

WITNESS Leishmania

GÉNÉRALITÉS

La leishmaniose canine est une zoonose parasitaire endémique due à un protozoaire du genre *Leishmania*. C'est une maladie commune au chien et à l'homme provoquée par un parasite microscopique qui se développe dans les globules blancs des sujets parasités.

La transmission de cette affection est due à un insecte piqueur appelé phlébotome. Le phlébotome est un petit insecte de 2 à 4 mm de long qui vit principalement dans les régions de collines. Il s'active dès le crépuscule et pratiquement toute la nuit dès la fin du printemps jusqu'au milieu de l'automne. Suivant la climatologie locale, cette activité peut débuter plus tôt et finir plus tard. La femelle (elle seule pique) recherche, pour se nourrir un animal à sang chaud. On ne sait pas pour quelle raison, mais elle est très attirée par le chien qu'elle pique plusieurs fois au niveau du museau et de la face interne de l'oreille.

PRINCIPE DU TEST

Le test WITNESS *Leishmania* est un test de réalisation simple, fondé sur une technique d'immunomigration rapide (*Rapid Immunomigration, RIM*).

L'échantillon à tester contenant les anticorps anti-*Leishmania* (sang total, sérum ou plasma) est mis en contact avec des particules d'or colloïdal sensibilisées. Le complexe ainsi formé migre sur une membrane avant d'être capturé sur une zone réactive, au niveau de laquelle sa concentration provoque la formation d'une bande de couleur rose clairement visible. Une bande de contrôle, située à l'extrémité de la membrane, permet de s'assurer que le test a été réalisé correctement.

ECHANTILLONS

- Le test peut être réalisé sur du sang total, du sérum ou du plasma. Pour le sang total, l'échantillon doit être prélevé sur anticoagulant (citrate ou héparine).
- Les échantillons doivent toujours être prélevés avec une seringue et une aiguille stériles.
- L'hémolyse n'interfère pas significativement avec le test, bien qu'un échantillon fortement hémolysé puisse être à l'origine d'un bruit de fond (hémoglobine) pouvant gêner la lecture en cas de réaction faiblement positive.

Conservation des échantillons

Les échantillons doivent être testés de préférence immédiatement après le prélèvement, mais pas plus de 4 heures après s'ils sont conservés à température ambiante. Si l'analyse est repoussée (jusqu'à 2 jours), l'échantillon devra être conservé réfrigéré entre +2 et 8°C. Pour une conservation prolongée, il sera conseillé de congeler l'échantillon (plasma ou sérum seulement) à -20°C.

CONTENU DU KIT

- A. 10 sachets, contenant chacun une plaquette test et un sachet déshydratant.
- B. Un flacon compte-gouttes de solution tampon (2 ml).
- C. Une notice d'emploi.
- D. 1 sachet de 25 embouts de pipette.

Remarque :

Pour des raisons de contrôle de qualité, la bandelette réactive présente deux bandes jaunes à l'ouverture du sachet. Celles-ci n'interfèrent pas avec le résultat du test et seront éliminées lors de la migration de l'échantillon.

PRÉCAUTIONS

1. Ne pas utiliser de réactifs après la date de péremption.
2. Conserver le kit entre 2°C et 25°C. Ne pas congeler.
3. Utiliser le test rapidement après ouverture (dans les 10 minutes après ouverture du sachet).
4. Éviter de toucher ou d'endommager les membranes réactives (puits échantillon (1) et fenêtre de lecture (2), (3)).
5. Placer la plaquette WITNESS sur une surface plane et horizontale pour permettre une migration correcte de l'échantillon.
6. Utiliser un embout de pipette différent pour chaque échantillon.
7. Tenir la pipette et le flacon de solution tampon verticalement lors de la distribution des échantillons et du réactif.
8. Manipuler les prélèvements et le matériel d'analyse comme susceptibles de transmettre la *Leishmaniose*.
9. Pour usage vétérinaire uniquement.

ANWENDUNG DES TESTS - AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

1. Auftragen der Proben

- Öffnen Sie einen Beutel und legen Sie die Testplatte auf eine horizontale Unterlage.
- Mit der gelieferten Pipette wird 2 x 5 µl (oder 1 x 10 µl) der Probe senkrecht in die Probenvertiefung pipettiert (1).

2. Auftragen der Pufferlösung

- Überprüfen Sie, ob die Probe in die Membran eingebracht ist.
- Entfernen Sie den Deckel der Pufferlösungsflasche, halten Sie sie senkrecht und pipettieren Sie drei Tropfen in die Probenvertiefung (1).
- Lassen Sie die Testplatte flach liegen bis zur Diffusion des Proben/Reagenzienkomplexes durch das Auswertefenster.

3. Ablesen der Reaktion

- Nach 10 Minuten stellt man fest, ob in dem Auswertefenster (2) und dem Kontrollfenster (3) rosafarbene Banden vorhanden sind.

Hinweis :

- *Falls schon vor Ablauf der 10minütigen Inkubationszeit eine rosafarbene Bande sowohl in dem Auswertefenster (2) als auch im Kontrollfenster (3) deutlich zu sehen ist, kann der Test vorzeitig beendet werden.*
- *Eine deutlich rosafarbene Bande im Kontrollfenster (3) heißt jedoch nicht, dass der Test schon fertig ist, denn schwach positive Proben können später als die Kontrolle zur Ausbildung einer Bande im Auswertefenster führen.*

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

1. Validierung des Tests

- Der Test ist gültig, sofern eine rosafarbene Bande im Kontrollfenster (3) zu sehen ist.

2. Testinterpretation

- Keine Bande im Auswertefenster (2) und eine Bande im Kontrollfenster (3) : Die Probe enthält keine *Leishmania*-Antikörper.
- Eine Bande im Auswertefenster (2) und eine Bande im Kontrollfenster (3) : Die Probe enthält *Leishmania*-Antikörper.

Hinweis :

- Keine Bande im Kontrollfenster (3) : Der Test ist ungültig.
- Das Testergebnis sollte stets im Zusammenhang mit dem anamnestischen und klinischen Kontext beurteilt werden.
- Alle Ergebnisse, die mit Vollblut erzielt wurden und nicht mit dem klinischen Bild übereinstimmen, sollten mit einer Plasma- oder Serumprobe wiederholt werden.
- Alle zweifelhaften Resultate sollten nach 6 bis 8 Wochen wiederholt werden.

Lagerung

Die Blutproben sollten kurz nach Entnahme (maximal 4 Stunden) getestet werden, falls sie bei Raumtemperatur gelagert werden. Proben, die nicht sofort getestet werden, sollten bei +2°C bis 8°C maximal 2 Tage aufbewahrt werden. Wenn Serum oder Plasma länger aufbewahrt werden, so ist es bei -20°C zu lagern.

ZUSAMMENSETZUNG

Packung enthält:

- A. 10 einzeln verpackte Testplatten und Trocknungsmittel
- B. 1 Tropfflasche mit 2 ml Pufferlösung
- C. Gebrauchsinformation
- D. 25 Pipettenspitzen

Hinweis:

Zum Zwecke der Qualitätskontrolle sind die Reaktionslinien gelb gefärbt. Diese Färbung hat keinen Einfluß auf das Testergebnis.

ANWENDUNGSHINWEISE

1. Nach Ablauf des Verfalldatums nicht mehr verwenden.
2. Bei 2°C bis 25°C lagern. Nicht gefrieren lassen.
3. Den Test möglichst schnell nach dem Öffnen der eingeschweißten Testplatte verwenden (innerhalb 10 Minuten).
4. Die Fenster (1), (2) und (3) der Membran nicht berühren oder beschädigen.
5. Während der Testdurchführung soll die Testplatte des WITNESS-Tests horizontal auf einer ebenen Fläche liegen.
6. Für jede Probe muß eine separate Pipettenspitze verwendet werden.
7. Pipette und Pufferlösungsflasche beim Auftragen der Proben senkrecht halten.
8. Behandeln Sie alle Proben so, als könnten sie *Leishmaniose* übertragen.
9. Für veterinärgebrauch nur.

REALISATION DU TEST ET RESULTATS

1. Répartition de l'échantillon

- Ouvrir un sachet, en retirer la plaquette test et placer celle-ci sur une surface plane.
- Prélever l'échantillon grâce à la pipette fournie et, tout en tenant celle-ci bien verticalement, en répartir 2 fois 5 µl (ou 1 fois 10 µl) dans le puits échantillon (1).

2. Répartition de la solution tampon

- Après s'être assuré que l'échantillon a bien pénétré dans la membrane.
- Oter le bouchon du flacon de solution tampon et, tout en tenant celui-ci bien verticalement, répartir quatre gouttes de la solution dans le puits échantillon (1). Laisser la membrane s'imprégner entre chaque goutte.
- Laisser ensuite la plaquette test bien à plat durant tout le temps de la migration du complexe échantillon / réactif sur la bandelette.

3. Lecture du test

- Observer au bout de 10 minutes, la présence ou non de bandes de couleur rose dans les fenêtres (2) et (3).

Remarques :

- *Il est possible de conclure la lecture du test avant 10 minutes si deux bandes de couleur rose (correspondant respectivement à la bande test (2) et à la bande témoin (3)) sont nettement apparues ;*
- *En revanche, la seule apparition d'une bande au niveau du repère (3) ne permet pas de conclure le test tant que les 10 minutes nécessaires à son développement complet ne se sont pas écoulées. En effet, cette bande de contrôle peut apparaître plus précocement que la bande résultat (2), notamment dans le cas d'échantillons faiblement positifs.*

RÉSULTATS

1. Validation

- Le test est validé si une bande est présente dans la fenêtre de lecture au niveau du repère correspondant (3).

2. Interprétation

- Absence d'une bande de couleur rose au niveau du repère 2 et apparition d'une bande au niveau du repère 3 : négatif en anticorps anti-*Leishmania*.
- Présence d'une bande de couleur rose au niveau du repère 2 et apparition d'une bande au niveau du repère 3 : positif en anticorps anti-*Leishmania*.

Attention :

- L'absence d'une bande de couleur rose au niveau du repère (3) rend le test invalide.
- L'interprétation de tout test de diagnostic doit se faire en fonction du contexte clinique et épidémiologique de l'animal testé.
- Pour tout résultat sur échantillon de sang en désaccord avec l'examen clinique, retester sur plasma ou sérum.
- Tout résultat douteux devrait être retesté après 6 à 8 semaines.

WITNESS *Leishmania*

GEBRAUCHSINFORMATION

ALLGEMEINE INFORMATION

Die Leishmaniose des Hundes ist eine endemische parasitäre Zoonose, die durch ein einzelliges Geißeltierchen der Gattung *Leishmania* verursacht wird. Leishmaniose ist eine bei Mensch und Hund vorkommende Krankheit, die durch mikroskopisch kleine Parasiten verursacht wird, die sich in weißen Blutzellen vermehren.

Die Übertragung der Krankheit erfolgt durch Stechmücken der Gattung *Phlebotomus*.

Phlebotomen sind kleine Insekten mit einer Länge von 2 bis 4 mm, die in hügeligen Regionen leben. Ihre Aktivität beginnt in der Dämmerung und dauert die ganze Nacht hindurch. Sie sind von Frühlingsbeginn bis zur Herbstmitte aktiv. Abhängig von den örtlichen klimatischen Verhältnissen kann diese aktive Periode bereits früher beginnen und auch später enden.

Das Weibchen sucht sich ein warmblütiges Tier, um sich von seinem Blut zu ernähren.

Noch ist unklar, warum diese Stechmücken besonders von Hunden angezogen werden. Sie stechen mehrmals im Bereich der Schnauze und im inneren Teil der Ohren.

TESTPRINZIP

Der WITNESS *Leishmania*-Test ist ein schneller Immunmigrationstest.

Mit kolloidalem Gold markierte Partikel, die sich an Antikörper der Probe (Vollblut, Serum oder Plasma) gebunden haben, können entlang des Teststreifens diffundieren. Dieser Komplex wird dann an einer sensibilisierten Reaktionslinie gebunden. Die Akkumulation der Komplexe stellt sich in einer deutlich rosafarbenen Bande dar. Die Kontrollbande am Ende des Kontrollfensters zeigt die korrekte Ausführung des Tests an.

HINWEISE

- Als Blutprobe kann Vollblut (mit Citrat oder Heparin), Blutserum oder -plasma eingesetzt werden.
- Die Blutentnahme sollte immer mit einer sterilen Spritze und einer sterilen Nadel erfolgen.
- Hämolyse stört den Test nicht wesentlich, jedoch kann starke Färbung durch Hämolyse das Erkennen einer schwach positiven Reaktionsbande erschweren.

WITNESS Leishmania

GENERALIDADES

La Leishmaniosis Canina es una zoonosis parasitaria endémica debida a un protozoario del género *Leishmania*. Es una enfermedad común al perro y al humano provocada por un parásito microscópico que se desarrolla en los globulos blanco del sujeto parasitado.

La transmisión de esta afección es debida a un insecto llamado flebotomo. El flebotomo es un pequeño insecto de 2-4 mm de largo que vive principalmente en las colinas. Actúa a partir del crepúsculo y prácticamente toda la noche, desde el final de la primavera hasta la mitad del otoño. Según las condiciones climatológicas locales, su actividad puede empezar antes y acabar después. La hembra (ella sola pica) busca un animal de sangre caliente para alimentarse. Sin que sepamos la razón exacta, está muy atraída por el perro y le pica varias veces en la región nasal y en el pabellón auricular.

PRINCIPIO DEL TEST

El test WITNESS *Leishmania* es un test de fácil manejo, basado en una técnica de inmunomigración rápida (*Rapid Immunomigration, RIM*). Se pone en contacto la muestra (sangre total, suero o plasma) conteniendo el anticuerpo con partículas de oro coloidal sensibilizadas. El complejo formado migra por una membrana hasta ser capturado en una zona reactiva dando lugar a una banda de color rosa claramente visible. Una banda de control, situada en el extremo de la membrana, confirma que el test se ha realizado correctamente.

MUESTRAS

- El test puede realizarse sobre muestras de sangre entera con anticoagulante (citrato o heparina) o sobre muestras de suero o de plasma.
- Las muestras deben extraerse siempre con una jeringuilla y una aguja estériles.
- La hemólisis no interfiere de una manera significativa con el test, aunque una muestra muy hemolizada puede crear un ruido de fondo (hemoglobina) que podría perturbar la lectura en caso de reacción débilmente positiva.

Conservación de las muestras

Las muestras deben ser testeadas de preferencia inmediatamente después de la extracción. Si no, las muestras pueden conservarse a temperatura ambiente hasta 4 horas después de la extracción. Entre +2^o y 8°C durante 2 días. Para una conservación prolongada, se recomiendan congelar la muestra (suero y plasma solamente) a -20°C.

CONTENIDO DEL KIT

- A. 10 sobres con cada uno, una placa-test individual y desecante.
- B. Un frasco cuenta-gotas de solución tampón (2 ml).
- C. Un modo de empleo.
- D. 25 puntas de pipetas.

Nota :

Por motivos de control de calidad, en la zona reactiva aparecen dos bandas amarillas al abrir el sobre. Estas bandas no interfieren con el resultado del test y desaparecen al migrar la muestra.

PRECAUCIONES

- 1. No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad.
- 2. Conservar el kit entre 2°C y 25°C. No congelar.
- 3. Utilizar el test inmediatamente después de abrir el sobre (hasta 10 minutos después de abrir).
- 4. No tocar, ni dañar las membranas de la placa-test (pocillo de la muestra (1) y ventanas de lectura (2), (3)).
- 5. Disponer la placa-test WITNESS sobre una superficie plana y horizontal para permitir una buena migración de la muestra.
- 6. Utilizar una punta de pipeta diferente para cada muestra.
- 7. Mantener la pipeta y el frasco de solución tampón en posición vertical durante la distribución de la muestra y del tampón.
- 8. Manipular las muestras y el material de análisis como susceptibles de transmitir la *Leishmania*.
- 9. Para uso veterinario exclusivamente.

TESTPROCEDURE - RESULTATEN

1. Opbrengen van het monster

- Scheur het zakje open en plaats het testplaatje op een vlakke horizontale ondergrond.
- Breng met de pipet (goed vertikaal houden) 2 x 5 µl (of 1 x 10 µl) van het monster in het testcupje (1).

2. Toevoegen van de bufferoplossing

- Kijk na of het monster goed in het membraan gedrongen is.
- Verwijder de dop van de flacon bufferoplossing en druppel direct uit de flacon vier druppels in het testcupje (1).
- Laat het testplaatje gedurende de migratie van het monster/reagens complex op een vlakke ondergrond staan.

3. Aflezen van de test

- Lees de test na 10 minuten af en kijk of er wel of geen roze banden in de afleesramen (2) en (3) zijn verschenen.

Noot :

- *Het is mogelijk om de test binnen 10 minuten af te lezen indien duidelijk 2 roze banden (respectievelijk in (2) en (3)) zichtbaar zijn.*
- *Daarentegen, mag bij het verschijnen van slechts een roze/paarse band in raam (3), de test niet worden geïnterpreteerd voor de 10 minuten, nodig voor zijn voltooiing, verstreken zijn. Het is mogelijk dat een roze/paarse band in raam (2) later verschijnt dan de controleband in raam (3).*

RESULTATEN

1. Validatie

- De test is gevalideerd als een roze band in het "controle" afleesraam (3) aanwezig is.

2. Interpretatie

- Geen band in afleesraam (2), wel een band in afleesraam (3) : het monster is negatief voor *Leishmania* antilichamen.
- Zowel een roze band in afleesraam (2) als in afleesraam (3) : het monster is positief voor *Leishmania* antilichamen.

Noot :

- Geen band in het "controle" afleesraam (3) : geen goede test.
- Een testresultaat dient altijd geïnterpreteerd te worden in de context van de beschikbare klinische informatie en de (ziekte)geschiedenis van het geteste dier.
- Indien een resultaat afwijkt van het klinisch beeld, is het aanbevolen om opnieuw op serum of plasma te testen.
- De test dient, bij een twijfelachtig resultaat, na 6 tot 8 weken herhaald te worden.

Bewaren

Monsters dienen bij voorkeur direct na afname getest te worden en zeker niet later dan 4 uur na afname, indien zij bij kamertemperatuur bewaard zijn.

Monsters kunnen eventueel, gedurende maximaal 2 dagen, gekoeld (+2-8°C) bewaard worden. Alleen serum-en plasmamonsters kunnen, indien langere houdbaarheid gewenst is, ingevroren worden (-20°C).

INHOUD VAN DE KIT

- 10 zakjes, met ieder 1 testkit en een vochtabsorberend middel.
- 1 druppelflacon buffervloeistof (2 ml).
- Gebruiksaanwijzing.
- 25 pipettippen.

Opmerking :

Test- en controlebanden zijn geel gekleurd voor de kwaliteitscontrole. Deze kleurstof zal niet interfereren met de testresultaten en wordt tijdens de testprocedure uitgewassen.

ALGEMENE WAARSCHUWINGEN

1. Gebruik geen testbestanddelen na hun verloopdatum.
2. Bewaar de test bij 2-25°C. Niet invriezen.
3. Gebruik de test binnen 10 minuten na het openen van de zakjes.
4. Vermijd aanraken en beschadigen van de membranen (cupje (1) en afleesramen (2), (3)).
5. Het testplaatje dient tijdens het gebruik op een horizontale en vlakke ondergrond te worden geplaatst.
6. Gebruik voor ieder monster een nieuwe pipettip.
7. Houd tijdens het druppelen de pipet en de flacon met bufferoplossing goed verticaal.
8. Behandel al de monsters en het analysemateriaal als in staat *Leishmania* over te brengen.
9. Uitsluitend voor diergeneeskunding gebruik.

MODO DE EMPLEO - RESULTADOS

1. Distribución de la muestra

- Abrir un sobre, extraer la pipeta y la placa-test. Disponer la placa-test sobre una superficie plana.
- Utilizar la pipeta para depositar la muestra sobre la placa-test. Mantener la pipeta vertical y depositar 2 x 5 µl (o 1 x 10 µl) en el pocillo de la muestra (1).

2. Distribución de la solución tampón

- Asegurarse que la muestra ha penetrado en la membrana.
- Distribuir cuatro gotas de solución tampón, manteniendo el frasco en posición vertical, en el pocillo de la muestra (1).
- Mantener la placa-test sobre una superficie plana durante todo el tiempo de migración del complejo muestra/reactivo por la membrana.

3. Lectura del test

- Observar al cabo de 10 minutos la presencia o no de bandas de color rosa en las ventanas (2) y (3).

Nota :

- *La lectura del test puede realizarse en menos de 10 minutos si 2 bandas de color rosa aparecen claramente (banda rosa del test y banda rosa del control).*
- *Sin embargo, la aparición de una única banda rosa en (3) antes de los 10 minutos, no permite dar por concluido el test. Esta banda de control puede aparecer antes que la banda del test, especialmente en caso de una muestra débilmente positiva.*

RESULTADOS

1. Validación

- El test es válido si aparece una banda control en la ventana (3).

2. Interpretación

- Ausencia de banda rosa en la ventana (2) y presencia de una banda rosa en la ventana (3) : muestra negativa en anticuerpo anti-*Leishmania*.
- Presencia de una banda rosa en la ventana (2) y presencia de una banda rosa en a ventana (3) : muestra positiva en anticuerpo anti-*Leishmania*.

Cuidado :

- La ausencia de una banda rosa en la ventana (3) invalida el test.
- La interpretación de cualquier test de diagnóstico debe hacerse en función del contexto clínico y epidemiológico del animal.
- En caso de que el resultado en muestra de sangre este en desacuerdo con el examen clínico, repetir el test con suero o plasma.
- Cualquier muestra dudosa debería ser testeada de nuevo pasadas 6 a 8 semanas.

WITNESS Leishmania

ALGEMENE INFORMATIE

Leishmaniose is een endemische zoönose, die het gevolg is van een infectie met een protozoön van het genus *Leishmania*. De ziekte komt zowel bij honden als mensen voor en wordt veroorzaakt door de groei van deze microscopische parasiet in witte bloedcellen.

De overdracht van de aandoening geschiedt door de beet van de mug *Phlebotoma*, die in Europa voornamelijk in heuvelachtige gebieden rondom de Middellandse Zee voorkomt.

De *Phlebotoma* is 2 tot 4 mm groot, en is van juni tot oktober, vanaf de schemering tot diep in de nacht actief.

De vrouwelijke mug voedt zich met het bloed van warmbloedige dieren. Om een tot nu toe nog onbekende reden, wordt het mugje vooral door honden aangetrokken, die doorgaans meermaalen op de snuit en aan de binnenkant van de oren worden gestoken.

HET TESTPRINCIPE

De *Witness Leishmania* test is een eenvoudige test, gebaseerd op de snelle immunomigratie (*Rapid Immunochromatografic Migration, RIM*) technologie.

Het te testen monster (volbloed, serum of plasma) dat anti-*Leishmania* antilichamen bevat, wordt in contact gebracht met gesensibiliseerde colloïdale gouddeeltjes. Het gevormde complex migreert langs een membraan en wordt gebonden aan een gesensibiliseerde reactielijn, waar de opeenstapeling van het complex een duidelijk zichtbare roze band vormt. Aan het einde van het membraan vormt zich een controleband om te valideren of de test correct is uitgevoerd.

MONSTERS

- De test kan worden uitgevoerd met ontstold bloed (bij voorkeur citraat of heparine buis), serum of plasma.
- De monsters dienen altijd te worden afgenomen met een steriele naald en spuit.
- Hemolyse zal de uitslag van de test niet significant verstoren.
Sterk gehemolyseerd bloed zal echter het aflezen van een zwak positieve test bemoeilijken.

WITNESS Leishmania

CARATTERISTICHE

La leishmaniosi canina è una zoonosi parassitaria endemica causata da un protozoo del genere leishmania. È una malattia comune al cane e all'uomo provocata da un microscopico parassita che si sviluppa all'interno dei globuli bianchi dei soggetti infestati.

La trasmissione di questa infezione è dovuta a un insetto (Phlebotomo). Il Phlebotomo è un piccolo insetto di 2-4 mm che vive principalmente nelle zone collinari. La sua azione si concentra durante le ore notturne, dal crepuscolo per tutto il resto della notte, nel periodo che va dalla fine della primavera sino alla metà dell'autunno. Solo le femmine del Phlebotomo sono in grado di colpire ripetutamente il cane preferibilmente nella zona del viso o all'interno delle orecchie.

PRINCIPIO DEL TEST

WITNESS *Leishmania* è un test di facile realizzazione, basato su una tecnica d'immunomigrazione rapida (*Rapid Immunomigration RIM*).

Il campione da testare contenente l'anticorpo (sangue intero, siero o plasma) viene messo a contatto con delle particelle d'oro colloidale sensibilizzate. Il complesso così ottenuto migra su una membrana prima di essere catturato in una zona di reazione, dove la sua concentrazione provoca la formazione di una banda di colore rosa ben visibile. Una banda di controllo, posta all'estremità della membrana, permette di assicurare la corretta realizzazione del test.

CAMPIONI

- Il test può essere realizzato su sangue intero, siero o plasma. Per il sangue intero, il campione dev'essere prelevato su anticoagulante (citrato o eparina).
- I campioni devono essere prelevati sempre con siringa e ago sterili.
- L'emolisi non ha alcuna interferenza significativa con il test, sebbene l'emoglobina libera presente in un campione fortemente emolizzato possa disturbare la lettura in caso di reazione debolmente positiva.

Conservazione dei campioni

I campioni devono essere testati preferibilmente subito dopo il prelievo o comunque, se conservati a temperatura ambiente, entro le 4 ore successive. Se l'analisi viene rinviata (fino a 2 giorni), il campione dovrà essere conservato in frigorifero tra +2°C e 8°C. Per una conservazione prolungata, si consiglia di congelare il campione (solo plasma o siero) a - 20°C.

CONTENUTO DEL KIT

- A. 10 sacchetti contenenti ciascuno una piastrina-test e un sacchetto disidratante.
- B. Un flacone contagocce di soluzione tampone (2 ml).
- C. Un foglietto illustrativo.
- D. 25 puntali di pipetta.

N.B. :

Per motivi di controllo qualità, all'apertura del sacchetto saranno presenti due bande gialle sulla membrana di reazione. Queste non interferiscono con il risultato del test e saranno eliminate durante la migrazione del campione.

PRECAUZIONI

- 1. Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza.
- 2. Conservare il kit tra 2°C e 25°C. No congelare.
- 3. Utilizzare il test subito dopo l'apertura (entro 10 minuti dopo l'apertura del sacchetto).
- 4. Evitare di toccare o rovinare le membrane di reazione (pozzetti campione (1) e griglie di lettura (2), (3)).
- 5. Per una corretta migrazione del campione, appoggiare la piastrina WITNESS su una superficie piana e in orizzontale.
- 6. Per ogni campione, utilizzare un puntale di pipetta diverso.
- 7. Durante la ripartizione dei campioni e del reagente, tenere la pipetta e il flacone di soluzione tampone in posizione verticale.
- 8. Secondo le BPL manipolare i prelievi e il materiale diagnostico come capace di trasmettere la Leishmaniosi.
- 9. Esclusivamente per uso veterinario.

10

TEST PROCEDURE AND RESULTS

1. Sample application

- Tear open a pouch provided and place the test device on a flat horizontal surface.
- Holding the provided pipette vertically, transfer 2 time 5 µl (or once 10 µl) of sample to the sample well (1).

2. Buffer dispensing

- Check that the sample has truly penetrated the membrane.
- Remove the cap from the buffer bottle, hold it vertically and add four drops of buffer to the sample well (1).
- Leave the test device flat during migration of sample/reagent complex through the reading window.

3. Reading test

After 10 minutes, observe the presence or absence of pink bands in reading windows (2) and (3).

Note :

- *It is possible to read the test before 10 minutes if two pink bands (respectively in windows (2) and (3)) are clearly visible.*
- *The presence of only one band in reading window (3), prior to the end of the development time (10min), does not mean that the test is complete, as weak samples may appear slower than the control band.*

RESULTS

1. Validation

- Test is validated if a pink band is present in the reading window (3).

2. Interpretation

- No band in reading window (2), with one band in window (3) : sample is negative for *Leishmania* antibodies.
- One band in reading window (2), with one band in window (3) : sample is positive for *Leishmania* antibodies.

Note :

- No band in control window (3) : invalid test.
- A test result should always be interpreted in the context of all available clinical information and history for the dog being tested.
- It is recommended to re-test a whole blood sample as a serum or plasma sample, if the results do not correlate with the clinical symptoms.
- In case of doubtful results, sample should be re-tested after 6 or 8 weeks.

19

SPECIMEN INFORMATION

- The test can be performed on whole blood, serum or plasma. Whole blood samples must be anti-coagulated with citrate or heparin.
- Samples should always be collected with a sterile needle and syringe.
- Haemolysis does not significantly interfere with the test, but strongly haemolyzed samples may partly obscure (due to haemoglobin background) a weak positive result.

Storage

Sample should preferably be tested immediately after collection but not longer than 4 hours after collection, if stored at room temperature.

If testing is further delayed, samples should be refrigerated (+2°C - 8°C) for up to 2 days.

For prolonged storage, samples (serum and plasma only) should be kept frozen (-20°C).

KIT CONTENTS

- A. 10 pouches, each containing 1 test device and desiccant.
- B. 1 Buffer dropper bottle (2 ml).
- C. Instructions for use.
- D. 1 bag with 25 pipet tips.

Note :

Test and control bands are dyed yellow for quality control purposes. This dye does not interfere with the test results and will wash away while the test is developing.

GENERAL PRECAUTIONS

1. Do not use components after expiration date.
2. Store the test kit at 2°C - 25°C. Do not freeze.
3. Use the test shortly after opening the sealed pouch (within 10 minutes).
4. Avoid touching or damaging membrane at windows (1), (2), (3).
5. The WITNESS device should be placed horizontally on a flat surface while performing the test.
6. Use a new pipette tip for each sample.
7. Hold pipette and buffer bottle vertically when dispensing sample and buffer respectively.
8. Handle all samples as capable of transmitting *Leishmaniasis*.
9. For veterinary use only.

REALIZZAZIONE DEL TEST - RISULTATI

1. Ripartizione del campione

- Aprire un sacchetto, togliere la pipetta e la piastra test e appoggiarla su una superficie piana.
- Prelevare il campione con l'apposita pipetta e, sempre tenendola in posizione verticale, ripartire 2 volte 5 µl (o 1 volta 10 µl) nel pozzetto campione (1).

2. Ripartizione della soluzione tampone

- Dopo essersi assicurati che il campione sia penetrato nella membrana.
- Togliere il tappo del flacone della soluzione tampone e, sempre tenendolo in posizione verticale, ripartire quattro gocce di soluzione nel pozzetto campione (1).
- Mantenere la piastrina-test su una superficie piana durante il tempo di migrazione del complesso campione / reagente.

3. Lettura del test

- Dopo 10 minuti, osservare nelle griglie di lettura (2) e (3) la presenza o l'assenza di bande di colore rosa.

Note :

- *La lettura del test si conclude in meno di 10 minuti se compaiono 2 bande di colore rosa (che corrispondono rispettivamente al risultato test (2) e alla banda di convalida (3)).*
- *per contro, se compare solo la striscia relativa al controllo (3) non si può concludere l'analisi finché non sono trascorsi i 10 minuti richiesti per il suo completo sviluppo. Infatti, la striscia di controllo può comparire prima rispetto alla striscia test (2), soprattutto nel caso di campione leggermente positivo.*

RISULTATI

1. Convalida

- Il test è ritenuto valido se nella griglia di lettura del corrispondente riferimento (3) è presente una banda colorata.

2. Interpretazione

- Assenza di una banda di colore rosa nel riferimento (2) e presenza della sola banda di convalida (3) : RISULTATO NEGATIVO.
- Presenza di entrambe le bande ai punti 2 e 3 : RISULTATO POSITIVO.

Attenzione

- L'assenza della banda di colore rosa nel riferimento (3) non convalida il test.
- L'interpretazione dei test diagnostici deve avvenire in funzione del contesto clinico e epidemiologico dell'animale testato.
- Si raccomanda di eseguire un nuovo test su siero o su plasma per tutti quei risultati discrepanti dai sintomi clinici.
- Tutti risultati dubbi dovrebbero essere rianalizzati dopo 6-8 settimane.

WITNESS *Leishmania*

GENERAL INFORMATION

Phlebotomine sandflies vector or carry the disease agent associated with leishmaniasis. Sandflies can carry the disease agent from a variety of animals to humans. Although some forms of *Leishmania* are maintained by human populations, the majority of strains is more often associated with an animal reservoir and may not even infect humans (Bray 1974). Many forms of leishmaniasis are maintained by animal reservoirs in both the New and the Old World.

Three kinds of animal reservoirs can harbor *Leishmania* parasites (WHO Expert Committee 1990). A primary host harbors parasites and maintains the disease in the environment, acting as a stable reservoir. Because a primary host may have adapted to the parasite, the disease may not cause debilitation or illness in the host. The primary host plays the most important role in maintaining the epidemiology of the disease in animals (or humans) even if direct contact is not made. A secondary host may help maintain the parasite in the environment and bring the parasite into direct contact with animals (humans). A variety of wild and domestic animals can serve as *Leishmania* reservoirs. Rodents such as rats and gerbils as well as wild canines such as foxes are frequently implicated in outbreaks of the disease. Domestic dogs frequently harbor *L. infantum* which may be passed to humans, particularly children (Kirmse et al. 1987). Animals infected by parasites can show a variety of symptoms. Frequently, lesions develop on exposed skin (i.e., ears, nose, lips, tail) (Schlein et al. 1984). Less frequently, lesions develop on the neck or other parts of the body and result in severe depilation (Elbihart et al. 1987). Parasites can also cause problems in internal organs such as lungs, spleen, liver and kidneys (Duarte et al. 1986). Clinical signs of leishmaniasis in dogs can easily be confused with other diseases such as systemic lupus erythematosus, malignancies, and endocrine disorders (Harith et al. 1989). Some animals, however, show no obvious signs of the disease (Schlein et al. 1984 ; Who Expert Committee 1984 ; Jambou et al. 1986).

TEST PRINCIPLE

The WITNESS *Leishmania* test is a simple test, based on Rapid Immunomigration (RIM) technology. Sensitized colloidal gold particles having bound to the antibody present within the sample (whole blood, serum or plasma) are allowed to migrate along a strip. The complex is then captured on a sensitized reaction zone where its accumulation causes the formation of a clearly visible pink band. A control band, located at the end of the reading window, ensures that the test was performed correctly.

WITNESS Leishmania

GENERALIDADES

A Leishmaniose canina é uma zoonose parasitária endémica, causada por um protozoário do género *Leishmania*. É uma doença comum ao cão e ao homem causada por um parasita microscópico que se desenvolve nos glóbulos brancos dos sujeitos parasitados.

A transmissão desta afecção é devida a um insecto picador chamado flebótomo. O flebótomo é um pequeno insecto de 2 a 4 mm de comprimento que vive principalmente nas regiões montanhosas. Ele é activo desde o crepúsculo e durante praticamente toda a noite desde o fim da Primavera até ao meio do Outono. Consoante a climatologia local, esta actividade pode iniciar-se mais cedo e terminar mais tarde. A fêmea (a única que pica) procura um animal de sangue quente para se alimentar. Não se sabe por que razão, mas, ela tem uma atracção especial para o cão, onde pica por várias vezes principalmente ao nível do focinho e face interna do pavilhão auricular.

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste WITNESS *LEISHMANIA* é um teste de realização simples, baseado numa técnica de imunomigração rápida (*Rapid Immunomigration, RIM*).

A amostra a testar contendo este anticorpo (sangue total, soro ou plasma) é posto em contacto com partículas de ouro coloidal sensibilizadas.

O complexo assim formado migra sobre uma membrana antes de ser capturado sobre uma zona reactiva, ao nível da qual a sua concentração provoca a formação de uma banda de cor rosa claramente visível. Uma banda de controlo, situada na extremidade da membrana, permite assegurar que o teste foi realizado correctamente.

AMOSTRAS

- O teste pode ser realizado em sangue total, soro ou plasma. Para o sangue total, a amostra deve ser colhida com anticoagulante (citrato ou heparina).
- As amostras devem ser sempre colhidas com seringa e agulha estéreis.
- A hemólise não interfere significativamente com o teste, se bem que uma amostra fortemente hemolizada possa estar na origem de uma interferência (hemoglobina), podendo prejudicar a leitura em casos de reacção fracamente positiva.

Conservação das amostras

As amostras devem ser testadas, de preferência imediatamente após a colheita, mas não mais de 4 horas depois, se forem conservadas à temperatura ambiente. Se a análise for adiada (até dois dias), a amostra deverá ser conservada refrigerada entre +2° e 8°C. Para uma conservação mais prolongada, será aconselhável congelar a amostra (plasma ou soro somente) a -20°C.

CONTEÚDO DO KIT

- A. 10 saquetas, contendo cada uma, 1 placa teste e uma saqueta desidratante.
- B. Um frasco conta-gotas de solução tampão (2 ml).
- C. Uma literatura.
- D. 25 pontas de pipeta.

Nota:

Por razões de controlo de qualidade, a banda reactiva apresenta duas faixas amarelas à abertura da saqueta. Estas não interferem com o resultado do teste e são eliminadas quando da migração da amostra.

PRECAUÇÕES

1. Não utilizar reagentes após a data de validade.
2. Conservar o kit entre 2° e 25°C. Não congelar.
3. Utilizar o teste após a abertura (nos 10 minutos após a abertura da saqueta).
4. Evitar tocar ou danificar as membranas reactivas (janela da amostra (1) e janela de leitura (2) e (3)).
5. Colocar a placa WITNESS sobre uma superfície plana e horizontal para permitir uma migração correcta da amostra.
6. Utilizar uma ponta de pipeta diferente para cada amostra.
7. Segurar a pipeta e o frasco de solução tampão na vertical quando da distribuição das amostras e do reagente.
8. Manipular as amostras e o material de análise como susceptíveis de transmitir a *Leishmania*.
9. Apenas para uso veterinário.

REALIZAÇÃO DO TESTE - RESULTADOS

1. Repartição da amostra

- Abrir uma saqueta, retirar a pipeta e a placa teste e colocá-la sobre uma superfície plana e horizontal.
- Colher a amostra com a pipeta fornecida e, mantendo-a bem vertical, colocar 2 x 5 µl (ou 1 x 10 µl) na janela da amostra (1).

2. Repartição da solução tampão

- Depois de ter a certeza de que a amostra penetrou bem na membrana ;
- Tirar a tampa do frasco de solução tampão e, segurando-o sempre na vertical, colocar quatro gotas de solução na janela da amostra (1).
- Deixar em seguida a placa teste, sempre na horizontal, durante todo o tempo da migração do complexo amostra/reagente sobre a banda reactiva.

3. Leitura do teste

- Observar ao fim de 10 minutos a presença ou não de faixas de cor rosa nas janelas (2) e (3).

Notas

- *É possível concluir a leitura do teste antes de 10 minutos, se as duas faixas de cor rosa (correspondendo respectivamente à faixa teste (2) e à faixa testemunha (3)) aparecerem nitidamente ;*
- *Pelo contrário, o aparecimento somente de uma faixa cor de rosa ao nível da faixa (3) não permite concluir o teste antes de decorrerem os 10 minutos necessários ao seu desenvolvimento completo. Com efeito, esta faixa de controlo (3) pode aparecer corada mais precocemente que a faixa teste (2), nomeadamente no caso de amostras fracamente positivas.*

RESULTADOS

1. Validação

- O teste é validado se uma faixa cor de rosa aparecer na janela de leitura correspondente à testemu-nha (3).

2. Interpretação

- Ausência de uma faixa cor de rosa ao nível da janela (2) e aparecimento de uma faixa cor de rosa ao nível da janela (3) : negativo em anticorpos anti-*Leishmania*.
- Presença de uma faixa cor de rosa ao nível das janelas (2) e (3) : positivo em anticorpos anti-*Leishmania*.

Atenção:

- A ausência de uma faixa cor de rosa no nível da janela (3) torna o teste não válido.
- A interpretação de qualquer teste de diagnóstico deve ser feita em função do contexto clínico e epidemiológico do animal testado.
- Nos casos em que o resultado, sobre amostras de sangue total, estiver em desacordo com o exame clínico, deverá efectuar novo teste, utilizando, desta vez, soro ou plasma.
- Todos os animais com resultados duvidosos, deverão ser testados de novo, decorridas 6 a 8 semanas.