

CONSEILS D'UTILISATION DES KITS WESTERN BLOT

LDBIO DIAGNOSTICS

Ce manuel a pour but de guider les utilisateurs de kits Western Blot LDBIO Diagnostics dans leur manipulation, indépendamment du paramètre. Il est complémentaire de la notice propre à chacun des kits. Chaque étape décrite ci-dessous est issue de notre propre expérience dans la mise en œuvre de nos tests et des problèmes que nous avons pu résoudre chez nos clients depuis 20 ans.

Ce manuel est destiné à indiquer à chacun les pratiques que nous avons validées pour permettre à nos kits de vous fournir performances et reproductibilité.

La première partie concerne les utilisateurs en méthode manuelle, la seconde les utilisateurs d'automates.

UTILISATEURS EN MÉTHODE MANUELLE

1. Conditionnement des kits

Les kits Western Blot (WB) LDBIO Diagnostics sont constitués de 3 sous-ensembles :

- Les transferts (bandelettes) conservés dans une pochette transparente.
- Les réactifs liquides ou Produits Constituants (PC).
- Le contrôle positif (C+).

Comme il est expliqué dans toutes nos notices, tous les PC possédant le même numéro de lot peuvent être utilisés ensembles avec tous les paramètres et quel que soit le paramètre.

Il est par ailleurs recommandé d'utiliser les flacons de PC séquentiellement et de **ne mettre en service qu'un seul flacon de chaque réactif à la fois**, servant à tous les paramètres.

A réception des kits :

- Nous vous conseillons de classer transferts et réactifs par ordre chronologique d'arrivée afin d'utiliser en priorité les bandelettes et PC les plus anciens.
- Si les coffrets sont conservés, utilisez-les par ordre de réception.
- Si les coffrets sont déconditionnés, classez chronologiquement les transferts et les C+ par paramètre, et les PC par numéro de lot.

2. Utilisation du matériel

Les pipettes doivent être propres et calibrées, les cônes à usage unique changés entre chaque échantillon. Si la pipette elle-même touche les parois du tube échantillon, prévoir de l'essuyer avec un papier absorbant avant le pipetage suivant.

Pour l'entretien des cuves d'incubation (boîtes 8 puits réf. WBPP-08) :

- Rincer à l'eau distillée les cuves d'incubation manuelle. **NE PAS UTILISER DE JAVEL OU DE DÉTERGENTS.**
- Les boîtes sont réutilisables, même noircies par le substrat. Elles peuvent être changées par exemple tous les 6 mois.

Remarque : Ne pas utiliser l'eau du robinet pour rincer les cuves d'incubation, celle-ci contient de la javel en quantité non maîtrisée.

L'agitation lors des temps d'incubation est critique et conditionne la qualité des résultats. Il est INDISPENSABLE que les bandelettes bougent dans leur puits : la vitesse et l'amplitude d'agitation doit être suffisamment importante. Nous recommandons l'utilisation d'un agitateur à bascule comme ci-dessous, avec une agitation de 60 RPM :



3. Réalisation des tests Western Blot

La technique de Western Blot est basée sur des réactions biologiques, pour lesquelles **la température ambiante joue un rôle important**. Plus la température sera basse, plus les résultats seront faibles. Les tests LDBIO Diagnostics sont optimisés pour des températures comprises **entre 21 et 26°C**.

Utilisation des contrôles positifs

Ce contrôle permet de valider ou d'invalider techniquement une manipulation. Ce sérum de contrôle doit présenter des bandes nettes. D'une manip à l'autre, un même contrôle (même numéro de lot) doit présenter un profil comparable (nombre de bandes, intensité).

Remarque 1 : Pour un même paramètre, des contrôles positifs de numéros de lots différents peuvent parfois présenter des profils très différents.

Remarque 2 : D'expérience, les contrôles positifs sont stables. La baisse d'intensité du contrôle positif témoigne donc d'un problème de manipulation ou d'une contamination (le plus souvent du conjugué).

IL EST INDISPENSABLE DE PASSER AU MOINS UN CONTROLE POSITIF PAR MANIPULATION.

Remarque 3 : On ne peut pas utiliser une bandelette contrôle pour interpréter des résultats de bandelettes issues d'un transfert de numéro de série différent, car l'étalonnage de la position et de l'aspect des bandes peut varier légèrement entre deux transferts.

Remarque 4 : L'utilisation en contrôle C+ d'une bandelette conjointe à celle du patient (ex : bandelettes n° 3 et 4) est la méthode la plus précise pour déterminer la position d'une bande inconnue sur la bandelette du patient.

Plan de manipulation

Rédiger un plan de manipulation avec **TOUTES** les informations nécessaires à la traçabilité du test. Chaque plan de manipulation doit au moins faire apparaître les informations suivantes :

- N° de l'échantillon
- Date
- Nom du technicien
- **N° de lot du transfert**
- **N° de lot des réactifs (PC)**
- **N° de lot du contrôle positif (C+)**
- Les temps d'incubation réalisés
- Incorporer une bandelette pour le contrôle positif.

Remarque : Le numéro de lot du kit ne nous permet pas de connaître tous les réactifs utilisés. Seul le numéro de série inscrit sur l'étiquette principale du coffret ou à défaut le détail des N° de transfert, N° de PC et N° du C+ peut apporter cette traçabilité. Dans le cas où une assistance doit vous être apportée, nous avons besoin de connaître précisément tous ces éléments.

Distribution des réactifs

- Le pipetage répété des réactifs dans les flacons est une étape délicate pour laquelle il est essentiel d'éviter la formation de bulles dans les cônes des pipettes automatiques. Les PC ont en effet tendance à mousser et les bulles à rincer le corps de la pipette entraînant une contamination bactériologique massive des réactifs : l'utilisation ultérieure de ces réactifs contaminés sera un désastre...

Remarque : Pipeter dans un flacon autre que le flacon d'origine peut être une bonne idée. Dans ce cas, ne pas rempoter les reliquats.

Lavage des bandelettes

- Ajouter du tampon de lavage à la pissette dans chacun des puits jusqu'à mi-hauteur. Agiter les cuves en évitant :

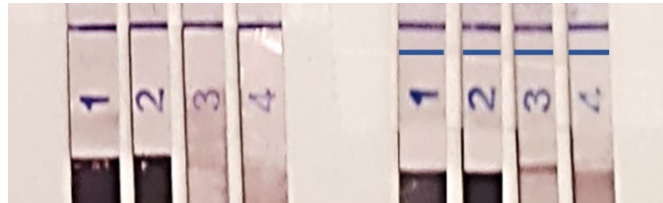
- Les débordements
- Les contaminations inter-puits
- Le retournement des bandelettes
- Laisser incuber 3 minutes sur l'agitateur.
- Retourner les cuves doucement, puits vers le bas pour éliminer le tampon de lavage. Les bandelettes restent collées au fond des puits par capillarité. Bien égoutter.
- Recommencer ce lavage 2 fois.

Remarque : Le tampon de lavage concentré doit être dilué au 1/10^{ème} dans de l'eau distillée/désionisée. Attention à **bien homogénéiser le tampon dilué avant son utilisation**.

Distribution des bandelettes

La distribution des bandelettes ainsi que des échantillons doit se faire sur une paillasse propre et dégagée.

- Astuce : Dans le cas où des bandelettes de même numéro seraient utilisées dans une même manipulation, vous pouvez les distinguer par un doublage du trait d'alignement bleu (cf. photo ci-dessous). Utilisez pour cela uniquement un stylo à bille fin de couleur bleue et une règle (l'encre noire a tendance à diffuser).



- Détacher ou découper les bandelettes au-dessus du trait d'alignement bleu à l'aide d'un scalpel : ne jamais la détacher avec les doigts ou toucher la bandelette en-dessous du trait d'alignement.
- Distribuer **1,2mL** de diluant échantillon (DE) dans chacun des puits.

Remarque : Ce volume de 1.2ml permet d'assurer le volume nécessaire et suffisant pour la bonne immersion/incubation de la bandelette. Un volume insuffisant peut entraîner une révélation irrégulière, la bandelette étant mal immergée.

- Distribuer les bandelettes suivant le plan de manipulation établi, numéro de bandelette visible vers le haut. **Les bandelettes doivent être déposées à la surface du DE : elles doivent flotter.**
- Laisser les bandelettes se réhydrater dans le DE pendant ~1-2 mn puis les immerger doucement par un léger va-et-vient de la cuve d'incubation.

LA RÉHYDRATATION NATURELLE ET COMPLÈTE DES BANDETTES EST INDISPENSABLE POUR LE BON DÉROULEMENT DU TEST.

Distribution des échantillons

La distribution des échantillons dans les puits réactionnels doit respecter les points suivants :

- Tous les échantillons doivent être homogénéisés avant dépôt d'autant plus s'ils étaient congelés.
- Vérifier le volume réglé sur la pipette (10, 25µL... cf. notice du kit).
- Distribuer chaque échantillon selon le plan préétabli. Prendre soin d'homogénéiser en agitant la cuve d'incubation par 3-4 va-et-vient à plat sur la paillasse **après chaque dépôt**.
- Incuber **90 min** sur agitateur.
- Laver 3 fois avec le tampon de lavage dilué.
- Distribuer **1,2mL** de conjugué, et incuber **60 min** sur agitateur.
- Laver 3 fois avec le lavage dilué.
- Distribuer **1,2mL** de substrat, et incuber **60 min** sur agitateur à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction par 2 lavages à l'eau distillée. Les bandelettes peuvent rester dans l'eau distillée plusieurs heures, mais doivent être sorties et mises à sécher (par exemple sur du papier buvard ou papier filtre) avant leur interprétation.

Interprétation

- Attendre le séchage des bandelettes : celles-ci s'éclaircissent en séchant.
- Une fois sèches, les bandelettes doivent être organisées par paramètre, par transfert et dans leur ordre numérique, espacées de quelques millimètres, et alignées entre elles grâce au trait bleu présent sur chaque bandelette.

Remarque 1 : Cette manière de « reconstituer » les transferts après révélation (le transfert est l'unité originelle de production du WB) affine énormément la qualité de l'interprétation, permettant de suivre les bandes spécifiques sur l'ensemble du transfert.

- Utiliser la bandelette du C+ pour déterminer la présence et la position des bandes spécifiques potentiellement présentes sur les bandelettes de chaque patient.
Si les bandelettes sont associées au dossier de chaque patient, reporter les références du plan de manip avec chaque bandelette. Conserver/archiver le plan de manip pour assurer la traçabilité de la manipulation.

Remarque 2 : Vous pouvez trouver un exemple des profils obtenus avec nos contrôles positifs pour chacun des paramètres dans l'espace « MYLDBIO » sur notre site internet.

UTILISATEURS D'AUTOMATES

1. Conditionnement des kits

Les kits Western Blot (WB) LDBIO Diagnostics sont constitués de 3 sous-ensembles :

- Les transferts (bandelettes) conservés dans une pochette transparente.
- Les réactifs liquides ou Produits Constituants (PC).
- Le contrôle positif (C+).

Comme il est expliqué dans toutes nos notices, tous les PC possédant le même numéro de lot peuvent être utilisés ensembles avec tous les paramètres et quel que soit le paramètre.

Il est par ailleurs recommandé d'utiliser les flacons de PC séquentiellement et de **ne mettre en service qu'un seul flacon de chaque réactif à la fois**, servant à tous les paramètres.

A réception des kits :

- Nous vous conseillons de classer transferts et réactifs par ordre chronologique d'arrivée afin d'utiliser en priorité les bandelettes et PC les plus anciens.
- Si les coffrets sont conservés, utilisez-les par ordre de réception.
Si les coffrets sont déconditionnés, classez chronologiquement les transferts et les C+ par paramètre, et les PC par numéro de lot.

2. Utilisation du matériel

Les pipettes doivent être propres et calibrées, les cônes à usage unique changés entre chaque échantillon. Si la pipette elle-même touche les parois du tube échantillon, prévoir de l'essuyer avec un papier absorbant avant le pipetage suivant.

Il est préférable de réserver l'automate à l'unique usage des tests LDBIO Diagnostics. L'utilisation de réactifs d'un autre fabricant est susceptible d'interagir et d'altérer les résultats. Une telle utilisation mixte, si elle est indispensable, devra nécessairement être validée, sous la responsabilité entière du laboratoire, et l'automate pour le moins rincé abondamment avant l'utilisation des réactifs LDBIO.

Des maintenances sont à effectuer sur les automates, décrites dans leur notice respective. Dans le cas des Autoblots et des Euroblots/Dynablots, les maintenances consistent en :

- Un rinçage quotidien avec le tampon de lavage dilué et de l'eau distillée
- Une décontamination et une calibration mensuelles
- Une maintenance annuelle, à réaliser par un technicien habilité.

CES MAINTENANCES SONT INDISPENSABLES AU BON FONCTIONNEMENT DE L'AUTOMATE ET PERMETTENT DE GARANTIR LES RÉSULTATS.

Pour l'entretien des racks (plateaux d'incubation 20, 30 ou 44 puits suivant l'automate) :

- Rincer les racks à l'eau distillée. **NE PAS UTILISER DE JAVEL OU DE DÉTERGENTS.**
- Les racks peuvent être réutilisés pendant 2 mois avant changement.

Remarque : Ne pas utiliser l'eau du robinet pour rincer les racks, celle-ci contient de la javel en quantité non maîtrisée.

3. Réalisation des tests Western Blot

La technique de Western Blot est basée sur des réactions biologiques, pour lesquelles **la température ambiante joue un rôle important**. Plus la température sera basse, plus les résultats seront faibles. Les tests LDBIO Diagnostics sont optimisés pour des températures comprises **entre 20 et 26°C**.

Utilisation des contrôles positifs

Ce contrôle permet de valider ou d'invalider techniquement une manipulation. Ce sérum de contrôle doit présenter des bandes nettes. D'une manip à l'autre, un même contrôle (même numéro de lot) doit présenter un profil comparable (nombre de bandes, intensité).

Remarque 1 : Pour un même paramètre, des contrôles positifs de numéros de lots différents peuvent parfois présenter des profils très différents.

Remarque 2 : D'expérience, les contrôles positifs sont stables. La baisse d'intensité du contrôle positif témoigne donc d'un problème de manipulation ou d'une contamination (le plus souvent du conjugué).

IL EST INDISPENSABLE DE PASSER AU MOINS UN CONTROLE POSITIF PAR MANIPULATION.

Remarque 3 : On ne peut pas utiliser une bandelette contrôle pour interpréter des résultats de bandelettes issues d'un transfert de numéro de série différent, car l'étalonnage de la position et de l'aspect des bandes peut varier légèrement entre deux transferts.

Remarque 4 : L'utilisation en contrôle C+ d'une bandelette conjointe à celle du patient (ex : bandelettes n° 3 et 4) est la méthode la plus précise pour déterminer la position d'une bande inconnue sur la bandelette du patient.

Plan de manipulation

Rédiger un plan de manipulation avec **TOUTES** les informations nécessaires à la traçabilité du test. Chaque plan de manipulation doit au moins faire apparaître les informations suivantes :

- N° de l'échantillon
- Date
- Nom du technicien
- **N° de lot du transfert**

- N° de lot des réactifs (PC)
- N° de lot du contrôle positif (C+)

Remarque : Le numéro de lot du kit ne nous permet pas de connaître tous les réactifs utilisés. Seul le numéro de série inscrit sur l'étiquette principale du coffret ou à défaut le détail des N° de transfert, N° de PC et N° du C+ peut apporter cette traçabilité. Dans le cas où une assistance doit vous être apportée, nous avons besoin de connaître précisément tous ces éléments.

- Incorporer une bandelette pour le contrôle positif.

Distribution des réactifs

Pour une meilleure gestion des réactifs, vous devez utiliser uniquement le volume nécessaire aux tests (avec un petit excès de sécurité) en utilisant les flacons en verre fournis ou des tubes Falcon de 50ml. Ces derniers étant coniques, permettent une meilleure gestion des volumes.

- Si le volume de réactif est insuffisant, il est possible de compléter les volumes avec un nouveau flacon neuf **de même numéro de lot**.
- **NE JAMAIS REMPOTER UN RÉACTIF UTILISÉ** : De notre expérience, les reliquats peuvent être conservés 2 semaines au réfrigérateur à 2-8°C. Les éliminer, nettoyer les flacons (ni javel, ni détergent) et repartir ainsi avec des réactifs neufs tous les 15 jours.

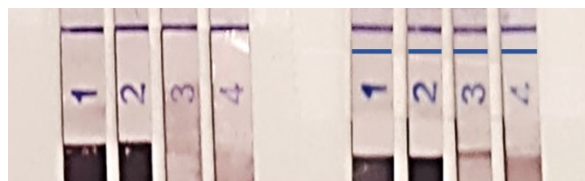
Remarque : LDBIO peut vous fournir, à votre demande et lors de votre prochaine commande, le réactif complémentaire pour compenser cette petite perte de réactifs.

Remarque : Un tampon de lavage trop concentré peut avoir un impact sur la réaction. Il est essentiel de bien respecter la dilution et de **bien homogénéiser le tampon dilué avant chaque utilisation**.

Distribution des bandelettes

La distribution des bandelettes ainsi que des échantillons doit se faire sur une paille propre et dégagée.

- Astuce : Dans le cas où des bandelettes de même numéro seraient utilisées dans une même manipulation, vous pouvez les distinguer par un doublage du trait d'alignement bleu (cf. photo ci-dessous). Utilisez pour cela uniquement un stylo BIC fin de couleur bleue et une règle.



- Détacher ou découper les bandelettes au-dessus du trait d'alignement bleu à l'aide d'un scalpel : ne jamais la détacher avec les doigts ou toucher la bandelette en-dessous du trait d'alignement.
- Distribuer **1,2mL** de diluant échantillon (DE) dans chacun des puits.

Remarque : Ce volume de 1.2ml permet d'assurer le volume nécessaire et suffisant pour la bonne immersion/incubation de la bandelette. Un volume insuffisant peut entraîner une révélation irrégulière, un volume trop important une contamination entre les puits.

- Distribuer les bandelettes suivant le plan de manipulation établi, numéro de bandelette visible vers le haut. **Les bandelettes doivent être déposées à la surface du DE : elles doivent flotter.**
- Laisser les bandelettes se réhydrater dans le DE pendant ~1-2 mn puis les immerger doucement par un léger va-et-vient du rack.

LA RÉHYDRATATION NATURELLE ET COMPLÈTE DES BANDELETTES EST INDISPENSABLE POUR LE BON DÉROULEMENT DU TEST.

Distribution des échantillons

La distribution des échantillons dans les puits réactionnels doit respecter les points suivants :

- Tous les échantillons doivent être homogénéisés avant dépôt d'autant plus s'ils étaient congelés.
- Vérifier le volume réglé sur la pipette (10, 25µL... cf. notice du kit).
- Distribuer les échantillons selon le plan préétabli. Prendre soin d'homogénéiser en agitant le rack par 3-4 va-et-vient à plat sur la paillasse **après chaque dépôt.**
- Lancer l'automate :
 - o Incubation Echantillon **90 min.**
 - o Lavage 3 fois avec le tampon de lavage dilué.
 - o Distribution **1,2mL** de conjugué, et incubation **60 min.**
 - o Lavage 3 fois avec le tampon de lavage dilué.
 - o Distribution **1,2mL** de substrat, et incubation **60 min** à l'abri de la lumière directe.
 - o Arrêt de la réaction par 2 lavages à l'eau distillée. Les bandelettes peuvent rester dans l'eau distillée plusieurs heures, mais doivent être sorties et mises à sécher (par exemple sur du papier buvard ou papier filtre) avant leur interprétation.

Interprétation

- Attendre le séchage des bandelettes : celles-ci s'éclaircissent en séchant.

- Une fois sèches, les bandelettes doivent être organisées par paramètre, par transfert et dans leur ordre numérique, espacées de quelques millimètres, et alignées entre elles grâce au trait bleu présent sur chaque bandelette.

Remarque 1 : Cette manière de « reconstituer » les transferts après révélation (le transfert est l'unité originelle de production du WB) affine énormément la qualité de l'interprétation, permettant de suivre les bandes spécifiques sur l'ensemble du transfert.

- Utiliser la bandelette du C+ pour déterminer la présence et la position des bandes spécifiques potentiellement présentes sur les bandelettes de chaque patient.
- Si les bandelettes sont associées au dossier de chaque patient, reporter les références du plan de manip avec chaque bandelette. Conserver/archiver le plan de manip pour assurer la traçabilité de la manipulation.

Remarque 2 : Vous pouvez trouver un exemple des profils obtenus avec nos contrôles positifs pour chacun des paramètres dans l'espace « MYLDBIO » sur notre site internet.

