

Fluoleish™

English	1
Français	5
Español	9
Português	13
Italiano	17
Ελληνικά	21
Deutsch	25
Netherlands	29

FOR *IN VITRO* USE ONLY ENGLISH

■ BENEFIT

Canine leishmaniosis is caused by the proliferation of a flagellated protozoan parasite, *Leishmania infantum*, in the macrophages of its host. The disease is transmitted by biting insects: sand flies, which serve as both host and vector.

The clinical manifestations of canine leishmaniosis are intermittent and of variable severity. This is why laboratory tests are needed to confirm the diagnosis. Serology is considered to be the most reliable diagnostic test as it provides an indication of the animal's immune response following an infestation. Several different serological tests are available; indirect immunofluorescence is considered the gold standard: it is a highly sensitive test and provides a quantitative evaluation of the animal's antibody levels. The intensity of the immunofluorescence reaction therefore increases during the phase of clinical expression, and monitoring over the time provides an indication of the progression of the disease.

■ PRINCIPLE

Fluoleish™ slides are used to perform an indirect immunofluorescence test to detect anti-*Leishmania* antibodies in the serum or plasma of the dog.

After depositing the sample to be analysed on one well sensitised by *Leishmania infantum*, any anti-*Leishmania* antibodies present in the sample will be captured by the leishmanias bound to the slide, and subsequently revealed by a canine anti-immunoglobulin that has been labelled with fluorescein.

The detection of antibodies is a qualitative test, any positive sample can then be quantitatively titrated using a simple series of dilutions.

■ MATERIAL REQUIRED

► Reagents needed to perform a Fluoleish™ test :

- one bottle of canine anti-immunoglobulin conjugated with fluorescein,
- one positive control,
- one negative control,
- PBS (Phosphate Buffered Saline),
- Tween® 80,
- Evans blue,
- Distilled water.

► **Required apparatus:** coverslips, an assembly medium for immunofluorescence, a humid chamber at +37°C, and a fluorescence microscope in UV light.

■ NATURE OF THE SAMPLE

Sample of canine serum or plasma.

■ OPERATING PROCEDURE

The reagents should be brought to room temperature 20 minutes before the start of the analysis.

► **For each test you will need:** 1 positive control well and 1 negative control well per slide, and as many wells as there are dilutions to be tested.

DILUTIONS OF THE SAMPLE:

- 1/50 Dilution: dilute 10 µL of the serum or plasma to be tested in 490 µL of PBS.
- 1/100 dilution and above: successive dilutions of 2 in 2 in PBS.

PERFORMING THE TEST:

1/ Place the following in separate wells:

- 15 µL of positive control,
- 15 µL of negative control,
- 15 µL of each dilution of the sample.

Allow to incubate for 30 minutes at +37°C in the humid chamber.

2/ Wash the slides by immersing them in a solution of PBS with Tween® 80: 2 drops of Tween® 80 for 1 litre of PBS (1 drop = 50 µL). Leave the slides immersed in the wash solution for 5 minutes under agitation.

Perform the second wash under agitation using a fresh solution for a further 5 minutes.

Briefly rinse in a bath of distilled water. Drain. Dry.

3/ In each well, place 15 µL of canine fluorescent anti-immunoglobulin conjugate diluted in a solution of PBS with Evans blue (1 drop - around 50 µL - of a 1% solution of Evans blue in 5 mL of PBS). The dilution of the conjugate should be defined for each batch of slides, from standard samples, as a function of the microscope used and the desired intensity of fluorescence.

Allow to incubate for 30 minutes at +37°C in the humid chamber.

4/ Wash the slides by immersing them in a solution of PBS with Tween® 80.

Leave the slides immersed in the wash solution for 5 minutes under agitation.

Perform a second wash under agitation using fresh solution for a further 5 minutes.

Briefly rinse in a bath of distilled water. Drain. Dry.

5/ Place 2 to 3 drops of the immunofluorescence mount medium on the surface of the slide and cover with a coverslip.

Read under the fluorescence microscope at 40 x 10.

■ READING

Negative reaction: absence of membrane fluorescence of leishmanias, which are stained dark red and are not easy to see.

Positive reaction: the leishmanias give off marked fluorescence, predominantly at the membrane. The flagellum is also fluorescent.

Intensity of the fluorescence of the sample tested: it can be more or less intense than the positive control.

Specific cases: in the event of a doubtful positive or negative control, it is important to repeat the procedure to validate your test samples under the right conditions.

■ INTERPRETATION

The titre of the sample corresponds to the last dilution that still shows fluorescence. The threshold of positivity is determined as a function of the standards and material used.

■ RECOMMENDATIONS

•STABILITY / STORAGE:

24 months between +2°C and +8°C.

•SAMPLES:

- Use samples of plasma or serum. It is preferable to work on fresh samples to prevent any risk of contamination or degradation.
- Storage for less than 5 days: store plasma and serum in the refrigerator between +2°C and +8°C.
- Storage for several weeks: store plasma and serum in the freezer at -20°C.

•GUIDELINES AND PRECAUTIONS OF USE:

- Do not use reagents that are past their expiry date.
- **Allow the slides and reagents to come to room temperature 20 minutes before the start of the analysis.**
- It is advisable to always perform 2 dilutions (1/50 and 1/100) to correctly evaluate the degree of basal fluorescence.
- It is advisable to perform one positive and one negative control well for each slide.
- If all of the wells of a slide have not been used for a test, the slide cannot be stored for future use.
- The dilution of the conjugate should be redefined, from standard samples, for each new batch of Fluoleish™ slides, as a function of the microscope used and the desired intensity of fluorescence.

These recommendations are for guidance only; no diagnostic method is ever precise 100% of the time. As with any diagnostic test, the results of the test should be interpreted in light of the history and clinical presentation.

Bio Véto Test cannot be held responsible for the consequences of incorrect use or interpretation of the results given by this test.

USAGE *IN VITRO* UNIQUEMENT FRANÇAIS

■ INTERET

La leishmaniose canine est une maladie due à la prolifération dans les macrophages d'un protozoaire flagellé appelé *Leishmania infantum*. La transmission est assurée par un insecte piqueur : le phlébotome, qui est à la fois hôte et vecteur.

La leishmaniose canine est une maladie dont les manifestations cliniques sont inconstantes et de gravité variable. C'est la raison pour laquelle un diagnostic biologique est nécessaire lors de suspicion clinique. La sérologie est considérée comme le test diagnostic le plus fiable puisqu'elle rend compte de la réponse immunitaire de l'animal suite à une infestation. Parmi les examens sérologiques disponibles, l'immunofluorescence indirecte est souvent considérée comme la méthode de référence : c'est un examen très sensible et qui permet une quantification du taux d'anticorps de l'animal. Ainsi, l'intensité de la réaction d'immunofluorescence augmente en phase d'expression clinique, et le suivi au cours du temps permet de rendre compte de l'évolution de la maladie.

■ PRINCIPE

Les lames Fluoleish™ permettent la réalisation d'un test d'immunofluorescence indirecte pour la détection des anticorps anti-*leishmania* dans le sérum ou le plasma du chien.

Après dépôt de l'échantillon à analyser sur un puits sensibilisé par *Leishmania infantum*, les anticorps anti-*Leishmania* présents sont capturés par les leishmanies immobilisées sur la lame, puis sont ensuite révélés par une anti-immunoglobuline de chien marquée à la fluorescéine.

La détection des anticorps est qualitative, tout prélèvement positif pouvant être titré quantitativement par simple série de dilutions.

■ MATERIEL NECESSAIRE

► Réactifs nécessaires pour la réalisation d'une lame Fluoleish™ :

- un flacon d'anti-immunoglobuline de chien conjugué à de la fluorescéine,
- un contrôle positif,
- un contrôle négatif,
- PBS (Phosphate Buffered Saline),
- Tween® 80,
- Bleu d'Evans,
- eau distillée.

► **Matériel à prévoir** : des lamelles couvre-objets, un milieu de montage pour immunofluorescence, une chambre humide à +37°C et un microscope à fluorescence en lumière UV.

■ NATURE DE L'ÉCHANTILLON

Echantillon de sérum ou plasma, chez le chien.

■ PROTOCOLE OPERATOIRE

Les réactifs doivent être ramenés à température ambiante 20 minutes avant le début de l'analyse.

► **Pour un test prévoir** : 1 puits contrôle positif et 1 puits contrôle négatif par lame, et autant de puits que de dilutions à tester.

DILUTIONS DE L'ÉCHANTILLON :

- Dilution au 1/50 : diluer 10 µL de sérum ou plasma à tester dans 490 µL de PBS.
- Dilution au 1/100 et dilutions supérieures : dilutions successives de 2 en 2 dans du PBS.

RÉALISATION DU TEST :

1/ Déposer dans des puits distincts :

- 15 µL de contrôle positif,
- 15 µL de contrôle négatif,
- 15 µL de chaque dilution de l'échantillon.

Laisser incuber pendant 30 minutes à +37°C en chambre humide.

2/ Laver les lames en les immergeant dans une solution de PBS additionnée de Tween® 80 : 2 gouttes de Tween® 80 pour 1 litre de PBS (1 goutte = 50 µL).

Laisser les lames immergées dans la solution de lavage pendant 5 minutes sous agitation.

Réaliser un second lavage sous agitation à l'aide d'une nouvelle solution pendant 5 minutes.

Rincer rapidement dans un bain d'eau distillée. Egoutter. Sécher.

3/ Déposer sur chaque puits 15 μL de conjugué anti-immunoglobuline de chien fluorescent dilué dans une solution de PBS additionnée de Bleu d'Evans (1 goutte - environ 50 μL - d'une solution de bleu d'Evans à 1% dans 5mL de PBS). La dilution du conjugué doit être définie pour chaque lot de lames, à partir d'échantillons standards, en fonction du microscope utilisé et de l'intensité de fluorescence désirée.

Laisser incuber pendant 30 min à +37°C en chambre humide.

4/ Laver les lames en les immergeant dans une solution de PBS additionnée de Tween® 80.

Laisser les lames immergées dans la solution de lavage pendant 5 minutes sous agitation.

Réaliser un second lavage sous agitation à l'aide d'une nouvelle solution pendant 5 minutes.

Rincer rapidement dans un bain d'eau distillée. Egoutter. Sécher.

5/ Déposer 2 à 3 gouttes de milieu de montage pour immunofluorescence sur la surface de la lame et recouvrir d'une lamelle.

Lire au microscope à fluorescence 40 x 10.

■ LECTURE

Réaction négative : Absence de fluorescence membranaire des leishmanies, qui sont colorées en rouge sombre et sont peu visibles.

Réaction positive : Les leishmanies présentent une fluorescence nette à prédominance de fluorescence au niveau membranaire. Le flagelle est également fluorescent.

Intensité de fluorescence de l'échantillon testé : elle peut être plus ou moins intense que celle du contrôle positif.

Cas particulier : dans le cas d'un contrôle positif ou d'un contrôle négatif douteux, il est important de refaire la manipulation afin de valider dans de bonnes conditions votre échantillon testé.

■ INTERPRÉTATION

Le titre d'un échantillon correspond à la dernière dilution montrant encore une fluorescence. Le seuil de positivité est déterminé en fonction des standards et du matériel utilisé.

■ RECOMMANDATIONS

• STABILITÉ / CONSERVATION :

24 mois entre +2°C et +8°C.

• ÉCHANTILLONS :

- Utilisation d'échantillons de plasma ou de sérum. Il est préférable de travailler sur des échantillons frais pour éviter tout risque de contamination ou de dégradation.
- Conservation jusqu'à 5 jours : conserver plasma et sérum au réfrigérateur entre +2°C et +8°C.
- Conservation plusieurs semaines : conserver plasma et sérum au congélateur à -20°C.

• CONSEILS ET PRECAUTIONS D'EMPLOI :

- Ne pas utiliser de réactifs périmés.
- **Laisser les lames et les réactifs revenir à température ambiante 20 minutes avant le début de l'analyse.**
- Il est recommandé de toujours effectuer 2 dilutions (1/50 et 1/100) pour bien évaluer l'importance de la fluorescence basale.
- Il est conseillé d'effectuer un contrôle positif et un contrôle négatif sur chaque lame.
- Si tous les puits d'une lame n'ont pas été utilisés lors d'une manipulation, la lame ne peut pas être conservée pour une utilisation ultérieure.
- Pour chaque nouveau lot de lame Fluoleish™, la dilution du conjugué doit être ré-évaluée à partir d'échantillons standards, en fonction du microscope utilisé et de l'intensité de fluorescence désirée.

Ces recommandations constituent un guide, aucune méthode de diagnostic ne pouvant prétendre être précise à 100%. Comme pour tout diagnostic, l'interprétation du test doit se faire en fonction des commémoratifs et du contexte clinique.

Bio Véto Test ne peut être tenu responsable des conséquences liées à une mauvaise utilisation ou une mauvaise interprétation des résultats donnés par ce test.

USO EXCLUSIVO *IN VITRO* ESPAÑOL

■ INTERÉS CLINICO

La leishmaniosis canina es una enfermedad causada por la proliferación de un protozoo flagelado *Leishmania infantum*, en los macrófagos de su huésped. Esta enfermedad es transmitida por un pequeño díptero volador del género *Phlebotomus*, el cual es a la vez huésped y vector.

La Leishmaniosis canina es una enfermedad con síntomas clínicos inconstantes y de gravedad variable que necesita un diagnóstico biológico en caso de sospecha clínica. La serología se considera como el test diagnóstico más fiable ya que tiene en cuenta la respuesta inmunitaria del animal en caso de infestación. Entre los exámenes serológicos existentes, la inmunofluorescencia indirecta es a menudo considerada como el método de referencia: test muy sensible y que permite la cuantificación del nivel de anticuerpos del animal. Así, la intensidad de la reacción de inmunofluorescencia aumenta durante la fase de expresión clínica y el seguimiento a lo largo plazo permite darse cuenta de la evolución de la enfermedad.

■ PRINCIPIO

Las láminas portaobjetos Fluoleish™ permiten la realización de un test de inmunofluorescencia indirecta de detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en el suero o plasma de perro.

Una vez depositada la muestra a analizar en el pocillo sensibilizado con *Leishmania infantum*, los anticuerpos anti-*Leishmania* presentes en la muestra se unen a las leishmanias inmovilizadas en la lámina portaobjeto y son a continuación revelados gracias a la anti-inmunoglobulina de perro marcada con fluoresceína.

La detección de los anticuerpos es cualitativa, toda muestra positiva puede ser titulada cuantitativamente usando una serie de diluciones.

■ MATERIAL

► Reactivos necesarios para la realización de una lámina portaobjeto Fluoleish™ :

- un frasco de anticuerpos anti-inmunoglobulina de perro conjugados con fluoresceína,
- un control positivo,
- un control negativo,
- Tampón fosfato salino (PBS),
- Tween® 80,
- Azul de Evans,
- agua destilada.

► **Material a prever:** dos láminas cubreobjetos, un medio de montaje para inmunofluorescencia, una cámara húmeda a +37°C y un microscopio de fluorescencia de luz UV.

■ TIPO DE MUESTRA

Suero o plasma de perro.

■ PROTOCOLO

Los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente 20 minutos antes del principio del análisis.

► **Para un test prever:** 1 pocillo control positivo y 1 pocillo control negativo por lámina y tantos pocillos como diluciones se van a realizar.

DILUCIONES DE LA MUESTRA:

- Dilución al 1/50: diluir 10 µL de suero o plasma en 490 µL de PBS.
- Dilución al 1/100 y diluciones superiores: diluciones sucesivas de 2 en 2 de PBS.

REALIZACION DEL TEST:

1/ Depositar en pocillos distintos:

- 15 µL de control positivo,
- 15 µL de control negativo,
- 15 µL de cada dilución de la muestra.

Dejar incubar durante 30 minutos a +37°C en cámara húmeda.

2/ Lavar las láminas portaobjetos sumergiéndolas en una solución de PBS adicionada con Tween® 80: 2 gotas de Tween® por cada litro de PBS (1 gota = 50 µL).

Dejar las láminas portaobjetos sumergidas en la solución de lavado durante 5 minutos bajo agitación.

Realizar un segundo lavado bajo agitación con una nueva solución durante 5 minutos.

Aclarar rápidamente en un baño de agua destilada. Escurrir. Secar.

3/ Depositar en cada pocillo 15 μL de conjugado de anti-inmunoglobulina de perro fluorescente diluida en una solución de PBS adicionada con Azul de Evans (1 gota – aproximadamente 50 μL - de una solución de azul de Evans al 1% en 5 mL de PBS). La dilución del conjugado debe ser definida para cada lote de láminas portaobjetos, a partir de muestras estandarizadas, en función del microscopio utilizado y de la intensidad de la fluorescencia deseada.

Dejar incubar durante 30 minutos a +37°C en cámara húmeda.

4/ Lavar las láminas portaobjetos sumergiéndolas en una solución de PBS adicionada con Tween® 80.

Dejar las láminas portaobjetos sumergidas en la solución de lavado durante 5 minutos bajo agitación.

Realizar un segundo lavado bajo agitación con una nueva solución durante 5 minutos.

Aclarar rápidamente en un baño de agua destilada. Escurrir. Secar.

5/ Depositar 2 – 3 gotas de medio de montaje para inmunofluorescencia sobre la superficie de la lámina portaobjeto y colocar el cubre.

Observar al microscopio óptico de fluorescencia a 400x aumentos.

■ LECTURA

Reacción negativa: ausencia de fluorescencia de membranas de leishmanias las cuales aparecen coloreadas de rojo oscuro y son poco visibles.

Reacción positiva: las leishmanias presentan una fluorescencia nítida con predominancia de fluorescencia a nivel de la membrana. El flagelo también aparece fluorescente.

Intensidad de la fluorescencia de la muestra realizada: puede ser más o menos intensa que la del control positivo.

Caso especial: en el caso de un control positivo o negativo dudoso, es importante rehacer la manipulación, para validar en buenas condiciones su muestra analizada.

■ INTERPRETACION

La titulación de la muestra corresponde a la última dilución en la que se observa fluorescencia. El umbral de positividad se determina en función de los estándares y del material utilizado.

■ RECOMENDACIONES

•ESTABILIDAD/CONSERVACION:

24 meses entre +2°C y +8°C.

•MUESTRAS:

- Utilización de muestras de plasma o suero. Es preferible trabajar con muestras frescas para evitar todo riesgo de contaminación o degradación.
- Conservación hasta 5 días: mantener el plasma y el suero en el refrigerador entre +2°C y +8°C.
- Conservación durante varias semanas: mantener el plasma y el suero en el congelador a -20°C.

•CONSEJOS Y PRECACUCIONES:

- No utilizar reactivos caducados.
- **Dejar que las láminas portaobjetos y los reactivos alcancen la temperatura ambiente 20 minutos antes de empezar el análisis.**
- Se recomienda efectuar siempre dos diluciones (1/50 y 1/100) para poder bien evaluar la fluorescencia basal.
- Se aconseja realizar un control positivo y un control negativo de cada lámina portaobjeto.
- Si todos los pocillos de la lámina portaobjeto no han sido utilizados durante la manipulación, esta lámina no puede conservarse para una utilización posterior.
- En cada lote nuevo de láminas portaobjetos Fluoleish™ la dilución del conjugado debe ser revaluada a partir de muestras estandarizadas, en función del microscopio utilizado y de la intensidad de la fluorescencia deseada.

Estas recomendaciones son una guía, ya que ningún test es preciso al 100%. Como todo diagnóstico, la interpretación del test debe hacerse teniendo en cuenta el historial así como el contexto clínico del animal.

Bio Véto Test y sus distribuidores no se hacen responsables de las consecuencias de un mal uso del test o de una mala interpretación de los resultados obtenidos

PARA UTILIZAÇÃO EXCLUSIVA *IN VITRO* PORTUGUÊS

■ INTERESSE CLÍNICO

A Leishmaniose canina é uma protozoonose causada pela multiplicação de um parasita flagelado, a *Leishmania infantum*, nos macrófagos dos seus hospedeiros. A doença é transmitida por um díptero picador: o flebótomo, que é em simultâneo hospedeiro e vector.

A fase clínica da doença está associada a um estado de portador assintomático de vários meses a anos. A doença apresenta uma distribuição mundial associada á dos seus vectores. Na Europa, a Leishmaniose está presente em toda a Bacia Mediterrânica. As manifestações clínicas da leishmaniose canina são inconstantes e de uma gravidade varável. Por isso, os testes laboratoriais são necessários para confirmação do diagnóstico. A serologia é considerada o teste de diagnóstico mais fiável uma vez que fornece indicação sobre a resposta imunitária do animal após a infestação. Existem diversos testes serológicos disponíveis; a imunofluorescência indirecta é considerada o melhor de todos eles: é um teste altamente sensível e permite uma avaliação quantitativa dos níveis sobre os níveis de anticorpos do animal. A intensidade da reacção de imunofluorescência aumenta durante a fase de expressão clínica e a monitorização prolongada fornece indicações sobre a progressão da doença.

■ FUNDAMENTO

As lâminas Fluoleish™ são utilizadas para realizar o teste de imunofluorescência indirecta para deteção dos anticorpos anti-*Leishmania* no soro ou plasma do cão.

Após depósito da amostra a analisar num dos poços sensibilizados com *Leishmania infantum*, os anticorpos anti-*Leishmania* presentes na amostra são capturados pelas leishmanias ligadas à lâmina, e posteriormente evidenciados por uma anti-imunoglobulina canina previamente marcada com fluoresceína.

A deteção dos anticorpos é um teste qualitativo, qualquer amostra positiva pode ser titulada quantitativamente através de simples diluições em série.

■ MATERIAL NECESSÁRIO:

► Reagentes necessários para a realização do teste Fluoleish™ :

- Um frasco com anti-imunoglobulina canina conjugada com fluoresceína,
- Um controlo positivo,
- Um controlo negativo,
- PBS (Tampão Fosfato Salino),
- Tween® 80,
- Azul de Evans,
- Água destilada.

► **Equipamento necessário:** lamelas, meio de montagem para imunofluorescência, uma câmara húmida a +37°C, e um microscópio de fluorescência com luz UV.

■ TIPO DE AMOSTRA

Amostra de soro ou plasma canino.

■ PROCEDIMENTO

Deixar os reagentes atingir a temperatura ambiente 20 minutos antes do início do teste.

► **Material necessário para um teste:** 1 poço controlo positivo e um poço controlo negativo por lâmina, e um número de poços igual ao das diluições a testar.

DILUIÇÕES DA AMOSTRA:

- Diluição 1/50 : diluir 10 µL de soro ou plasma a testar em 490 µL de PBS.
- Diluição 1/100 e superior: diluições sucessivas de 2 para 2 em PBS.

REALIZAÇÃO DO TESTE:

1/ Colocar em poços separados:

- 15 µL de controlo positivo,
- 15 µL de controlo negativo,
- 15 µL de cada diluição da amostra.

Incubar durante 30 minutos a +37°C na câmara húmida.

2/ Lavar as lâminas por imersão na solução de PBS com Tween® 80: 2 gotas de Tween® 80 para 1 litro de PBS (1 gota = 50 µL).

Deixar as lâminas imersas na solução de lavagem durante 5 minutos agitando.

Efectuar a segunda lavagem sob agitação utilizando uma solução fresca durante mais 5 minutos.

Passar rapidamente por um banho de água destilada. Escorrer. Secar.

3/ Adicionar a cada poço 15 μL de conjugado de anti-imunoglobulina canina fluorescente, diluído numa solução de PBS com azul de Evans (1 gota-aproximadamente 50 μL – de uma solução a 1% de azul de Evans em 5 mL de PBS).

A diluição do conjugado deve ser definida para cada lote de lâminas a partir de amostras padrão, em função das especificações do microscópio utilizado e da intensidade de fluorescência pretendida.

Incubar durante 30 minutos a +37°C na câmara húmida.

4/ Lavar as lâminas por imersão na solução de PBS com Tween® 80. Deixar as lâminas imersas na solução de lavagem durante 5 minutos agitando.

Efectuar a segunda lavagem sob agitação utilizando uma solução fresca durante mais 5 minutos.

Passar rapidamente por um banho de água destilada. Escorrer. Secar.

5/ Depositar 2 a 3 gotas do meio de montagem para imunofluorescência à superfície da lâmina e cobrir com lamela.

Ler com o microscópio de fluorescência utilizando uma ampliação de 40 x 10.

■ LEITURA

Reacção negativa: ausência de fluorescência da membrana das leishmanias, cor vermelha escura e difíceis de visualizar.

Reacção positiva: fluorescência acentuada das leishmanias, sobretudo da membrana. O flagelo também é fluorescente.

Intensidade da fluorescência da amostra testada: pode ser mais ou menos intensa que a do controlo positivo.

Casos específicos: em caso de controlo positivo ou negativo duvidoso, é importante repetir o procedimento para validar as amostras teste de acordo com as condições correctas.

■ INTERPRETAÇÃO

O título sérico é a diluição final em que há fluorescência positiva. O limiar de positividade é determinado em função dos padrões e do material utilizado.

■ RECOMENDAÇÕES

• ESTABILIDADE / CONSERVAÇÃO:

24 meses entre +2°C e +8°C.

• AMOSTRAS:

- Utilizar amostras de plasma ou soro. É aconselhável utilizar amostras frescas para prevenir qualquer risco de contaminação ou degradação.
- Conservação das amostras até 5 dias: conservar plasma e soro entre +2°C e +8°C.
- Conservação das amostras durante várias semanas: conservar plasma e soro a -20°C.

• RECOMENDAÇÕES E PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO:

- Não utilizar reagentes cuja validade tenha expirado.
- **Deixar as lâminas e os reagentes atingir a temperatura ambiente 20 minutos antes do início do teste.**
- Efectuar sempre 2 diluições (1/50 e 1/100) para avaliar corretamente a intensidade da fluorescência basal.
- Aconselha-se a realização de um controlo positivo e de um controlo negativo para cada lâmina.
- Inutilizar a lâmina caso algumas porções não tenham sido usadas.
- A diluição do conjugado deve ser redefinida a partir de amostras padrão, para cada novo lote de lâminas, em função das especificações do microscópio utilizado e da intensidade de fluorescência pretendida.

Estas recomendações constituem um guia, assumindo-se que nenhum método de diagnóstico poderá ser considerado como 100% certo. Por esta razão, o médico-veterinário, no momento de tomar decisões, deve sempre ter em conta o histórico e o exame clínico do animal.

A Bio Véto Test, não poderá nunca, em condição alguma, ser considerada responsável das consequências da má utilização ou má interpretação dos resultados obtidos com este teste.

SOLO PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO* ITALIANO

■ INTERESSE

La leishmaniosi canina è una malattia dovuta alla proliferazione nei macrofagi di un protozoo flagellato chiamato *Leishmania infantum*. La trasmissione è garantita dalla puntura di un insetto, il flebotomo, che è al tempo stesso ospite e vettore.

La leishmaniosi canina è una malattia le cui manifestazioni cliniche non sono costanti e presentano una gravità variabile. Per questo motivo, in caso di sospetto clinico è necessaria una diagnosi biologica. L'esame sierologico è considerato il test diagnostico più affidabile in quanto testimonia la risposta immunitaria dell'animale in seguito a un'infestazione. Tra gli esami sierologici disponibili, l'immunofluorescenza indiretta è spesso considerata il metodo di riferimento: si tratta di un esame molto sensibile, che permette una quantificazione del tasso di anticorpi dell'animale. L'intensità della reazione di immunofluorescenza aumenta durante l'espressione clinica e il monitoraggio nel tempo permette di testimoniare l'evoluzione della malattia.

■ PRINCIPIO

I vetrini Fluoleish™ permettono di realizzare un test di immunofluorescenza indiretta per l'identificazione degli anticorpi anti-*leishmania* nel siero o nel plasma del cane.

Una volta deposto il campione da analizzare su un pozzetto sensibilizzato mediante *Leishmania infantum*, gli anticorpi anti-*leishmania* presenti vengono catturati dalle leishmanie fissate sul vetrino, quindi vengono rivelati mediante una anti-immunoglobulina di cane marcata con fluoresceina.

Il rilevamento degli anticorpi è qualitativo; i campioni positivi possono essere titolati quantitativamente mediante una semplice serie di diluizioni.

■ MATERIALE NECESSARIO

► Reagenti necessari per la realizzazione di un vetrino Fluoleish™ :

- un flacone di anti-immunoglobulina di cane coniugata con fluoresceina,
- un controllo positivo,
- un controllo negativo,
- PBS (tampone fosfato salino),
- Tween® 80,
- Blu Evans,
- acqua distillata.

► **Materiale da prevedere:** vetrini coprioggetto, un mezzo di montaggio per immunofluorescenza, una camera umida a +37°C e un microscopio a fluorescenza con luce UV.

■ NATURA DEL CAMPIONE

Campione di siero o plasma di cane.

■ PROTOCOLLO OPERATIVO

I reagenti devono essere portati a temperatura ambiente 20 minuti prima dell'inizio dell'analisi.

► **Per un test prevedere:** 1 pozzetto di controllo positivo e 1 pozzetto di controllo negativo per vetrino e un numero di pozzetti pari alle diluizioni da analizzare.

DILUIZIONI DEL CAMPIONE:

- Diluizione 1/50: diluire 10 µL di siero o plasma da analizzare in 490 µL di PBS.
- Diluizione 1/100 e diluizioni superiori: diluizioni successive 50 a 50 in PBS.

ESECUZIONE DEL TEST:

1/ Deposare in pozzetti distinti:

- 15 µL di controllo positivo,
- 15 µL di controllo negativo,
- 15 µL di ogni diluizione del campione.

Incubare per 30 minuti a +37°C in camera umida.

2/ Lavare i vetrini immergendoli in una soluzione di PBS a cui è stato aggiunto Tween® 80: 2 gocce di Tween® 80 per litro di PBS (1 goccia = 50 µL).

Lasciare i vetrini immersi nella soluzione di lavaggio per 5 minuti sotto agitazione.

Eeguire un secondo lavaggio sotto agitazione con una nuova soluzione per 5 minuti.

Sciappare rapidamente in un bagno d'acqua distillata. Fare sgocciolare. Asciugare.

3/ Deporre su ogni pozzetto 15 μL di coniugato anti-immunoglobulina di cane fluorescente diluito in una soluzione di PBS a cui è stato aggiunto Blu Evans (1 goccia - circa 50 μL - di una soluzione di Blu Evans all'1% in 5 mL di PBS). La diluizione del coniugato deve essere definita per ciascun lotto di vetrini, a partire da campioni standard, in funzione del microscopio utilizzato e dell'intensità di fluorescenza desiderata.

Incubare per 30 min a +37°C in camera umida.

4/ Lavare i vetrini immergendoli in una soluzione di PBS a cui è stato aggiunto Tween® 80.

Lasciare i vetrini immersi nella soluzione di lavaggio per 5 minuti sotto agitazione.

Eeguire un secondo lavaggio sotto agitazione con una nuova soluzione per 5 minuti.

Sciappare rapidamente in un bagno d'acqua distillata. Fare sgocciolare. Asciugare.

5/ Deporre 2 o 3 gocce del mezzo di montaggio per immunofluorescenza sulla superficie del vetrino e coprirlo con un vetrino coprioggetto.

Leggere al microscopio a fluorescenza 40 x 10.

■ LETTURA

Reazione negativa: assenza di fluorescenza a livello della membrana delle leishmanie, che sono colorate in rosso scuro e poco visibili.

Reazione positiva: le leishmanie presentano una fluorescenza principalmente a livello della membrana. Anche il flagello è fluorescente.

Intensità della fluorescenza del campione analizzato: può essere più o meno intensa di quella del controllo positivo.

Caso particolare: nel caso in cui il controllo positivo o il controllo negativo siano dubbi, è importante ripetere l'esperimento per convalidare in buone condizioni il risultato del campione analizzato.

■ INTERPRETAZIONE

Il titolo di un campione corrisponde all'ultima diluizione che mostra ancora fluorescenza. La soglia di positività è determinata in funzione degli standard e del materiale utilizzato.

■ RACCOMANDAZIONI

• STABILITÀ / CONSERVAZIONE:

24 mesi tra +2°C e +8°C.

• CAMPIONI:

- Utilizzo di campioni di plasma o di siero. È preferibile lavorare su campioni freschi in modo da evitare rischi di contaminazione o di degradazione.

- Conservazione fino a 5 giorni: conservare plasma e siero in frigorifero tra +2°C e +8°C.

- Conservazione per diverse settimane: conservare plasma e siero in congelatore a -20°C.

• CONSIGLI E PRECAUZIONI D'IMPIEGO:

- Non utilizzare reagenti scaduti.

- **Lasciare che i vetrini e i reagenti raggiungano la temperatura ambiente 20 minuti prima dell'inizio dell'analisi.**

- Si consiglia di effettuare sempre 2 diluizioni (1/50 e 1/100) per valutare bene l'intensità della fluorescenza basale.

- Si consiglia di effettuare un controllo positivo e un controllo negativo su ciascun vetrino.

- Se non sono stati utilizzati tutti i pozzetti di un vetrino durante un esperimento, non si può conservare il vetrino per un impiego successivo.

- Per ogni nuovo lotto di vetrini Fluoleish™ la diluizione del coniugato deve essere rivalutata a partire da campioni standard, in funzione del microscopio utilizzato e dell'intensità di fluorescenza desiderata.

Queste raccomandazioni costituiscono solo una guida, in quanto non si può pretendere che alcun metodo diagnostico sia preciso al 100%. Come per qualsiasi diagnosi, l'interpretazione del test deve avvenire in funzione dell'anamnesi e del contesto clinico.

Bio Véto Test non può essere ritenuta responsabile delle conseguenze legate a un utilizzo scorretto o a un'interpretazione scorretta dei risultati forniti da questo test.

ΜΟΝΟ ΓΙΑ IN VITRO ΧΡΗΣΗ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

■ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Η λεισμανίωση είναι μια ασθένεια του σκύλου, η οποία προκαλείται από τον πολλαπλασιασμό του μαστογοφόρου πρωτόζωου *Leishmania infantum* στα μακροφάγα των ξενιστών του. Μεταδίδεται από ένα μικρό δίπτερο, τη σκνίπα (φλεβοτόμο), που δρα ως φορέας και ως ενδιάμεσος ξενιστής. Η κλινική εκδήλωση της λεισμανίωσης του σκύλου είναι δαλείπυσα και ποικίλης βαρύτητας. Επομένως, οι εργαστηριακές δοκιμές είναι απαραίτητες για την επιβεβαίωση της διάγνωσης. Οι ορολογικές εξετάσεις είναι οι πιο αξιόπιστες διαγνωστικές δοκιμές, διότι είναι ενδεικτικές της ανοσοολογικής απόκρισης του ζώου μετά τη μόλυνση. Από όλες τις διαθέσιμες ορολογικές εξετάσεις, η δοκιμή έμμεσου ανοσοφθορισμού θεωρείται συχνά ως η μέθοδος αναφοράς. Πρόκειται για μια δοκιμή με υψηλή ευαισθησία, η οποία επιτρέπει την ποσοτική αξιολόγηση των επιπέδων των αντισωμάτων του ζώου. Η ένταση της αντίδρασης ανοσοφθορισμού αυξάνεται στη φάση της εκδήλωσης των κλινικών συμπτωμάτων και ο περιοδικός έλεγχος επιτρέπει την παρακολούθηση της εξέλιξης της ασθένειας.

■ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα πλακίδια Fluoris™ επιτρέπουν την εφαρμογή δοκιμής έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση αντισωμάτων αντι-*leishmania* στον ορό ή το πλάσμα σκύλου. Μετά την εναπόθεση του προς ανάλυση δείγματος σε βοηθίο ευαισθητοποιημένο με *Leishmania infantum*, τα τυχόν υπάρχοντα αντισώματα αντιδρούν με τις ακινητοποιημένες *Leishmania* και στη συνέχεια ανχνεύονται με χρήση αντι-ανοσοσφαιρίνης σκύλου επισημασμένης με φλουορεσκήνη.

Η ανίχνευση των αντισωμάτων είναι ποιοτική και κάθε θετικό δείγμα μπορεί περαιτέρω να τιτλοποιηθεί ποσοτικά με τη χρήση απλών διαδικασιών αραιώσεων

■ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΔΟΚΙΜΗ ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ:

► Αντιδραστήρια που απαιτούνται για την εκτέλεση μιας δοκιμής Fluoleish™ :

- φάλη αντ -ανοσοσφαιρίνης σκύλου συζευγμένης με φλουορεσκεινη
- θετικός μάρτυρας
- αρνητικός μάρτυρας
- PBS (ρυθμιστικό δόλυμα φωσφορικών αλάτων)
- Tween® 80,
- Evans Blue,
- Απεσταγμένο νερό

► ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ :

καλυπτρίδες, μέσο στερέωσης για ανοσοσφαιρισμό, υγρός θάλαμος σε θερμοκρασία 37°C και μικροσκοπιοφθορισμού με λαμπτήρα UV

■ ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ορός ή πλάσμα αίματος σκύλου

■ ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ

Αφήστε τα αντιδραστήρια να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου 20 λεπτά πριν την έναρξη της ανάλυσης

► Για κάθε ανάλυση θα χρειαστείτε: βοηθίο θετικού μάρτυρα και αρνητικού μάρτυρα σε κάθε πλακίδιο, καθώς και τόσα βοηθία όσες και ο δόξαοχέσ αρά ώσε ς

ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ:

- Αραίωση /50: 0 μ ορού ή πλάσματος 490 μ PBS
- Αραίωση / 00 και άνω: δ οξαοχέσ αρά ώσε ς δ αλύματος 2 προς 2 με PBS

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ:

1/ Τοποθετήστε σε δ αφορετ κά βοηθία:

- 5 μ θετικού μάρτυρα
- 5 μ αρνητικού μάρτυρα
- 5 μ από κάθε αράιωση του δείγματος

Επνώστε για 30 λεπτά στους 37°C σε υγρό θάλαμο.

2/ Ξεπλύνετε τα πλακίδια, βυθίζοντάς τα σε PBS-Tween® 80: 2 σταγόνες Tween® 80 για λίτρο PBS (σταγόνα = 50 μ).

Αφήστε τα πλακίδια βυθισμένα στο διάλυμα για 5 λεπτά υπό ανάδευση.

Επανάλάβετε δεύτερη έκπλυση με φρέσκο διάλυμα για 5 λεπτά

υπό ανάδευση.

Ξεπλύνετε ελαφρώς με αποσταγμένο νερό. Στραγγίστε και στεγνώστε.

3/ Προσθέστε σε κάθε βοθρίο 5 μ συζεύγματος φθορίζουσας αντ -ανοσοσφαρίνης σκύλου αραωμένου σε PBS με Evans Blue (σταγόνα - περίπου 50 μ - δ αλύματος Evans Blue %, σε 5 ml PBS) Καθορίστε την αραίωση του συζεύγματος για κάθε παρτίδα πλακιδίων χρησιμοποιώντας δείγματα αναφοράς, λαμβάνοντας υπόψη τα χαρακτηριστικά του διαθρόμου κροσκοπίου και τον επιθυμητό φθορισμό

Επώαστε για 30 λεπτά στους 37 °C σε υγρό θάλαμο.

4/ Ξεπλύνετε τα πλακίδια, βυθίζοντάς τα σε PBS Tween® 80

Αφήστε τα πλακίδια βυθισμένα στο διάλυμα για 5 λεπτά υπό ανάδευση.

Επαναλάβετε δεύτερη έκπλυση με φρέσκο διάλυμα για 5 λεπτά υπό ανάδευση.

Ξεπλύνετε ελαφρώς με αποσταγμένο νερό. Στραγγίστε και στεγνώστε.

5/ Τοποθετήστε 2-3 σταγόνες μέσου στερέωσης ανοσοφθορισμού στην επιφάνεια του πλακιδίου και σκεπάστε με την καλυπτρίδα

Αναγνώστε με μικροσκόπιο φθορισμού 40 x 0

■ ΑΝΑΓΝΩΣΗ

Αρνητική αντίδραση: Απουσία φθορισμού των μεμβρανών των παρασίτων *Leishmania*, οι οποίες έχουν σκούρο κόκκινο χρώμα και είναι δύσκολα διακρίσιμες

Θετική αντίδραση: Τα παράσιτα *Leishmania* και εδκότερα οι μεμβράνες τους, φθορίζουν έντονα Το μαστίγιο είναι επίσης φθορίζον

Ένταση φθορισμού του δείγματος υπό ανάλυση: μπορεί να είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη από αυτήν του θετικού μάρτυρα

Εδκές περιπτώσεις: Σε περίπτωση αμφίβολου θετικού ή αρνητικού μάρτυρα, είναι σημαντικό να επαναλάβετε τη δοκιμή προκειμένου να επικυρωθεί το αποτέλεσμα του δείγματος υπό τις κατάλληλες συνθήκες

■ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Ο τίτλος των αντ σωμάτων του δείγματος αντ στο χεί στην τελευταία αραίωση με αν χνεύσ μο φθορ σμό Το κατώτερο όρ ο (ουδός) θετ κού δείγματος ορίζετα σε συνάρτηση με τα πρότυπα κα τα υλ κά που χρησ μοπο ήθηκαν

■ ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ

● ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ/ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ:

24 μήνες στους 2 °C έως 8 °C

● ΔΕΙΓΜΑΤΑ:

- Χρησ μοπο είστε δείγματα πλάσματος ή ορού Συν στάτα να χρησ μοπο είτε φρέσκα δείγματα, προκε μένου να αποφευχθεί οπο αδήποτε μόλυνση ή υποβάθμ σή τους
- Δ ατήρηση δείγματος μέχρ 5 ημέρες: αποθηκεύστε πλάσμα ή ορό στο ψυγείο στους 2 έως 8 °C
- Δ ατήρηση δείγματος γ α αρκετές εβδομάδες: αποθηκεύστε πλάσμα ή ορό στον καταψύκτη στους -20 °C

● ΟΔΗΓΙΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ:

- Μη χρησ μοπο είτε τα αντ δραστήρ α μετά την ημερομηνία λήξης
- Αφήστε τα αντ δραστήρ α κα τα πλακίδια να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου γ α περίπου 20 λεπτά πρ ν την έναρξη της ανάλυσης
- Συν στάτα να γίνοντα πάντα δύο αρα ώσε ς (/50 κα / 00), προκε μένου να εκτ μηθούν τα επίπεδα του βασ κού φθορ σμού
- Συν στάτα να χρησ μοπο είτε ένα βοθρίο θετ κού μάρτυρα κα ένα αρνητ κού μάρτυρα σε κάθε πλακίδ ο
- Εάν δεν έχουν χρησ μοπο ηθεί όλα τα βοθρία ενός πλακίδιου κατά την ανάλυση, το πλακίδ ο δεν μπορεί να αποθηκευθεί γ α μελλοντ κή χρήση
- Γ α κάθε νέα παρτίδα πλακίδιων F uo eis TM, η αραίωση του συζεύγματος πρέπε να αξ ολογείτα εκ νέου χρησ μοπο ώντας πρότυπα δείγματα, ανάλογα με το μ κροσκόπ ο φθορ σμού κα την επι θυμητή ένταση φθορ σμού

Ο συν στώμενες ενέργε ες αποτελούν κατευθυντήρ α γραμμή, καθώς καμία δοκ μή δεν είνα 00% ακρ βής πάντα κα υπό οπο εσδήποτε συνθήκες Όλα τα αποτελέσματα των δοκ μών πρέπε να ερμηνευθούν υπό το φωσ της κλ ν κής εξέτασης κα του στορ κού

Η Bio Vé ο Tes δεν μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνη γ α τ ς συνέπε ες της κακής χρήσης ή παρερμηνείας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη δοκ μή

NUR ZUR *IN-VITRO* DIAGNOSTIK DEUTSCH

■ LEISTUNG

Canine Leishmaniose wird durch die Ausbreitung eines begeißelten Parasiten, *Leishmania infantum*, in den Makrophagen seines Wirtes verursacht. Die Krankheit wird durch Insektenbisse übertragen: Sandfliegen, die gleichzeitig als Wirt und als Vektor dienen.

Die klinischen Manifestationen der caninen Leishmaniose sind intermittierend und von unterschiedlichem Schweregrad. Deshalb werden Labortests benötigt um die Diagnose zu bestätigen. Die Serologie hat sich als verlässlichster diagnostischer Test durchgesetzt, da sie die, auf einen Befall folgenden, Zeichen einer Immunantwort des Tieres aufzeigt. Mehrere unterschiedliche serologische Tests stehen zur Verfügung; indirekte Immunfluoreszenz gilt als goldener Standard: es ist ein hoch empfindlicher Test, der eine quantitative Auswertung des tierischen Antikörperlevels liefert. Folglich steigt die Intensität der Immunfluoreszenz während der Phase der klinischen Manifestation und eine Kontrolle während dieser Zeit zeigt den Verlauf der Krankheit.

■ TESTPRINZIP

Fluoleish™ Testschlitten werden für die Durchführung eines indirekten Immunfluoreszenztests verwendet, um Anti-*Leishmania* Antikörper im Serum oder Plasma des Hundes anzuzeigen.

Nach Positionierung der zu analysierenden Probe auf einer für *Leishmania infantum* sensibilisierten Einsenkung, werden alle Anti-*Leishmania* Antikörper in der Probe an membrangebundene Leishmanien gebunden und anschließend durch, fluoreszinmarkiertes, canines Anti-Immunglobulin angezeigt.

Der Antikörpernachweis ist ein qualitativer Test, jede positive Probe kann danach durch Titration quantitativ analysiert werden, indem man eine einfache Verdünnungsreihe einer Lösung benutzt.

■ BENÖTIGTES MATERIAL

► **Reagenzien, die für die Durchführung eines Fluoleish™ Tests benötigt werden :**

- eine Flasche fluoreszierendes canines Anti-Immunglobulin,
- eine Positivkontrolle,
- eine Negativkontrolle,
- PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung),
- Tween® 80,
- Evans Blau,
- destilliertes Wasser.

► **Benötigte Apparaturen:** Deckgläser, ein Bestückungsmedium für Immunfluoreszenz, eine Feuchtkammer bei +37°C, und ein Fluoreszenzmikroskop mit UV Licht.

■ PROBENART

Serum- oder Plasmaprobe des Hundes.

■ GEBRAUCHSANWEISUNG

Das Reagenz sollte 20 Minuten vor Beginn der Analyse Raumtemperatur annehmen können.

► **Für jeden Test benötigen Sie:** 1 Vertiefung für die Positivkontrolle, 1 Vertiefung für die Negativkontrolle pro Schlitten, sowie für jede zu testende Lösung eine Vertiefung.

VERDÜNNUNGEN DER PROBE:

- 1/50 Verdünnung: verdünnen Sie 10 µL des Testserums oder -plasmas in 490 µL PBS.
- 1/100 Verdünnung und höher: fortlaufende Verdünnungen von 2 in 2 PBS.

DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1/ Füllen Sie folgendes in separate Vertiefungen:

- 15 µL Positivkontrolle,
- 15 µL Negativkontrolle,
- 15 µL jeder Verdünnung der Probe.

30 Minuten bei +37°C in der Feuchtkammer bebrüten lassen.

2/ Waschen Sie die Schlitten durch Untertauchen in einer PBS-Lösung mit Tween® 80: 2 Tropfen Tween® 80 auf 1 Liter PBS (1 Tropfen = 50 µL).

Schwenken Sie die untergetauchten Schlitten 5 Minuten in der Waschlösung.

Waschen Sie ein zweites Mal für weitere 5 Minuten unter Schwenken in einer frischen Lösung.
Kurz in einem Bad aus destilliertem Wasser ausspülen. Abtropfen lassen. Trocknen.

3/ Füllen Sie in jede Vertiefung 15 μL canines fluoreszierendes Anti-Immunglobulin Konjugat verdünnt in einer Lösung aus PBS mit Evans Blau (1 Tropfen - etwa 50 μL – einer 1% -igen Lösung Evans Blau in 5 mL PBS). Die Verdünnung des Konjugats sollte für jede Packung Testschlitten definiert werden, abhängig von Standardauswertungen des verwendeten Mikroskops und der erwünschten Intensität der Fluoreszenz.

30 Minuten bei +37°C in der Feuchtkammer bebrüten lassen.

4/ Waschen Sie die Schlitten durch Tauchen in einer PBS-Lösung mit Tween® 80.

Waschen Sie ein zweites Mal für weitere 5 Minuten unter Schwenken in einer frischen Lösung.

Kurz in einem Bad aus destilliertem Wasser ausspülen. Abtropfen lassen. Trocknen.

5/ Bringen Sie 2 bis 3 Tropfen des immun fluoreszierenden Trägermediums auf die Oberfläche des Schlittens auf und bedecken Sie sie mit einem Deckgläschen.

Ablesen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Vergrößerung von 40 x 10.

■ ABLESEN

Negative Reaktion: keine Membranfluoreszenz der Leishmanien, welche dunkelrot gefärbt und kaum sichtbar sind.

Positive Reaktion: Die Leishmanien zeigen deutliche Fluoreszenz, vorwiegend an ihrer Membran, aber auch an den Geißeln.

Intensität der Fluoreszenz der untersuchten Probe: kann stärker oder schwächer als die der Positivkontrolle sein.

Sonderfälle: im Fall einer fraglichen Positiv- oder Negativkontrolle, ist es wichtig den Vorgang zu wiederholen um die Proben unter den richtigen Bedingungen zu bestätigen.

■ INTERPRETATION

Der Titer der Probe entspricht der letzten Verdünnung die noch fluoresziert. Der Schwellwert der Positivität ist abhängig von den Standards und vom verwendeten Material.

■ EMPFEHLUNGEN

•STABILITÄT/ LAGERUNG:

24 Monate zwischen +2°C und +8°C.

•PROBEN:

- Verwenden Sie Plasma- oder Serumproben. Vorzugsweise mit frischen Proben arbeiten, um jedem Risiko auf Verschmutzung oder Degeneration vorzubeugen.
- Aufbewahrung für weniger als 5 Tage: Lagern Sie Plasma und Serum im Kühlschrank zwischen +2°C und +8°C.
- Aufbewahrung für mehrere Wochen: Lagern Sie Plasma und Serum im Gefrierschrank bei -20°C.

•RICHTLINIEN UND NUTZUNGSHINWEISE:

- Verwenden Sie keine abgelaufenen Reagenzien.
- **Lassen Sie vor Beginn der Analyse Schlitten und Reagenzien Raumtemperatur annehmen.**
- Es ist ratsam immer 2 Verdünnungen (1/50 und 1/100) auszuführen, um den Grad der Basalfluoreszenz korrekt zu bestimmen.
- Es ist ratsam eine Positiv- und eine Negativkontrolle für jeden Testschlitten durchzuführen.
- Wenn nicht alle Vertiefungen eines Testschlittens für eine Analyse verwendet wurden, kann der Schlitten nicht zum weiteren Gebrauch aufbewahrt werden.
- Die Verdünnung des Konjugats sollte für jede neue Packung Fluoleish™-Testschlitten, durch Standardproben, abhängig vom verwendeten Mikroskop und der erwünschten Intensität der Fluoreszenz, neu definiert werden.

Diese Empfehlungen sind nur Hinweise; keine diagnostische Methode ist immer zu 100% genau. Wie bei jedem diagnostischen Test, sollten die Ergebnisse unter Berücksichtigung der Anamnese und der klinischen Symptomatik interpretiert werden.

Bio Véto Test kann nicht für die Folgen falscher Anwendung oder Interpretation der Testergebnisse verantwortlich gemacht werden.

ALLEEN VOOR *IN VITRO* GEBRUIK NEDERLANDS

■ VOORDELEN

Canine leishmaniose wordt veroorzaakt door vermenigvuldiging van de geflagelleerde ééncellige parasiet, *Leishmania infantum*, in de macrofagen van de gastheer. De ziekte wordt overgebracht door stekende insecten: zandvliegen, die zowel als gastheer en als vector optreden.

Het klinisch beeld van canine leishmaniose is intermitterend en varieert in ernst. Daarom is laboratoriumonderzoek nodig om de diagnose te bevestigen. Serologie wordt beschouwd als het meest betrouwbare diagnostische onderzoek, omdat het een indicatie geeft van de immunrespons van het dier na infectie. Er zijn verschillende serologische testen beschikbaar, waarbij de indirecte immunofluorescentietest wordt beschouwd als de gouden standaard. Het is een zeer gevoelige test die een kwantitatieve beoordeling van het antilichaamgehalte bij het dier mogelijk maakt. De intensiteit van de immunofluorescentie-reactie neemt toe tijdens de klinische fase van ziekte. Het monitoren hiervan in de loop van de tijd geeft een goed beeld van het ziekteverloop.

■ PRINCIPE

Fluoleish™ testplaten worden gebruikt om een indirecte immunofluorescentietest uit te voeren om anti-*Leishmania*-antilichamen aan te tonen in het serum of plasma van de hond.

Na aanbrengen van het te analyseren monster in het cupje, dat gesensibiliseerd is met *Leishmania infantum*, zal elk anti-*Leishmania*-antilichaam dat aanwezig is in het monster gebonden worden aan het antigeen op de testplaat. De reactie wordt vervolgens zichtbaar gemaakt door binding aan een canine anti-immunoglobuline dat is gelabeld met fluoresceïne.

Het aantonen van antilichamen is een kwalitatieve test en elk positief monster kan vervolgens door titratie gekwantificeerd worden met behulp van een eenvoudige verdunningsreeks.

■ NBENODIGDE MATERIALEN

► Benodigde reagentia voor de Fluoleish™ test :

- fles canine anti-immunoglobuline geconjugerd met fluoresceïne (fluorochroom)
- een positief controlemonster
- een negatief controlemonster
- PBS (fosfaat gebufferde zoutoplossing)
- Tween® 80
- Evans blauw
- Gedestilleerd water

► **Benodigde materialen:** Dekglasjes, een opstelling voor immunofluorescentie, een broedstoom van +37°C, en een fluorescentiemicroscoop met UV-licht.

■ AARD VAN HET MONSTER

Serum- of plasmamonster van een hond.

■ UITVOERING

Het reagens moet ongeveer 20 minuten voor uitvoering van de test op kamertemperatuur worden gebracht.

► **Benodigheden voor elke test:** 1 positieve en 1 negatieve controlecup, en evenveel bemonsteringscups als verdunningen die getest moeten worden.

VERDUNNINGSREEKS VAN HET MONSTER:

- 1/50 verdunning: verdun 10 µL van het serum of plasma in 490 µL PBS.
- 1/100 verdunning en hoger: opeenvolgende verdunningen in PBS.

UITVOERING VAN DE TEST:

1/ Breng de volgende hoeveelheden aan in de afzonderlijke cupjes:

- 15 µL van het positieve controlemonster,
- 15 µL van het negatieve controlemonster,
- 15 µL van elke verdunning van het monster.

Laat alle monsters 30 minuten incuberen bij een temperatuur van +37°C in een broedstoom.

2/ Spoel de testplaten af door ze te dompelen in een oplossing van PBS met Tween® 80: 2 druppels Tween® 80 op 1 liter PBS (1 druppel = 50 µL).

Laat de testplaten gedurende 5 minuten ondergedompeld staan in

deze oplossing, onder voortdurend zwenken.

Spoel de testplaat voor een tweede keer gedurende 5 minuten af met een verse oplossing.

Spoel kort na in een badje van gedestilleerd water. Laat de platen uitlekken en drogen.

3/ Voeg aan elk cupje 15 μL canine fluorescerend anti-immunoglobuline conjugaat verdund in een oplossing van PBS met Evans blauw toe (1 druppel, van ongeveer 50 μL van een 1% Evans blauw oplossing in 5 mL PBS). Het verdunde conjugaat moet voor elke serie testplaten opnieuw worden bepaald, vanuit de standaardmonsters, aangepast aan de microscoop die gebruikt wordt en aan de gewenste intensiteit van fluorescentie.

Laat alle monsters 30 minuten incuberen bij een temperatuur van +37°C in een incubatiekamer.

4/ Spoel de testplaten af door ze te dompelen in een oplossing van PBS met Tween® 80.

Laat de testplaten gedurende 5 minuten ondergedompeld staan in deze oplossing, onder voortdurend zwenken.

Spoel de testplaat voor een tweede keer gedurende 5 minuten af met een verse oplossing.

Spoel kort na in een badje van gedestilleerd water. Laat de platen uitlekken en drogen.

5/ Breng 2 tot 3 druppels van het fluorochroom aan op het oppervlak van de testplaat en bedek deze met een dekglasje.

Bekijk het preparaat onder de fluorescentiemicroscoop bij een 40 x 10 vergroting.

■ AFLEZEN

Negatieve reactie: afwezigheid van membraanfluorescentie van *Leishmania*-antigenen, die donkerrood gekleurd zijn en niet eenvoudig te zien.

Positieve reactie: de *Leishmania*-antigenen geven een duidelijke fluorescentie, vooral ter hoogte van de membraan. Ook het flagel fluoresceert.

De intensiteit van de fluorescentie van het geteste monster: deze kan meer of minder intens zijn dan de positieve controle.

Specifieke gevallen: bij een twijfelachtig positieve of negatieve controle is het belangrijk de procedure te herhalen met de monsters om deze te controleren onder dezelfde omstandigheden.

■ INTERPRETATIE

De titer van het monster komt overeen met de laatste verdunning die nog fluorescentie vertoont. De drempel van positiviteit wordt vastgesteld op basis van de standaardmonsters en het gebruikte materiaal.

■ AANBEVELINGEN

• OPSLAG / HOUDBAARHEIDSDUUR:

24 maanden tussen de +2°C en +8°C.

• MONSTERS:

- Gebruik een serum- of plasmamonster. Maak bij voorkeur gebruik van een vers afgenomen monster om het risico op contaminatie of degradatie te voorkomen.
- Opslag korter dan 5 dagen: bewaar serum en plasma tussen de +2°C en +8°C (koelkast).
- Opslag gedurende enkele weken: bewaar plasma en serum in de vriezer bij -20°C.

• RICHTLIJNEN EN VOORZORGSMAATREGELEN:

- Gebruik geen reagentia waarvan de houdbaarheidsdatum is verstreken.
- **Laat de testplaten en reagentia 20 minuten voor aanvang van de test op kamertemperatuur komen.**
- Gebruik altijd 2 verdunningen (1/50 en 1/100) voor een juiste beoordeling van de afname in basale fluorescentie.
- Maak gebruik van een positieve en negatieve controle cup voor elke plaat.
- Wanneer geen enkel cupje van een plaat is gebruikt voor een test, dan kan deze bewaard worden voor toekomstig gebruik.
- Het verdunde conjugaat moet voor elke nieuwe serie Fluoleish™ testplaten opnieuw worden bepaald, met behulp van standaard monsters, aangepast aan de microscoop die gebruikt wordt en de gewenste intensiteit van fluorescentie.

Bovenstaande aanbevelingen dienen als richtlijn; geen enkele diagnostische methode is 100% betrouwbaar. De testresultaten moeten altijd worden geïnterpreteerd in combinatie met de voorgeschiedenis en het klinisch onderzoek.

Bio Véto test kan niet verantwoordelijk worden gehouden voor eventuele gevolgen in verband met het onjuiste gebruik van deze test of verkeerde interpretatie van de resultaten.

Manufactured by / Fabriqué par / Fabricado por / Manufacturado por / Prodotto da / Κατασκευάζεται από την / Hergestellt von / Vervaardigd door :

BIO VETO TEST
285, AVENUE DE ROME
83500 LA SEYNE SUR MER - FRANCE
TEL. +33 (0)4 94 10 58 94 - FAX +33 (0)4 94 10 58 90
WEB: www.bvt.fr - E-MAIL: bvt@bvt.fr