hidróxido de sodio 1 M (concentración final).
- Papel absorbente.
- Guantes desechables.
- Gafas protectoras o máscara con visor.

#### Paso de purificación:

- Microtubos de ensayo de polipropileno de 2 ml con tapas y un soporte de tubos adecuado.
- Pipetas automáticas o semiautomáticas regulables, que puedan distribuir volúmenes entre 20 µl y 500 µl.
- Homogeneizador de tejidos tipo Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ o TeSeE™ PRECESS 48™\*
- Centrífuga\* adaptada a los microtubos de ensayo.
- Un incubador de microtubos\* termostatzado a 37°C ± 2°C y un incubador de microtubos\* termostatzado a 100°C ± 5°C.

Para la purificación semiautomática de la muestra: sistema TeSeE™ NSP.

#### Paso de detección:

- Pipetas automáticas o semiautomáticas regulables o fijas que puedan distribuir 50 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl.
- Tubos de ensayo graduados de 10 ml, 20 ml y 100 ml.
- Contenedores de desechos contaminantes.
- Incubador de microplaca termostatzado a 37°C ± 2°C.
- Cámara refrigerada de +2°C a +8°C.
- Sistema de lavado de microplacas automático o semiautomático.\*
- Aparato de lectura de microplacas\* (equipado con filtros de 450 nm y 620 nm).
- Sistema de microplacas\* para la automatización de las etapas del protocolo del análisis. La calidad del sistema debe estar en concordancia con los requisitos del protocolo de la prueba.

\* Contactar Bio-Rad para obtener la lista de los instrumentos disponibles.

### 5 - PRECAUCIONES

La calidad de los resultados depende del cumplimiento de las siguientes buenas prácticas de laboratorio:

- Los reactivos se deben conservar de +2°C a +8°C.
- No usar reactivos cuya caducidad haya expirado.
- No usar la proteínaasa K reconstituida y conservada a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante más de 6 horas.
- No mezclar reactivos procedentes de kits con diferentes números de lote en el mismo ensayo, excepto los reactivos genéricos: solución de lavado (R2), diluyente de las muestras (R6), tampón sustrato de la peroxidasa (R8), cromógeno (R9), solución de parada (R10), tubos de trituración, reactivo A y reactivo B.

- La solución de lavado (R2), el diluyente de las muestras (R6), el tampón sustrato de la peroxidasa (R8), el cromógeno (R9), la solución de parada (R10) y los tubos de trituración se pueden utilizar con otros productos de la gama TeSeE™ (TeSeE™ y TeSeE™ sheep/goat).
- Permitir que los reactivos se ajusten a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 30 minutos antes de su uso.
- Reconstituir cuidadosamente los reactivos, evitando cualquier contaminación.
- No realizar la prueba en presencia de vapores reactivos (ácidos, básicos, aldehídos) o polvo, que podrían alterar la actividad enzimática del conjugado.
- Usar sólo tubos de polipropileno.
- Usar elementos de vidrio perfectamente lavados, aclarados en agua destilada o preferiblemente, material desechable.
- No dejar que la microplaca se seque más de 5 minutos entre el final del lavado y la distribución de los reactivos.
- La reacción enzimática es muy sensible a todos los metales o iones metálicos. En consecuencia, ningún elemento metálico debe entrar en contacto con las diversas soluciones que contienen el conjugado o el sustrato.
- La solución de revelado (tampón de sustrato + cromógeno) debe ser incolora. La aparición de un color pocos minutos después de la reconstitución indica que no se puede usar el reactivo y debe reemplazarse. La solución de revelado se debe preparar preferiblemente en recipientes de plástico desechables o material de vidrio previamente lavado con ácido clorhídrico 1 N, aclarado en agua destilada y seco. **Conservar esta solución protegida de la luz.**
- Usar una punta de pipeta nueva para cada muestra.
- El lavado de los pocillos es un paso esencial del procedimiento: respetar el número recomendado de ciclos de lavado y asegurarse de que todos los pocillos están completamente llenos y luego completamente vacíos. Un lavado incorrecto puede dar resultados incorrectos.
- No usar nunca el mismo recipiente ni la misma punta de pipeta para distribuir el conjugado y la solución de revelado.

## 6 - NORMAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD

De manera general las condiciones de higiene, las medidas de bioseguridad y los buenos métodos de trabajo tienen que seguir la recomendación de las autoridades legales del país.

- Todos los reactivos del kit están diseñados para su uso en el diagnóstico *in vitro*.
- Utilizar guantes desechables durante la manipulación de los reactivos y de las muestras y lavarse las manos concienzudamente después de manipularlos.
- No pipetear con la boca.
- Usar contenedores de polipropileno para evitar cualquier herida con vidrio roto.
- Todos los materiales que estén en contacto directo con las muestras y las soluciones de lavado se deben considerar contaminados.
- Evitar las salpicaduras de muestras o de las soluciones que las contienen.
- Las superficies contaminadas se deben limpiar con lejía a 20 000 ppm. Cuando el líquido contaminante es un ácido, las superficies contaminadas se deben neutralizar en primer lugar con soda antes de usar lejía. Las superficies se deben aclarar con agua destilada, se deben secar con etanol y limpiar con papel absorbente. El material empleado para el lavado se debe desechar en un contenedor especial para desechos contaminados.
- Las muestras, el material y los productos contaminados se deben eliminar después de la descontaminación:
  - empapando en soda 1M (concentración final) durante una hora a temperatura ambiente (+18°C a +30°C),
  - o empapando en lejía a 20 000 ppm durante 1 hora a temperatura ambiente (+18°C a +30°C),

- o en autoclave a un mínimo de 134°C durante por lo menos 18 minutos, bajo 3 bares de presión.

**Nota: no autoclavar nunca soluciones que contengan lejía o reactivo B.**

- Todas las operaciones implicadas en las pruebas de detección de la encefalopatía espongiforme transmisible (EET) están sometidas a leyes y se deben realizar en un laboratorio aislado, de acceso limitado y controlado, dedicados exclusivamente a esta actividad. Es obligatorio el uso de bata de laboratorio, calzas, guantes, máscaras con visor o máscaras simples con gafas de seguridad para garantizar la seguridad del operador.
- Los operadores deben recibir una formación específica sobre los riesgos relacionados con los agentes de la EET o priones y las formas validadas de descontaminación para agentes no convencionales.

Las medidas de bioseguridad deben estar de acuerdo con las recomendaciones de las autoridades legales del país.

- Evitar cualquier contacto del tampón del sustrato, del cromógeno y de la solución de parada con la piel y las mucosas.
- Neutralizar o someter a autoclave todas las soluciones de lavado o los desechos de lavado de cualquier líquido que contengan muestras biológicas antes de su eliminación.
- El reactivo B está una sustancia peligrosa clasificada como nociva (> 25% alcohol) en la reglamentación europea.
- Los reactivos que contengan 0.1% del ProClin™ 300 son clasificados como preparaciones irritantes en la reglamentación europea.



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

**R : 10-22-37/38-41-43-67** Inflamable. Nocivo en caso de ingestión. Irritante para el sistema respiratorio y la piel. Riesgo de serias lesiones en caso de contacto con los ojos. Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel. La inhalación de vapores puede provocar somnolencia y vértigos.

**S : 7/9-13-26-28-37/39-46** Conservar el recipiente bien cerrado y en un lugar bien ventilado. Conservar apartado de alimentos y bebidas, incluyendo los destinados a animales. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con abundante agua y consultar a un especialista. En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua. Utilizar guantes apropiados y un sistema de protección de ojos/cara. En caso de ingestión, consultar inmediatamente con un médico y enseñarle el envase o la etiqueta.

## 7 - BIBLIOGRAFÍA

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

# Jeringa de muestra

355-1175

---

**METODO DE MUESTREO PARA LOS ANALISIS DE SCREENING  
DE LA ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME TRANSMISIBLE (EET)  
DE BIO-RAD (PLATELIA® Y TeSeE™ PROTOCOLO RAPIDO)**

---

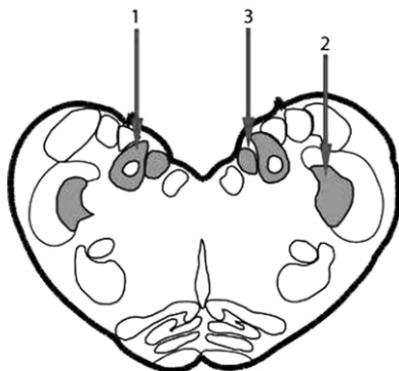
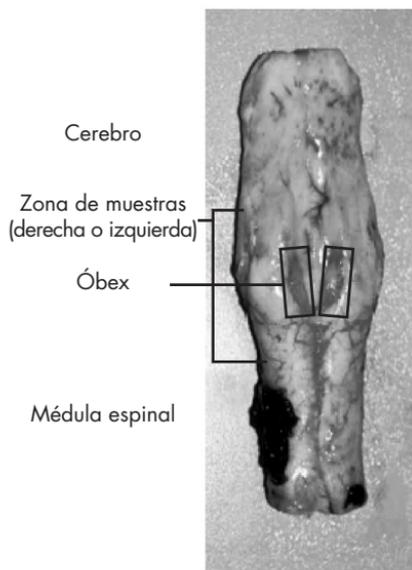
**BIO-RAD**

## ÍNDICE

- 1 - INFORMACIÓN GENERAL
  - 1 - 1 Recogida de la muestra en el matadero
  - 1 - 2 Procedimiento de muestreo en el laboratorio
- 2 - JERINGA DE MUESTRA DE BIO-RAD
- 3 - MASA DE MUESTRA NECESARIA PARA EL ANÁLISIS
- 4 - PROCEDIMIENTO OPERATIVO
- 5 - PRECAUCIONES/ADVERTENCIAS
- 6 - PROCEDIMIENTOS DE SALUD Y SEGURIDAD

## 1 - INFORMACIÓN GENERAL

Los análisis de screening de la EET de Bio-Rad se aplican sobre una muestra de  $350 \pm 40$  mg de tejidos del Sistema Nervioso Central (SNC). La región anatómica específica para detectar la PrP<sup>Sc</sup> de los animales infectados es el tronco encefálico, en concreto, la zona del núcleo del nervio vagal en la región del óbex. Esta es la región del tronco encefálico donde más se concentra la PrP<sup>Sc</sup>.

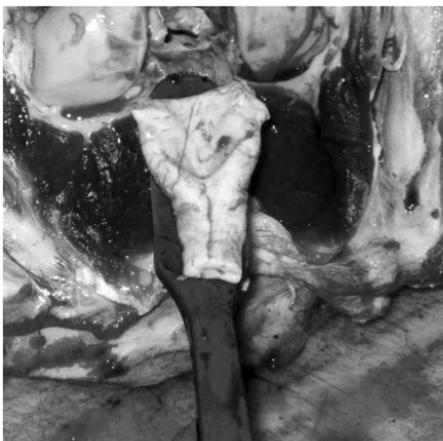


Corte transversalmente el tronco cerebral a nivel del óbex identificando las zonas claves para el diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico en EEB [núcleo del tracto solitario (1) y núcleo del tracto del trigémino V (2) y scrapie (núcleo dorsal del vago (3))]

(Procedencia: OIE Manual de Análisis diagnósticos y vacunas para animales terrestres)

### 1 - 1 Recogida de la muestra en el matadero

El tronco encefálico se recoge de manera fácil y rápida con un instrumento adecuado o una cuchara de recogida de la muestra, a través del orificio occipital, sin abrir la cavidad craneal.



Recogida de la muestra con la cuchara de Bio-Rad

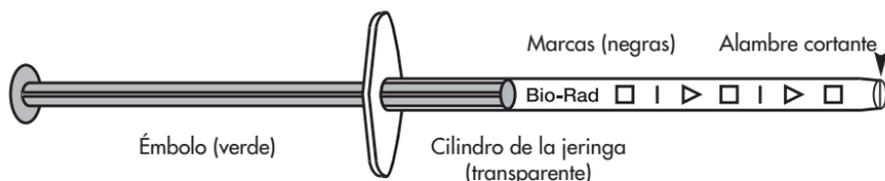
## 1 - 2 Procedimiento de muestreo en el laboratorio

Toda la muestra del tronco encefálico se remite al laboratorio de análisis procurando seguir las medidas pertinentes de seguridad biológica recomendadas por las autoridades sanitarias del país en cuestión. Dentro del laboratorio se corta la cantidad apropiada del material cerebral (hoja de bisturí...) de la región del óbex o se recoge con la **jeringa de muestra de Bio-Rad (Ref.: 355-1175)** que permite tomar la cantidad requerida de la región pertinente de un modo rápido y seguro sin riesgo de lesión por objetos punzantes o cortantes.

Seguidamente se describe el procedimiento para la recogida eficaz de la muestra de la región del óbex empleando la jeringa de muestra de Bio-Rad sin dañar el tejido.

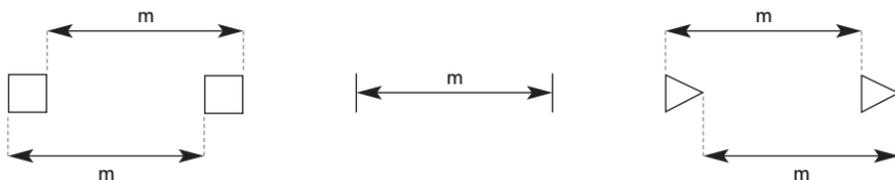
## 2 - JERINGA DE MUESTRA DE BIO-RAD

La jeringa de muestra de Bio-Rad consta de un émbolo verde y un cilindro transparente. El cilindro de la jeringa está rotulado con una serie de formas geométricas. (□ ▷ |)



## 3 - MASA DE MUESTRA NECESARIA PARA EL ANALISIS

La masa de la muestra debe ocupar el espacio entre dos símbolos de la misma forma; esta cifra corresponde a una masa (m) de 350 +/- 40 mg.



## 4 - PROCEDIMIENTO OPERATIVO

- Tome una jeringa de muestra y extraiga el émbolo verde hasta aproximadamente 1 cm de su posición inicial y luego llévelo otra vez a la posición inicial.
- Sujete con firmeza el tronco encefálico con una mano, empleando un envoltorio desechable (bolsa de plástico, guante, etc.) para evitar la posible contaminación cruzada de la muestra. El extremo del tronco encefálico debe permanecer accesible.
- Utilice la otra mano para colocar el extremo abierto de la jeringa de muestra en el lado derecho o izquierdo de la base del tronco encefálico.

**Nota:** después de recoger la muestra se debe poder efectuar una hemisección completa del tronco encefálico, con la región del óbex intacta, por si fuera necesario un análisis confirmatorio.



- Inserte poco a poco el cilindro de la jeringa dentro del tronco encefálico sin desplazar el émbolo verde (relativamente al tronco encefálico).

**Nota: cuando tome la muestra de la región del óbex procure que el cilindro de la jeringa permanezca dentro del lugar elegido del tronco.**



- Detenga el movimiento cuando la parte superior del cilindro haya alcanzado el límite alto de la zona de muestreo.
- Corte el cilindro de muestra dando una vuelta completa al cilindro de la jeringa.
- Extraiga lentamente el cilindro de muestra del tronco encefálico, procurando no dañar las estructuras vecinas. El resto del tronco encefálico se puede colocar en el envase original de la muestra.
- Verifique si se han quedado atrapadas burbujas de aire en el cilindro de la muestra. Si fuera necesario, comprima el cilindro de la muestra cerrando la parte superior del cilindro de la jeringa y empujando el émbolo verde hasta que desaparezcan las burbujas de aire retenidas. Al mismo tiempo, cerciórese de que el tejido próximo al orificio del cilindro de la jeringa sigue dentro de ella.
- **Sin girar la parte superior del cilindro de la jeringa, desplace el émbolo verde hasta el símbolo siguiente.**
- Compruebe que el cilindro de la muestra cubre, al menos, una zona correspondiente a “m” según se describe en la sección anterior de este documento (masa de muestra necesaria para el análisis).
- Tome un tubo de trituración y retire la tapa; desplace el émbolo verde con cuidado hasta el siguiente símbolo de forma idéntica para dispensar la masa correcta de tejido (“m”) en el tubo de trituración. Recuerde que debe llevar el émbolo hasta la posición correspondiente del símbolo siguiente, según se indica en “Masa de muestra necesaria para el análisis”.
- Corte el cilindro de muestra sujetando la parte superior de la jeringa de muestra contra el borde interno del tubo de trituración.
- La parte no utilizada del cilindro de muestra se puede conservar llevando el cilindro de muestra al envase original junto con el resto del tronco encefálico.

## 5 - PRECAUCIONES/ADVERTENCIAS

Al igual que cuando se utiliza cualquier dispositivo de pipeteo, Bio-Rad recomienda una supervisión periódica de los operadores que utilicen la jeringa de muestra con la toma de una población estadística representativa de muestras para cerciorarse de la idoneidad del peso de cada muestra.

Las jeringas de muestra sólo se deben utilizar una vez y desechar a continuación para evitar cualquier contaminación cruzada de las muestras.

La muestra debe extraerse con todas las precauciones pertinentes para minimizar el riesgo de contaminación de los operadores.

Las jeringas utilizadas se desecharán una vez descontaminadas (véase instrucciones sobre salud y seguridad).

Si el cilindro de muestra no llena todo el cilindro de la jeringa, a pesar de efectuar correctamente el procedimiento, conviene pesar la muestra.

## 6 - PROCEDIMIENTOS DE SALUD Y SEGURIDAD

Las condiciones higiénicas, las medidas de seguridad biológica y las buenas prácticas de laboratorio se adaptarán a las directrices de las autoridades sanitarias del país.

La jeringa de muestra sólo está prevista para su uso con procedimientos diagnósticos "in vitro".

Póngase guantes desechables cuando manipule reactivos y muestras y lávese bien las manos después.

Todo equipo que haya entrado en contacto directo con las muestras debe considerarse contaminado.

Las superficies contaminadas se limpiarán con 20.000 ppm de una solución de hipoclorito sódico. Si el líquido contaminante es un ácido, las superficies contaminadas se neutralizarán primero con hidróxido sódico antes de utilizar el hipoclorito sódico. Hay que enjuagar las superficies con agua destilada, secarlas con etanol y frotarlas con un papel absorbente. El material de limpieza empleado se desechará en un envase específico para vertidos contaminados.

Las muestras, el equipo y los productos contaminados se eliminarán tras la descontaminación con uno de estos métodos:

- inmersión en hidróxido sódico 1 M (concentración final) durante 1 hora a temperatura ambiente (de +18°C a +30°C).
  - inmersión en una solución de hipoclorito sódico clorométrica 20 000 ppm durante 1 hora a temperatura ambiente (de +18°C a +30°C).
  - tratamiento con autoclave a una temperatura de al menos 134°C durante un período mínimo de 18 minutos con una presión de 3 baros.
- **Nota: nunca meta en el autoclave soluciones que contengan lejía.**

Todas las operaciones implicadas en los análisis de screening de la encefalopatía espongiforme transmisible (TSE) se hallan sujetas a las directrices de seguridad local y deben aplicarse en un laboratorio aislado, limitado y de acceso controlado, dedicado exclusivamente a esta actividad. Para la seguridad del operador se exigirá el uso de una bata de laboratorio o uniforme de fogonero, calzas, guantes (dos pares), mascarilla con visor e mascarilla simple con gafas de seguridad para garantizar la seguridad del operador.

Los operadores recibirán adiestramiento específico acerca de los riesgos relacionados con los agentes de las EETs o priones y los métodos validados para la descontaminación de los agentes poco convencionales. Las medidas de seguridad biológica se ajustarán a las directrices de las autoridades sanitarias del país en cuestión.

## 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 Entrepoto 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