

ISTRUZIONI PER L'USO

Kit IFA per anticorpi IgG canino anti-Ehrlichia canis

Numero di catalogo	ECG-120
Quantità	120 test
Conservazione	2-8°C

Test in immunofluorescenza per la rivelazione e la determinazione semi-quantitativa della classe di anticorpi IgG contro *Ehrlichia canis* nel siero o nel plasma canino

Esclusivamente per uso diagnostico in vitro



1135 E. Truslow Avenue
Fullerton, California 92831 USA
Tel.: +714 525-7660 • Fax: +714 525-7614
Email: info@fullerlabs.com •
URL: www.fullerlabs.com



MediMark Europe Sarl
11, rue Émile Zola – BP 2332
F-38033 Grenoble Cedex 2 – Francia

USO PREVISTO

Il kit IFA per anticorpi IgG canino anti-*Ehrlichia canis*, destinato alla rivelazione e determinazione semiquantitativa degli anticorpi di classe IgG contro *Ehrlichia canis*, è usato quale sussidio per la diagnosi dell'infezione canina da parte di quest'agente patogeno.

COMPENDIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La *Ehrlichia canis* è diffusa nel mondo prevalentemente nelle regioni tropicali e subtropicali. L'infezione canina è mediata dalla puntura di zecche infettate. L'infezione provocata da questo patogeno induce una specifica risposta anticorpale che, può essere rilevata ed usata quale mezzo indiretto di identificazione di un individuo infetto.

Il substrato delle slides è formato da pozzetti di teflon-mascherato in cui sono fissati cellule di macrofagi di cane (linea cellulare DH82), approssimativamente il 20-30% di queste sono infettate con *Ehrlichia canis* e contengono le caratteristiche morule citoplasmatiche. Il siero del paziente, opportunamente diluito almeno 1:50 con tampone PBS, viene incubato per permettere la reazione degli anticorpi del paziente con la *Rickettsia* intracellulare. Il vetrino viene lavato per eliminare quanto non ha reagito; sui pozzetti del vetrino viene aggiunto il coniugato anti-canino marcato DyLight 488 specifico onde ottenere il complesso antigene-anticorpo. Dopo ulteriore incubazione il vetrino viene lavato per eliminare ogni eccesso di coniugato. La reazione risultante può essere osservata con un microscopio a fluorescenza; una reazione positiva è identificabile con fluorescenza chiaramente definita di colore verde mela delle morule nel citoplasma delle cellule infette. In una reazione negativa si vedono le cellule di colore rossastro o una fluorescenza non specifica diversa da quella riscontrata nel controllo positivo.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

IFA Ag x 12

Vetrini con substrato (10)

Dieci vetrini contenenti dodici pozzetti ciascuno. Ciascun pozzetto contiene cellule DH82 fissate con acetone e infettate con il ceppo OSU/LSU di *Ehrlichia canis* inattivate, confezionate sotto vuoto.

CONJ FITC

Coniugato per IgG, 2.0 mL

Flacone con contagocce, tappo giallo, contenente coniugato anticaino di coniglio coniugato DyLight 488 (catena pesante specifica) con albumina bovina serica e contrastante blue Evans.

CONT +

Controllo Positivo, 0.5 mL

Flacone con contagocce, tappo blu, contenente siero canino alla diluizione di screening 1:50 con titolo ad end-point 1:400.

CONT -

Controllo Negativo, 0.5 mL

Flacone con contagocce, tappo rosso, contenente pool di sieri canini non reattivo alla diluizione di 1:50.

MM

Tampone di Montaggio, 1 mL

Flacone con contagocce, tappo bianco, contenente 50% glicerolo in PBS, pH 7,2.

BUF WASH PBS

PBS, 1 litro

Aggiungere il contenuto di una bustina ad 1 litro d'acqua purificata per ottenere la soluzione tampone a pH 7,2.

PRECAUZIONI E AVVERTENZE

Tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi; evitare il contatto con la pelle o l'ingestione. I vetrini substrato sono stati preparati con antigeni chimicamente inattivati. Devono comunque essere considerati potenzialmente infetti; manipolare con adeguata attenzione.

Modalità di conservazione e manipolazione

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Riportarli a temperatura ambiente prima dell'uso. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

Prelievo e preparazione dei campioni

Usare campioni di siero canino. Se il test viene fatto entro 24 ore dal prelievo, i campioni possono essere conservati tra 2-8°C, altrimenti devono essere aliquotati e congelati a -20°C o inferiore. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.* Per verificare la sierconversione, prelevare i campioni in fase acuta e in fase convalescente a 2, 4 settimane d'intervallo, confermare il cambio di titolo anticorpale.

PROCEDURA

Materiali forniti

Il kit contiene reattivi e materiali sufficienti per 120 determinazioni.

Materiali Richiesti ma Non Forniti

- Acqua purificata (distillata o deionizzata)
- Vetreria da laboratorio da 250 o 500 mL per tamponi di lavaggio PBS
- Provette o micropiastre per le diluizioni manuali
- Pipetta(e) di precisione per le diluizioni manuali
- Vetrini coprioggetto 24 x 50 mm
- Microscopio a fluorescenza con filtri per il sistema FITC (massima eccitazione lunghezza d'onda 490 nm, lunghezza d'onda di emissione media 530 nm) e 400X ingrandimento
- Incubatore a bagno d'acqua a 37°C
- Camera umida per passaggi di incubazione

Avvertenze

- Non usare alcun componente dopo la data di scadenza.
- Il coniugato è fotosensibile ed a protezione è confezionato in contenitore di plastica opaca. Conservare al buio e riporlo subito dopo l'uso.
- Il coniugato contiene blue Evans che può essere cancerogeno. Evitare il contatto con la pelle.
- I liquidi reattivi contengono thimerosal allo 0,01% che potrebbe essere tossico se ingerito

PROCEDIMENTO

Portare tutti I reagenti e I sieri al raggiungimento di temperatura ambiente prima di procedere all'indagine

1. Per i campioni di siero dei pazienti preparare diluizioni di screening 1:50 in PBS. Per sieri, riconosciutamenetivi da precedenti analisi, preparare ulteriori diluizioni seriali in PBS.
2. Per il Controllo Positivo preparare diluizioni in PBS che includano una diluizione sopra ed una sotto di quella riportata come end-point (1:400). Il controllo è confezionato con diluizione 1:50.
3. Dispensare, per ogni diluizione di siero, circa 10 µL in un

pozzetto di reazione ed annotare la posizione per il successivo riferimento. Per ogni sessione d'analisi includere le diluizioni del siero di controllo positivo previste al punto 2, dispensare inoltre in un pozzetto (10 µL) di controllo negativo tal quale.

4. Riporre i vetrini in camera umida per 30 minuti a 37±0.5°C .
5. Rimuovere i vetrini dall'incubatore e dalla camera umida. Lavare i vetrini con un leggero flusso di PBS per tre volte. Lasciare i vetrini a bagno in PBS per almeno 5 minuti.
6. Rimuovere l'eccesso di PBS dai vetrini, eseguire il passaggio successivo evitandone la completa asciugatura.
7. Aggiungere ad ogni pozzetto una goccia (10 µL) di coniugato, riporre nuovamente i vetrini in camera umida nell'incubatore. Incubare 30 minuti a 37±0.5°C. L'incubazione dovrebbe essere fatta al buio per proteggere il coniugato fotosensibile.
8. Lavare i vetrini come al punto 5-6.
9. Aggiungere 2-3 gocce di liquido di montaggio ad ogni vetrino ed applicare il vetrino coprioggetto evitando di intrappolare bolle d'aria.
10. Leggere I vetrini con il substrato con ingrandimento 400X, comparando ogni pozzetto con quanto osservato sui pozzetti Positivo e Negativo. I vetrini possono essere conservati al buio e a 2-8°C per 24 ore.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il siero di Controllo Negativo e le diluizioni del siero di Controllo Positivo dovrebbero essere incluse in ogni sessione d'analisi. Il Controllo Negativo è un esempio di reazione negativa con sia il colore rossastro di contrasto distribuito uniformemente che con una leggera colorazione verdastra uniformemente diffusa. I pozzetti del Controllo Positivo dovrebbero dare un titolo ad end-point compreso tra 1:200 e 1:800. L'intensità di fluorescenza a 1:400 può essere usata come livello di cut-off per la definizione di positività di un campione in esame. Se per i controlli non si riscontrano i valori previsti la sessione d'analisi, deve essere invalidata e ripetuta, tutti i reattivi ed i passaggi della procedura devono essere verificati.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Una reazione positiva appare come una luminosa colorazione (minimo 1+) delle corte forme di corpi inclusi che si vedono nel citoplasma delle cellule infettate . La colorazione specifica è all'interno del citoplasma delle cellule (20-30%) di ogni campo visivo. La dimensione, l'apparenza e la densità delle cellule infette deve essere confrontata con la reazione ottenuta per il Controllo Positivo e Negativo. Morfologie e reattività differenti da quelle osservate nel controllo positivo devono essere considerate non-specifiche.

L'infezione primaria è caratterizzata da un'immediata salita degli anticorpi di classe IgG ed IgM. Il picco massimo di risposta degli anticorpi di classe IgM avviene dopo 3 settimane dall'instaurarsi dell'infezione e rimangono rilevabili per due-tre mesi. Il raggiungimento del picco massimo di risposta degli anticorpi di classe IgG avviene in 7-12 settimane, declina molto più lentamente dei livelli degli anticorpi di classe IgM e rimangono elevati per circa 12 mesi.

CAMPIONI DI SIERO

Positivo a 1:50: Titoli di IgG 1:50 e maggiori indicano un'infezione pregressa (sieropositivo). I sieri positivi dovrebbero essere titolati onde ottenere il valore di end-point per comparazione con valori precedenti o successivi dello stesso paziente.

Negativo a 1:50: Viene considerato negativo per anticorpi *R. conorii*. Se il prelievo è avvenuto immediatamente dopo l'instaurarsi dell'infezione e in particolar modo se era in atto una terapia antibiotica si consiglia un ulteriore prelievo ed analisi.

LIMITAZIONI

Ehrlichia canis è antigenicamente correlata ad *Ehrlichia ewingii* e ad *Ehrlichia chaffeensis*, entrambe patogeni per il cane. Per questo motivo la differenziazione di questi agenti per mezzo delle titolazioni in IFA o in ELISA, senza l'isolamento dell'organismo in colture cellulari o con determinazione in PCR, è problematica. Relativamente alle altre specie di *Ehrlichia* qualche volta sono determinate con IFA, ma le titolazioni hanno un ordine di grandezza più basso rispetto agli altri antigeni di genogruppo omologo.

VALORI ATTESI

La prevalenza degli anticorpi di *Ehrlichia canis* varia in funzione della regione geografica e della popolazione testata..

Revised 5/99
Version C