

FASCIOLA E/S

Western blot IgG



Technique d'immunoblot pour usage diagnostique *in vitro*



#FAS ES-WB24G : 24 tests

#FAS ES-WB12G : 12 tests

#FAS ES-WB96G : 96 tests

ENGLISH VERSION PAGE 9

NOTICE D'UTILISATION

Indication du test

FASCIOLA E/S Western Blot (WB) IgG est un test qualitatif de diagnostic sérologique IgG par immunoblot de la distomatose proposé comme test de confirmation d'un résultat positif ou équivoque obtenu par les tests classiques de dépistage.

Principe du test

Technique de Western Blot : Les antigènes de *Fasciola hepatica* *excrétion sécrétion* (E/S), après séparation électrophorétique ont été fixés par électro-transfert à la surface d'une feuille de nitrocellulose (appelée le transfert) découpée en 24 bandelettes identifiées de 1 à 24.

Déroulement du test : Chaque échantillon sérique à tester est incubé séparément avec une bandelette. Les anticorps spécifiques éventuellement présents dans le prélèvement se fixent sélectivement sur les antigènes. A l'étape suivante, le conjugué Phosphatase Alcaline-anti-IgG humaines se lie aux anticorps fixés. Enfin, les immun-complexes réagissent avec l e substrat. Les antigènes reconnus par les anticorps spécifiques de classe IgG présents dans les échantillons sont ainsi révélés sous forme de bandes transversales violettes.



Réactifs fournis avec la trousse

italique : conditionnement 12 tests (#FAS ES-WB12G) - **gras** : Conditionnement 96 tests (#FAS ES-WB96G).

ID	Qté	Description	Composition
R1	1	Pochette(s) de 24 (<i>12, 4x24</i>) BANDELETTES prédécoupées + Standards colorés. (Chaque pochette et chaque transfert est identifié par un numéro de série unique)	Nitrocellulose sensibilisée. Poids Moléculaires Colorés (kDa) : Bleu : 250, Bleu : 150, Bleu : 100, Rose : 75, Bleu : 50, Vert : 37, Rose : 25, bleu : 20, bleu : 15, jaune : 10.
R2	1	Flacon de 30 (<i>30, 125</i>) ml de DILUANT ECHANTILLON (Prêt à l'emploi - solution rose).	Tampon + surfactant + NaN ₃ (inf. 0.1%).
R3	1	Flacon(s) de 30 (<i>30, 2x60</i>) ml de CONJUGUE ANTI-IgG (Prêt à l'emploi - solution bleue).	Tampon + sérum polyclonal de chèvre anti-IgG humaines conjugué à la phosphatase alcaline + NaN ₃ (inf. 0.1%) + stabilisants.
R5	1	Flacon de 30 (<i>30, 125</i>) ml de SUBSTRAT (Prêt à l'emploi - flacon opaque marron).	Tampon + NBT + BCIP + stabilisants.
R6	1	Flacon de 60 (<i>60, 250</i>) ml de TAMPON DE LAVAGE CONCENTRE 10X (<u>A diluer 10 fois</u> dans de l'eau distillée - solution incolore).	Tampon + surfactant + NaN ₃ (inf. 0.1%).
R10	1	Tube de 200 (<i>200, 2x200</i>) µl de SERUM DE CONTROLE POSITIF (Prêt à l'emploi - bouchon rouge).	Tampon + pool de sérums humains positif en sérologie <i>Fasciola</i> + NaN ₃ (inf. 0.1%) + stabilisants.

R2, R3, R5 et R6 sont communs à tous les kits et présentent un numéro de lot unique qui ne dépend que de la date de leur production. Il est recommandé de réaliser des séries multiparamétriques (Cf. la gamme immunoblots LDBIO) pour limiter le nombre de flacons entamés et pour assurer un meilleur contrôle de qualité.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Cuves d'incubation multicanaux en polypropylène adaptées aux miniblots (# WBPP- 08 ou équivalent).
- Agitateur oscillant pour immunoblots, système d'aspiration pour les liquides (les cuves # WBPP- 08 que nous fournissons peuvent être vidées par simple retournement).
- Tubes et matériel pour le prélèvement des échantillons, éprouvettes graduées, récipients adaptés. Pipettes automatiques, micropipettes et pointes à usage unique (volumes de 25µl, 1.2ml et 2ml).
- Eau distillée ou désionisée. Papier absorbant (ex : papier filtre Whatman), ruban adhésif transparent.
- Gants en latex, pincette pour manipuler les bandelettes, cutter ou scalpel, règle plate transparente.

Remarque : Nos réactifs peuvent être utilisés sur automate pour immunoblots. **Attention aux possibles contaminations chimiques de nos réactifs si l'automate est partagé avec des réactifs d'un autre fabricant** (exemple connu : contamination par le TWEEN 20) et aux contaminations bactériologiques. Dédier des flacons à l'automate. Ne pas rempoter les réactifs en fin de manipulation.

Conditions de conservation et péremption

Conservation entre 2 et 8°C. Les réactifs du coffret sont valables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le couvercle de la boîte et les étiquettes des flacons. Le tampon de lavage dilué 1/10 est stable 2 mois entre +2 et +8°C et une semaine à température ambiante.

Précautions d'emploi

Sécurité

- Pour usage *in vitro* exclusivement. Manipuler selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire et considérer tout réactif et tout échantillon comme potentiellement toxique et/ou infectieux.
- Porter une blouse, des gants et lunettes, ne pas boire, manger ou fumer dans le laboratoire. Ne pas pipeter avec la bouche.
- Le contrôle positif est un sérum d'origine humaine qui a subi un dépistage négatif concernant les anticorps anti-VIH 1 et 2, les anticorps anti-VHC et l'antigène HBs. Il doit cependant être manipulé comme un produit potentiellement infectieux.
- Le substrat contient un mélange NBT et BCIP, toxique par contact (peau et muqueuses) et inhalation.
- Les réactifs contiennent de l'azide de sodium susceptible de former des sels métalliques explosifs avec le plomb ou le cuivre. Rincer à l'eau tout rejet à l'évier.
- Éliminer les déchets (prélèvements, pointes, tubes, liquides de lavage, réactifs usagés...) conformément aux bonnes pratiques en usage dans la profession et aux règlements en vigueur dans le Pays.

Précautions

- Ne pas utiliser ensemble des réactifs liquides de lots différents.
- Utiliser les bandelettes dans leur ordre numérique. Ne pas mélanger des bandelettes de plusieurs numéros de série mais utiliser les transferts successivement. Etablir un plan de distribution précis avant de commencer la manipulation.
- Ne pas toucher les bandelettes avec les doigts, utiliser une pincette.
- Les réactifs doivent être bien mélangés avant usage, en particulier le tampon de lavage concentré.
- Refermer les flacons après usage, ne pas utiliser en cas de pénétration accidentelle de substance dans les réactifs. Ne pas utiliser de réactif provenant d'un flacon présentant des signes de fuite. Ne pas utiliser de solution trouble ou précipitée.
- N'utiliser que des cônes de pipette à usage unique. Eviter toute contamination inter-puits. Attention à la formation d'aérosols.
- Ne nettoyer les cuves d'incubation qu'à l'eau claire puis distillée (ne jamais utiliser de détergeant ou de javel).
- L'omission de distribution d'un échantillon ou la distribution d'un volume inapproprié peut faire considérer comme négatif le résultat du test quel que soit son statut réel.

Prélèvement des échantillons

Prélever de manière aseptique les échantillons sur tube sec. Un minimum de 10µl de sérum est nécessaire.

Conserver les échantillons à 2-8°C. S'ils doivent être conservés, les congeler à $-20 \pm 5^\circ\text{C}$. Ne pas utiliser d'échantillon contaminé. Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois.

Préparation des réactifs

Tampon de lavage : Pour 4 tests, diluer dans un flacon propre 10ml de tampon de lavage concentré 10x (**R6**) dans 90ml d'eau distillée ou désionisée .

Mode opératoire

Nota Bene : Il est recommandé de réaliser des séries multiparamétriques (Cf. la gamme immunoblots LDBIO) pour limiter le nombre de flacons entamés et pour assurer un meilleur contrôle de qualité.

1. Préparer le plan de distribution des échantillons et du contrôle positif C+ (**R10**).
Seule l'utilisation de ce contrôle permet de valider techniquement la manipulation et d'identifier pour un numéro de série donné, les bandes spécifiques révélées. On ne peut pas utiliser une bandelette C+ pour interpréter les résultats de bandelettes issues d'un transfert de numéro de série différent.
2. Découper le nombre de bandelettes (R1) nécessaires, à l'aide d'un scalpel et d'une règle plate transparente, propre et sèche, en conservant le trait bleu de positionnement sur les bandelettes : les maintenir fermement plaquées par la règle et les découper du côté de la souche (les numéros étant visibles au travers de la règle par transparence).
3. Distribuer 1.2ml de tampon échantillon (R2) dans chacun des puits selon le plan établi.
4. Déposer dans leur ordre numérique les bandelettes numérotées dans les puits : Laisser les bandelettes se réhydrater pendant environ 1 minute, numéro visible vers le haut en agitant doucement la cuve pour les immerger totalement dans le tampon.
5. Distribuer échantillons et contrôle(s) positif(s) : selon le plan de distribution, à raison de 10 µl par puits. Agiter doucement la cuve après chaque dépôt. La placer sur un agitateur oscillant.
Incubation 90mn \pm 5mn à 18-25°C.
6. Lavage : Vider le contenu des puits à l'aide d'une pipette pasteur ou par retournement de la cuve d'incubation et répartir 2 à 3 ml de tampon de lavage dilué dans chacun d'eux et incubé 3 mn sur l'agitateur. Répéter 2 fois, puis vider le contenu des puits. Faire attention à ce que les bandelettes ne se retournent pas pendant ces opérations.
7. Distribuer 1.2 ml de conjugué anti-IgG (R3) dans chacun des puits. Placer la cuve sur l'agitateur oscillant.
Incubation 60mn \pm 5mn à 18-25°C
8. Lavage : procéder comme pour l'étape 6.
9. Distribuer 1.2 ml de substrat NBT/BCIP (R5) dans chacun des puits et placer sur l'agitateur

oscillant, à l'abri de la lumière directe. **Incubation 60mn** \pm 5mn à 18-25°C.

Quelque soit le paramètre, surveiller le développement de la coloration. La révélation peut être interrompue si la couleur du fond de la bandelette s'assombrit au point de rendre la lecture difficile (La qualité des lavages a une influence fondamentale sur cette coloration). Noter que les bandelettes s'éclairciront en séchant.

10. Arrêter la réaction par aspiration du substrat avec une pipette pasteur ou par retournement de la cuve d'incubation puis par la distribution de 2ml d'eau distillée dans le puits. Répéter une fois ce dernier lavage.
11. Séchage des bandelettes : Les puits toujours remplis d'eau, saisir les bandelettes par leur extrémité numérotée à l'aide de la pincette et les déposer, numéro visible, sur un papier absorbant de type Whatman. Les laisser sécher à l'air. La couleur des bandelettes s'éclaircit naturellement en séchant. La lecture ne doit s'effectuer qu'après séchage complet.
12. Stockage : Transférer les bandelettes sur la feuille de papier qui servira à les archiver. Aligner les traits de positionnement. Maintenir les bandelettes avec la règle plate et les coller par le haut à l'aide du ruban adhésif transparent.

Pour une bonne interprétation, les bandelettes doivent être ordonnées par transfert et dans leur ordre numérique, espacées d'au maximum quelques millimètres. Il est aléatoire de vouloir comparer des bandelettes très espacées (ex : n°2 avec n°15). **Il est dangereux** (faux résultats) de vouloir comparer des bandelettes de kits différents (N° de série de bandelettes différent).

Contrôle qualité et interprétation

Le sérum de contrôle (R10) fourni avec le coffret doit systématiquement être inclus dans toute série d'immunoblots. Il présente le profil type et permet de valider techniquement le bon déroulement du test (les bandes doivent apparaître très nettement sur la bandelette) et d'étalonner précisément la position et l'aspect des bandes spécifiques pour permettre l'interprétation des résultats de bandelettes issues d'un même transfert (même numéro de série).

- Description des bandes :

Un échantillon positif peut présenter de nombreuses bandes situées entre 120 et 7kDa.

Parmi les bandes plus ou moins marquées que l'on peut retrouver dans cette zone, 3 d'entre elles ont été spécialement retenues pour leur spécificité, leur sensibilité et leur facilité de lecture : Un doublet à 8-9 kDa, une bande large à 28 kDa (souvent associée à une bande fine à 25kDa) et une bande large à 42kDa. Elles sont donc appelées : **P8-9, P28 et P42.**

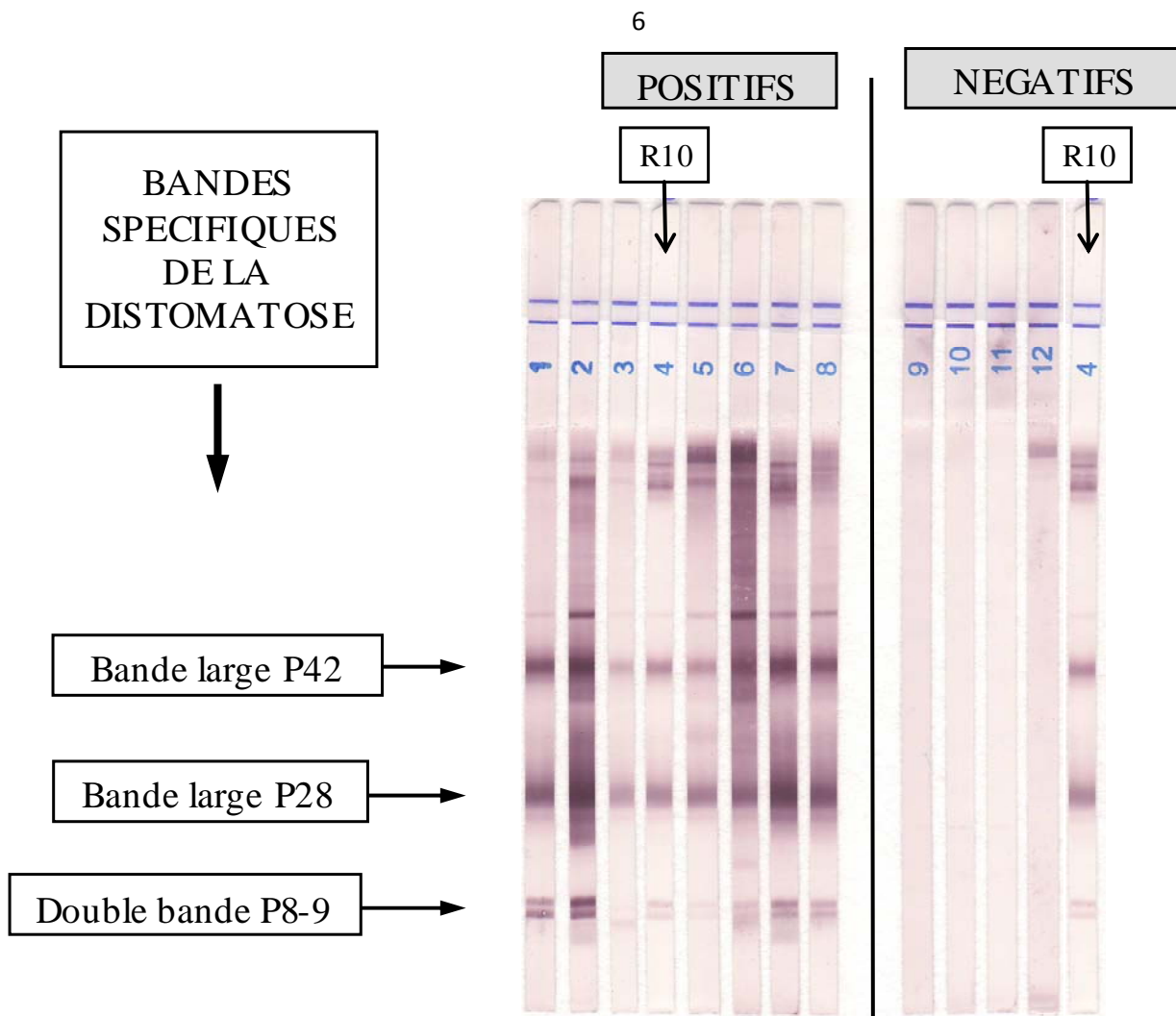


Fig. 1 : Exemples de résultats positifs et négatifs

- Interprétation :

La présence simultanée de deux bandes parmi les bandes **P8-9**, **P28**, **P42** et incluant P28 est indicative d'une distomatose.
 Les bandelettes « POSITIFS » ci-dessus montrent différents exemples de profils spécifiques retrouvés.

Pour la validation des résultats, toujours comparer le profil de l'immuno-blot de chaque échantillon avec celui du contrôle positif R10. L'aspect des bandes est important dans l'interprétation du test.

Limites du test

Les résultats sérologiques doivent être interprétés en fonction des renseignements disponibles (épidémiologie, clinique, imagerie, biologie) afin d'établir le diagnostic.

Performances

L'évaluation des performances de la trousse FASCIOLA E/S WB IgG (*Fasciola hepatica* - **Antigène E/S**) a été réalisée en comparaison avec la version précédente du kit LDBIO Diagnostics FASCIOLA WB IgG *Fasciola hepatica* - **Antigène Total**) désigné ci-après : WB REFERENCE commercialisé depuis 2004.

- Sensibilité (Se):

L'échantillon étudié correspond à 75 sérums de patients suspectés de distomatose.

Ces 75 sérums ont été testés en parallèle avec les techniques FASCIOLA E/S WB IgG et WB REFERENCE.

n=75	WB REFERENCE	FAS ES WB IgG
POSITIF	75	75
NEGATIF	0	0

Tableau 1 : Corrélation FASCIOLA E/S WB IgG / WB REFERENCE

La corrélation est excellente (Se=100%)

n = 75			
Nature des bandes spécifiques (Kda)	P8-9	P28	P42
Fréquence %	65.3	100.0	100.0

Tableau 2 : Fréquence de la présence de chacune des bandes spécifiques observée sur les immunoblots lors de notre étude sur 75 échantillons positifs.

- Spécificité :

151 sérums provenant d'infections parasitaires et fongiques, de maladies autoimmunes et de donneurs de sang ont été testés en WB : *Echinococcus multilocularis* (7), *E. granulosus* (7), *Taenia solium* (cysticercosis) (14), *Entamoeba histolytica* (7), *Shistosoma spp* (14), *Trichinella spiralis* (7), *Toxocara canis* (7), *Strongyloides stercoralis* (7), malaria (7), *Candida spp* (7), Facteur rhumatoïde RF+ (7), Anticorps anti-nucléaires ANA+ (7), donneurs de sang (53).

La spécificité des bandes P8-9, P28 et P42 issues de l'antigène E/S est de 100%. Les bandes situées en dehors de cette zone ne sont pas considérées comme spécifiques.

- Reproductibilité :

Reproductibilités inter-séries et inter-lots ont été testées. Dans les deux cas, la corrélation sérum à sérum vis-à-vis des bandes spécifiques est excellente.

- Interférences :

Bien qu'aucune interférence particulière n'ait été relevée avec des sérums hémolysés, ictériques ou lipidiques, il est conseillé d'interpréter les résultats provenant de l'utilisation de tels échantillons avec prudence.

Problèmes rencontrés

"Les bandes sont pâles et peu contrastées" : Certains sérums très peu chargés en anticorps peuvent donner de tels résultats.

"Des zones d'ombre se voient, plus ou moins colorées, légèrement diffuses" : La bandelette n'était pas totalement immergée dans l'un des réactifs et n'a pas incubé correctement sur toute sa longueur. Des taches peuvent être également présentes à l'endroit du dépôt de l'échantillon si la cuve n'a pas été agitée après la distribution.

"Le bruit de fond est important, rendant la lecture très difficile" : Les lavages ont été insuffisants ou

la dernière incubation a été trop longue. S'assurer du bon déroulement technique du test, du respect des temps de lavage, de la qualité de l'eau. Diminuer le temps de la dernière incubation. Exceptionnellement, certains sérums peuvent réagir ainsi de façon non spécifique. Le résultat de l'immunoblot ne peut alors être rendu.

Ce bruit de fond non spécifique peut ne concerner qu'une partie de la bandelette, rendant les résultats ininterprétables sur cette partie seulement.

"Un précipité apparaît dans la solution lors de la dernière étape de révélation" : le substrat peut effectivement partiellement précipiter (flocons noirs) dans le tampon en fin de révélation. Ce phénomène n'altère pas la qualité de la révélation qui doit être poursuivie normalement. Le lavage final à l'eau distillée élimine les particules solides éventuellement présentes.

Bibliographie

- Agnamey, P, E Fortes-Lopes, C P Raccurt, J Boncy, et A Totet. 2012. « Cross-sectional serological survey of human fascioliasis in haiti ». *Journal of parasitology research* 2012: 751951. doi:10.1155/2012/751951.
- Arafa, M. S., S. M. Abaza, K. A. El-Shewy, E. W. Mohareb, et A. A. El-Moamly. 1999. « Detection of Fasciola-Specific Excretory/ Secretory (E/S) Protein Fraction Band (49.5 kDa) and Its Utilization in Diagnosis of Early Fascioliasis Using Different Diagnostic Techniques ». *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 29 (3): 911-26.
- Hotez, Peter J., Lorenzo Savioli, et Alan Fenwick. 2012. « Neglected Tropical Diseases of the Middle East and North Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Opportunities for Control ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (2): e1475. doi:10.1371/journal.pntd.0001475.
- Khan, Muhammad Kasib, Muhammad Sohail Sajid, Hasan Riaz, Nazia Ehsan Ahmad, Lan He, Muhammad Shahzad, Altaf Hussain, Muhammad Nisar Khan, Zafar Iqbal, et Junlong Zhao. 2013. « The Global Burden of Fasciolosis in Domestic Animals with an Outlook on the Contribution of New Approaches for Diagnosis and Control ». *Parasitology Research* 112 (7): 2421-30. doi:10.1007/s00436-013-3464-6.
- Mera y Sierra, Roberto, Veronica H. Agramunt, Pablo Cuervo, et Santiago Mas-Coma. 2011. « Human Fascioliasis in Argentina: Retrospective Overview, Critical Analysis and Baseline for Future Research ». *Parasites & Vectors* 4: 104. doi:10.1186/1756-3305-4-104.
- Rondelaud, D., G. Dreyfuss, B. Bouteille, et M. L. Dardé. 2000. « Changes in Human Fasciolosis in a Temperate Area: About Some Observations over a 28-Year Period in Central France ». *Parasitology Research* 86 (9): 753-57.
- Salimi-Bejestani, M.R., J.W. McGarry, S. Felstead, P. Ortiz, A. Akca, et D.J.L. Williams. 2005. « Development of an Antibody-Detection ELISA for Fasciola Hepatica and Its Evaluation against a Commercially Available Test ». *Research in Veterinary Science* 78 (2): 177-81. doi:10.1016/j.rvsc.2004.08.005.
- Youssef, Ahmed I., et Shoji Uga. 2014. « Review of Parasitic Zoonoses in Egypt ». *Tropical Medicine and Health* 42 (1): 3-14. doi:10.2149/tmh.2013-23.

FASCIOLA E/S

Western blot IgG



Immunoblot assay for
in vitro diagnostic use



#FAS ES-WB24G : 24 tests

#FAS ES-WB12G : 12 tests

#FAS ES-WB96G : 96 tests

INSTRUCTIONS FOR USE

Intended use

FASCIOLA E/S Western Blot (WB) IgG is a qualitative test of serological IgG diagnosis by Immunoblot Assay of fasciolosis intended for confirmatory testing of a positive or equivocal result obtained through classic screening tests.

Principle of the test

Western Blot technique: The excretory/secretory (E/S) antigens of *Fasciola hepatica*, once separated by electrophoresis, are bound by electroblotting to the surface of a nitrocellulose membrane (called the transfer) cut into 24 strips numbered from 1 to 24.

Conduct of the test: Each sera specimen to be tested is separately incubated with a strip. The anti-*Fasciola* antibodies potentially present in the sample selectively bind themselves onto the antigens of *F. hepatica*. The alkaline phosphatase-anti human IgG conjugate then binds itself to the bound anti-*Fasciola* antibodies. Finally, the immunocomplexes react with the substrate. The antigens recognized by the anti-*Fasciola* antibodies of type IgG present in the samples are revealed as purple transversal bands.

Reagents supplied with the kit

italic: package of 12 tests (#FAS ES-WB12G) - bold: Package of 96 tests (#FAS ES-WB96G).

ID	Qty	Description	Composition
R1	1	Folder(s) of 24 (<i>12, 4x24</i>) STRIPS: precut + coloured Standards. (Each folder and each transfer is identified by a unique serial number)	Sensitized nitrocellulose. Coloured Molecular Weight (kDa): Blue: 250, Blue: 150, Blue: 100, Pink: 75, Blue: 50, Green: 37, Pink: 25, Blue: 20, Blue: 15, Yellow: 10.
R2	1	Vial of 30 (<i>30, 125</i>) ml of SAMPLE BUFFER (Ready to use - pink solution).	Buffer + surfactant + NaN3 (<0.1%).
R3	1	Vial(s) of 30 (<i>30, 2x60</i>) ml of ANTI IgG CONJUGATE (Ready to use - blue solution).	Buffer + anti-human IgG polyclonal goat sera conjugated with Alkaline Phosphatase + NaN3 (<0.1%) + stabilisers.
R5	1	Vial of 30 (<i>30, 125</i>) ml of SUBSTRATE (Ready to use - opaque brown vial).	Buffer + NBT + BCIP + stabilisers.
R6	1	Vial of 60 (<i>60, 250</i>) ml of WASH CONCENTRATE 10X BUFFER (<u>To be diluted 10 times</u> in distilled water - colourless solution).	Buffer + surfactant + NaN3 (<0.1%).
R10	1	Tube of 200 (<i>200, 2x200</i>) µl of POSITIVE CONTROL SERUM (Ready to use - red cap).	Buffer + pool of human sera positive in <i>Fasciola</i> serology + NaN3 (<0.1%) + stabilisers.

R2, R3, R5 and R6 are common to all kits and have a unique lot number depending only on the date of their production. It is recommended to perform multiparameter testing (see the LDBIO immunoblot range) to limit the number of vials opened and to ensure better quality control.

Additional material required but not provided

- Multi-channel polypropylene incubation trays for mini-blots (# WBPP- 08 or equivalent).
- Rocking platform for immunoblots, vacuum system for liquids (the # WBPP- 08 tubs that we supply can be emptied by simply turning them over).
- Tubes and material for drawing the samples, graduated cylinders, adapted containers. Automatic pipettes, micropipettes and disposable tips (volumes of 25 µl, 1.2 ml and 2 ml).
- Distilled or deionised water. Absorbent paper (e.g., Whatman filter paper), transparent adhesive tape.
- Latex gloves, tweezers to handle the strips, cutter or scalpel, flat transparent ruler.

Note: Our reagents can be used in an automated immunoblot processor. **Care should be taken with possible chemical contaminations of our reagents if the processor is shared with reagents from another manufacturer** (known example: contamination by the TWEEN 20), and bacterial contaminations. Reserve vials for the processor. After processing, do not place the remaining used reagents back into the original vials.

Storage and stability

Store between 2 and 8°C. The reagents from the kit are stable until the expiry date indicated on the outer box and the vial labels. Wash buffer diluted to 1/10 is stable for 2 months at +2 to +8 °C and one week at room temperature.

Precautions for use

Safety

- For *in vitro* use only. Handle according to Good Laboratory Practices and consider any reagent and any sample as potentially toxic and/or infectious.
- Wear a lab coat, gloves and glasses; do not drink, eat or smoke in the laboratory. Do not mouth the pipettes.
- Positive control is a serum of human origin that has been screened and found negative for to HIV 1 and 2 antibodies and HCV antibodies, and HB antigen. However, it must be handled like a potentially infectious product.
- The substrate contains a mixture of NBT and BCIP, toxic on contact (skin and mucous membranes) and inhalation.
- The reagents contain sodium azide which can form explosive metallic salts with lead and copper. Rinse any spill with water.
- Dispose of waste (samples, tips, tubes, wash liquid, used reagent...) according to good practices used in the industry and current regulations in the country.

Precautions

- Do not use liquid reagents from different lots together.
- Use the strips in numerical order. Do not mix strips from different serial numbers; use the transfers in succession. Establish a specific distribution plan before starting the test.
- Do not touch the strips with your fingers; use tweezers.
- The reagents must be mixed well before use, particularly the concentrated wash buffer.
- Close the vials after use; do not use if a substance was accidentally introduced in the reagents. Do not use reagent from a vial that presents signs of leakage. Do not use cloudy or precipitated solution.
- Use only disposable pipette tips. Avoid any inter-channel contamination. Watch for the formation of foam or bubbles in the pipette tips (bacterial contamination of reagent vials).
- Clean incubation trays only with clear water followed by distilled water (never use detergent or bleach).
- The omission of a sample or the distribution of an inadequate volume may render the test result negative, regardless of its actual status.

Specimen collection

Aseptically collect the samples in dry tubes. A minimum of 10 µl of serum is necessary.

Keep the samples at 2-8 °C until they are processed. If they need to be stored, freeze the samples at -20 ± 5 °C. Do not use a contaminated sample. Avoid freezing and thawing the samples repeatedly.

Preparation of reagents

Wash buffer: For 4 tests, in a clean bottle, dilute 10 ml of Wash Concentrate 10X (**R6**) in 90 ml of distilled or deionised water.

Test procedure

Nota Bene: It is recommended to perform multiparameter testing (see the LDBIO immunoblot range) to limit the number of vials opened and to ensure better quality control.

1. Prepare a distribution plan for the samples and C+ positive control (**R10**).
Only by using this control can the test be technically validated and identification made, for a given serial number, of the specific bands developed. A C+ strip cannot be used to interpret the results of strips from a blot of a different serial number.
2. Cut the required number of strips (R1) using a scalpel and a clean and dry flat transparent ruler, keeping the blue positioning line on the strips: hold the strips firmly in place with the ruler and cut them on the side of the stain (the numbers are visible through the ruler).
3. Distribute 1.2 ml of sample buffer (R2) in each channel according to the established plan.
4. Deposit, in their numerical order, the numbered strips in the channels: Let the strips rehydrate themselves for approximately 1 minute, with the number visible at the top, by gently shaking the tray to totally immerse them in the buffer.
5. Distribute the samples and positive control(s): according to the distribution plan, at a rate of 10 µl per channel. Gently shake the tray after each dispense. Place the tray on a rocking platform. **Incubate for 90 min** ± 5 min at 18-25 °C.
6. Wash step: Empty the contents of the channels with a Pasteur pipette or by turning the incubation tray over. Dispense 2 to 3 ml of diluted Wash Buffer in each channel. Incubate on the rocking platform for 3 min. Repeat 2 times, then empty the contents of the channels. Ensure that the strips don't turn during these steps.
7. Dispense 1.2 ml of anti IgG conjugate (R3) into each channel. Place the tray on the rocking platform. **Incubate for 60 min** ± 5 min at 18-25 °C
8. Wash step: repeat step 6.
9. Distribute 1.2 ml of NBT/BCIP substrate (R5) into each of the channels. Place on the rocking platform and protect from direct light. **Incubate for 60 min** ± 5 min at 18-25 °C.

Regardless of the parameter, monitor the development of the colour. The development can be stopped if the background colour of the strip darkens to the point where reading is difficult (the quality of the wash steps has a fundamental influence on the background coloration). Note that the strips will lighten as they dry.

10. Stop the reaction by aspirating substrate with a Pasteur pipette or by turning the incubation tub over and dispensing 2 ml of distilled water in the channels. Repeat this last washing step one more time.

11. Drying the strips: With the channels still water-filled, take the strips by the numbered end using the tweezers and deposit them, with the number visible, onto a Whatman absorbent paper. Let air dry. The colour of the strips will naturally lighten while drying. Interpretation must only be performed after drying is complete.
12. Storage: Transfer the strips onto a sheet of paper, which will be used to archive them. Align the positioning lines. Keeping them in place with the flat ruler, stick the top of the strips with transparent adhesive tape.

For a good interpretation, the strips must be ordered by transfer and in their numerical order, spaced at a maximum of a few millimetres apart. It is unreliable to compare strips that are spaced far apart (e.g., no.2 with no.15). **It is dangerous** (false results) to compare strips from different kits (strips with different serial numbers).

Quality control and interpretation

The serum control (R10) provided with the kit must be systematically included in any immunoblot series. It shows the typical profile and allows for technical validation of the good conduct of the test (the bands must appear very clearly on the strip) and to calibrate precisely the position and aspect of the specific bands to allow interpretation of the results of the strips from the same transfer (same serial number).

- Description of the bands:

A positive sample can present numerous bands located between 120 and 7 kDa.

Among the more or less marked bands that can be found in this area, 3 of them were specially selected for their specificity, their sensitivity and their ease of reading: A doublet at 8-9 kDa, a large band at 28 kDa (often associated with a narrow band at 25 kDa) and a large band at 42 kDa. They are therefore called: **P8-9, P28 and P42.**

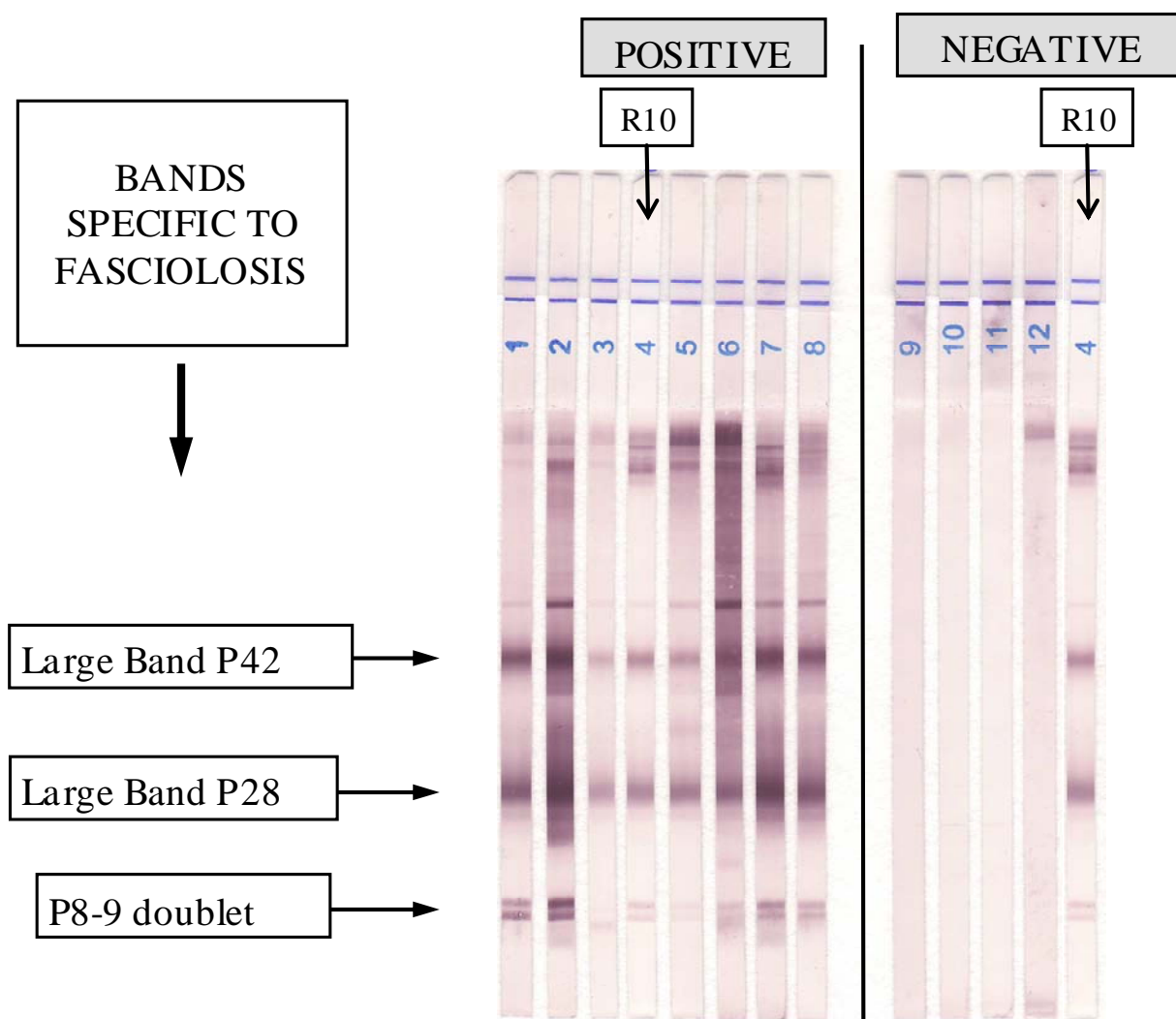


Fig. 1: Examples of positive and negative results

- Interpretation:

The simultaneous presence of two bands among **P8-9, P28 and P42** and the inclusion of **P28** is indicative of fasciolosis.

The “POSITIVE” strips above show different examples of specific profiles found.

To validate the results, always compare the profile of the immunoblot of each sample with that of the R10 positive control. The aspect of the bands is important when interpreting the test.

Limitations of use

These serological results must be interpreted according to available information (epidemiological, clinical, imaging, biological) in order to establish a diagnosis.

Performances

The evaluation of the FASCIOLA E/S WB IgG kit's performance (*Fasciola hepatica* - **E/S antigen**) was done and compared the previous version of the LDBIO Diagnostics kit FASCIOLA WB IgG c€ (*Fasciola hepatica* - **Total Antigen**) designated hereafter: REFERENCE WB marketed since 2004.

- Sensitivity (Se):

The studied sample corresponds to 75 sera from patients with suspected clinical fasciolosis. These 75 sera were tested in parallel with the FASCIOLA E/S WB IgG and the REFERENCE WB.

n=75	REFERENCE WB	FAS ES WB IgG
POSITIVE	75	75
NEGATIVE	0	0

Table 1: Correlation FASCIOLA E/S WB IgG / WB REFERENCE
The correlation is excellent (Se=100%)

n = 75			
Nature of the specific bands (Kda)	P8-9	P28	P42
Frequency %	65.3	100.0	100.0

Table 2: Frequency of the presence of each of the specific bands observed on the immunoblots during our study on 75 positive samples.

- Specificity:

151 sera from parasitic and fungal infections, autoimmune diseases and blood donors were tested with FASCIOLA E/S WB IgG: *Echinococcus multilocularis* (7), *E. granulosus* (7), *Taenia solium* (cysticercosis) (14), *Entamoeba histolytica* (7), *Shistosoma spp* (14), *Trichinella spiralis* (7), *Toxocara canis* (7), *Strongyloides stercoralis* (7), malaria (7), *Candida spp* (7), RF+ Rheumatoid factor (7), ANA+ Anti-nuclear antibodies (7) blood donors (53).

The specificity of the bands P8-9, P28 and P42 from the E/S antigen is 100%. The bands outside of this range are not considered specific.

- Reproducibility:

Inter-series and inter-lot reproducibility were tested. In both cases, the serum to serum correlation with respect to specific bands is excellent.

- Interferences:

Even though no particular cross-reaction has been observed with haemolysed, icteric or lipidic sera, it is recommended to interpret the results from the use of such samples with care.

Trouble shooting

"The bands are pale with little contrast": Certain sera with low concentrations of antibodies may give such results.

"Shaded areas can be seen, more or less coloured, slightly diffuse": The strip was not totally submerged in one of the reagents and did not incubate correctly along its entire length. Stains can also be present where the sample was deposited if the tray was not shaken after dispensing.

"The background noise is significant, making reading very difficult": The washes were insufficient or the last incubation was too long. Ensure good test performance techniques, respect wash times and ensure water quality. Reduce the time of the last incubation.

Exceptionally, certain sera may react in a non-specific manner. Then, the result of the immunoblot cannot be used.

This non-specific background noise may involve only part of the strip, making the results uninterpretable for that part only.

"A precipitate appears in the solution during the last step of development": the substrate may in fact partially precipitate (black flakes) in the buffer at the end of development. This phenomenon does not alter the quality of the development which must be continued normally. The last wash with distilled water eliminates the possible solid particles present.

Bibliography

- Agnamey, P, E Fortes-Lopes, C P Raccurt, J Boncy, et A Totet. 2012. « Cross-sectional serological survey of human fascioliasis in haiti ». *Journal of parasitology research* 2012: 751951. doi:10.1155/2012/751951.
- Arafa, M. S., S. M. Abaza, K. A. El-Shewy, E. W. Mohareb, et A. A. El-Moamly. 1999. « Detection of Fasciola-Specific Excretory/ Secretory (E/S) Protein Fraction Band (49.5 kDa) and Its Utilization in Diagnosis of Early Fascioliasis Using Different Diagnostic Techniques ». *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 29 (3): 911-26.
- Hotez, Peter J., Lorenzo Savioli, et Alan Fenwick. 2012. « Neglected Tropical Diseases of the Middle East and North Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Opportunities for Control ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (2): e1475. doi:10.1371/journal.pntd.0001475.
- Khan, Muhammad Kasib, Muhammad Sohail Sajid, Hasan Riaz, Nazia Ehsan Ahmad, Lan He, Muhammad Shahzad, Altaf Hussain, Muhammad Nisar Khan, Zafar Iqbal, et Junlong Zhao. 2013. « The Global Burden of Fasciolosis in Domestic Animals with an Outlook on the Contribution of New Approaches for Diagnosis and Control ». *Parasitology Research* 112 (7): 2421-30. doi:10.1007/s00436-013-3464-6.
- Mera y Sierra, Roberto, Veronica H. Agramunt, Pablo Cuervo, et Santiago Mas-Coma. 2011. « Human Fascioliasis in Argentina: Retrospective Overview, Critical Analysis and Baseline for Future Research ». *Parasites & Vectors* 4: 104. doi:10.1186/1756-3305-4-104.
- Rondelaud, D., G. Dreyfuss, B. Bouteille, et M. L. Dardé. 2000. « Changes in Human Fasciolosis in a Temperate Area: About Some Observations over a 28-Year Period in Central France ». *Parasitology Research* 86 (9): 753-57.
- Salimi-Bejestani, M.R., J.W. McGarry, S. Felstead, P. Ortiz, A. Akca, et D.J.L. Williams. 2005. « Development of an Antibody-Detection ELISA for Fasciola Hepatica and Its Evaluation against a Commercially Available Test ». *Research in Veterinary Science* 78 (2): 177-81. doi:10.1016/j.rvsc.2004.08.005.
- Youssef, Ahmed I., et Shoji Uga. 2014. « Review of Parasitic Zoonoses in Egypt ». *Tropical Medicine and Health* 42 (1): 3-14. doi:10.2149/tmh.2013-23.

