

LEISHMANIA

Western blot IgG



Technique d'immunoblot pour usage diagnostique *in vitro*



#LES-WB24G : 24 tests

#LES-WB12G : 12 tests

#LES-WB96G : 96 tests

ENGLISH VERSION PAGE 9

NOTICE D'UTILISATION

Indication du test

LEISHMANIA Western Blot (WB) IgG est un test qualitatif de diagnostic sérologique IgG par immunoblot de la leishmaniose 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 (promastigotes de *Leishmania infantum*, 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 le 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 (#LES-WB12G) - **gras** : Conditionnement **96 tests** (#LES-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>Leishmania</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 25µl 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 25 µl par puits. Agiter doucement la cuve après chaque dépôt. La placer sur un agitateur oscillant. **Incubation 90mn** ± 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 ± 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** ± 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).

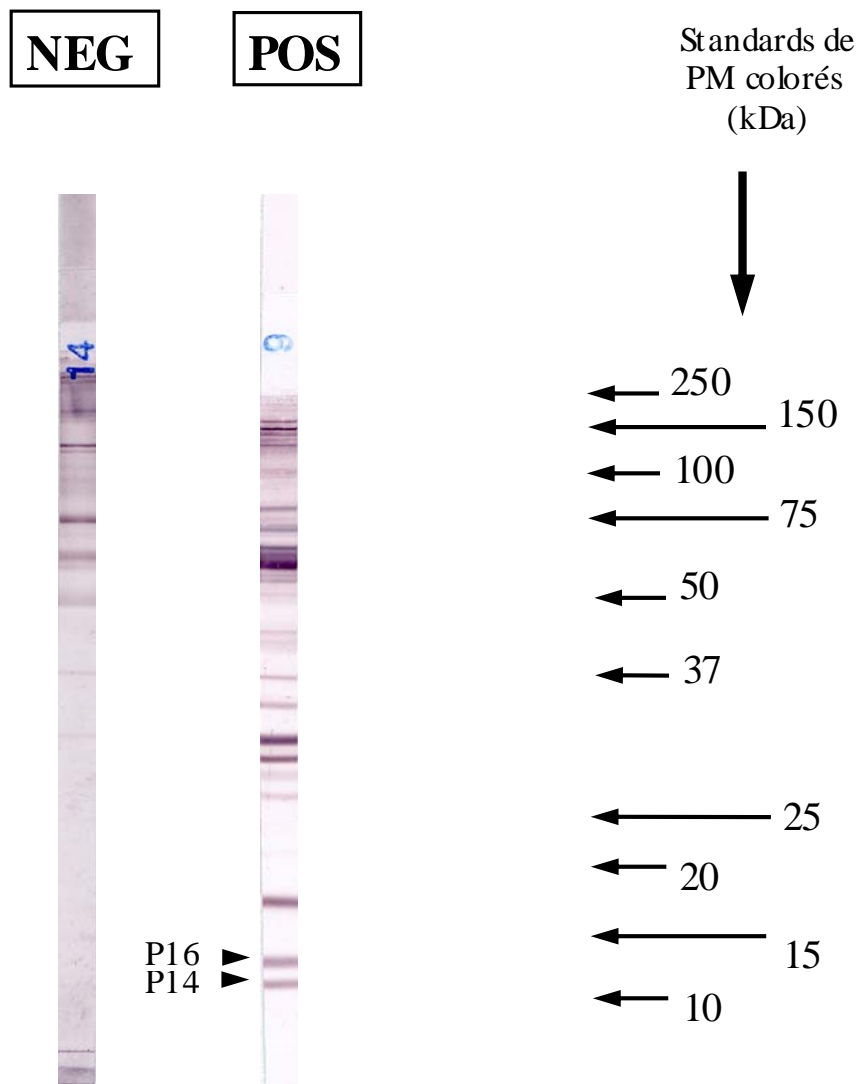


Fig. 1 : Exemples de résultats positifs et négatifs

- Description des bandes :

Un échantillon positif peut présenter de nombreuses bandes situées entre 8 et 200k Kilo-Daltons (kDa). Certaines sont spécifiques de la leishmaniose [9]. La difficulté à les localiser au milieu des autres bandes dont la spécificité n'est pas certaine représente cependant un handicap à leur exploitation.

Rechercher la présence des bandes 14 et 16kDa pour chacun des échantillons testés à l'aide des outils d'étalonnage décrits ci-dessus. Ces bandes situées en bas de la bandelette, généralement bien isolées, sont généralement très facilement interprétables.

- Interprétation :

La présence sur la bandelette de la bande antigénique 14kDa et/ou 16kDa permet d'interpréter le test comme positif et de conclure à la présence d'anticorps IgG anti-Leishmania dans l'échantillon testé. (Le résultat positif ci-dessus a été obtenu en utilisant le contrôle positif **R10** fourni dans le kit)

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.

Un résultat sérologique négatif n'écarte pas le diagnostic de leishmaniose viscérale notamment chez le sujet immunodéprimé.

Toute suspicion de leishmaniose doit faire automatiquement pratiquer une recherche parasitologique du protozoaire.

Performances

Le test LEISHMANIA WB IgG a fait l'objet d'une étude comparative avec les techniques IFA et ELISA dans un laboratoire indépendant.

- Sensibilité :

	IFA	ELISA	WB
POSITIFS	41	40	51
NEGATIFS	10	11	0

Tableau 1 : 51 sérums provenant de sujets atteints de leishmaniose viscérale évolutive ont été testés par le 3 techniques. ELISA et IFA ont présenté des résultats faussement négatifs en particulier chez les sujets immunodéprimés (VIH)

	IFA	ELISA	WB
POSITIFS	0	0	15
NEGATIFS	20	20	5

Tableau 2: 20 sérums provenant de sujets sains vivant en zone d'endémie et présentant un test de sensibilité cutané positif ont été testés en parallèle dans le trois techniques : la sensibilité de IFA et ELISA est insuffisante pour détecter de très faibles taux d'anticorps.

- Spécificité :

	IFA	ELISA	WB
POSITIFS	0	0	0
NEGATIFS	30	30	30

Tableau 3: 30 sérums provenant de sujets adultes sains vivant en zone non endémique ont été testés en parallèle en immunoblot, en Elisa et en IFA dans un laboratoire indépendant : la spécificité des trois techniques était de 100%. *NB : Des réactions faussement positives sont fréquemment retrouvées quelque soit la technique chez des patients atteints de trypanosomiase (T. cruzi).*

- 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

- Aoun, Olivier, Charles Mary, Cédric Roqueplo, Jean-Lou Marié, Olivier Terrier, Aurélie Levieuge, et Bernard Davoust. 2009. « Canine Leishmaniasis in South-East of France: Screening of Leishmania Infantum Antibodies (western Blotting, ELISA) and Parasitaemia Levels by PCR Quantification ». *Veterinary Parasitology* 166 (1-2): 27-31. doi:10.1016/j.vetpar.2009.08.006.
- Biglino, A., C. Bolla, E. Concialdi, A. Trisciuglio, A. Romano, et E. Ferroglio. 2010. « Asymptomatic Leishmania Infantum Infection in an Area of Northwestern Italy (Piedmont Region) Where Such Infections Are Traditionally Nonendemic ». *Journal of Clinical Microbiology* 48 (1): 131-36. doi:10.1128/JCM.00416-09.

- Cota, Gláucia Fernandes, Marcos Roberto de Sousa, Fábio Nogueira Demarqui, et Ana Rabello. 2012. « The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (5): e1665. doi:10.1371/journal.pntd.0001665.
- Deniau, M., C. Cañavate, F. Faraut-Gambarelli, et P. Marty. 2003. « The Biological Diagnosis of Leishmaniasis in HIV-Infected Patients ». *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 97 (Supplement-1): 115-33. doi:10.1179/000349803225002598.
- Ferroglio, E., E. Centaro, W. Mignone, et A. Trisciuglio. 2007. « Evaluation of an ELISA Rapid Device for the Serological Diagnosis of Leishmania Infantum Infection in Dog as Compared with Immunofluorescence Assay and Western Blot ». *Veterinary Parasitology* 144 (1-2): 162-66. doi:10.1016/j.vetpar.2006.09.017.
- Kallel, K, L Ammari, E Kaouech, S Belhadj, S Anane, B Kilani, et E Chaker. 2007. « [Asymptomatic bearing of Leishmania infantum among Tunisian HIV infected patients] ». *Pathologie-biologie* 55 (10): 521-24. doi:10.1016/j.patbio.2007.07.017.
- Lachaud, L., J. P. Dedet, P. Marty, F. Faraut, P. Buffet, J. P. Gangneux, C. Ravel, P. Bastien, et Working Group for the Notification of Human Leishmanioses in France. 2013. « Surveillance of Leishmaniasis in France, 1999 to 2012 ». *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 18 (29): 20534.
- Marty, P., A. Lelievre, J. F. Quaranta, A. Rahal, M. Gari-Toussaint, et Y. Le Fichoux. 1994. « Use of the Leishmanin Skin Test and Western Blot Analysis for Epidemiological Studies in Visceral Leishmaniasis Areas: Experience in a Highly Endemic Focus in Alpes-Maritimes (France) ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88 (6): 658-59.
- Marty, P., A. Lelièvre, J. F. Quaranta, I. Suffia, M. Eulalio, M. Gari-Toussaint, Y. Le Fichoux, et J. Kubar. 1995. « Detection by Western Blot of Four Antigens Characterizing Acute Clinical Leishmaniasis due to Leishmania Infantum ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89 (6): 690-91.
- Mary, C., D. Lamouroux, S. Dunan, et M. Quilici. 1992. « Western Blot Analysis of Antibodies to Leishmania Infantum Antigens: Potential of the 14-kD and 16-kD Antigens for Diagnosis and Epidemiologic Purposes ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47 (6): 764-71.
- Pomares, Christelle, Laura Despierres, Pascal del Giudice, Pascal Delaunay, Grégory Michel, Bernard Ferrua, et Pierre Marty. 2012. « Western Blot Analysis as an Aid for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis due to Leishmania Major ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106 (7): 452-54. doi:10.1016/j.trstmh.2012.03.001.
- Ready, Paul. 2014. « Epidemiology of Visceral Leishmaniasis ». *Clinical Epidemiology*, mai, 147. doi:10.2147/CLEP.S44267.
- Saghrouni, F, I Khammari, N Kaabia, J Bouguila, J Ben Abdeljelil, A Fathallah, F Amri, et M Ben Saïd. 2011. « Asymptomatic carriage of Leishmania in family members of patients with visceral leishmaniasis in Central Tunisia ». *Pathologie-biologie*, décembre. doi:10.1016/j.patbio.2011.11.001.
- Solano-Gallego, Laia, Guadalupe Miró, Alek Koutinas, Luis Cardoso, Maria Grazia Pennisi, Luis Ferrer, Patrick Bourdeau, Gaetano Oliva, Gad Baneth, et null The LeishVet Group. 2011. « LeishVet Guidelines for the Practical Management of Canine Leishmaniosis ». *Parasites & Vectors* 4: 86. doi:10.1186/1756-3305-4-86.
- Van Griensven, J., E. Carrillo, R. López-Vélez, L. Lynen, et J. Moreno. 2014. « Leishmaniasis in Immunosuppressed Individuals ». *Clinical Microbiology and Infection* 20 (4): 286-99. doi:10.1111/1469-0691.12556.

LEISHMANIA

Western blot IgG

CE

Immunoblot assay for
in vitro diagnostic use



#LES-WB24G : 24 tests
#LES-WB12G : 12 tests
#LES-WB96G : 96 tests

INSTRUCTIONS FOR USE

Intended use

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

Principle of the test

Western Blot technique: The antigens of *Leishmania infantum*, 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-*Leishmania* antibodies potentially present in the sample selectively bind themselves onto the antigens of *L. infantum*. The alkaline phosphatase-anti human IgG conjugate then binds itself to the bound anti-*Leishmania* antibodies. Finally, the immunocomplexes react with the substrate. The antigens recognized by the anti-*Leishmania* antibodies of type IgG present in the samples are revealed as purple transversal bands.

Reagents supplied with the kit

italic: package of 12 tests (#LES-WB12G) - bold: Package of 96 tests (#LES-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 + NaN ₃ (<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 + NaN ₃ (<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 (To be diluted 10 times in distilled water - colourless solution).	Buffer + surfactant + NaN ₃ (<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>Leishmania</i> serology + NaN ₃ (<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 25 µl of serum is required. 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 25 μ l per channel. Gently shake the tray after each dispense. Place the tray on a rocking platform. **Incubate for 90 min \pm 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 \pm 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 \pm 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).

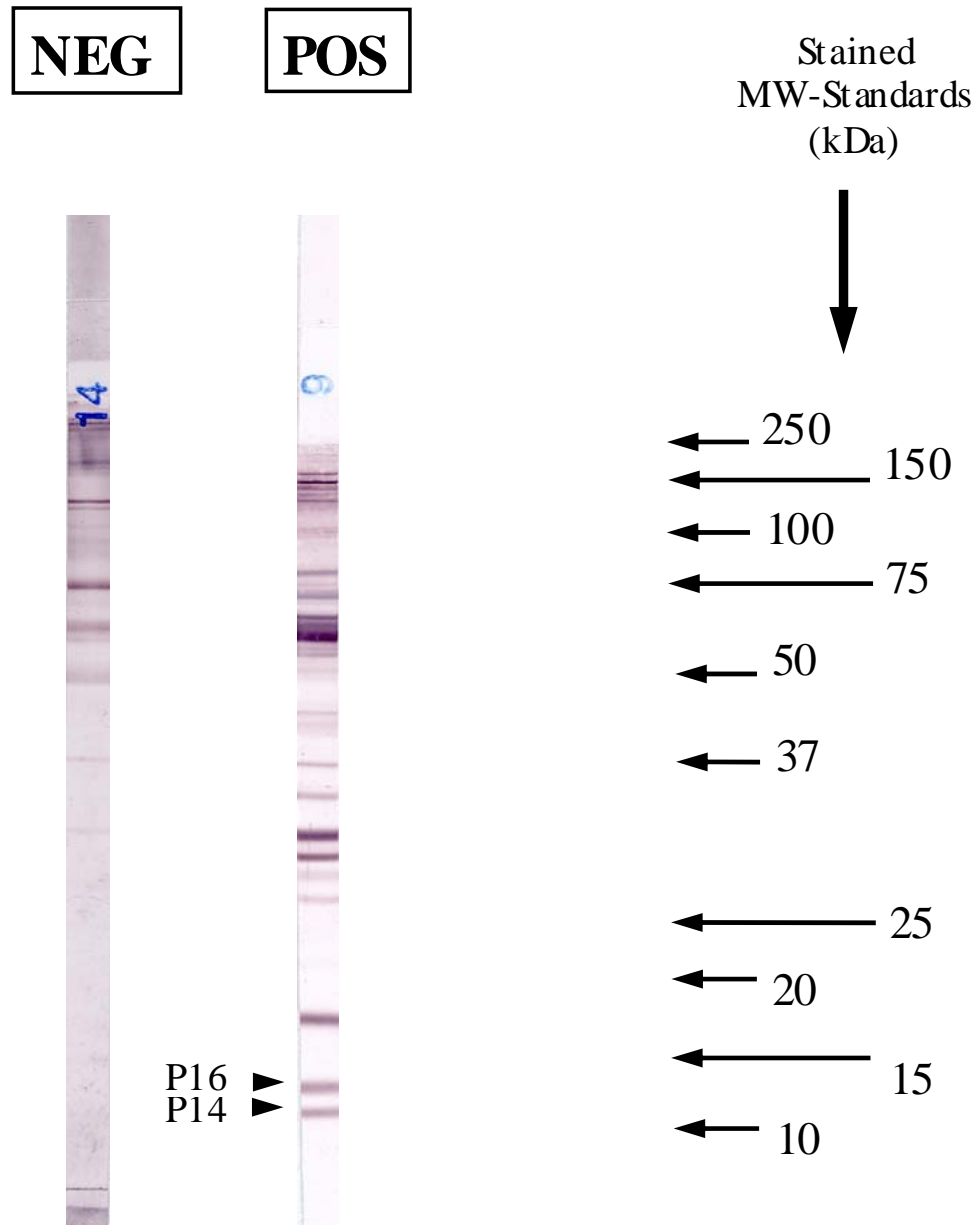


Fig. 1: Examples of positive and negative results

- Description of the bands

A positive sample can present numerous bands located between 8 and 200k kilodaltons (kDa). Certain are specific to leishmaniasis [9]. However, the difficulty in locating them in the middle of the other bands without a definite specificity is a disadvantage of using them.

Search for the presence of 14 and 16 kDa bands for each of the tested samples with the calibration tools described above. These bands, located at the bottom of the strip and generally well isolated, are generally very easy to interpret.

- Interpretation

The presence on the strip of the 14 kDa and/or 16 kDa antigenic band allows the test to be interpreted as positive and to conclude that anti-Leishmania IgG antibodies are present in the tested sample. (The above positive result was obtained by using the **R10** positive control provided in the kit)

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.

A negative serological result does not rule out the diagnosis of visceral leishmaniasis, particularly in immuno-suppressed patients.

Any suspicion of leishmaniasis must automatically result in performing a parasitological search for protozoans.

Performances

The LEISHMANIA WB IgG test was the subject of a comparative study with the IFA and ELISA techniques in an independent laboratory.

- Sensitivity:

	IFA	ELISA	WB
POSITIVE	41	40	51
NEGATIVE	10	11	0

Table 1: 51 sera from subjects suffering from progressive visceral leishmaniasis were tested by the 3 techniques. ELISA and IFA presented false-negative results, in particular in immuno-compromised patients (HIV)

	IFA	ELISA	WB
POSITIVE	0	0	15
NEGATIVE	20	20	5

Table 2: 20 sera from healthy living patients in an endemic area and presenting a positive skin sensitivity test were tested in parallel with the three techniques: the sensitivity of IFA and ELISA is insufficient to detect very low levels of antibodies.

- Specificity:

	IFA	ELISA	WB
POSITIVE	0	0	0
NEGATIVE	30	30	30

Table 3: 30 sera from healthy living adult patients in a non-endemic area were tested in parallel with the immunoblot, ELISA and IFA in an independent laboratory: the specificity of the three techniques was 100%. *NB: False-positive reactions are frequently found, regardless of the technique, in patients suffering from trypanosomiasis (T. cruzi).*

- 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

- Aoun, Olivier, Charles Mary, Cédric Roqueplo, Jean-Lou Marié, Olivier Terrier, Aurélie Levieuge, et Bernard Davoust. 2009. « Canine Leishmaniasis in South-East of France: Screening of Leishmania Infantum Antibodies (western Blotting, ELISA) and Parasitaemia Levels by PCR Quantification ». *Veterinary Parasitology* 166 (1-2): 27-31. doi:10.1016/j.vetpar.2009.08.006.
- Biglino, A., C. Bolla, E. Concialdi, A. Trisciuglio, A. Romano, et E. Ferroglio. 2010. « Asymptomatic Leishmania Infantum Infection in an Area of Northwestern Italy (Piedmont Region) Where Such Infections Are Traditionally Nonendemic ». *Journal of Clinical Microbiology* 48 (1): 131-36. doi:10.1128/JCM.00416-09.
- Cota, Gláucia Fernandes, Marcos Roberto de Sousa, Fábio Nogueira Demarqui, et Ana Rabello. 2012.

- « The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (5): e1665. doi:10.1371/journal.pntd.0001665.
- Deniau, M., C. Cañavate, F. Faraut-Gambarelli, et P. Marty. 2003. « The Biological Diagnosis of Leishmaniasis in HIV-Infected Patients ». *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 97 (Supplement-1): 115-33. doi:10.1179/000349803225002598.
- Ferroglio, E., E. Centaro, W. Mignone, et A. Trisciuglio. 2007. « Evaluation of an ELISA Rapid Device for the Serological Diagnosis of *Leishmania infantum* Infection in Dog as Compared with Immunofluorescence Assay and Western Blot ». *Veterinary Parasitology* 144 (1-2): 162-66. doi:10.1016/j.vetpar.2006.09.017.
- Kallel, K, L Ammari, E Kaouech, S Belhadj, S Anane, B Kilani, et E Chaker. 2007. « [Asymptomatic bearing of *Leishmania infantum* among Tunisian HIV infected patients] ». *Pathologie-biologie* 55 (10): 521-24. doi:10.1016/j.patbio.2007.07.017.
- Lachaud, L., J. P. Dedet, P. Marty, F. Faraut, P. Buffet, J. P. Gangneux, C. Ravel, P. Bastien, et Working Group for the Notification of Human Leishmanioses in France. 2013. « Surveillance of Leishmaniasis in France, 1999 to 2012 ». *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 18 (29): 20534.
- Marty, P., A. Lelievre, J. F. Quaranta, A. Rahal, M. Gari-Toussaint, et Y. Le Fichoux. 1994. « Use of the Leishmanin Skin Test and Western Blot Analysis for Epidemiological Studies in Visceral Leishmaniasis Areas: Experience in a Highly Endemic Focus in Alpes-Maritimes (France) ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88 (6): 658-59.
- Marty, P., A. Lelièvre, J. F. Quaranta, I. Suffia, M. Eulalio, M. Gari-Toussaint, Y. Le Fichoux, et J. Kubar. 1995. « Detection by Western Blot of Four Antigens Characterizing Acute Clinical Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89 (6): 690-91.
- Mary, C., D. Lamouroux, S. Dunan, et M. Quilici. 1992. « Western Blot Analysis of Antibodies to *Leishmania infantum* Antigens: Potential of the 14-kD and 16-kD Antigens for Diagnosis and Epidemiologic Purposes ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47 (6): 764-71.
- Pomares, Christelle, Laura Despierres, Pascal del Giudice, Pascal Delaunay, Grégory Michel, Bernard Ferrua, et Pierre Marty. 2012. « Western Blot Analysis as an Aid for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania major* ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106 (7): 452-54. doi:10.1016/j.trstmh.2012.03.001.
- Ready, Paul. 2014. « Epidemiology of Visceral Leishmaniasis ». *Clinical Epidemiology*, mai, 147. doi:10.2147/CLEP.S44267.
- Saghrouni, F, I Khammari, N Kaabia, J Bouguila, J Ben Abdeljelil, A Fathallah, F Amri, et M Ben Saïd. 2011. « Asymptomatic carriage of *Leishmania* in family members of patients with visceral leishmaniasis in Central Tunisia ». *Pathologie-biologie*, décembre. doi:10.1016/j.patbio.2011.11.001.
- Solano-Gallego, Laia, Guadalupe Miró, Alek Koutinas, Luis Cardoso, Maria Grazia Pennisi, Luis Ferrer, Patrick Bourdeau, Gaetano Oliva, Gad Baneth, et null The LeishVet Group. 2011. « LeishVet Guidelines for the Practical Management of Canine Leishmaniosis ». *Parasites & Vectors* 4: 86. doi:10.1186/1756-3305-4-86.
- Van Griensven, J., E. Carrillo, R. López-Vélez, L. Lynen, et J. Moreno. 2014. « Leishmaniasis in Immunosuppressed Individuals ». *Clinical Microbiology and Infection* 20 (4): 286-99. doi:10.1111/1469-0691.12556.