

PEO**CE**

Western Blot IgG

Test immunoblot de diagnostic *in vitro*
Technique manuelle / semi-automatisable

Immunoblot assay for *in vitro* diagnostic use
Semi-automated / manual technique

#PEO-WB24G: 24 tests

#PEO-WB12G: 12 tests

#PEO-WB96G: 96 tests

NOTICE D'UTILISATION

INSTRUCTIONS FOR USE - page 9

Retrouvez plus d'informations et les notices traduites dans votre langue
sur notre site internet www.ldbiodiagnostics.com

Find more information and IFU in your language on our website www.ldbiodiagnostics.com



INDICATION DU TEST

PEO Western Blot (WB) IgG est un test qualitatif à usage unique de diagnostic sérologique IgG par immunoblot de la maladie des éleveurs d'oiseaux (alvéolite allergique extrinsèque (AAE) à antigènes aviaires) 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 lait de jabot de pigeon, après séparation électrophorétique ont été fixés par électro-transfert à la surface d'une feuille de nitrocellulose (appelée le transfert) qui est ensuite 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

Par défaut : conditionnement 24 tests (#PEO-WB24G)

Italique : conditionnement 12 tests (#PEO-WB12G) – **Gras** : conditionnement 96 tests (#PEO-WB96G)

ID	Qté	Description	Composition
R1	1	Pochette(s) de 24 (<i>12</i> , 4x24) 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</i> , 125) mL de DILUANT ECHANTILLON (Prêt à l'emploi - solution rose).	Tampon + surfactant.
R3	1	Flacon(s) de 30 (<i>30</i> , 2x60) 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</i> , 125) mL de SUBSTRAT (Prêt à l'emploi - flacon opaque marron).	Tampon + NBT + BCIP + stabilisants.
R6	1	Flacon de 60 (<i>60</i> , 250) mL de TAMPON DE LAVAGE CONCENTRE 10X (A diluer 10 fois dans de l'eau distillée - solution incolore).	Tampon + surfactant.
R10	1	Tube de 100 (<i>100</i> , 2x100) µL de SERUM DE CONTROLE POSITIF (prêt à l'emploi).	Tampon + pool de sérums humains positif en sérologie PEO + NaN ₃ (inf. 0,1%) + stabilisants.

R2, R3, R5 et R6 sont communs à tous les kits LDBIO Diagnostics 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.**

gamme immunoblots LDBIO Diagnostics) pour limiter le nombre de flacons entamés et pour assurer un meilleur contrôle de qualité.

R3, et R10 (NaN₃) : EUH 032 - Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.

EUH 210 Fiche de données de sécurité disponible sur demande ainsi que sur notre site internet www.ldbiodiagnostics.com

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Une cuve d'incubation multicanaux en polypropylène adaptées aux miniblots (#WBPP-08 ou équivalent).
- Un agitateur oscillant pour immunoblots, un système d'aspiration pour les liquides (les cuves LDBIO #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 10µL, 1,2mL et 2mL).
- Eau distillée ou désionisée. Papier absorbant (ex : papier filtre Whatman), ruban adhésif transparent.
- Gants, 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°C et 8°C. Les réactifs du coffret sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le couvercle de la boîte et sur les étiquettes des flacons, en l'absence de contamination. Ne pas utiliser de réactif contaminé ou trouble. Le tampon de lavage dilué 1/10 est stable pendant 2 mois à +2-8°C et pendant une semaine à température ambiante.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Sécurité

- Pour usage *in vitro* exclusivement. Pour usage professionnel uniquement. Réservé à un personnel formé à la technique. 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 de protection, 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 une inactivation concernant les virus HIV 1 et 2, hépatite B et hépatite C. 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.
- Tout incident grave doit faire l'objet d'une déclaration auprès du fabricant et de l'autorité compétente.

Précautions

- Lire et interpréter les résultats sous une lumière blanche et directe.
- Il est préférable d'utiliser tous les réactifs d'un même lot. En cas d'utilisation de lots différents, en assurer la traçabilité..
- 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 de mousse/bulles dans les cônes de pipette (contamination bactérienne des réactifs).
- Ne jamais nettoyer les cuves d'incubation à la javel ou au détergent. Utiliser seulement de l'eau distillée ou déionisée.
- L'omission de distribution d'un échantillon ou la distribution d'un volume inapproprié peut faire considérer comme négatif ou positif 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 plus d'une semaine, les congeler à -20 ± 5°C. Ne pas utiliser d'échantillon contaminé. Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois.

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.

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 déionisée. Attention à bien mélanger le tampon dilué.

MODE OPÉRATOIRE

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

1. Etablir soigneusement 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. Il n'est pas possible d'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 1,2 mL 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 à la surface du tampon pendant environ 2 minutes, numéro visible vers le haut PUIS agiter doucement la cuve afin de 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 90 minutes ± 5 minutes à 20-26 °C.
6. Lavage : vider le contenu des puits à l'aide d'une pipette pasteur ou par retournement de la cuve d'incubation. Répartir 2 à 3 mL de tampon de lavage dilué dans chacun d'eux et incuber 3 minutes sur l'agitateur. Répéter 2 fois, puis vider le contenu des puits. Faire attention à ce que les bandelettes ne se retournent pas dans leurs puits au cours de ces opérations.
7. Distribuer 1,2 mL de conjugué anti-IgG (R3) dans chacun des puits. Placer la cuve sur l'agitateur oscillant.
Incubation 60 minutes ± 5 minutes à 20-26 °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 60 minutes** ± 5 minutes à 20-26 °C.

Quel que 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 ou déionisée 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 bleus. Pour cela, 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 distantes (ex : n°2 avec n°15). **Il est dangereux** (faux résultats) de vouloir comparer des bandelettes de kits différents (numéros de série de bandelettes différents).

CONTRÔLE QUALITÉ ET INTERPRÉTATION

Le sérum de contrôle (contrôle positif R10) fourni avec le coffret doit systématiquement être inclus dans toute série d'immunoblots. Il présente le profil type permettant : (1) de valider techniquement le bon déroulement du test (les bandes doivent apparaître très nettement sur la bandelette); (2) et d'étalonner précisément la position et l'aspect des bandes spécifiques nécessaires à l'interprétation des résultats de bandelettes issues d'un même transfert (même numéro de série).

Nota Bene : Le profil du contrôle positif R10 peut être variable en fonction des lots de réactifs utilisés. Les images correspondantes sont disponibles sur notre site internet www.ldbiodiagnostics.com à titre d'exemple.

Description des bandes

Un échantillon positif peut présenter de nombreuses bandes situées entre 25 et 200 kilodaltons (kDa). Plusieurs d'entre elles ont été retenues pour leur spécificité, leur sensibilité et leur facilité de lecture :

- une bande large à 25 kDa : **P25**
- un ensemble de bandes entre 40 et 80 kDa comprenant notamment un doublet à 40 kDa et une bande large à 80 kDa : **P40-80**
- une bande large à 120 kDa : **P120**.

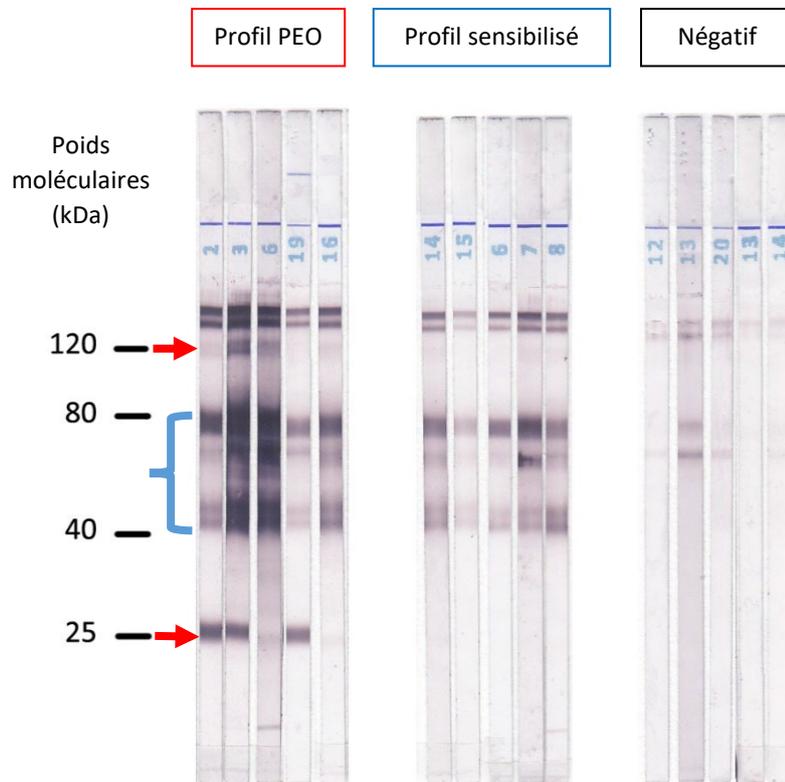


Fig. 1 : Exemples de résultats : profils PEO, profils sensibilisés et négatifs

Les profils sont donnés à titre d'exemple. **Les bandelettes comportent la lettre « L » spécifique du paramètre.**

Interprétation

- La présence **simultanée** des bandes **P40-80** **et** de la bande **P25 ou P120** est indicative du **PEO**.
- La présence **simultanée** des bandes **P40-80** est indicative d'une **sensibilisation**.

La figure ci-dessus montre plusieurs exemples des profils spécifiques retrouvés.

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

LIMITES DU TEST

- Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne peut pas être établi sur la base du résultat d'un seul test.
- Dans le but d'établir un diagnostic clinique, les résultats sérologiques doivent être interprétés en fonction des renseignements disponibles (ex : épidémiologie, clinique, imagerie, biologie...). Ils ne doivent pas faire poser le diagnostic devant leur seule positivité.

PERFORMANCES

L'évaluation a porté sur deux cohortes complémentaires de patients :

- Une cohorte prospective de 185 sérums caractérisés par une technique de dépistage automatisée dans un laboratoire de biologie spécialisée et dont les positifs ont été envoyés pour confirmation dans un laboratoire de référence de la maladie du poumon des éleveurs d'oiseaux (16 PEO, 5 sensibilisés, 164 négatifs).
- Une cohorte complémentaire de 63 sérums caractérisées issue de l'activité du même laboratoire de référence (38 PEO, 10 sensibilisés, 15 négatifs).

L'évaluation a eu pour but de déterminer les performances du WB sur les patients PEO et sa capacité à discriminer les PEO des autres patients. Les intervalles de confiance sont calculés selon la méthode de Wilson avec correction de la continuité.

<i>Patients</i>	Profils PEO WB IgG N=248		
	PEO	Sensibilisé	Neg
<i>PEO</i> <i>N=54</i>	45	7	2
<i>Sensibilisé</i> <i>N=15</i>	2	2	11
<i>Négatif</i> <i>N=179</i>	15	23	141

La présence des bandes P40-80 (profil PEO + profil sensibilisé) a permis la détection de 56/69 échantillons positifs dont 52/54 PEO, tout en étant négatif pour 141/179 échantillons négatifs. La sensibilité du PEO WB IgG est donc de 81,2% (IC95 [69,6-89,2%]) pour l'ensemble des positifs et de 96,3% (IC95 [86,1-99,4%]) pour les patients PEO. Sa spécificité est de 78,8% (IC95 [71,9-84,4%]).

Le profil PEO a permis l'identification correcte de 45/54 patients PEO, tout en permettant d'exclure 177/194 des autres échantillons. La sensibilité du PEO WB IgG est donc de 83,3% (IC95 [70,2-91,6%]) et sa spécificité de 91,2% (IC95 [86,1-94,7%]).

Ces performances permettent d'utiliser PEO WB IgG en test de seconde intention, pour la confirmation des cas suspect de PEO.

Reproductibilité

Les 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.

RÉSOLUTION DE PROBLÈMES

"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 partiellement précipiter (flocons noirs) dans le tampon en fin de révélation. Ce phénomène n'altère en rien la qualité de la révélation qui doit être poursuivie normalement. Le lavage final à l'eau distillée élimine les particules solides éventuellement présentes.

BIBLIOGRAPHIE : page 16

NOTIFICATION DE CHANGEMENT DE VERSION – A lire attentivement

DATE DE VERSION	VERSION	RÉSUMÉ DE LA MODIFICATION
13/05/2022	Vs 01	Conception
10/08/2022	Vs02	R6 sans NaN3. Bandelette identifiée par lettre A. Possibilité d'utilisation de réactifs de lots différents
30/11/2022	Vs03	Nouvelle adresse
16/06/2023	Vs04	Correction: identification bandelette par lettre L.



PEO Western Blot IgG

Bird Breeder's lung Disease WB IgG

INTENDED USE

PEO Western Blot (WB) IgG is a single use qualitative test of serological IgG diagnosis by Immunoblot Assay of the bird-breeder's lung disease (BBD), extrinsic allergic alveolitis (EAA) with avian antigens, intended for confirmatory testing of a positive or equivocal result obtained through classic screening tests.

PRINCIPLE OF THE TEST

Western Blot technique

The squab crop milk antigens, 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 specimen to be tested is separately incubated with a strip. The specific antibodies potentially present in the sample selectively bind themselves onto the antigens. The alkaline phosphatase-anti human IgG conjugate then binds itself to the bound antibodies. Finally, the immunocomplexes react with the substrate. The antigens recognized by the specific antibodies of type IgG present in the samples are revealed as purple transversal bands.

REAGENTS SUPPLIED

Default: package of 24 tests (#PEO-WB24G)

Italic: package of 12 tests (#PEO-WB12G) – Bold: package of 96 tests (#PEO-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.
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.
R10	1	Tube of 100 (<i>100, 2x100</i>) µL of POSITIVE CONTROL SERUM (Ready to use).	Buffer + pool of human sera positive in BBD 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 Diagnostics immunoblot range) to limit the number of vials opened and to ensure better quality control.**

R3, R10 (NaN₃): EUH 032 - Contact with acids liberates very toxic gas.

EUH 210 Safety data sheet available on request as well as on our website www.ldbiodiagnostics.com

ADDITIONAL MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- One multi-channel polypropylene incubation trays for mini-blots (# WBPP-08 or equivalent).
- One rocking platform for immunoblots, one 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 10 µL, 1.2 mL and 2 mL).
- Distilled or deionised water. Absorbent paper (e.g., Whatman filter paper), transparent adhesive tape.
- 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. Do not use contaminated or cloudy reagent. 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. For professional use only. Only for technically trained personnel. 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.
- The positive control is a serum of human origin that has been inactivated for HIV 1 and 2, hepatitis B and hepatitis C viruses. 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.
- Any serious incident must be the subject of a declaration to the manufacturer and the competent authority.

Precautions

- Read and interpret the results under direct white light.
- It is preferable to use all reagents from the same batch. If different batches are used, ensure traceability.
- 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 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 or positive, regardless of its actual status.

SPECIMEN COLLECTION

Aseptically collect the samples in dry tubes. A minimum of 10 µL of serum are required.

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

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.

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. Be careful to mix the diluted buffer well.

TEST PROCEDURE

Nota Bene: It is recommended to perform multiparameter testing (see the LDBIO Diagnostics 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 at the surface of the buffer for approximately 2 minutes, with the number visible at the top, THEN gently shake 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 minutes ± 5 minutes at 20-26 °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 minutes. 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 minutes ± 5 minutes at 20-26 °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 minutes ± 5 minutes at 20-26 °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 or deionised 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 blue 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).

Nota Bene: The positive control (R10) profile may vary according to the lot number of the reagents used. Corresponding images are available on our website www.ldbiodiagnostics.com as an example.

Description of the bands

A positive sample may show many bands between 25 and 200 kilodaltons (kDa). Several of them have been selected for their specificity, sensitivity and ease of reading:

- A broad band at 25 kDa: **P25**
- A set of bands between 40 and 80 kDa including a double band at 40kDa and a wide band at 80kDa: **P40-80**
- A wide band at 120 kDa: **P120**.

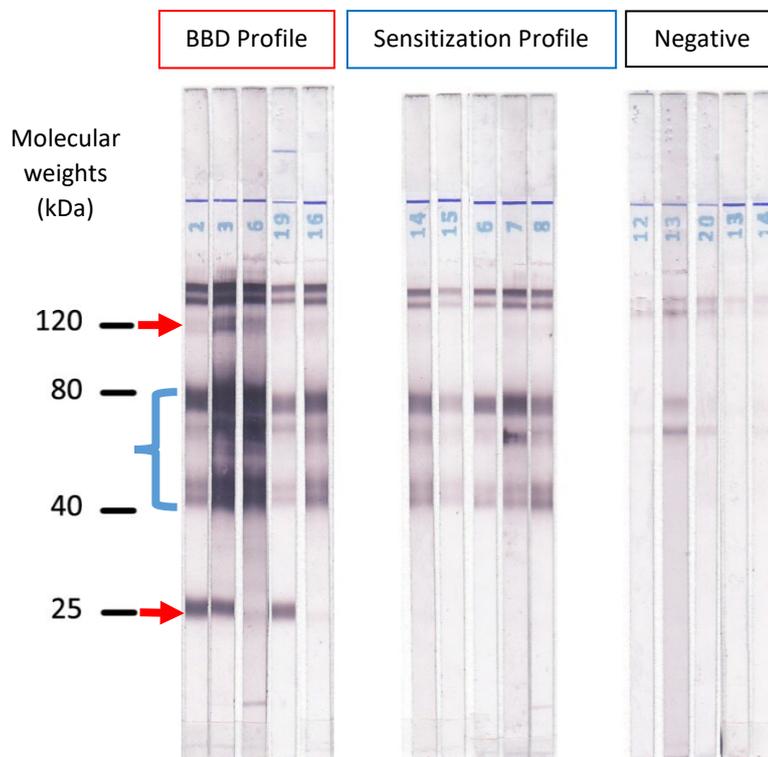


Fig. 1: Examples of BBD profiles, sensitization profiles and negative

The profiles are given as examples. **The strips are marked with the letter "L" specific to the parameter.**

Interpretation

- The simultaneous presence of the bands **P40-80** and **P25** or **P120** is indicative of bird-breeder's lung disease.
- The simultaneous presence of the bands **P40-80** is indicative of **sensitization**.

The figure 1 shows 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.

LIMITATION OF USE

- The diagnosis of an infectious disease cannot be established on the basis of a single test result.
- Serological results must be interpreted according to available information (e.g., epidemiology, clinical, imaging, biology...) in order to establish a diagnosis. They should not be used to make a diagnosis based on their positivity alone.

PERFORMANCES

The evaluation included two complementary cohorts of patients:

- A prospective cohort of 185 sera characterized by an automated screening technique in a specialized biology laboratory and whose positives were sent for confirmation to a bird-breeder's disease EAA diagnosis reference laboratory (16 BBD, 5 sensitized, 164 negative).

- A complementary cohort of characterized sera from the same reference laboratory of 63 sera (38 BBD, 10 sensitized, 15 negative).

The purpose of the evaluation was to determine the performance of the WB on BBD patients and its ability to discriminate BBD from other patients. Confidence intervals are calculated using Wilson's method with continuity correction.

<i>Patients</i>	Profiles of PEO WB IgG N=248		
	BBD	Sensitized	Neg
<i>BBD</i> <i>N=54</i>	45	7	2
<i>Sensitized</i> <i>N=15</i>	2	2	11
<i>Negative</i> <i>N=179</i>	15	23	141

The presence of the P40-80 bands (BBD profile + sensitized profile) allowed the detection of 56/69 positive samples including 52/54 EAA, while being negative for 141/179 negative samples. Its sensitivity is therefore 81.2% (CI95 [69.6-89.2%]) for all positives and 96.3% (CI95 [86.1-99.4%]) for BBD patients. Its specificity was 78.8% (CI95 [71.9-84.4%]).

The BBD profile allowed the correct identification of 45/54 BBD patients, while allowing the exclusion of 177/194 of the other samples. Its sensitivity was therefore 83.3% (CI95 [70.2-91.6%]) and its specificity 91.2% (CI95 [86.1-94.7%]).

These performances allow the use of PEO WB IgG as a second-line test for the confirmation of suspected bird-breeder's disease BBD cases.

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.

TROUBLESHOOTING

"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.

BIBLIOGRAPHIE/BIBLIOGRAPHY

- Goudswaard J, Noordzij A, Stam JW. Pigeon IgA: a major antigen in pigeon breeder's disease. *Immunol Commun.* 1978;7(6):661–8.
- McSharry C, Anderson K, Boyd G. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* 2000 Sep;30(9):1221–9.
- Chan AL, Juarez MM, Leslie KO, Ismail HA, Albertson TE. Bird fancier's lung: a state-of-the-art review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012 Aug;43(1-2):69–83.
- Nademi Z, Todryk S, Baldwin C. Characteristics of antibody responses in Pigeon Fanciers' Lung. *Mol Immunol.* 2013 Jun;54(2):227–32.
- Ohtani Y, Hisauchi K, Sumi Y, Miyashita Y, Sawada M, Miyake S, et al. Sequential changes in bronchoalveolar lavage cells and cytokines in a patient progressing from acute to chronic bird Fancier's lung disease. *Intern Med Tokyo Jpn.* 1999 Nov;38(11):896–9.
- Toubas D, Aubert D, Villena I, Foudrinier F, Chemla C, Pinon JM. Use of co-immunoelectrodiffusion to detect presumed disease-associated precipitating antibodies, and time-course value of specific isotypes in bird-breeder's disease. *J Immunol Methods.* 2003 Jan 15;272(1-2):135–45.
- Lacasse Y, Girard M, Cormier Y. Recent advances in hypersensitivity pneumonitis. *Chest.* 2012 Jul;142(1):208–17.

UPDATE NOTIFICATION – Please read carefully

RELEASE DATE	VERSION	MODIFICATION SUMMARY
13/05/2022	Vs 01	conception
10/08/2022	Vs 02	R6 without NaN3. Strip identified by letter A. Possible use of reagents from different batches
30/11/2022	Vs03	New address
16/06/2023	Vs04	Correction: Strip identified by letter L.



NF EN ISO 13485

24 Av. Joannes MASSET – 69009 LYON – FRANCE
 Tel : +33(0)4 7883 3487 – Fax : +33(0)4 7883 3430
www.ldbiodiagnostics.com – info@ldbiodiag.com