

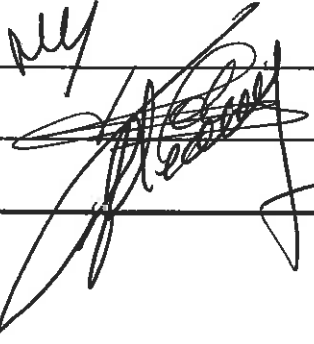
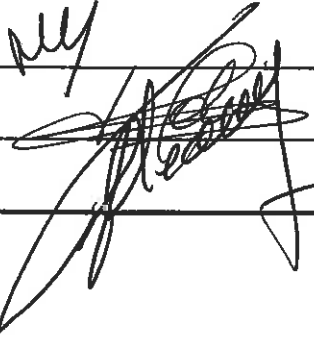


Modes opératoires test EPO

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date : 11/09/2003 1 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

Action	Personne concernée	Date	Visa
rédigé par	Nathalie CREPIN	02/09/2003	
vérifié par	Francoise LASNE	02/09/2003	
vérifié par	Adeline MOLINA	09/09/2003	
approuvé par	Jacques DE CEARRIZ	09/09/2003	

SOMMAIRE

1/ But

2/ Domaine d'application

3/ Définitions

4/ Equipements, Fournitures, Imprimés

5/ Contenu du mode opératoire

6/ Annexes

ASSURANCE QUALITÉ
LNDD

APPLICABLE le
 12 SEP. 2003

PÉRIMÉ le
 10 OCT. 2005

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date : 11/09/2003 2 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

1/ But

Description du mode opératoire de caractérisation de l'EPO urinaire.

2/ Domaine d'application

Personnes concernées : Opérateurs du département recherche et développement biologie.

3/ Définitions

- Témoin négatif : Urine provenant d'un donneur identifié du laboratoire (Cf E-P-13 dans le classeur C-P-EPO), dont on est certain qu'elle ne contient pas d'EPO recombinante, qui sert de témoin de préparation et de migration. Il est préparé en même temps que les échantillons urinaires de contrôle, selon M-Ex-25 pour le screening et M-Ex-28 pour la confirmation.
- Standard : EPO naturelle purifiée qui sert de témoin de migration, lors des confirmations. Cf E-P-19 pour le suivi des codifications.
- Indicateur de migration : Solution de rouge de méthyle qui sert à voir pendant la phase de migration que celle-ci s'effectue correctement.
- Rétentat r : nom donné à l'échantillon urinaire concentré issu de l'étape de préparation M-Ex-25 pour le screening et M-Ex-28 pour la confirmation.

4/ Equipements, Fournitures, Imprimés

- Cuves d'électrofocalisation "Multiphor II" (Amersham-Pharmacia) :
Electro1 Unité 3 ou Electro 1 Unité 4 salle 107.
Electro3 Unité 2 salle 110.
- Cryostats "Multi Temp III" (Amersham-Pharmacia) :
Electro1 Unité 5 salle 110.
Electro3 Unité 3 salle 110.
- Générateurs de focalisation :
 "EPS 3500 XL" (Amersham-Pharmacia) : *Electro 1 Unité 1* salle 107.
 "EPS 3501 XL" (Amersham-Pharmacia) : *Electro 3 Unité 1* salle 110 et *Electro 1 Unité 10* salle 107.
- Générateurs de blot :
 "Power Pac 200" (Bio-Rad) : *Electro 1 Unités 2, 13 et 18* salle 107.
- Electrodes pour le blot :
 "Trans-Blot SD" en platine (Bio-Rad) : *Electro 1 Unité 6* salle 107.
 "Nova Blot" en graphite (Pharmacia-Biotech) : *Electro 1 Unités 9, 11, 12 et 17* salle 107.
- Electrodes pour le "Double Blotting" :
 "Nova Blot" (Pharmacia Biotech) : *Electro 1 Unités 8, 14, 15 et 16* salle 107.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date : 11/09/2003 3 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

- Caméras pour la révélation :
 "Fuji Film LAS-1000" (Raytest) : *Camera 1* salle 107. Cf I-N-36 pour l'utilisation.
 "Fuji Film LAS-3000" (Raytest) : *Caméra 2* salle 110. Cf I-N-37 pour l'utilisation.

5/ Contenu du mode opératoire

La caractérisation de l'EPO s'effectue en 8 étapes, que l'on peut distinguer comme suit :

- Pré-focalisation, c'est à dire établissement du gradient de pH au sein du gel (préparé selon M-P-11) : § 5-1.
- Pendant la pré-focalisation, préparation des rétentats et des références : § 5-2.
- Dépôt des rétentats sur le gel pré-focalisé et migration des rétentats sur le gel : § 5-3.
- Blot : transfert des protéines du gel vers la membrane "noire" : § 5-4.
- Traitement de la membrane "noire" : § 5-5.
- "Double Blotting" : transfert des anticorps primaires de la membrane "noire" vers la membrane "rouge" : § 5-6.
- Traitement de la membrane "rouge" : § 5-7.
- Révélation : § 5-8.

Au cours de la manipulation, renseigner au fur et à mesure l'enregistrement E-TE-06A (screening) ou E-TE-06B (confirmation) de suivi de l'analyse.

5-1/ Pré-focalisation :

- Allumer le cryostat afin de réfrigérer la plaque de refroidissement sur laquelle sera placé le gel.
- Le gel se trouve sous atmosphère humide depuis sa préparation, il convient de le démouler afin de le positionner sur la plaque de refroidissement : avec une pince glissée sous le Gelbond®, exercer une pression afin de décoller celui-ci de la plaque de verre.
- A l'aide du " Film Remover ", éliminer environ 5 mm de gel en haut et en bas.
- Mouiller la plaque de refroidissement et positionner le gel sur cette plaque (en s'aidant du schéma inscrit sur la plaque), de façon à ce que le contact Gelbond® / plaque soit parfait : en effet, une bulle d'air entre le Gelbond® et la plaque pourrait entraîner un mauvais refroidissement du gel qui risquerait de brûler sous l'action du courant électrique.
- Placer les électrolytes E1 (Cathode : solution 2% w/v ~~électrolytes~~ ^{d'ampholytes} 6-8) et E2 (anode : 0.5 M H₃PO₄) dans des réservoirs à réactifs.
- Préparer deux "strips" (*Strip-AP*) légèrement plus courts que la longueur du gel (1 mm environ), les plonger dans les solutions d'électrolytes, les éponger sur du papier absorbant, et les placer sur le gel aux emplacements prévus à cet effet.
- Placer les électrodes au contact des strips ; les brancher, puis fermer le couvercle.
- Sélectionner le programme 1 du générateur de focalisation (*Electro 1 Unité 1 ou 10* salle 107 ou *Electro 3 Unité 1* salle 110), le modifier comme suit :

- 250 V
- 150 mA
- 70 W
- 30 min

Sélectionner " Run " afin de démarrer la pré-focalisation.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date : 11/09/2003 4 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

5-2/ Préparation des rétentats et des références :

Ces préparations sont effectuées pendant l'étape de pré-focalisation.

5-2-1/ Préparation des rétentats :

- Décongeler si nécessaire un aliquote de chaque rétentat, bien "vortexer".

Rappel : les rétentats ont été préparés à une concentration maximale de 800 UI/L, à l'issue du mode opératoire de préparation M-Ex-25 (screening) ou M-Ex-28 (confirmation).

Chauffer à 80°C (*Agit.21, unités 1 et 2*) pendant 3 minutes, puis refroidir les micro tubes dans de l'eau froide.

Ajouter 1/10 du volume final de "Surfact Amps® 80" (*Tw80-PB*), i.e 2.2 µL, afin d'empêcher la précipitation de l'EPO au niveau des dépôts. Bien "vortexer".

5-2-2/ Préparation des références :

La solution de références est préparée à partir des solutions mères d' "EPO BRP" (à défaut, d'époïétine α ou β) et de "Nesp" diluées dans du 1% w/v BSA / T2 (Cf M-P-10).

Les reconstitutions de la solution mère d'EPO BRP sont effectuées selon M-P-10 et suivies par l'enregistrement E-P-18.

Les ouvertures des seringues de Nesp sont suivies par l'enregistrement E-P-20.

Quantité déposée sur le gel : elle est définie lors de la première utilisation d'un nouveau flacon, et reste identique lors de chaque utilisation ; détermination de cette quantité en fonction du résultat de la focalisation de plusieurs dilutions du nouveau flacon.

La concentration et les dilutions à effectuer sont notées sur l'enregistrement E-DIL-01.

- Ajouter 1/10 du volume final de "Surfact Amps® 80" (*Tw80-PB*). Bien "vortexer".

5-2-3/ Standard d'EPO naturelle : (pour les confirmations uniquement)

Il est déposé sur le gel à une concentration de 800 UI/L, et est dilué dans une solution à 1%₀ BSA/ Tris préparée selon besoin : Dilution 1/10 du diluant 1% w/v BSA / T2 dans T2.

Ajouter 1/10 du volume final de "Surfact Amps® 80" (*Tw80-PB*). Bien "vortexer".

Les reconstitutions du standard sont suivies par l'enregistrement E-P-19.

5-2-4/ Indicateur de migration et blanc réactif :

L'indicateur de migration est du rouge de méthyle (RM), préparé qualitativement pour une longue durée : dilution à environ 10% w/v de RM dans du méthanol ; puis dilution dans l'eau ultra-pure jusqu'à obtention d'une couleur rouge pâle.

Le blanc réactif n'est utilisé que pour les confirmations : 20 µL H₂O + 2.2 µL "Surfact Amps® 80" (*Tw80-PB*).

Avec H₂O = Eau ultra-pure qui sera utilisée pour le rinçage de la pince lors des dépôts.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date : 11/09/2003 5 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

5-3/ Dépôt des rétentats sur le gel et migration :

Pour éviter toute pollution, employer une pince et un paquet de "Sample Application Pieces" différents pour les références et pour les rétentats / témoin négatif / standard / blanc réactif / RM.

- Imprégner de 20 µL des différents échantillons les "Sample Application Pieces" (SAP-AP), et les déposer à la surface du gel pré-focalisé aux endroits prévus à cet effet, selon l'ordre d'emplacement défini sur l'enregistrement E-PLAN-01, et selon l'ordre chronologique suivant :

- Indicateur de migration (Rouge de méthyle RM)
- Eventuellement blanc réactif.
- Témoin négatif.
- Eventuellement standard.
- Echantillons à analyser (rétentats).
- Références.

Pour chacune des analyses (screening et confirmation), le plan indicatif à respecter pour les dépôts est précisé en annexe.

Remarques : - Entre chaque dépôt, rincer la pince avec de l'eau ultra-pure.
 - Si les rétentats sont pris en masse, ajouter jusqu'à 20 µL d'eau ultra-pure pour pouvoir les déposer sur les "Sample Application Pieces".

- Replacer les électrodes. Fermer le couvercle.

- Sélectionner le programme 2 du générateur de focalisation (*Electro 1 Unités 1 ou 10* salle 107 ou *Electro 3 Unité 1* salle 110), le modifier comme suit :

- 2000 V
- 131 mA
- 3600 V/h
- Ajuster la puissance à raison de 1 W par dépôt possible sur le gel.

Sélectionner " Run " afin de démarrer la migration.

Pendant la migration, préparer le nécessaire pour le blot, en portant des gants :

- Une membrane de transfert hydrophobe "Immobilon-P" (*Immob-MI*) et une membrane intermédiaire hydrophile "Durapore" (*Durap-MI*) de longueurs en centimètres égales au nombre de dépôts et de largeurs 7 cm. Donner un sens à la membrane d'"Immobilon-P" par une lettre noire en haut à droite.

- 2 paquets de 9 papiers filtres ("Electrode Paper Novablot" *PF-AP*), d'1 cm de moins que les membranes en longueur et de 0.5 cm de moins en largeur.

- Un bain de Tampon T3 (Cf M-P-10) 25 mM Tris / 192 mM glycine.

- Lorsque le générateur affiche 3000 V/h environ, conditionner les membranes :

- "Immobilon" : - MeOH, 1 minute environ
 - H₂O doublement distillée, 30 secondes environ en agitant manuellement
 - H₂O doublement distillée, 2 minutes environ
 - Tampon T3 (Cf M-P-10) 25 mM Tris / 192 mM Glycine
- "Durapore" et papiers filtres : - Tampon T3 (Cf M-P-10) 25 mM Tris / 192 mM Glycine

- Si les électrodes utilisées pour le blot sont celles en graphite (*Electro 1 Unités 9 ou 12*), les humidifier avec de l'eau déminéralisée au moment du conditionnement des membranes.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date : 11/09/2003 6 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

NB : La membrane d'Immobilon-P" (Immobilon-MI) avec la lettre noire d'identification en haut à droite sera nommée "membrane noire" pour la suite du protocole.

Il est très important que la membrane ne sèche pas au cours des manipulations : veiller à ne pas la laisser à l'air libre.

Préparer également le nécessaire pour le traitement de la membrane noire, mais aussi pour la membrane qui sera issue du "Double-Blotting" :

- Environ 100 mL d'une solution à 5 mM Dithiothreitol (DTT) / PBS :
 Dans un bécher muni d'un barreau aimanté, peser environ 80 mg de DTT.
 Remplir une éprouvette graduée de PBS, à raison en mL de 1.3 fois la masse de DTT pesée en mg ; transvaser le volume de PBS dans le bécher.
 Lorsque le DTT est dissout, transférer dans un récipient d'incubation (de taille adaptée à la membrane) et le placer au bain-marie à 37 °C.
- 400 mL de solution 5 % w/v lait écrémé (SAT-) / PBS : solution S
 => 20 g lait + 400 mL PBS
- 30 mL de solution S/5 pour l'anticorps primaire Ac I (AcI-) :
 Le volume d'anticorps ajouté est indiqué sur l'enregistrement E-DIL-01. S'assurer que l'anticorps a été vérifié et validé selon le mode opératoire M-Vpt-01.
 => 6 mL S + 24 mL PBS + x µL AcI
- 1200 mL de solution de rinçage et de lavage : S/10
 => 120 mL S + 1080 mL PBS
- 40 mL de solution S/5 qui servira pour l'anticorps secondaire Ac II (AcII-) ; celui-ci sera ajouté à la solution S/5 au moment de l'utilisation, à une concentration définie pour un flacon donné : voir E-DIL-01.
 => 8 mL S + 32 mL PBS

5-4/ Blot : transfert des protéines du gel vers la membrane noire

Lorsque la migration est terminée, le générateur sonne, sélectionner "stop".

- Eteindre le générateur et le cryostat ; ouvrir la cuve. Retirer les strips du gel puis retirer le gel de la plaque de refroidissement.
- Oter aux ciseaux la portion de gel où il y a les dépôts, à environ 0.3 cm des "Sample Application Pieces" en direction de l'anode.
- Retourner le gel à la surface d'un bain de tampon T3 "25 mM Tris / 192 mM Glycine" (Cf M-P-10) pendant 2 minutes.
 Pendant ce temps, placer un premier paquet de neuf papiers filtres conditionnés sur l'anode (si les électrodes utilisées sont celles en graphite, éliminer au préalable l'excès d'eau du conditionnement) ; chasser les bulles d'air avec le rouleau passé sur un "Parafilm".
- Désolidariser le gel du Gelbond® à l'aide du "Film Remover".
- Sur le gel, déposer :
 1- La membrane intermédiaire hydrophile "Durapore" (Durap-MI), alignée du côté de l'anode et recouvrant tous les dépôts.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date : 11/09/2003 7 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

2- La membrane hydrophobe "Immobilon-P" (*Immobilon-MI*) de transfert, avec la lettre noire côté anode face au premier dépôt, parfaitement superposée à la membrane hydrophile.

Attention au risque de séchage : placer rapidement la membrane noire de transfert sur la membrane intermédiaire.

- Eliminer aux ciseaux le surplus de gel dépassant en haut et en bas des membranes et du côté de la cathode.
- Faire adhérer un bande de papier filtre sec sur la partie du gel non recouverte par les membranes (= côté anode).
- Retourner le sandwich "gel + membranes" sur les papiers filtres, en prenant garde à ce que le sandwich soit bien centré sur les papiers filtres.
- Décoller le gel de son "Gelbond®".
- Eliminer le gel dépassant des membranes.
- Sur le gel, déposer le deuxième paquet de 9 papiers filtres conditionnés ; chasser les bulles d'air avec le rouleau passé délicatement (ne pas faire bouger le gel) sur un "Parafilm".
- Mettre en place la cathode (si les électrodes utilisées sont celles en graphite, éliminer au préalable l'excès d'eau du conditionnement).
- Brancher les électrodes, programmer le générateur de blot (*Electro 1 Unités 2, 13 ou 18* salle 107) :

$$\left. \begin{array}{l} I = \text{cte} = 1 \text{ mA} / \text{cm}^2 \text{ de membrane} \\ t = 30 \text{ min} \end{array} \right\}$$

Puis faire démarrer le transfert des protéines du gel vers la membrane d'"Immobilon-P" (*Immobilon-MI*).

Lorsque le blot est terminé, récupérer la membrane noire, jeter le reste.

Manipulation de la membrane noire après le blot :

Mettre le côté avec les protéines vers soi : lettre noire contre le fond de la boîte d'incubation (on voit alors la lettre noire "en haut à gauche")

NE : Attention au risque de séchage, placer rapidement la membrane dans les solutions.

Nettoyage des électrodes :

Les laver à l'eau déminéralisée.

5-5/ Traitement de la membrane noire :

- **Traitement au DTT** : rupture des ponts di-sulfures de l'EPO.
 Environ 100 mL - 45 min - 37°C
- **Rinçage au PBS** : élimination de l'excès de DTT
 2 rinçages avec environ 100 mL PBS - Agitation manuelle de 15 s environ
- **Saturation de la membrane** : Saturation des sites libres de la membrane
 Environ 50 mL S - 45 min - Température ambiante - Agitation mécanique lente

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date : 11/09/2003 8 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

- Rinçage au PBS : élimination de l'excès de saturant
2 rinçages avec environ 100 mL PBS - Agitation manuelle de 15 s environ
- Fixation de l'Ac I : fixation de l'Ac I sur les isoformes de l'EPO
30 mL - 1 h - Température ambiante - Agitation mécanique lente
- Lavages de la membrane :
 - 3 rinçages avec environ 100 mL S/10 - Agitation manuelle de 15 s environ
 - 3 lavages avec environ 100 mL S/10 - 8 min - Agitation mécanique rapide
- Rinçage au PBS :
Rinçage avec environ 100 mL de PBS - Agitation manuelle de 15 s environ.

Pendant le traitement de la membrane noire, préparer le nécessaire pour le double blot, en portant des gants :

- Une membrane de transfert hydrophobe "Immobilon-P" (*Immobilon-MI*) et une membrane intermédiaire hydrophile "Durapore" (*Durapore-MI*) de longueurs en centimètres égales au nombre de dépôts et de largeurs 7 cm.
Donner un sens à la membrane d'"Immobilon-P" par un "H" rouge en haut à droite.
La caméra nous permet de révéler des membranes de maximum 13 cm de longueur, il nous faudra donc couper la membrane rouge avant de la révéler ; délimiter par un trait rouge la limite de coupure : à x cm du haut de la membrane, avec x = numéro de dépôt sur le plan de gel du RM intermédiaire.
Noter un "B" rouge sous le trait, à droite ; cela permettra d'orienter la demi-membrane.
- 2 paquets de 9 papiers filtres ("Electrode Paper Novablot" *PF-AP*), d'1 cm de moins que les membranes en longueur et de 0.5 cm de moins en largeur.
- Pendant le premier lavage de la membrane noire, conditionner les membranes :
 - "Immobilon" :
 - MeOH, 30 secondes en agitant manuellement
 - H₂O doublement distillée, 30 secondes en agitant manuellement
 - H₂O doublement distillée, 2 minutes
 - Tampon T4 (Cf M-P-10) 0.7 % CH₃COOH
 - "Durapore" et papiers filtres : - Tampon T4 (Cf M-P-10) 0.7 % CH₃COOH
- Préparer les électrodes en graphite (*Electro 1 Unités 8 ou 15*), en les humidifiant avec de l'eau déminéralisée au moment du conditionnement des membranes.

NB : La membrane d'"Immobilon-P" (*Immobilon-MI*) avec les lettres rouges d'identification sera nommée "membrane rouge" pour la suite du protocole.

Il est très important que la membrane ne sèche pas au cours des manipulations : veiller à ne jamais la laisser à l'air libre.

5-6/ Double Blotting : transfert des Ac I de la membrane noire vers la membrane rouge

- Eliminer l'excès d'eau des électrodes.
- Placer un premier paquet de neuf papiers filtres conditionnés sur l'anode ; chasser les bulles d'air avec le rouleau passé sur un "Parafilm".

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date : 11/09/2003 9 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

- Déposer sur les papiers filtres la membrane noire avec les protéines vers soi : concrètement, avec la lettre noire au contact des papiers filtres.
- Placer la membrane intermédiaire hydrophile "Durapore" (*Durap-MI*) sur la membrane noire.
- Placer la membrane hydrophobe "Immobilon-P" (*Immob-MI*) rouge de transfert, avec le "H" rouge superposé à la lettre noire.
Attention au risque de séchage : placer rapidement la membrane rouge sur la membrane intermédiaire.
- Centrer sur les membranes le second paquet de neuf papiers filtres conditionnés ; chasser les bulles d'air avec le rouleau passé sur un "Parafilm".
- Mettre en place la cathode.

Brancher les électrodes, programmer le générateur de blot (*Electro 1 Unités 2, 13 ou 18* salle 107) :

$$\left\{ \begin{array}{l} I = \text{cte} = 0.8 \text{ mA} / \text{cm}^2 \text{ de membrane} \\ t = 10 \text{ min} \end{array} \right.$$

Puis faire démarrer le programme.

Lorsque le double-blot est terminé, rincer la membrane rouge au PBS, jeter le reste.

Manipulation de la membrane rouge après le blot :

Mettre vers soi le côté avec les protéines : opposé des lettres rouges contre le fond de la boîte d'incubation (on voit alors les lettres rouges "à droite").

NB : Attention au risque de séchage, placer rapidement la membrane dans les solutions.

Nettoyage des électrodes :

Les laver à l'eau déminéralisée.

5-7/ Traitement de la membrane rouge :

- Saturation de la membrane : Saturation des sites libres de la membrane
 Environ 50 mL de S - 45 min - Température ambiante - Agitation mécanique lente

Ajouter l'anticorps secondaire préalablement vortexé dans la solution S/5 préparée précédemment : le volume ajouté est indiqué sur l'enregistrement E-DIL-01 ; la reconstitution des anticorps est suivie par E-P-12. S'assurer que l'anti-corps a été vérifié et validé selon le mode opératoire M-Vpt-01.

- Rinçages au PBS : Elimination de l'excès de saturant
 2 rinçages avec environ 100 mL de PBS - Agitation manuelle de 15 s environ
- Fixation de l'Ac II : Fixation de l'Ac II sur l'Ac I
 40 mL - Toute la nuit - 4 °C - Agitation mécanique lente

Le lendemain, il est nécessaire de préparer le nécessaire pour la suite du traitement de la membrane rouge : utilisation du reste des solutions S et S/10 de la veille.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date :11/09/2003 10 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

. 40 mL de solution S/5 pour la Streptavidine Peroxidase (SP-) : le volume ajouté est indiqué sur l'enregistrement E-DIL-01. S'assurer que la SP a été vérifiée et validée selon le mode opératoire M-Vpt-01.

⇒ 8 mL S + 24 mL PBS + x µL SP préalablement centrifugée (2700 g - 5 min)

- Lavages de la membrane : Elimination de l'excès d'Ac II
 - 3 rinçages avec environ 100 mL S/10 - Température ambiante - Agitation manuelle de 15 s environ
 - 3 lavages avec environ 100 mL S/10 - Température ambiante - 8 min - Agitation mécanique rapide
- Fixation de la SP : fixation de la SP sur l'Ac II
 - 40 mL - 1 h - 4°C - Agitation mécanique lente
- Lavages de la membrane : Elimination de l'excès de SP
 - 3 rinçages avec environ 100 mL PBS - Température ambiante - Agitation manuelle de 15 s environ
 - 3 lavages avec environ 100 mL PBS - Température ambiante - 8 min - Agitation mécanique rapide

5-8/ Révélation :

- Préparation du réactif chimiluminescent :

Tout réactif de chimie luminescence est composé d'un flacon de substrat et d'un flacon d'oxydant : préparer le mélange selon les proportions prévues par le fabricant.

Exemples :

"Super Signal" (RC-PB) : 1 mL de substrat pour 1 mL d'oxydant

"Covalight" (Cov-Cov) : 1 mL de substrat pour 1 goutte d'oxydant

Prévoir un volume de réactif de minimum 30 µL / cm² de membrane.

- Préparation de la caméra :

Voir les instructions d'utilisation I-N-36 (Caméra 1) et I-N-37 (Caméra 2)

- Egoutter la membrane à révéler et la placer sur une plaque de "Plexiglass" à l'endroit prévu à cet effet. Eliminer avec un papier filtre le surplus de tampon PBS sur les bords de la membrane.

- Placer la plaque de "Plexiglass" sur le plateau noir en position 2 de la chambre noire de la caméra. Sélectionner "Focusing", l'image de la membrane apparaît à l'écran ; ajuster alors la position de la plaque de "Plexiglass" dans la chambre noire afin de visualiser toute la membrane à l'écran.

- Avec une micro-pipette (200-1000 µL ou 1-5 mL), déposer sur toute la surface de la membrane le mélange "substrat + oxydant". Fermer la porte de la chambre noire. Laisser en contact 3 min.

- Ouvrir la chambre noire, placer un transparent sur la membrane en évitant la formation de bulles d'air, refermer la chambre noire.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date :11/09/2003 11 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

- Sélectionner "Increment", une incrémentation de 30 secondes, et cliquer sur "Start". L'image apparaît toutes les trente secondes.
- Stopper l'exposition dès saturation ; s'il n'y a pas saturation, stopper après 20 minutes. Les 16 dernières images apparaissent à l'écran ; sauver les images souhaitées dans le fichier :
« c:\images_fujil\images "mois + année en cours" » sous le nom « *EPO + Numéro de manip + temps d'exposition* »
- Jeter la membrane rouge venant d'être révélée.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-An -43 Version : D Date :11/09/2003 12 / 12
CARACTERISATION DE L'EPO URINAIRE		

6/ Annexes :

Plan de gel à respecter
pour une analyse de screening

- 1- RM
- 2- Référence
- 3- Référence
- 4- Rétentat
- 5- Rétentat
- 6- Rétentat
- 7- Rétentat
- 8- Référence
- 9- Rétentat
- 10- Rétentat
- 11- Rétentat
- 12- Référence
- 13- RM
- 14- Référence
- 15- Rétentat
- 16- Rétentat
- 17- Rétentat
- 18- Rétentat
- 19- Référence
- 20- Rétentat
- 21- Rétentat
- 22- Rétentat
- 23- Rétentat
- 24- Référence
- 25- RM

Plan de gel à respecter
pour une analyse de confirmation

Voir I-CONF-07

Notes :

- Le témoin négatif est appelé ici rétentat, il n'a ainsi pas de place définie sur le gel.
- Le plan de gel ci-dessus est donné à titre d'exemple, il est bien sûr adaptable en fonction du nombre de rétentats à analyser.
- Il est par contre indispensable de respecter :
 - RM aux extrémités du gel, RM intermédiaire en position 13 maximum.
 - Références placées aux extrémités et en position intermédiaire des demi-gels.

LNDD	ENREGISTREMENT	Codification : E-INFO Version : B Date : 08/06/2004 1/1
COMPLEMENT TRANSITOIRE D'UN DOCUMENT QUALITE		

Cet enregistrement n'est à utiliser que si la modification est **URGENTE** et **majeure** et/ou **conséquente** et/ou applicable à plusieurs documents

Référence(s) du(des) document(s) qualité concerné(s): Y1-Am - 43 (v. D)

Durée d'application de la modification:

TEMPORAIRE, date de début d'application:..... date de fin d'application:

DEFINITIVE (modification à apporter dans la prochaine version du(des)doc.concerné(s))

date de début d'application:.....02/07/04.

Modification apportée: § 5.2.2/ Prépa des réf

Quantité déposée sur le gel: " ---- chaque utilisation : détermination de cette quantité en fonction de la comparaison des résultats de la foc de plusieurs dilutions du mouleau flacon et des résultats de la foc du témoin négatif; l'intensité maximale de la dilution choisie doit être du même ordre de grandeur que celle du TN $\left(\frac{1}{2} I_{max\ ref} \approx \leq I_{max\ TN} \leq 2 I_{max\ ref} \approx \right) -$

~~La dilution "choisie" sera utilisée lors de 2 manipulations de contrôle les lesquelles~~

ASSURANCE QUALITE
LNDD

VISA DU RESPONSABLE TECHNIQUE:



NB: Faire valider cet enregistrement à l'Assurance Qualité (tampon)

L'original de cet enregistrement est à archiver vivant au Département Assurance Qualité

LNDD	ENREGISTREMENT	Codification : E-INFO Version : A Date : 25/09/2003
		1/1
COMPLEMENT TRANSITOIRE D'UN DOCUMENT QUALITE		

Modification à date du 080304

Justification : Dans l'optique d'un futur changement des critères de positivité

Référence du document qualité concerné:	$\left\{ \begin{array}{l} M-P-10 \\ M-Am-43 \\ I-CONF-07 \end{array} \right.$
-----------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

* M-P-10 § 5.9.1 : Le catholyte E1 est additionné de RTI

→ Prépa RTI : dilution 0,5% w/v de RTI dans TleOH

20 mg RTI + 4 ml TleOH

DU = 1 an pas reprise des aux et péremption des réactifs

- Créer le suivi des prép: E-P-09b

- Commanda du RTI ayant une péremption connue

→ Pour 20 ml de E1 : 18,925 ml H₂O + 25 µl an + 1 ml 6-8

* M-Am-43 :

§ 3) : l'indicateur de migration est intégré à la solution de catholyte

§ 5.2.4) : suppression de l'alinéa concernant l'indicateur de migration

§ 3) : suppression indicateur de migration

§ 1) : aux emplacements du RTI, placer 1 SAP imprégné de 20 µl d'H₂O

* I-CONF-07 :

aux emplacements du RTI, placer 1 SAP imprégné de 20 µl d'H₂O

ASSURANCE QUALITÉ
LNDD

VISA DU RESPONSABLE TECHNIQUE:



NB: Faire valider cet enregistrement à l'Assurance Qualité (tampon)

LNDD	ENREGISTREMENT	Codification : E-INFO Version : C Date : 09/07/2004
1/1		
COMPLEMENT TRANSITOIRE D'UN DOCUMENT QUALITE		

Cet enregistrement n'est à utiliser que si la modification est URGENTE et majeure et/ou conséquente et/ou applicable à plusieurs documents

Référence(s) du(des) document(s) qualité concerné(s): I - LEC - 09 (V.A)
+ 91 - Am - 43 (V.D)

ASSURANCE QUALITE
LNDD

Durée d'application de la modification:

TEMPORAIRE, date de début d'application:..... date de fin d'application:

DEFINITIVE (modification à apporter dans la prochaine version du(des) doc. concerné(s))

date de début d'application:.....200704..

Modification apportée: Précisions quant à la lecture des analyses Et

- Pour le screening : en cas de décision "Z-conf-07" ou "incertaine : incertitude de mesure", une autre lecture doit être effectuée selon le protocole décrit pages suivantes -

La décision sera basée sur les pourcentages obtenus avec cette méthode.

- Pour la confirmation : La lecture est effectuée selon le protocole décrit pages suivantes

Cette modification majeure implique que dorénavant, une photo numérique du gel soit prise (à l'issue de la migration) : à intégrer à 91 - Am - 43 -

VISA DU RESPONSABLE TECHNIQUE:



Identification par un NUMERO.....16

et validation de cet enregistrement par l'Assurance Qualité (tampon)

L'original de cet enregistrement est à archiver vivant au Département Assurance Qualité

La lecture des résultats avec l'indicateur Rouge de méthyle s'effectue pour tout échantillon à confirmer ou Inclassable – Incertitude de mesure après dépouillement des résultats suivant I-Lec-09. Elle s'applique en cas d'analyse de screening comme en cas d'analyse de confirmation.

1-Photographie du gel par un appareil numérique

A la fin de l'IEF, une photo du gel est prise sur sa plaque de refroidissement à l'aide d'un appareil photo numérique.

L'image est transférée vers l'ordinateur relié à la caméra et enregistrée sous c:\Photogel\ »Gel N°manip »

-Ouvrir le logiciel Camedia Master pro. Sélectionner Obtenir les images.

-Sélectionner l'image à transférer, cocher le bouton Images sélectionnées. Ouvrir le média

Photogel et appuyer sur la flèche  pour enregistrer l'image dans le dossier choisi.

2-Copies des images gel et fichier Aida dans un logiciel de retouche d'image.

Après révélation, l'image Aida et la photo du gel sont copiées puis collées dans un nouveau document « PhotoImpact »

- Ouvrir le logiciel PhotoImpact.

- Menu Fichier « Nouvelle »-« nouvelle Image » Choisir une taille standard A4 ainsi qu'une résolution de 200 Pixels/Pouce.

- Copie du fichier image Aida :

A partir du fichier image « EPO + N° manip+temps d'exposition »

Menu Edit « Copy Content »

Choisir une résolution de 300 dpi dans « Bitmap Size »

Dans le document ouvert PhotoImpact, coller cette image :

Menu Edition « Coller » « Comme objet »

- Copie du fichier photogel

Ouvrir la photo enregistrée par PhotoImpact

Recadrer l'image de façon à ne sélectionner que le gel à l'aide de l'outil « Découper »



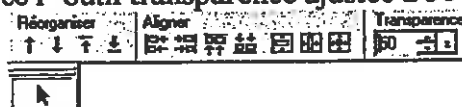
Copier l'image par Menu Edition « Copier »

Coller l'image dans le document ouvert contenant l'image Aida par Menu Edition « Coller » « Comme objet »


3-Superposition des images.

- Amener à l'arrière l'image Aida par le menu Objet « Disposer »-« Amener à l'arrière »





- Régler l'image gel avec l'outil transparence ajustée à 50



La visibilité des deux images peuvent être améliorées en jouant sur la luminosité et le contraste avec le bouton 

- Redimensionner les objets image de manière à les superposer les uns aux autres à la taille réelle avec l'outil Transformation 

- Aligner le rouge de méthyle de l'objet PhotoGel avec les bandes les plus acides des références BRP. (position approximative m_B)

On peut s'aider pour cela de l'option Rotation   0.25   de l'outil Transformation.

- Sauvegarder l'image ainsi obtenue dans c:\Gel +membrane\Gel+membrane+n° manip

4- Dépouillement des échantillons

- La position du rouge de méthyle sur les pistes échantillons définira la nouvelle valeur m_B .

Le dépouillement des échantillons est alors effectuée selon le paragraphe 5-6 de l'instruction I-Lec 09.

Les critères de décision restent inchangés avec les nouvelles ICB (paragraphe 5-3)

- Le même dépouillement est effectué pour déterminer la nouvelle valeur m_A en déplaçant l'image PhotoGel de manière à aligner le rouge de méthyle avec la bande principale la plus basique de la référence Nesp.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-Ex -25 Version : E Date : 17/10/2003 1 / 2
SCREENING EPO : PREPARATION DES ECHANTILLONS		

Action	Personne concernée	Date	Visa
rédigé par	Nathalie CREPIN	16/10/2003	
vérifié par	Francoise LASNE	16/10/2003	
vérifié par	Sandrine MARTIN	16/10/2003	
approuvé par	Jacques DE CEARRIZ	17/10/2003	

Prévoir la préparation d'un témoin négatif par gel.

Opérations	Matériel	Réactifs / consommables
Sur la fiche labo, noter : - Le volume d'urine - Le pH - La densité	REFRACT.	Papier pH : pHu-
Prise d'essai = 18 mL		Tubes coniques 50 mL Réf interne : TC-
Ajout de 200 µL de solution de "Complete™"		Réf interne : Comp-RM Préparée selon M-P-10
Ajuster à pH ≥ 7.4 : 1.8 mL tampon T1 Vérifier le pH, si nécessaire, ajuster avec T1		Papier pH : pH714- T1 : selon M-P-10
Centrifugation 10 min, 2700 g, 20°C	CENTRI.7	
Transvaser l'urine dans un autre tube, jeter le culot		Tubes coniques 50 mL Réf interne : TC-
Microfiltration	Pompe à air	"Stériflip®" : Stff-MI
Transférer l'urine dans un "Centricon® Plus 20" Centrifuger minimum 20 min, 3500 g, 20°C Conserver le filtrat avec le reliquat d'urine	CENTRI.7	Centr_20-MI
Rincer avec 20 mL de tampon T2 et 200 µL de solution de "Complete™" Centrifuger 20 min, 3500 g, 20°C	CENTRI.7	Tubes 50 mL : TC-
Centrifugation inverse 4 min, 1000 g, 20°C	CENTRI.7	T2 : selon M-P-10 Comp-RM : selon M-P-10
Transférer dans "Microcone" Centrifuger 15 min, 14000 g, 20°C	CENTRI.6	Micr-MI

ASSURANCE QUALITE
LNDD

APPLICABLE le
21 OCT. 2003

PÉRIMÉ le
20 JUL. 2004

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-Ex -25 Version : E Date : 17/10/2003 2 / 2
SCREENING EPO : PREPARATION DES ECHANTILLONS		

Opérations	Matériel	Réactifs / consommables
Centrifugation inverse 3 min. 1000 g, 20°C	CENTRI.6	
Si celui-ci est inférieur, amener le volume de rétentat à 25 µL, par ajout du volume adéquat de tampon T2		T2 : Cf M-P-10
Diluer 3 µL de rétentat dans 147 µL de Specimen Diluant du Kit de dosage EPO. Placer le reste à 4°C.	REFRIG.11	EPO-RD
Procéder au dosage EPO selon M-An-44		EPO-RD
<u>Aliquoter le rétentat</u> - 1 aliquot de 20 µL, en le diluant si nécessaire avec T2 de façon à l'amener à une concentration de 800 UI/L. - Le volume restant tel quel. <u>Cas du témoin négatif</u> Aliquots de 20 µL - 800 UI/L Placer les aliquots - A 4°C si utilisation le lendemain - A - 20 °C jusqu'à utilisation.	REFRIG.11 CONGEL.8	T2 : Cf M-P-10 Micro-tubes : MT-

Au cours de la préparation, ne pas oublier de renseigner l'enregistrement **E-TE-02G** de suivi de préparation des échantillons.

Identification du témoin négatif :

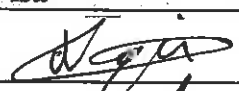
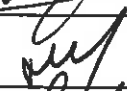
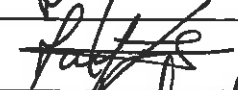
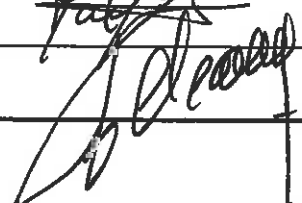
Selon le schéma : **Code TN - Date prép - (n') - (n")**

Avec : - n' : numéro éventuel de la préparation à la date considérée
 - n" : distinction des témoins négatifs, si au moins deux sont préparés en même temps (ex : lors de la préparation de plus de 12 échantillons)

Exemples : *TN 010 - 2809 - 2 - b* Témoin négatif "b", de code "010", de la deuxième préparation du 28 septembre.
 TN 010 - 2809 Témoin négatif de code "010", de la seule préparation du 28 septembre.
 TN 010 - 2809 - 1 Témoin négatif de code "010", de la première ou de la seule préparation du 28 septembre.

Remarque : sur les micro-tubes, la nomination est réduite au strict minimum, dès lors qu'aucune confusion n'est possible.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-Ex -25 Version : F Date : 20/07/2004 1 / 3
PREPARATION DES ECHANTILLONS - DEPISTAGE RAPIDE EPO		

Action	Personne concernée	Date	Visa
rédigé par	Nathalie CREPIN	20/07/2004	
vérifié par	Francoise LASNE	20/07/2004	
vérifié par	Sandrine MARTIN	20/07/2004	
approuvé par	Jacques DE CEARRIZ	20/07/2004	

Documents cités :

E-Fiche_Labo-01 ; M-P-10 ; M-An-44.

ASSURANCE QUALITÉ
LNDD

Au cours de la préparation, ne pas oublier de renseigner l'enregistrement **E-TE-02G** de suivi de préparation des échantillons.

Contenu du mode opératoire :

Prévoir la préparation d'un témoin négatif par gel.

APPLICABLE le
22 JUL. 2004

FÉRIMÉ le
02 DEC. 2004

Opérations	Matériel	Réactifs / consommables
1 Sur la fiche labo E-Fiche labo-01, noter - Le volume d'urine - Le pH - La densité	REFRACT.	Papier pH : pHu-
2 Prise d'essai = 18 mL		Tubes coniques 50 mL Réf interne : TC-
3 Ajout de 200 µL de solution de "Complete™"		Réf interne : Comp-RM Préparée selon M-P-10
4 Ajuster à pH ≥ 7.4 : 1.8 mL tampon T1 Vérifier le pH ; si nécessaire, ajuster avec T1		Papier pH : pH714- T1 : selon M-P-10
5 Centrifugation 10 min, 2700 g, 20°C	CENTRI.7	
6 Transvaser l'urine dans un autre tube, jeter le culot		Tubes coniques 50 mL Réf interne : TC-
7 Microfiltration	Pompe à air	"Stériflip®" : Stfl-MI

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-Ex -25 Version : F Date :20/07/2004 2 / 3
PREPARATION DES ECHANTILLONS - DEPISTAGE RAPIDE EPO		

8	Transférer l'urine dans un "Centricon® Plus 20" Centrifuger minimum 20 min, 3500 g, 20°C Conserver le filtrat avec le reliquat d'urine	CENTRI.7	<i>Centr_20-MI</i> Tubes 50 mL : TC-
9	Rincer avec 20 mL de tampon T2 et 200 µL de solution de "Complete™" Centrifuger 20 min, 3500 g, 20°C	CENTRI.7	T2 : selon M-P-10 Comp-RM : selon M-P-10
10	Centrifugation inverse 4 min, 1000 g, 20°C	CENTRI.7	
11	Transférer dans "Microcon®" Centrifuger 15 min, 14000 g, 20°C	CENTRI.6	<i>Micr-MI</i>
12	Centrifugation inverse 3 min, 1000 g, 20°C	CENTRI.6	
13	Si celui-ci est inférieur, amener le volume de rétentat à 25 µL, par ajout du volume adéquat de tampon T2		T2 : Cf M-P-10
14	Diluer 3 µL de rétentat dans 147 µL de Specimen Diluant du Kit de dosage EPO. Placer le reste à 4°C	REFRIG.11	<i>EPO-RD</i>
15	Procéder au dosage EPO selon M-An-44		<i>EPO-RD</i>
16	<u>Aliquoter le rétentat :</u> - 1 aliquot de 20 µL en le diluant si nécessaire avec T2 de façon à l'amener à une concentration de 800 UI/L. - Le volume restant tel quel. <u>Cas du témoin négatif :</u> Aliquots de 20 µL - 800 UI/L Placer les aliquots - A 4°C si utilisation le lendemain - A -20°C jusqu'à utilisation	REFRIG.11 CONGEL.8	T2 : Cf M-P-10 Micro-tubes : MT-

Identification du témoin négatif :

Selon le schéma : **Code TN - Date prép - (n') - (n")**

Avec : - n' : numéro éventuel de la préparation à la date considérée
- n" : distinction des témoins négatifs, si au moins deux sont préparés en même temps (ex : lors de la préparation de plus de 12 échantillons)

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-Ex -25 Version : F Date :20/07/2004 3 / 3
PREPARATION DES ECHANTILLONS - DEPISTAGE RAPIDE EPO		

Exemples : *TN 010 - 2809 - 2 - b* Témoin négatif "b", de code "010", de la deuxième préparation du 28 septembre.
 TN 010 - 2809 Témoin négatif de code "010", de la seule préparation du 28 septembre.
 TN 010 - 2809 - 1 Témoin négatif de code "010", de la première ou de la seule préparation du 28 septembre.



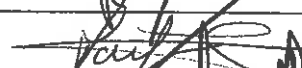
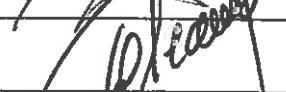
Remarque : sur les micro-tubes, la nomination est réduite au strict minimum, dès lors qu'aucune confusion n'est possible.

EVOLUTIONS

N° Version	Motif	Date
F	Numérotation des étapes.	20/07/2004

LNDD	MODE OPÉRATEUR	Codification : M-EX-25 Version : G Date :29/11/2004 1 / 4
------	----------------	--------------------------------------------------------------------

METHODE DE PREPARATION DES ALIQUOTES - DEPISTAGE RAPIDE EPO

Action	Personne concernée	Date	Signature
rédigé par	Nathalie CREPIN	29/11/2004	
vérifié par	Francoise LASNE	29/11/2004	
vérifié par	Sandrine MARTIN	29/11/2004	
approuvé par	Jacques DE CEARRIZ	29/11/2004	

ASSURANCE QUALITE
LNDD

REVU
le 31 OCT. 2006
PAR AS NE

APPLICABLE le
02 DEC. 2004

PÉRIMÉ le
17 MARS 2009

LNDD	MODE OPÉRATEUR	Codification : M-EX-25 Version : G Date : 29/11/2004 2 / 4
METHODE DE PREPARATION DES ALIQUOTES - DEPISTAGE RAPIDE EPO		

Documents cités :

M-P-10 ; E-P-13 ; E-Fiche_Labo-01 ; M-An-44.

Au cours de la préparation, ne pas oublier de renseigner l'enregistrement **E-TE-02G** de suivi des aliquotes.

ASSURANCE QUALITE
LNDD

Contenu du mode opératoire :

Prévoir la préparation d'un témoin négatif par gel.

Le témoin négatif est décongelé en même temps que les échantillons.

Origine des témoins négatifs : voir **M-P-10** et **E-P-13** (trouvés dans le classeur C-P-EPO)

APPLICABLE le
02 DEC. 2004

Opérations	Matériel	Réactifs / consommables
1 Sur la fiche labo E-Fiche labo-01, noter : - Le volume d'urine - Le pH - La densité	REFRACT.	Papier pH : <i>pHu-</i>
2 Prise d'essai = 18 mL		Tubes coniques 50 mL Réf interne : <i>TC-</i>
3 Ajout de 200 µL de solution de "Complete™"		Réf interne : <i>Comp-RM</i> Préparée selon M-P-10
4 Ajuster à pH ≥ 7.4 : 1.8 mL tampon T1 Vérifier le pH : si nécessaire, ajuster avec T1		Papier pH : <i>pH714-</i> T1 : selon M-P-10
5 Centrifugation 10 min, 2700 g, 20°C	CENTRI.7 ou 13	
6 Transvaser l'urine dans un autre tube, jeter le culot		Tubes coniques 50 mL Réf interne : <i>TC-</i>
7 Microfiltration	Pompe à air	"Stériflip®" : <i>Stfl-MI</i>
8 Transférer l'urine dans un "Centricon® Plus 20" Centrifuger minimum 20 min, 3500 g, 20°C Conservé le filtrat avec le reliquat d'urine Jeter le filtrat du témoin négatif	CENTRI.7 ou 13	<i>Centr_20-MI</i> Tubes 50 mL : <i>TC-</i>
9 Rincer avec 20 mL de tampon T2 et 200 µL de solution de "Complete™" Centrifuger 20 min, 3500 g, 20°C	CENTRI.7 ou 13	T2 : selon M-P-10 <i>Comp-RM</i> : selon M-P-10
10 Centrifugation inverse 4 min, 1000 g, 20°C	CENTRI.7 ou 13	
11 Transférer dans "Microcon®" Centrifuger 15 min, 14000 g, 20°C	CENTRI.6 ou 14	<i>Micr-MI</i>

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-EX-25 Version : G Date : 29/11/2004 3 / 4
METHODE DE PREPARATION DES ALIQUOTES - DEPISTAGE RAPIDE EPO		

12	Centrifugation inverse 3 min, 1000 g, 20°C	CENTRI.6 ou 14	
13	Si celui-ci est inférieur, amener le volume de rétentat à 25 µL par ajout du volume adéquat de tampon T2		T2 : Cf M-P-10
14	Diluer 3 µL de rétentat dans 147 µL de Specimen Diluant du Kit de dosage EPO. Placer le reste à 4°C.	REFRIG.	EPO-RD
15	Procéder au dosage EPO selon M-An-44.		EPO-RD
16	<u>Aliquoter le rétentat</u> - 1 aliquot de 20 µL, en le diluant si nécessaire avec T2 de façon à l'amener à une concentration de 800 U/L. - Le volume restant tel quel. <u>Cas du témoin négatif</u> Aliquots de 20 µL - 800 U/L Placer les aliquotes - A 4°C si utilisation le lendemain - A -20°C jusqu'à utilisation	REFRIG. CONGEL.	T2 : Cf M-P-10 Micro-tubes : MT-

Echantillons : identification du matériel

numéro de série + au moins les 3 derniers chiffres du numéro échantillon.

Excepté pour - Tubes 50 mL de l'étape 8 : *numéro de série + numéro échantillon complet*

Témoin négatif : identification du matériel

Selon le schéma : **Code TN - Date prép - (n') - (n'')**

Avec : - n' : numéro éventuel de la préparation à la date considérée
 - n'' : distinction des témoins négatifs, si au moins deux sont préparés en même temps (ex : lors de la préparation de plus de 12 échantillons)

Exemples : TN 010 - 2809 - 2 - b Témoin négatif "b", de code "010", de la deuxième préparation du 28 septembre.
 TN 010 - 2809 Témoin négatif de code "010", de la seule préparation du 28 septembre.
 TN 010 - 2809 - 1 Témoin négatif de code "010", de la première ou de la seule préparation du 28 septembre.

Il est indispensable de noter le nom complet sur les microtubes de l'étape 16 ; par contre pour toutes les autres étapes, la nomination peut être réduite, dès lors qu'aucune confusion n'est possible.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-EX-25 Version : G Date :29/11/2004 4 / 4
------	-----------------	--------------------------------------------------------------------

METHODE DE PREPARATION DES ALIQUOTES - DEPISTAGE RAPIDE EPO

EVOLUTIONS

N° Version	Motif	Date
G	<ul style="list-style-type: none"> - Modification du titre. - Ajout des numéros des nouvelles centri. - Action 10 Audit 26 : ajout de l'identification des différents tubes utilisés au cours de la préparation 	29/11/2004

COMPLEMENT TRANSITOIRE D'UN DOCUMENT QUALITE

Cet enregistrement n'est à utiliser que si la modification est URGENTE et majeure et/ou conséquente et/ou applicable à plusieurs documents

Référence(s) du ou des document(s) qualité concerné(s) :	<ul style="list-style-type: none"> • 11-Cx-25 56 - étapes 8 à 10 • 11-Cx-28 55 - étapes 7 à 9 } éch. urinaires - étapes 19 à 21 } - étapes 20 à 22 } éch. sanguins
----------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Durée d'application de la modification :

TEMPORAIRE

Date de début d'application :/...../.....

Date de fin d'application :/...../.....

DEFINITIVE (modification à apporter dans la prochaine version du ou des doc. concerné(s))

Date de début d'application : 01...../01...../.....2009 Fin janvier 2009, dès lors que la totalité du stock de consommable "Centricon 20" sera épuisé, et remplacé par "Amicon 15".

Description de la modification apportée :

Si utilisation d'Amicon :

- Sur la 1^{ère} étape citée : - le consommable utilisé est "Amicon 15", ref interne "Am15_30"
 - il est nécessaire d'effectuer cette étape en 2 fois
- Sur la 2^e étape citée : rincer avec 15 ml
- Sur la 3^e étape citée : Avec une micropipette, récupérer le résidu

ASSURANCE QUALITE
a f l d
Département des Analyses

Si utilisation de centricon : pas de changement

PÉRIMÉ

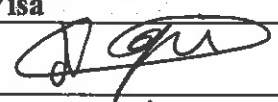
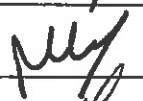
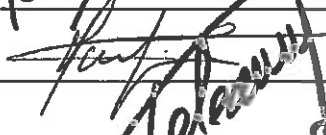

Visa du chef de section ou responsable secteur :

[Signature]

PARTIE A REMPLIR PAR L'ASSURANCE QUALITE

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-Ex -28 Version : E Date : 17/10/2003 1 / 2
-------------	------------------------	----------------------------------------------------------------------

CONFIRMATION EPO : PREPARATION DES ECHANTILLONS

Action	Personne concernée	Date	Visa
rédigé par	Nathalie CREPIN	16/10/2003	
vérifié par	Francoise LASNE	16/10/2003	
vérifié par	Sandrine MARTIN	17/10/2003	
approuvé par	Jacques DE CEARRIZ	17/10/2003	

Prévoir la préparation d'un témoin négatif par échantillon à confirmer.

Opérations **Matériel** **Réactifs / consommables**

Sur l'enregistrement E-TE-03E, noter :
- Le pH
- La densité

pH-MET.
REFRACT.

Prise d'essai PE voir avec la direction.
La noter sur E-TE-03E

ASSURANCE QUALITÉ
LNDD

Tubes coniques 50 mL
Réf interne : TC-

Solution de "CompleteTM". Ajouter 1/100 du volume de la PE

APPLICABLE le

Réf interne : Comp-RM
Préparée selon M-P-10

Ajuster à pH > 7.4 avec tampon T1. Ajouter 1/10 du volume de la PE
Vérifier le pH ; si nécessaire, ajuster avec T1

21 OCT. 2003

Papier pH : pH714-
T1 : selon M-P-10

Centrifugation 10 min. 2700 g, 20°C

CENTRI.7

~~EXP. 2004~~
20 JUL. 2004

Tubes coniques 50 mL
Réf interne : TC-

Transvaser l'urine dans un autre tube, jeter le culot

Microfiltration

Pompe à air

"Stériflip®" : Stfl-MI

Transférer l'urine dans un "Centricon® Plus 20"
Centrifuger minimum 20 min, 3500 g, 20°C
Conservé le filtrat avec le reliquat d'urine

CENTRI.7

le 2407104
PÉRIMÉ le

Réf interne : Centr_20-MI

Rincer avec 20 mL de tampon T2 et 200 µL de solution de "CompleteTM"
Centrifuger 20 min, 3500 g, 20°C

CENTRI.7

02 DEC. 2004

tubes 50 mL : TC-
T2 : selon M-P-10
Comp-RM : selon M-P-10

Centrifugation inverse
4 min, 1000 g, 20°C

CENTRI.7

Transférer dans "Microcon®"
Centrifuger 15 min, 14000 g, 20°C

CENTRI.6

Micr-MI

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-Ex -28 Version : E Date : 17/10/2003 2 / 2
CONFIRMATION EPO : PREPARATION DES ECHANTILLONS		

Opérations	Matériel	Réactifs / consommables
Centrifugation inverse 3 min, 1000 g 20°C	CENTRI.6	
Si celui-ci est inférieur, amener le volume de rétentat à 25 µL, par ajout du volume adéquat de tampon T2.		T2 : Cf M-P-10
Diluer 3 µL de rétentat dans 147 µL de Specimen Diluant du Kit de dosage EPO. Placer le reste à 4°C	REFRIG.11	EPO-RD
Procéder au dosage EPO selon M-An-44		EPO-RD
<u>Aliquoter le rétentat :</u> - 1 aliquot de 20 µL, en le diluant si nécessaire avec T2 de façon à l'amener à une concentration de 800 UI/L. - Le volume restant tel quel. <u>Cas du témoin négatif :</u> Aliquots de 20 µL - 800 UI/L <u>Placer les aliquots :</u> - A 4°C si utilisation le lendemain - A - 20°C jusqu'à utilisation.	REFRIG.11 CONGEL.8	T2 : Cf M-P-10 Micro-tubes : MT-

Au cours de la préparation, ne pas oublier de renseigner l'enregistrement E-TE-03E de suivi de préparation des échantillons.

Identification du témoin négatif :




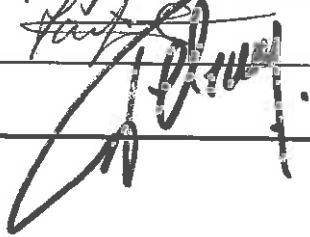
Selon le schéma : **Code TN - date prép - (n') - (n")**

Avec : - n' : numéro éventuel de la préparation à la date considérée.
 - n" : distinction des témoins négatifs, si au moins deux sont préparés en même temps (ex : lors de la préparation d'au moins deux échantillons à confirmer)

Exemples : TN 010 - 2809 -2 - b Témoin négatif "b", de code "010", de la deuxième préparation du 28 septembre.
 TN 010 - 2809 Témoin négatif de code "010", de la seule préparation du 28 septembre.
 TN 010 - 2809 - 1 Témoin négatif de code "010", de la première ou de la seule préparation du 28 septembre.

Remarque : sur les micro-tubes, la nomination est réduite au strict minimum, dès lors qu'aucune confusion n'est possible.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-EX-28 Version : F Date :29/11/2004 1 / 4
METHODE DE PREPARATION DES ALIQUOTES : CONFIRMATION EPO		

Action	Personne concernée	Date	Signature
rédigé par	Nathalie CREPIN	29/11/2004	
vérifié par	Francoise LASNE	29/11/2004	
vérifié par	Sandrine MARTIN	29/11/2004	
approuvé par	Jacques DE CEARRIZ	29/11/2004	

Périmé

Périmé

ASSURANCE QUALITÉ
LNDD

Périmé

LNDD	MODE OPÉRATEUR	Codification : M-EX-28 Version : F Date : 29/11/2004 2 / 4
METHODE DE PREPARATION DES ALIQUOTES : CONFIRMATION E-PO		

Documents cités

M-P-10 ; E-P-13 ; I-TE-03 ; M-An-44.

Au cours de la préparation, ne pas oublier de renseigner l'enregistrement **E-TE-03E** de suivi des aliquotes.

Contenu du mode opératoire

Prévoir la préparation d'un témoin négatif.

Le témoin négatif est décongelé en même temps que l'échantillon à confirmer.

Origine du témoin négatif : voir **M-P-10** et **E-P-13** (trouvés dans le classeur C-P-EPO)

Opérations	Matériel	Réactifs / consommables
1 Sur l'enregistrement E-TE-03E, noter : - Le pH - La densité	pH-MET. REFRACT.	Voir I-TE-03
2 Prise d'essai PE : voir avec la direction. La noter sur E-TE-03E		Tubes coniques 50 mL Réf interne : TC-
3 Solution de "Complete™" : Ajouter 1/100 du volume de la PE		Réf interne : <i>Comp-RM</i> Préparée selon M-P-10
4 Ajuster à pH ≥ 7.4 avec tampon T1 : Ajouter 1/10 du volume de la PE Vérifier le pH ; si nécessaire, ajuster avec T1		Papier pH : <i>pH714</i> T1 : selon M-P-10
5 Centrifugation 10 min, 2700 g, 20°C	CENTRI.7 ou 13	
6 Transvaser l'urine dans un autre tube, jeter le culot		Tubes coniques 50 mL Réf interne : TC-
7 Microfiltration	Pompe à air	"Stériflip®" : <i>Stff-MI</i>
8 Transférer l'urine dans un "Centricon® Plus 20" Centrifuger minimum 20 min, 3500 g, 20°C Conserver le filtrat avec le reliquat d'urine Jeter le filtrat du témoin négatif	CENTRI.7 ou 13	Réf interne : <i>Centr_20-MI</i> Tubes 50 mL : TC-
9 Rincer avec 20 mL de tampon T2 et 200 µL de solution de "Complete™" Centrifuger 20 min, 3500 g, 20°C	CENTRI.7 ou 13	T2 : selon M-P-10 <i>Comp-RM</i> : selon M-P-10
10 Centrifugation inverse 4 min, 1000 g, 20°C	CENTRI.7 ou 13	
11 Transférer dans "Microcon®" Centrifuger 15 min, 14000 g, 20°C	CENTRI.6 ou 14	<i>Micr-MI</i>

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-EX-28 Version : F Date :29/11/2004 3 / 4
METHODE DE PREPARATION DES ALIQUOTES : CONFIRMATION EPO		

12	Centrifugation inverse 3 min, 1000 g, 20°C	CENTRI.6 ou 14	
13	Si celui-ci est inférieur, amener le volume de rétentat à 25 µL, par ajout du volume adéquat de tampon T2		T2 : Cf M-P-10
14	Diluer 3 µL de rétentat dans 147 µL de Specimen Diluant du Kit de dosage EPO. Placer le reste à 4°C.	REFRIG.	EPO-RD
15	Procéder au dosage EPO selon M-An-44		EPO-RD
16	Aliquoter le rétentat - 1 aliquot de 20 µL, en le diluant si nécessaire avec T2, de façon à l'amener à une concentration de 800 UI/L. - Le volume restant tel que: Cas du témoin négatif : Aliquots de 20 µL - 800 UI/L Placer les aliquotes - A 4°C si utilisation le lendemain - A - 20°C jusqu'à utilisation.	REFRIG. CONGEL.	T2 : Cf M-P-10 Micro-tubes : MT-

Echantillon : identification du matériel

Numéro de série + au moins les 3 derniers chiffres du numéro échantillon.

Excepté pour - Tube 50 mL de l'étape 8 : *numéro de série + numéro échantillon complet*
- Microtubes de l'étape 16 : *numéro de série + au moins les 3 derniers chiffres du numéro échantillon + conf*

Témoin négatif : identification du matériel

Selon le schéma : **Code TN - date prép - (n') - (n")**

Avec : - n' : numéro éventuel de la préparation à la date considérée.
- n" : distinction des témoins négatifs, si au moins deux sont préparés en même temps (ex : lors de la préparation d'au moins deux échantillons à confirmer)

Exemples : TN 010 - 2809 - 2 - b Témoin négatif "b", de code "010", de la deuxième préparation du 28 septembre.
TN 010 - 2809 Témoin négatif de code "010", de la seule préparation du 28 septembre.
TN 010 - 2809 - 1 Témoin négatif de code "010", de la première ou de la seule préparation du 28 septembre.




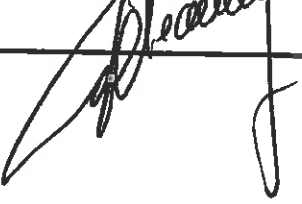
Il est indispensable de noter le nom complet sur les microtubes de l'étape 16 ; par contre pour toutes les autres étapes, la nomination peut être réduite, dès lors qu'aucune confusion n'est possible.

LNDD	MODE OPÉRATOIRE	Codification : M-EX-28 Version : F Date :29/11/2004 4 / 4
METHODE DE PREPARATION DES ALIQUOTES : CONFIRMATION EPO		

EVOLUTIONS

N° Version	Motif	Date
F	Numérotation des étapes et Ajout de l'identification des tubes utilisés lors de la préparation	29/11/2004

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : A Date : 11/09/2003 1 / 8
INSTRUCTION DE LECTURE POUR L'EPOETINE ALPHA, L'EPOETINE BETA ET LA DARBEPOETINE ALPHA		

Action	Personne concernée	Date	Visa
rédigé par	Nathalie CREPIN	08/09/2003	
vérifié par	Francoise LASNE	08/09/2003	
vérifié par	Adeline MOLINA	09/09/2003	
approuvé par	Jacques DE CEARRIZ	09/09/2003	

1/ But

Description de la procédure de dépouillement des résultats de la recherche d'EPO recombinante.

2/ Domaine d'application

Appareils concernés : - Marque : Fuji
 - Type : Caméra LAS1000 et LAS3000
 - N° d'identification : Camera1 et Camera2

Personnes concernées : opérateurs du département recherche et développement biologie.

ASSURANCE QUALITÉ
LNDD

PÉRIMÉ le
07 JAN. 2005

3/ Définitions

Contrôle : échantillon urinaire subissant le contrôle anti-dopage.

ICB : Isoformes colocalisées BRP (ou Epoétine α ou β)
 ICN : Isoformes colocalisées NESP

LD : Limite de détection
 LQ : Limite de quantification

CA : Critères d'activité

I : Intensité d'une bande du profil (en I.a.u)
 I_{rel} : intensité relative d'une bande du profil par rapport à la totalité des bandes du profil (en %)

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : A Date : 11/09/2003 2 / 8
INSTRUCTION DE LECTURE POUR L'EPOETINE ALPHA, L'EPOETINE BETA ET LA DARBEPOETINE ALPHA		

4/ Equipements, fournitures, imprimés

- Fiche labo **E-Fiche_labo-01**
- Feuille de remise en tube **E-Remis-07** (screening) ou **E-Remisconf-01** (confirmation)
- Feuille d'enregistrement des résultats **E-FSR-02** (screening) ou **E-FCR-08** (confirmation)

5/ Contenu de l'instruction

5-1/ Interférences

- Présence sur l'image d'un artéfact : 2 cas se présentent :
 - Artéfact compatible avec la lecture : possibilité de l'éliminer en réduisant la taille (largeur ou longueur) de la fenêtre d'intégration.
 - Artéfact invalidant la lecture (ex : tâche recouvrant toute la largeur des bandes).
- Migration de mauvaise qualité.

5-2/ Critères d'acceptation (en fin de temps d'exposition, voir § 5-8/ de M-An-43)

- Limite de détection LD : Intensité de luminescence maximale > 2500 I.a.u
- Limite de quantification LQ : intensité de luminescence maximale > 10000 I.a.u

5-3/ Critères de décision

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : A Date : 11/09/2003 3 / 8
INSTRUCTION DE LECTURE POUR L'EPOETINE ALPHA, L'EPOETINE BETA ET LA DARBEPOETINE ALPHA		

Cas d'une analyse de screening :

Imax	ICB	ICN	Artéfact invalidant	Intensités des bandes	Conclusion
1			X		E-Remis-07 1/ Si possible à partir du rétentat 2/ Si volume d'urine suffisant Sinon : Inclassable : artéfact invalidant
2	> LQ	> 85		rel bande 2 < 5% et bande 3 < bande 4	I-CONF-07 Si un des deux critères d'intensité n'est pas respecté : inclassable, échantillon dégradé.
3	> LQ	> 64			I-CONF-07
4	> LD	< 65			Négatif
5	> LD	< 52			Négatif
6	< LD				Inclassable : indétectable
7	$LD \leq I_{max} \leq LQ$	> 65			Inclassable : indétectable
8	$LD \leq I_{max} \leq LQ$	> 52			Inclassable : indétectable
9	> LQ	$65 \leq ICB \leq 85$			Inclassable : incertitude de mesure
10	> LQ	$52 \leq ICN \leq 64$			Inclassable : incertitude de mesure

Cas 2 : ICB et les deux critères d'intensité doivent être respectés pour effectuer la confirmation.

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : A Date : 11/09/2003 4 / 8
INSTRUCTION DE LECTURE POUR L'EPOETINE ALPHA, L'EPOETINE BETA ET LA DARBEPOETINE ALPHA		

Cas d'une analyse de confirmation :

	I_{max}	ICB	ICN	CA	Artéfact invalidant	Intensités des bandes	Conclusion
1	> LQ	> 85		Négatif		I _{rel} bande 2 < 5% et I bande 3 < I bande 4	Positif
2	> LQ		> 64	Sans objet			Positif
3	> LD	< 65					Négatif
4	> LD		< 52				Négatif
5	< LD						Inclassable : indétectable
6	LD ≤ I _{max} ≤ LQ	> 65					Inclassable : indétectable
7	LD ≤ I _{max} ≤ LQ		> 52				Inclassable : indétectable
8	> LQ	65 ≤ ICB ≤ 85					Inclassable : incertitude de mesure
9	> LQ		52 ≤ ICN ≤ 64				Inclassable : incertitude de mesure
10	> LQ	> 85		Positif		I _{rel} bande 2 ≥ 5% ou I bande 3 ≥ I bande 4	Inclassable : échantillon dégradé
11					X		E-Remisconf-01 1/ Si possible à partir du rétentat 2/ Si volume d'urine suffisant Sinon : Inclassable, artéfact invalidant l'analyse

Cas 1 : ICB et CA et les deux critères d'intensité doivent être respectés pour considérer le résultat positif.

Cas 10 : l'échantillon est considéré dégradé lorsque CA est positif ou au moins l'un des deux critères d'intensité.

5-4 / Critères d'activité CA :

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : A Date : 11/09/2003 5 / 8
INSTRUCTION DE LECTURE POUR L'EPOETINE ALPHA, L'EPOETINE BETA ET LA DARBEPOETINE ALPHA		


Ils sont au nombre de deux. Si un seul de ces critères est rempli, l'échantillon sera considéré "urine active" :

- Changement notable du profil de l'échantillon lorsqu'on compare le résultat de la confirmation à celui du screening ; ce critère est un indicateur de l'existence d'un processus d'activité dans l'urine considérée.
- Test d'activité positif : lorsque un shift (déplacement) est observé dans la position des bandes de l'EPO BRP ou de la NESP ; ce critère est une démonstration du processus d'activité.

5-5/ Dépouillement des références

Ouvrir le logiciel de dépouillement "AIDA Image Analyser" ainsi que le fichier à intégrer.

Rappel : la largeur de chaque fenêtre pourra être réduite en cas de présence d'artéfact permettant la lecture.

- Menu "Option" : charger la préférence "EPO".
- Menu "Display Control" : régler le contraste de l'image.
- Menu "Publishing Layout" :
 - Sélectionner l'outil "trait"
 - Tracer 1 (ou 2) ligne(s) droite passant par chaque deuxième bande la plus acide des références EPO BRP.
 - Déplacer cette droite au-delà des bandes les plus basiques des références ; la valider par un clic droit.
- Menu "Lane & Peak" : Sélectionner l'outil  / largeur 5 mm

Rappel : la largeur pourra être réduite en cas de présence d'artéfact permettant la lecture.

- Placer la fenêtre sur la première référence, de la ligne de base au delà du pic le plus acide ; dupliquer la fenêtre autant de fois que nécessaire pour les placer sur chaque autre référence ainsi que sur chaque profil à intégrer.

Note : il est possible de modifier la forme de chaque fenêtre afin de l'adapter au mouvement de chaque profil.

- Nommer les profils :
 - Edit / Select all
 - Clic droit sur l'image / change profil name
 - Nommer, selon le modèle suivant :

Références : N° manip - (n) - Réf - x

Témoin négatif : N° manip - (n) - Code TN - date prép - (n') - (n'')

Standard : N° manip - (n) - Code standard

Avec " n " = numéro de membrane, en cas de manip de plus d'une membrane.

" x " = numéro de la référence sur la membrane considérée.

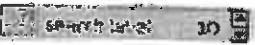





" n' " = numéro de la préparation à la date considérée.

" n'' " = distinction des témoins négatifs préparés en même temps

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : A Date : 11/09/2003 6 / 8
INSTRUCTION DE LECTURE POUR L'EPOETINE ALPHA, L'EPOETINE BETA ET LA DARBEPOETINE ALPHA		

- Sauver sous : c:\ EPO integration \ N° de manip + N° de demi membrane.
Sauver régulièrement et en fin de dépouillement.

- Sélectionner une référence, ouvrir son profil :

- Faire apparaître la ligne de base : 
- Aplanir celle-ci : 
- Supprimer manuellement les éventuels artéfacts :
 - Relever la ligne de base : 
 - Supprimer les pics à l'aide de la souris, valider l'opération par clic droit sur le profil.
 - Réaplanir la ligne de base : 
- Effectuer une recherche automatique de pic : 
- Vérifier que tous les pics sont pris en compte ; si ce n'est pas le cas, effectuer l'intégration manuelle de ce pic : 
- Imprimer

- Faire de même avec chaque référence.

- Déterminer la référence qui servira de base à la détermination des pourcentages d'isoformes colocalisés BRP (ICB) des contrôles : pour chacune d'elle, il s'agit de déterminer la position sur l'image jusqu'à laquelle la région est considérée comme colocalisée BRP.

- d_B = abscisse du sommet de la bande la plus acide de l'EPO BRP - abscisse du début de cette bande
- m_B = d_B + abscisse du sommet de la bande la plus acide de l'EPO BRP

La référence utilisée, à la faveur du sportif, sera celle de plus faible m_B .

- De même, déterminer la référence qui servira de base à la détermination des pourcentages d'isoformes colocalisés NESP (ICN) des contrôles : pour chacune d'elle, il s'agit de déterminer la position sur l'image jusqu'à laquelle la région est considérée comme colocalisée NESP.

- d_A = abscisse de la fin de la deuxième bande la plus basique de la Nesp - abscisse du sommet de cette bande
- m_A = abscisse du sommet de la deuxième bande la plus basique de la Nesp - d_A

la référence utilisée, à la faveur du sportif, sera celle de plus forte m_A

5-6/ Dépouillement des témoin négatif, standard d'EPO naturelle purifiée, échantillons

- Ouvrir le profil à intégrer

- Faire apparaître la ligne de base : 

- Aplanir celle-ci : 

- Supprimer manuellement les éventuels artéfacts :

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : A Date : 11/09/2003 7 / 8
INSTRUCTION DE LECTURE POUR L'EPOETINE ALPHA, L'EPOETINE BETA ET LA DARBEPOETINE ALPHA		

- Les repérer sur le profil, en faisant défiler le curseur dessus (☐) , les pics ne correspondant pas à une bande sur l'image.
 - Relever la ligne de base : ☐
 - Supprimer les artéfacts à l'aide de la souris, valider l'opération par clic droit sur le profil.
 - Réaplanir la ligne de base : ☐
- Délimiter les régions basique, médiane et acide du profil, par intégration manuelle :
- Déplacer le curseur de l'extrémité basique du profil jusqu'à la valeur m_B de la référence choisie. Valider par un clic droit.
 - Déplacer le curseur jusqu'à la valeur m_A de la référence choisie. Valider par un clic droit.
 - Déplacer le curseur jusqu'à l'extrémité acide du profil. Valider par un clic droit.
- Imprimer le profil. Tamponner chaque profil avec :

Date :

Opérateur :

Résultats : Négatif A vérifier

Remarques :

.....

.....

.....

Renseigner l'enregistrement **E-FSR-02** (screening) ou **E-FCR-08** (confirmation).

5-7/ Report des résultats sur la fiche labo

Cas d'une analyse de screening :

En cas de positivité suspectée :

- Indiquer que l'analyse de screening EPO est terminée en mettant une croix dans la case de l'échantillon correspondant.
- Encercler la croix pour indiquer la demande d'une confirmation.
- Noter cette demande dans les commentaires.

En l'absence de suspicion :

- Indiquer que l'analyse de screening EPO est terminée en mettant une croix dans la case de l'échantillon correspondant.

Si l'échantillon doit être repréparé :

- Indiquer au crayon noir AR suivi de la date (sous le format jjmm) dans la case de l'échantillon correspondant.
- Remplir l'enregistrement **E-Remis-07**.

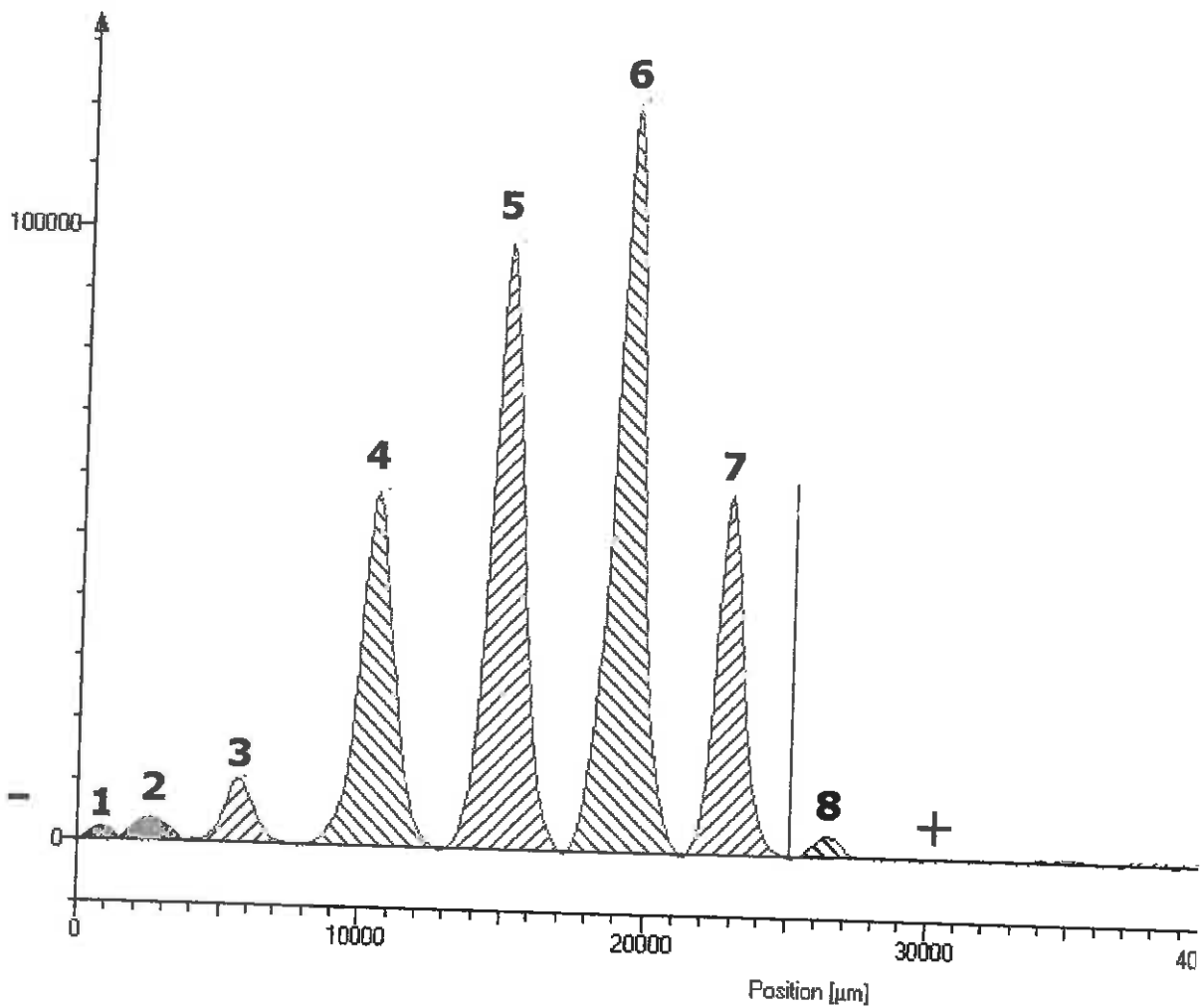
Cas d'une analyse de confirmation :

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : A Date : 11/09/2003 8 / 8
INSTRUCTION DE LECTURE POUR L'EPOETINE ALPHA, L'EPOETINE BETA ET LA DARBEPOETINE ALPHA		

Dans la case commentaire, indiquer la conclusion.

Compléter le dossier d'analyse EPO selon I-DOS-01B et le placer dans le dossier de la série salle 007.
Joindre le dossier de confirmation éventuel (Cf I-DOS-02D).

6/ Annexes



LNDD	ENREGISTREMENT	Codification : E-INFO Version : C Date : 09/07/2004
1/1		
COMPLEMENT TRANSITOIRE D'UN DOCUMENT QUALITE		

Cet enregistrement n'est à utiliser que si la modification est URGENTE et majeure et/ou conséquente et/ou applicable à plusieurs documents

Référence(s) du(des) document(s) qualité concerné(s): I - LEC - 09 (V.A)
+ SI - Am - 43 (V.D)

PÉRIMÉ le
07 JAN. 2005
Uniquement par
I-LEC09
(V.A)

Durée d'application de la modification:

TEMPORAIRE, date de début d'application:..... date de fin d'application:.....

DEFINITIVE (modification à apporter dans la prochaine version du(des)doc.concerné(s))

date de début d'application:.....200704...

Modification apportée: Précisions quant à la lecture des analyses EPO

ASSURANCE QUALITÉ
LNDD

- Pour le screening : en cas de décision "Z-COEF-07" ou "inclassable : incertitude de mesure", une autre lecture doit être effectuée selon le protocole décrit pages suivantes -
La décision sera basée sur les pourcentages obtenus avec cette méthode.

- Pour la confirmation : La lecture est effectuée selon le protocole décrit pages suivantes

Cette modification majeure implique que dorénavant, une photo numérique du gel soit prise (à l'issue de la migration) : à intégrer à SI - Am - 43 -

VISA DU RESPONSABLE TECHNIQUE: 

Identification par un NUMERO.....16
et validation de cet enregistrement par l'Assurance Qualité (tampon)

L'original de cet enregistrement est à archiver vivant au Département Assurance Qualité

La lecture des résultats avec l'indicateur Rouge de méthyle s'effectue pour tout échantillon à confirmer ou Inclassable – Incertitude de mesure après dépouillement des résultats suivant I-Lec-09. Elle s'applique en cas d'analyse de screening comme en cas d'analyse de confirmation.

1-Photographie du gel par un appareil numérique

A la fin de l'IEF, une photo du gel est prise sur sa plaque de refroidissement à l'aide d'un appareil photo numérique.

L'image est transférée vers l'ordinateur relié à la caméra et enregistrée sous c:\Photogel\ »Gel N°manip »


-Ouvrir le logiciel Camedia Master pro. Sélectionner Obtenir les images.

-Sélectionner l'image à transférer, cocher le bouton Images sélectionnées. Ouvrir le média

Photogel et appuyer sur la flèche  pour enregistrer l'image dans le dossier choisi.

2-Copies des images gel et fichier Aida dans un logiciel de retouche d'image.

Après révélation, l'image Aida et la photo du gel sont copiées puis collées dans un nouveau document « PhotoImpact »

- Ouvrir le logiciel PhotoImpact.
- Menu Fichier « Nouvelle »-« nouvelle Image » Choisir une taille standard A4 ainsi qu'une résolution de 200 Pixels/Pouce.
- Copie du fichier image Aida :
A partir du fichier image « EPO + N° manip+temps d'exposition »
Menu Edit « Copy Content »
Choisir une résolution de 300 dpi dans « Bitmap Size »
Dans le document ouvert PhotoImpact, coller cette image :
Menu Edition « Coller » « Comme objet »
- Copie du fichier photogel
Ouvrir la photo enregistrée par PhotoImpact
Recadrer l'image de façon à ne sélectionner que le gel à l'aide de l'outil « Découper »


Copier l'image par Menu Edition « Copier »

Coller l'image dans le document ouvert contenant l'image Aida par Menu Edition « Coller » « Comme objet »

3-Superposition des images.

- Amener à l'arrière l'image Aida par le menu Objet « Disposer »-« Amener à l'arrière »
- Régler l'image gel avec l'outil transparence ajustée à 50



La visibilité des deux images peuvent être améliorées en jouant sur la luminosité et le contraste avec le bouton 

- Redimensionner les objets image de manière à les superposer les uns aux autres à la taille réelle avec l'outil Transformation 

- Aligner le rouge de méthyle de l'objet PhotoGel avec les bandes les plus acides des références BRP. (position approximative m_B)

On peut s'aider pour cela de l'option Rotation  de l'outil Transformation.

- Sauvegarder l'image ainsi obtenue dans c:\Gel +membrane\Gel+membrane+n° manip

4- Dépouillement des échantillons





- La position du rouge de méthyle sur les pistes échantillons définira la nouvelle valeur m_B .

Le dépouillement des échantillons est alors effectuée selon le paragraphe 5-6 de l'instruction I-Lec 09.

Les critères de décision restent inchangés avec les nouvelles ICB (paragraphe 5-3)

- Le même dépouillement est effectué pour déterminer la nouvelle valeur m_A en déplaçant l'image PhotoGel de manière à aligner le rouge de méthyle avec la bande principale la plus basique de la référence Nesp.

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : B Date : 07/01/2005 1 / 10
Dépistage rapide EPO - Instruction de lecture pour l'Epoétine alpha, l'Epoétine beta et la Darbépoétine alpha		

Action	Personne concernée	Date	Signature
rédigé par	Nathalie CREPIN	17/11/2004	
vérifié par	Francoise LASNE	29/11/2004	
vérifié par	Sandrine MARTIN	07/01/2005	
approuvé par	Jacques DE CEARRIZ	07/01/2005	

Objet

Description de la procédure : de lecture des résultats de la recherche d'EPO recombinante, pour les analyses de dépistage rapide, de report des résultats sur les tracés et sur la fiche labo.

ASSURANCE QUALITÉ
LNDD

Documents cités

M-Ex-25 ; E-Remis-07 ; M-Ex-28B ; M-An-43 ; I-CONF-07 ; E-FSR-02 ; E-Fiche_lab0-01 ; I-DOS-01B

4. JUIL. 2005

Définitions

Contrôle : échantillon urinaire subissant le contrôle anti-dopage.

EPOr : Concentration en EPO du rétentat.

Rétentat : Echantillon urinaire issu de l'étape de préparation **M-Ex-25**.

ICB : Isoformes colocalisées BRP (ou Epoétine α ou β) - Exprimé en %

ICN : Isoformes colocalisées NESP - Exprimé en %

LD : Limite de détection.

LQ : Limite de quantification.

TS : Test de stabilité.

RM : Rouge de Méthyle, indicateur de migration.

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : B Date : 07/01/2005 2 / 10
Dépistage rapide EPO - Instruction de lecture pour l'Epoétine alpha, l'Epoétine beta et la Darbépoétine alpha		

I : Intensité d'une bande du profil (en I.a.u)

I_{rel} : intensité relative d'une bande du profil par rapport à la totalité des bandes du profil (en %)

Aspect profil :

- normal : I_{rel} bande 6 < 5%
et
I bande 5 < I bande 4
- anormal : I_{rel} bande 6 ≥ 5%
et / ou
I bande 5 ≥ I bande 4


Contenu de l'instruction

1/ Interférences

- Présence sur l'image d'un artéfact : 2 cas se présentent :
 - Artéfact compatible avec la lecture : possibilité de l'éliminer en réduisant la taille (largeur ou longueur) de la fenêtre d'intégration.
 - Artéfact invalidant la lecture (ex : tâche recouvrant toute la largeur des bandes).

2/ Etude des références

Ouvrir le logiciel de dépouillement "AIDA Image Analyser" ainsi que le fichier à intégrer.

- Menu "Option" : charger la préférence "EPO".
- Menu "Display Control" : régler le contraste de l'image.
- Menu "Publishing Layout" :
 - Sélectionner l'outil "trait"
 - Tracer 1 (ou 2) ligne(s) droite passant par chaque deuxième bande la plus acide des références EPO BRP.
 - Déplacer cette droite au-delà des bandes les plus basiques des références ; la valider par un clic droit. Cette position définit la "ligne d'origine".
- Menu "Lane & Peak" : Sélectionner l'outil  / largeur 5 mm

Rappel : la largeur pourra être réduite en cas de présence d'artéfact permettant la lecture.

- Créer une fenêtre d'intégration sur la première référence, à partir de la ligne d'origine jusqu'au delà du pic le plus acide de la Darbépoetine α ; dupliquer cette fenêtre autant de fois que nécessaire pour les placer sur chaque autre référence ainsi que sur chaque profil à intégrer.

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : B Date : 07/01/2005 3 / 10
Dépistage rapide EPO - Instruction de lecture pour l'Epoétine alpha, l'Epoétine beta et la Darbépoétine alpha		

Note : il est possible de modifier la forme de chaque fenêtre afin de l'adapter au mouvement de chaque profil.

- Nommer les profils :
 - Edit / Select all
 - Clic droit sur l'image / change profil name
 - Nommer, selon le modèle suivant :

Références : n° manip - (n) - Réf - x

Témoin négatif : n° manip - (n) - Code TN - date prép - (n') - (n'')

Contrôles : n° série + n° échantillon complet

Avec " n " = numéro de membrane, en cas de manip de plus d'une membrane.







" x " = numéro de la référence sur la membrane considérée.

" n' " = numéro de la préparation à la date considérée.

" n'' " = distinction des TN préparés en même temps

- Sauver sous : c:\ EPO integration \ N° de manip + N° de demi membrane.
Sauver régulièrement et en fin de dépouillement.

- Sélectionner une référence, ouvrir son profil :

- Faire apparaître la ligne de base : 
- Aplanir celle-ci : 
- Supprimer manuellement les éventuels artéfacts :
 - Relever la ligne de base : 
 - Supprimer les pics à l'aide de la souris, valider l'opération par clic droit sur le profil.
 - Réaplanir la ligne de base : 
- Effectuer une recherche automatique de pic : 
- Vérifier que tous les pics sont pris en compte ; si ce n'est pas le cas, effectuer l'intégration manuelle de ce pic : 
- Imprimer

- Faire de même avec chaque référence.

- Déterminer la référence qui servira de base à la détermination des pourcentages d'isoformes colocalisés BRP (ICB) des contrôles : pour chacune d'elle, il s'agit de déterminer la position sur l'image jusqu'à laquelle la région est considérée comme colocalisée BRP.

- d_B = abscisse du sommet de la bande la plus acide de l'EPO BRP - abscisse du début de cette bande
- m_B = d_B + abscisse du sommet de la bande la plus acide de l'EPO BRP

La référence utilisée, à la faveur du sportif, sera celle de plus faible m_B .

- De même, déterminer la référence qui servira de base à la détermination des pourcentages d'isoformes colocalisés NESP (ICN) des contrôles : pour chacune d'elle, il s'agit de déterminer la position sur l'image jusqu'à laquelle la région est considérée comme colocalisée NESP.






- d_A = abscisse de la fin de la deuxième bande la plus basique de la Nesp - abscisse du sommet de cette bande
- m_A = abscisse du sommet de la deuxième bande la plus basique de la Nesp - d_A

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : B Date : 07/01/2005 4 / 10
Dépistage rapide EPO - Instruction de lecture pour l'Epoétine alpha, l'Epoétine beta et la Darbépoétine alpha		

La référence utilisée, à la faveur du sportif, sera celle de plus forte m_A

3/ Etude des témoin négatif et contrôles

3-1/ Etude initiale

- Ouvrir le profil à intégrer
- Faire apparaître la ligne de base : 
- Aplanir celle-ci : 
- Supprimer manuellement les éventuels artéfacts :
 - Repérer sur le profil, en faisant défiler le curseur sur celui-ci  , les pics ne correspondant pas à une bande sur l'image.
 - Relever la ligne de base : 
 - Supprimer les artéfacts à l'aide de la souris, valider l'opération par clic droit sur le profil.
 - Réaplanir la ligne de base : 
- Délimiter les régions basique, médiane et acide du profil, par intégration manuelle :
 - Déplacer le curseur de l'extrémité basique du profil jusqu'à la valeur m_B de la référence choisie. Valider par un clic droit.
 - Déplacer le curseur jusqu'à la valeur m_A de la référence choisie. Valider par un clic droit.
 - Déplacer le curseur jusqu'à l'extrémité acide du profil. Valider par un clic droit.
- Imprimer le profil. Tamponner chaque profil avec :

Date :
Code Op. :
Conclusion :
.....
Remarques :

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : B Date : 07/01/2005 5 / 10
Dépistage rapide EPO - Instruction de lecture pour l'Epoétine alpha, l'Epoétine beta et la Darbépoétine alpha		

Critères d'acceptation

- Limite de détection LD : Intensité de luminescence maximale > 2500 I.a.u
- Limite de quantification LQ : intensité de luminescence maximale > 10000 I.a.u

Critères de décision

Imax	ICB	ICN	EPOr (UI/L)	Artéfact invalidant	Conclusion
1				x	E-Remis-07 1/ Si possible à partir du rétentat 2/ Si volume d'urine suffisant Sinon ou si déjà remis : Inclassable : artéfact invalidant
2	< LD		< 500		Inclassable : indétectable
3	< LD		≥ 500		M-Ex-28B
4	$LD \leq I_{max} \leq LQ$			≥ 52	Inclassable : indétectable
5	> LD			< 52	Négatif
6	> LQ			≥ 52	Etude selon § 3-2/
7	$LD \leq I_{max} \leq LQ$	≥ 65			Inclassable : indétectable
8	> LD	< 65			Négatif
9	> LQ	≥ 65			Etude selon § 3-2/

3-2/ Etude des contrôles nécessitant une prise en compte de la migration du RM


Le RM intégré à la solution de catholyte est le reflet exact de la migration tout le long du gel. Celle-ci est à considérer en cas de doute sur la conclusion d'une analyse.



A cet effet, une photo numérique du gel avait été prise à l'issue de la migration, et enregistrée (Cf **M-An-43**).

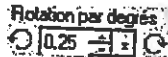
LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : B Date : 07/01/2005 6 / 10
Dépistage rapide EPO - Instruction de lecture pour l'Epoétine alpha, l'Epoétine beta et la Darbépoétine alpha		

- Ouvrir le logiciel "PhotoImpact"
 - Sélectionner "Fichier" / "Nouvelle" / "Nouvelle Image" : choisir la taille : A4, et la résolution : 200 Pixels/pouce.

 - Copie de l'image "Aida" (extension .img)
 - Sélectionner "Edit" / "Copy Content"
 - Dans le menu "Bitmap Size", choisir une résolution de 300 dpi.
 - Dans le document ouvert "PhotoImpact", coller cette image en sélectionnant "Edition" / "Coller" / "Comme objet"

 - Copie du fichier contenant la photo du gel
 - Ouvrir le fichier contenant la photo
 - A l'aide de l'outil "Découper" , recadrer l'image de façon à ne sélectionner que la partie gel.
 - Sélectionner "Edition" / "Copier"
 - Dans le document "PhotoImpact" contenant déjà l'image "Aida", coller la photo du gel en sélectionnant "Edition" / "Coller" / "Comme objet"

 - Superposition de l'image "Aida" et de la photo du gel
 - Menu déroulant "Transparence" : ajuster à 50 pour la photo du gel.
 - Outil "Transformation"  : Redimensionner l'image et la photo de manière à les superposer l'une à l'autre en respectant la proportionnalité des tailles.
 - La visibilité des deux images peut être améliorée en faisant varier la luminosité et le contraste : bouton 

 - Détermination du nouveau pourcentage ICB ou ICN
- Si cas "9" : détermination du nouveau pourcentage ICB, ICN restant inchangé*
- Aligner le RM (photo du gel) avec les bandes les plus acides des références BRP (image "Aida").
 - Pour cela, il est possible de s'aider de l'option "Rotation"  " de l'outil "Transformation"
 - Sauver sous : "c:\Gel + membrane\Gel + membrane + n° manip", puis imprimer.
 - Pour un échantillon donné, sa nouvelle valeur m_B est définie par la position du RM sur la piste de cet échantillon.
 - La détermination du pourcentage ICB est faite selon le § 3-1/
- Si cas "6" : détermination du nouveau pourcentage ICN, ICB restant inchangé*

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : B Date : 07/01/2005 7 / 10
Dépistage rapide EPO - Instruction de lecture pour l'Epoétine alpha, l'Epoétine beta et la Darbépoétine alpha		

- Aligner le RM (photo du gel) avec les bandes principales les plus basiques des références NESP (image "Aida").

Pour cela, il est possible de s'aider de l'option "Rotation"  " de l'outil "Transformation"

- Sauver sous : "c:\Gel + membrane\Gel + membrane + n° manip", puis imprimer.

- Pour un échantillon donné, sa nouvelle valeur m_A est définie par la position du RM sur la piste de cet échantillon.

- La détermination du pourcentage ICN est faite selon le § 3-1/

Critères de décision

Imax	ICB	Aspect profil	ICN	Conclusion
6-1 > LQ			< 52	Négatif
6-2 > LQ			$52 \leq ICN \leq 64$	Inclassable : incertitude de mesure
6-3 > LQ			> 64	I-CONF-07
9-1 > LQ	< 65			Négatif
9-2 > LQ	$65 \leq ICB \leq 85$	Normal		Inclassable : incertitude de mesure
9-3 > LQ	$65 \leq ICB \leq 85$	Anormal		Inclassable : échantillon dégradé
9-4 > LQ	> 85	Normal		I-CONF-07
9-5 > LQ	> 85	Anormal		Inclassable : échantillon dégradé

3-3/ Etude des contrôles ayant subi un test de stabilité TS selon M-Ex-28B : cas 3

Un échantillon est considéré "urine instable" lorsque un shift (déplacement) est observé dans la position des bandes de l'EPO BRP ou de la NESP ; ce critère est une démonstration de l'instabilité.

L'étude est effectuée selon le § 3-2 (prise en compte de la migration du RM)

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : B Date : 07/01/2005 8 / 10
Dépistage rapide EPO - Instruction de lecture pour l'Epoétine alpha, l'Epoétine beta et la Darbépoétine alpha		

Critères de décision

Rappel des résultats du dépistage rapide					
	Imax	ICB	EPOr (UI/L)	Test de stabilité TS	Conclusion
3-1	<LD		≥ 500	Urine stable	Inclassable : indétectable
3-2	< LD		≥ 500	Urine instable	Inclassable : échantillon dégradé

Lorsque la conclusion est connue, compléter le tampon apposé sur chaque tracé.

Renseigner l'enregistrement de résultats **E-FSR-02**.

LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : B Date : 07/01/2005 9 / 10
Dépistage rapide EPO - Instruction de lecture pour l'Epoétine alpha, l'Epoétine beta et la Darbépoétine alpha		

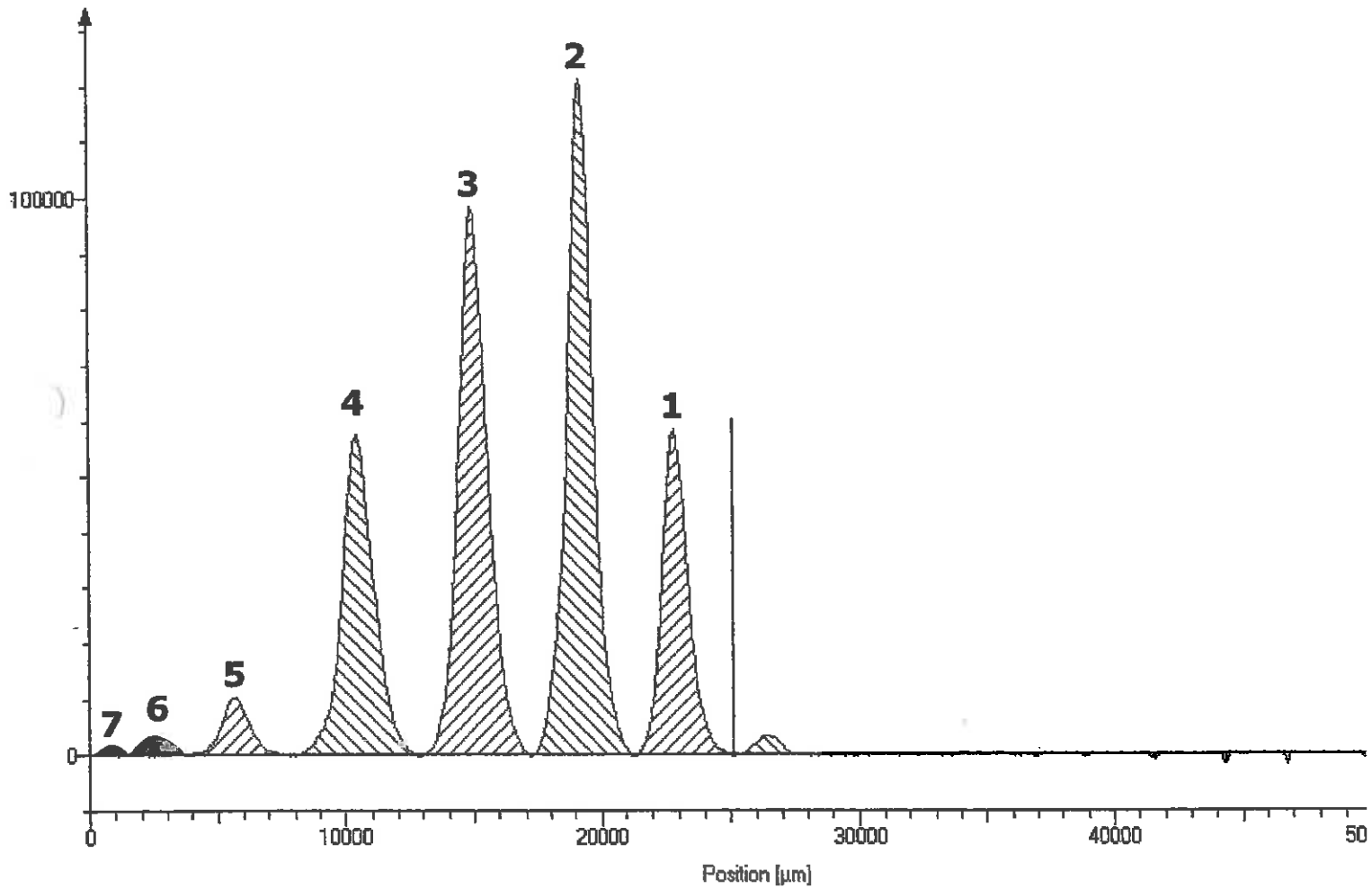
4/ Report des résultats sur la fiche labo E-Fiche labo-01

Conclusion	Cas	A noter sur fiche labo E-Fiche_lab0-01
E-Remis-07	1	<ul style="list-style-type: none"> - Indiquer au crayon noir AR suivi de la date (sous la forme jjmm) dans la case de l'échantillon correspondant. - Remplir l'enregistrement E-Remis-07.
Inclassable : indétectable Négatif Inclassable : échantillon dégradé Inclassable : incertitude de mesure Inclassable : artéfact invalidant	2 ; 3-1 ; 4 ; 7 5 ; 6-1 ; 8 ; 9-1 3-2 ; 9-3 ; 9-5 6-2 ; 9-2 1	Indiquer que l'analyse de dépistage rapide EPO est terminée en mettant une croix dans la case de l'échantillon correspondant.
I-CONF-07	6-3 ; 9-4	<ul style="list-style-type: none"> - Indiquer que l'analyse de dépistage rapide EPO est terminée en mettant une croix dans la case de l'échantillon correspondant. - Encercler la croix au crayon noir. - Noter dans la partie "commentaires" la demande de confirmation.

Compléter le dossier d'analyse EPO selon **I-DOS-01B** et le placer dans le dossier de la série salle 007.

Annexes

Numérotation des pics.



LNDD	INSTRUCTION	Codification : I-LEC-09 Version : B Date : 07/01/2005 10 / 10
-------------	--------------------	--------------------------------------------------------------------------------------

Dépistage rapide EPO - Instruction de lecture pour l'Epoétine alpha, l'Epoétine beta et la Darbépoétine alpha

EVOLUTIONS

N° Version	Motif	Date
A	Création du document.	11/09/2003
B	<ul style="list-style-type: none"> - Changement de titre : cette instruction concerne désormais uniquement le screening. - Introduction de la lecture en tenant compte du rouge de méthyle (cf E-INFO n° 16) - Introduction de nouveaux critères. 	07/01/2005