

FASTest® ANAPLASMA-EHRLICHIA



ad us. vet.

In vitro Diagnostikum

Testkit zum qualitativen Nachweis von Antikörpern gegen *Anaplasma* spp. (*A. phagocytophilum*, *A. platys*) und gegen *Ehrlichia canis* im Vollblut, Plasma oder Serum des Hundes

GEBRUCHSINFORMATION



1. INFORMATIONEN ZUM TESTKIT

TESTKITKOMPONENTEN

- 1 Testkit **FASTest® ANAPLASMA-EHRLICHIA** enthält:
 - 2 oder 10 Doppeltestkassetten, beschichtet mit rekombinanten *Anaplasma* spp.- bzw. *Ehrlichia canis*-Antigenen
 - 1 Tropfflasche **A** mit 1,0 ml oder 3,0 ml Pufferlösung
 - 2 oder 10 Einmal-Kunststoffpipetten
 - 1 Gebrauchsinformation

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

- Lagerung 15–25°C
- Verwendbar bis – siehe Etikett

ANWENDUNG UND ABKÜRZUNGEN

- Für den tierärztlichen Gebrauch
 - In vitro Diagnostikum
 - Gebrauchsinformation genau beachten
 - Chargen-Bezeichnung
 - Keine Reagenzien verschiedener Testkits, Chargennummern oder mit abgelaufenem Verfallsdatum verwenden.
- T** – Testlinie, **C** – KONTROLLlinie, **LF** – Lateral flow

HAFTUNG

Das gesamte Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produktes liegt beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für indirekte, spezielle oder daraus folgende Schäden jeglicher Art, die aus der Benutzung, Testdurchführung und -auswertung dieses Produktes resultieren.

2. EINLEITUNG

Die canine granulozytäre Anaplasiose (gA, *Anaplasma phagocytophilum* [A.p.]), die thrombozytäre Anaplasiose (tA, *A. platys*) und die canine monozytäre Ehrlichiose (CME, *Ehrlichia canis*) zählen zu den wichtigsten vektorübertragenen Infektionskrankheiten/Reiseparasitosen des Hundes. Koinfektionen spielen bei beiden Erregern eine große Rolle, daher sollten je nach Herkunft und Aufenthaltsort der Tiere potenzielle weitere Erreger (z.B. *Borrelia* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp.) bzw. für diese Erreger hinweisende Laborwerte (z.B. Anämie, Leukozytose/Neutrophilie, Hypalbuminämie/Hypergammaglobulinämie, Nierenwerte etc.) abgeklärt werden.

Grundsätzlich gelten zeckenreiche Regionen (endemische Gebiete) als potentielle Ansteckungsgebiete. Die Seroprävalenzen für die gA/tA bzw. CME variieren je nach Land (endemisch oder nicht-endemisch) und Studie stark.

Eine Infektion mit *A. p.* weist eine Inkubationszeit von 2–20 Tagen auf mit i.d.R. subklinischen bzw. selbstlimitierenden Verläufen. Klinisch sind Fieber, Apathie, Muskelverhärtung, Polyarthritiden mit Gelenkschmerz, Gelenkschwellung, Lahmheit sowie Gewichtsverlust, Thrombozytopenie, Anämie, Petechien und erhöhte Entzündungswerte (CRP, Haptoglobin etc.) zu sehen. Hirnhautblutungen können zu zentralnervösen Störungen führen. Der Erreger der tA, *A. platys*, kommt weltweit, v.a. in der südlichen Hemisphäre, vor. Zumeist verläuft die Infektion asymptomatisch mit mildem Fieber, Uveitis, Petechien und Ekchymosen. Labordiagnostisch zeigt sich eine Thrombozytopenie.

Die CME zeichnet sich durch eine sehr lange Inkubationszeit (Ø 4–5 bis hin zu 12–13 Jahren) sowie einer unspezifischen Klinik aus und wird daher auch als „silent killer“ bezeichnet!

Die Folgen einer solchen Koinfektion aus immunologischer, therapeutischer und diagnostischer Hinsicht sind den wenigsten Tierärzten bekannt. Daher eignet sich der **FASTest® ANAPLASMA-EHRLICHIA** bei Verdacht des Vorliegens einer Anaplasiose, Ehrlichiose oder einer Koinfektion als schneller, qualitativer Antikörper (Ak)-Nachweis und ermöglicht somit unverzüglich weitere diagnostische, therapeutische und prophylaktische Maßnahmen.

3. INFORMATIONEN ZUM PROBENMATERIAL

Für den Test werden **je exakt 10 µl** (aus der beigefügten Einmalpipette) **15–25°C warmes Vollblut** (VB, mit Gerinnungshemmer) bzw. **Plasma (P) oder Serum (S)** benötigt. **Nativblut ohne Zusatz von Gerinnungshemmern darf aufgrund potentieller Mikroagglutinationen** (z.B. Migrationsverzögerungen auf der Membran, unspezifische Reaktionen) **nicht verwendet werden!**

Das Probenmaterial vor der Verwendung gut homogenisieren! Ungekühlt (**15–25°C**) sollten VB, P und S innerhalb von 4 Stunden getestet werden! Bei **2–8°C** können VB, P und S bis max. 4 Tage gelagert werden. **Serum- und/oder Plasmaproben** können dauerhaft bei **mindestens –20°C** aufbewahrt werden. Beachten Sie, dass das Probenmaterial, ebenso wie alle verwendeten Testkitkomponenten, zum Zeitpunkt der Anwendung **Raumtemperatur** haben sollte.

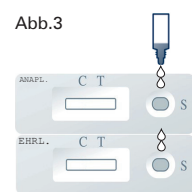
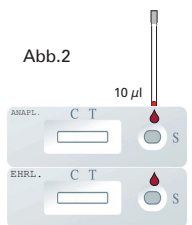
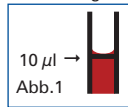
Endogene und exogene Störsubstanzen einer Probe (z.B. Albumin, Fibrinogen, Lipide, CRP, heterophile Antikörper, v.a. IgA-Typ, aber auch Viskosität, pH-Wert und/oder EDTA-Überschuss) **sowie Nativblut können Störeffekte** (Matrixeffekte) **verursachen, welche die Messung des Targets beeinflussen können. Diese können zu gestörtem LF und/oder unspezifischen Reaktionen auf T und C führen.**

4. PROBENVORBEREITUNG

- Keine Probenvorbereitung notwendig.
- CAVE:** Unvollständig gefüllte und/oder unzureichend durchmischte EDTA-, Citrat- oder Heparinröhrchen können nicht sichtbare Mikrogerinnsel verursachen, die ebenfalls zu Migrationsverzögerungen bzw. zu unspezifischen Reaktionen (z.B. gräuliche, schattenartige Linien) führen können.

5. TESTDURCHFÜHRUNG

- Entnehmen Sie die Doppeltestkassette erst kurz vor Gebrauch der Verpackung. Legen Sie sie auf eine glatte Oberfläche.
- Saugen Sie mit der beigefügten Einmalpipette die Probe bis zur Markierung (± 10 µl Probenvolumen) auf. **Der Meniskus muss oberhalb der schwarzen Linie sein** (Abb.1). Geben **das gesamte Probenvolumen (10 µl)** in das **Probenfenster S** der Anaplasma-Testkassette (Pipette dabei senkrecht halten, Abb.2). **Wiederholen Sie den gesamten Vorgang für die Ehrlichia-Testkassette.**
- Halten Sie die Tropfflasche **A** senkrecht und tropfen Sie **je 2 Tropfen der Pufferlösung** (ca. **80–100 µl**) in das Probenfenster der Anaplasma- bzw. Ehrlichia-Testkassette (Abb.3).
- Sollte 1 Minute nach Auftropfen der Pufferlösung kein beginnender m.o.w. pinkfarbener LF sichtbar werden, geben Sie sofort 1 Tropfen Pufferlösung in das Probenfenster S.



6. ABLESEN DES TESTERGEBNISSES

Das Testergebnis ist nach einer Inkubationszeit von **10 Minuten** nach Zugabe der Pufferlösung in das Probenfenster S abzulesen.

POSITIVES *Anaplasma*- und/oder *Ehrlichia*-TESTERGEBNIS (Abb.4–6)

Eine **pink-purpurfarbene TESTlinie** **jedweder Intensität** (variabel von sehr schwach bis stark intensiv) und eine **pink-purpurfarbene KONTROLLlinie** erscheinen.

NEGATIVES TESTERGEBNIS (Abb.5–7)
Nur eine **pink-purpurfarbene KONTROLLlinie** erscheint. Diese Linie zeigt, unabhängig von ihrer Intensität, die korrekte Testdurchführung an.

UNGÜLTIGES TESTERGEBNIS

Keine KONTROLLlinie sichtbar. Der Test muss unter Verwendung einer neuen Doppeltestkassette wiederholt werden.

Abb.4 *Anaplasma* positiv, Ehrlichia positiv

Abb.5 *Anaplasma* negativ, Ehrlichia positiv

Abb.6 *Anaplasma* positiv, Ehrlichia negativ

Abb.7 *Anaplasma* negativ, Ehrlichia negativ

7. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Es wird empfohlen, Einmal-Handschuhe und weitere persönliche Schutzausrüstung (Schutzkleidung, evtl. Mundschutz) zu tragen. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen und desinfizieren.
- Beschriften Sie Probenmaterial und zugehörige Doppeltestkassette, damit die exakte Zuordnung gewährleistet ist.
- Für jede Probe eine neue Pipette und eine neue Doppeltestkassette verwenden.
- Die Pufferlösung enthält geringgradige Konzentrationen an toxischem Natriumazid als Konservierungsmittel. Haut-/Augenkontakt und/oder Ingestion sind unbedingt zu vermeiden!
- Das Probenmaterial muss als potentiell infektiös angesehen werden und ist mit den verwendeten Testkitkomponenten nach der Testdurchführung fachgemäß zu entsorgen.

8. TESTPRINZIP

Der **FASTest® ANAPLASMA-EHRLICHIA** basiert auf einem immunochromatographischen „Sandwich-Prinzip“. Die im Probenmaterial enthaltenen Antikörper gegen *Anaplasma* spp. bzw. *Ehrlichia canis* reagieren im Konjugatkiten mit mobilen, an Goldpartikel konjugierten Antikörpern. Diese Antikörper-Komplexe wandern entlang der Membran („lateral flow“, **LF**) und binden unter Ausbildung einer pinkpurpurfarbenen **TESTlinie (T)** an membranfixierte, rekombinante *Anaplasma* spp.- bzw. *Ehrlichia canis*-Antigene. Die korrekte Testdurchführung wird durch die Ausbildung einer zweiten, pink-purpurfarbenen **KONTROLLlinie (C)** angezeigt.

9. INFORMATIONEN ZUR TESTAUSWERTUNG

- Die Interpretation des abgelesenen Testergebnisses sollte im Rahmen der Anamnese (Auslandsaufenthalt, Zeckenbefall), Klinik, Therapie- und Prophylaxemöglichkeiten betrachtet werden.
- Jegliche nicht beschriebenen Farb- und Konturabweichungen von T und C (z.B. gräuliche, schattenartige Linien) sind als unspezifische Reaktionen und somit als negatives Testergebnis zu werten.
- T kann sowohl in Intensität (von schwach bis stark pinkpurpurfarben) als auch in der Breite variieren und ist daher im Falle eines Erscheinens innerhalb der angegebenen Inkubationszeit als positiv zu interpretieren.
- Positive Testresultate können in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration bereits vor Ende der Inkubationszeit auftreten. Darüber hinaus abgelesene Testresultate sind nicht interpretierbar!
- Im Falle gerinnungsgehemmten Vollbluts und/oder stark hämolytierten Probenmaterials kann T aufgrund des m.o.w. stark rötlichen Hintergrundes nur schwach oder nicht sichtbar sein.
- Bei der Antikörperbestimmung gilt die Zwei-Stufen-Diagnostik als Mittel der Wahl. In einer ersten Stufe wird i.d.R. ein Vor-Ort-IgG-Screening-Test wie der **FASTest® ANAPLASMA-EHRLICHIA** eingesetzt. In Kombination mit entsprechender Klinik erhärtet sich die Verdachtsdiagnose aktive Anaplasiose/Ehrlichiose. Zusätzlich ist ein quantitativer Antikörper-Test mittels IFAT (Serumpaar im Abstand von 2–4 Wochen) sinnvoll, um einen Endtiter bzw. einen Titeranstieg („Serokonversion“) zu bestimmen.

Positives Testergebnis

- Der Nachweis von Ak gegen *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis* **mit dazu passender Anamnese/Klinik** weist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine klinische *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis*-Infektion hin.
- Hund hatte Kontakt mit *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis* (Ak-Bildung!).
- Ak können trotz Therapie über Monate bis Jahre persistieren (potentielle chronische Trägartiere).
- Asymptomatische, aber **Anti-*Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis*-Ak-positive** Tiere haben sich zu einem bestimmten Zeitpunkt mit *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis* infiziert. Sie sind somit als potentielle *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis*-Träger anzusehen. Subklinische Tiere können später eine klinische Erkrankung entwickeln, v.a. bei zusätzlicher Koinfektion mit einem weiteren vektorübertragenen Erreger.
- Die Entscheidung zum Start einer Antibiotikatherapie sollte auf einem Immunfluoreszenztest (Serumpaar im Abstand von 2–3 Wochen mit 3-fachem Titeranstieg) kombiniert mit klinischen Symptomen basieren. Die Ak-Persistenz kann über einen längeren Zeitraum bestehen bleiben.

Negatives Testergebnis

- Hund hatte mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen Kontakt mit *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis*.
- Frühes Stadium einer *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis*-Infektion (< 2–3 Wochen post infectionem!). Hund hat noch keine Ak in nachweisbarer Konzentration gebildet. Tiere können zum Zeitpunkt der akuten Erkrankung noch seronegativ sein (Ak-Anstieg ca. ab 14 Tage post infectionem) und daher ein negatives Testergebnis aufweisen.

FASTest® ANAPLASMA -EHRlichia

ad us. vet.

In vitro diagnosticum

Test-kit for the qualitative detection of antibodies against *Anaplasma* spp. (*A. phagocytophilum*, *A. platys*) and against *Ehrlichia canis* in whole blood, plasma or serum of the dog

INSTRUCTIONS FOR USE



3. INFORMATION ON THE SPECIMEN MATERIAL

Exactly 10 µl each (1 drop of attached plastic pipette) 15–25°C warm whole blood (WB, with anticoagulant), plasma (P) or serum (S) are needed. Native blood without anticoagulant must not be used due to potential micro agglutination (e.g. migration delay on the membrane, unspecific reaction)!

Mix the sample material well before use!

Non-cooled (15–25°C), WB, P and S should be tested within 4 hours! At 2–8°C, WB, P and S can be stored up to 4 days. Serum and/or plasma samples can be permanently stored at minimum –20°C.

Keep in mind that the sample material, as well as all used test-kit components, should have reached room temperature at the time of application.

Endogenous and exogenous interfering substances of the sample (e.g. albumin, fibrinogen, lipids, CRP, heterophilic antibodies, especially type IgA, as well as viscosity, pH-value and excess EDTA) as well as native blood can cause interferences (matrix effects) that can influence the target measurement. These can lead to an impaired LF and/or unspecific reactions on T and C.

4. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- No specimen preparation necessary.
- ATTENTION:** Partially filled and/or insufficient mixed EDTA, Citrate or Heparin tubes could create invisible microclots resulting in lateral flow delay and/or unspecific reactions (e.g. greyish shadow like lines).

7. PRECAUTIONS FOR USERS

- The guidelines for working in medical laboratories must be observed. It is recommended to wear disposable gloves and other personal protective equipment (protective clothing, possibly a face mask). Wash and disinfect hands after completing the test.
- Label sample material and associated twin test cassette to ensure a precise assignment.
- Use a new pipette and a new twin test cassette for each sample.
- The buffer diluent contains low concentrations of toxic sodium azide as a preservative, therefore avoid skin/eye contact and/or ingestion.
- The sample material must be seen as potentially infectious and disposed accordingly, together with the used test-kit components.

8. TEST PRINCIPLE

The FASTest® ANAPLASMA-EHRlichia is based on an immunochromatographic "sandwich principle".

The antibodies against *Anaplasma* spp. and/or *Ehrlichia canis* present in the sample react in the conjugate pad with mobile antibodies, which are conjugated to colloidal gold particles. These antibody complexes are migrating along the nitrocellulose membrane ("lateral flow", LF) and bind to fixed recombinant *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp. antigens, forming a pink-purple TEST line (T).

A correct test procedure will be indicated by a second, pink-purple CONTROL line (C).

1. INFORMATION ON THE TEST-KIT

TEST-KIT COMPONENTS

1 test-kit FASTest® ANAPLASMA-EHRlichia contains:

- 2 or 10 twin test cassettes coated with recombinant *Anaplasma* spp. or *Ehrlichia canis* antigens
- 1 dropper bottle A with 1.0 ml or 3.0 ml buffer diluent
- 2 or 10 disposable plastic pipettes
- 1 instructions for use

STABILITY AND STORAGE

Store at 15–25°C Expiry date – see label

APPLICATION AND ABBREVIATIONS

- For veterinary use only LOT Lot number
- In vitro diagnosticum Do not use test-kit components from different kits, lot numbers or beyond stated expiry date.
- Follow instructions for use precisely

T – TEST line, C – CONTROL line, LF – Lateral flow

LIABILITY

The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from the use of this product.

2. INTRODUCTION

Canine Granulocytic Anaplasmosis (GA, *Anaplasma phagocytophilum* [A. p.]), Thrombocytic Anaplasmosis (TA, *Anaplasma platys*) and Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME, *Ehrlichia canis*) belong to the most important vector-borne infectious diseases induced by canine parasites. Co-infections play a major role in both pathogens, therefore, depending on the animals' place of origin and whereabouts, potential other pathogens (e.g. *Borrelia* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp.) or laboratory values indicative of these pathogens (e.g. anaemia, leucocytosis/neutrophilia, hypoalbuminaemia/hypergammaglobulinaemia, kidney values etc.) should be clarified.

In principle, tick territories (endemic area) are potential breeding grounds. Seroprevalences for GA/TA and CME vary widely, depending on country (endemic or non-endemic) and study.

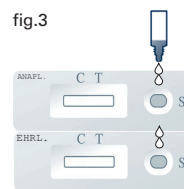
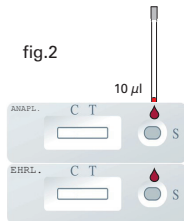
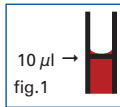
With an incubation time of 2–20 days, *A. phagocytophilum* infections are often subclinical or self-limiting. Clinical symptoms are fever, apathy, stiff muscle, polyarthritis with joint pain/swelling, lameness, weight loss, thrombocytopenia, anaemia, petechial haemorrhages and increasing inflammatory values (CRP, haptoglobin). Subarachnoid haemorrhage could lead to central nervous disorders. The cause of TA is *A. platys*. It occurs worldwide, mainly in the Southern Hemisphere. In most cases, the infection is asymptomatic with mild fever, uveitis, petechiae and ecchymoses. In the laboratory diagnostics, a thrombocytopenia is shown.

CME is characterised by a very long incubation period (Ø 4–5 up to 12–13 years) and an unspecific clinic. It is therefore also referred to as a "silent killer"!

Very few veterinarians are aware of the consequences of such a co-infection from an immunological, therapeutic and diagnostic point of view. Therefore, FASTest® ANAPLASMA-EHRlichia is suitable as a quick, qualitative antibody (ab) detection if an anaplasmosis, ehrlichiosis or a co-infection is suspected. This enables to start immediately further diagnostic investigations as well as therapeutic and prophylactic measures.

5. TEST PROCEDURE

- Remove the twin test cassette from its foil pouch shortly before use. Place it on a flat surface.
- Draw sample up to the mark (± 10 µl sample volume) using the disposable plastic pipette. The meniscus must be above the black line (fig.1). Place the whole sample volume (10 µl) into the sample window S of the Anaplasma test cassette (hold pipette vertically, fig.2). Repeat the whole procedure for the Ehrlichia test cassette.
- Hold the dropper bottle A vertically and place 2 drops (ca. 80–100 µl) of the buffer diluent into the sample window S of the Anaplasma and the Ehrlichia test cassette (fig.3).
- Add 1 additional drop of buffer diluent into the sample window S if there is no beginning LF visible within 1 minute after adding the buffer diluent.



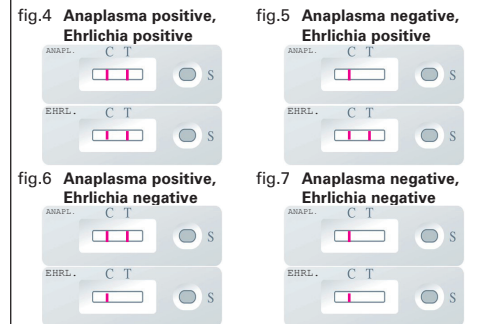
6. READING OF THE TEST RESULT

Read the test result 10 minutes after the buffer solution has been added into the sample window S.

POSITIVE Anaplasma and/or Ehrlichia TEST RESULT (fig.4–6) A pink-purple TEST line of any intensity (varying from very weak to strongly intensive) and a pink-purple CONTROL line appear.

NEGATIVE TEST RESULT (fig.5–7) Only a pink-purple CONTROL line appears. This line indicates, irrespective of its intensity, that the test has been performed properly.

INVALID TEST RESULT No CONTROL line visible. The test should be repeated using a new twin test cassette.



9. INFORMATION FOR THE INTERPRETATION

- The interpretation of the test result should always be based on anamnestic (stay abroad, tick infestation) and clinical data as well as therapy and prophylaxis possibilities.
- Any non-described colour or contour variation of T and C (e.g. greyish, shadow-like lines) has to be considered as unspecific reaction and therefore as negative test result.
- T can vary both in intensity (from weak to strong pink-purple) and in width. Therefore, any pink-purple line appearing within the required incubation time has to be interpreted as positive test result.
- Positive test results may be observed even before the end of incubation. Beyond this time, test results should not be interpreted.
- Due to anticoagulated whole blood and/or red hemoglobin background of the test membrane caused by hemolytic blood samples, the visibility of T could be from worse to not visible.
- For the detection of antibodies, a two-step diagnostics is known to be standard. The first step starts with in-clinic IgG antibody screening test like FASTest® ANAPLASMA-EHRlichia. The suspicion about an active anaplasmosis/ehrlichiosis is substantiated by combination with according clinic. Furthermore, a quantitative antibody testing via IFAT (coupled serum samples at intervals of 2–4 weeks) should be taken to determine the end titre or the titre increase (seroconversion).

Positive test result

- The proof of ab against *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis*, together with anamnesis and clinic, shows with a high likelihood that *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis* can be considered as cause of the acute disease.
- Dog has had contact with *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis* (ab formation!)
- Ab can persist over months to years inspite of therapy (potential chronic carriers).
- Asymptomatic, but anti-*Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis* ab positive animals have been infected with *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis* at a particular time. Therefore, they are potential carriers of *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis*. Subclinical animals could develop clinical symptoms at some indefinite future date, especially in case of coinfection with another vector-transmitted agent.
- The decision starting an antibiotic therapy should be based on indirect immunofluorescence test (coupled serum test in an interval of 2–3 weeks with 3-fold titre increase) combined with clinical symptoms. Persistence of abs could be stable over a long term.

Negative test result

- With high likelihood, dog had no contact with *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis*.
- Early stage of an *Anaplasma* spp./*Ehrlichia canis* infection (< 2–3 weeks post infection!). Dog has not formed abs in detectable concentration. Animals could still be seronegative during acute infection (ab increase from 14 days post infection) resulting in a negative test result.