

**Campioni negativi alla diluizione di screening EHV-1 (1:50) / EHV-4 (1:100):** campioni negativi per anticorpi anti-EHV 1 e/o 4.

La prevalenza di anticorpi anti-EHV varia a seconda delle regioni geografiche e della popolazione analizzata.

## **CONTROLLO DI QUALITA'**

Il controllo negativo e il controllo positivo devono essere ripetute in ogni analisi. Il controllo negativo è un esempio di siero non reattivo. L'intensità di fluorescenza del controllo positivo è un esempio di fluorescenza di media intensità. Se uno dei controlli non reagisce come indicato, l'analisi deve essere ritenuta non valida, i reagenti e i passaggi effettuati devono essere analizzati e il test deve essere ripetuto.

## **PRECAUZIONI**

- Solo per uso veterinario
- Non usare componenti di kit diversi
- Seguire le istruzioni attentamente
- Poiché nessun test può assicurare l'assenza di agenti infettivi, i componenti del test devono essere manipolati con attenzione al fine di evitare il contatto con la pelle o l'ingestione.
- I vetrini sono preparati con antigeni inattivati chimicamente. Tuttavia i vetrini devono essere considerati potenzialmente infettivi e manipolati con le dovute precauzioni.
- Il coniugato è fotosensibile, deve essere conservato lontano dalla luce e a 2-8°C.
- Il coniugato contiene colorante Blu Evans, che può essere cancerogeno. Evitare il contatto con la pelle.
- Non utilizzare i componenti del kit dopo la data di scadenza.

R1 - 29/10/18

# **FLUO HERPESVIRUS 1 e 4**

**Kit per la determinazione degli anticorpi anti-*Herpesvirus* 1 e 4 nel siero o plasma di cavallo**

## **UTILIZZO**

Il kit FLUOHERPESVIRUS 1 e 4 può essere utilizzato per la determinazione qualitativa o semi-quantitativa delle IgG di cavallo dirette verso *Herpesvirus* equino 1 e 4 (EHV-1 e EHV-4).

## **PRINCIPIO DEL TEST**

I vetrini sono suddivisi in pozzetti coperti da Teflon contenenti cellule infettate con EHV, più precisamente nei 5 pozzetti nella linea superiore le cellule sono infettate con EHV-1 e nei 5 pozzetti nella linea inferiore con EHV-4. I campioni da analizzare vengono diluiti in un tampone salino e incubati sui singoli pozzetti al fine di permettere la reazione degli anticorpi del paziente con le cellule infettate con EHV-1 e/o EHV-4 fissate sul vetrino. I vetrini vengono quindi lavati per rimuovere le proteine del siero che non hanno reagito e viene aggiunto un anticorpo anti-IgG di cavallo marcato con fluoresceina (coniugato). Questo coniugato reagisce con i complessi antigene-anticorpo precedentemente formati. Il risultato può essere visualizzato usando un microscopio a fluorescenza standard: le reazioni positive si presentano come colorazione verde fluorescente legata alle proteine di superficie delle cellule infette. Le reazioni negative non mostrano fluorescenza e si presentano con una colorazione di fondo grigio-verde. I campioni positivi possono essere nuovamente analizzati a diluizioni maggiori per determinarne il titolo anticorpale.



## COMPONENTI DEL KIT

- 10 vetrini da 10 pozzetti (5 pozzetti nella linea superiore EHV-1, 5 pozzetti nella linea inferiore EHV-4)
- 1 flacone di anti-IgG di cavallo coniugato con FITC, pronto all'uso.
- 1 flacone di controllo positivo, pronto all'uso.
- 1 flacone di controllo negativo, pronto all'uso.
- 1 flacone di liquido di montaggio

## MATERIALI RICHIESTI NON FORNITI

- tampone salino PBS
- acqua distillata o deionizzata
- bottiglie da 250 o 500 ml per tampone PBS
- provette per la diluizione dei campioni
- pipette di precisione
- coprivetrini da 24x50 mm
- microscopio a fluorescenza con filtro per FITC (eccitazione 490 nm, emissione 530 nm)
- incubatore a 37°C
- camere umide per incubazione dei vetrini

## STABILITA'

I componenti del kit devono essere conservati a 2-8°C. Portare i componenti del kit a temperatura ambiente (20-25°C) prima di eseguire il test.

## CAMPIONI

I campioni di sangue devono essere prelevati da personale qualificato utilizzando sistemi di prelievo approvati. Avvenuta la coagulazione, separare il siero mediante centrifugazione. Trasferire il siero o il plasma in provette sterili con sodio azide 0,1%. Conservare a 2-8°C fino a 5 giorni dal prelievo. Se l'analisi viene effettuata dopo più di 5 giorni, congelare i campioni a -20°C o a temperature inferiori. Campioni prelevati da soggetti con forma acuta devono essere raccolti all'inizio della malattia; a intervalli di due e quattro settimane si possono prelevare ulteriori campioni per rilevare un eventuale variazione del titolo anticorpale durante la convalescenza.

## PROCEDIMENTO

Per lo screening, preparare le seguenti diluizioni dei campioni: 1:50 da utilizzare nei pozzetti EHV-1, 1:100 da utilizzare nei pozzetti EHV-4 in PBS dei campioni non sottoposti a precedenti analisi. Per i sieri risultati positivi in precedenti analisi, preparare diluizioni seriali in PBS partendo dalla diluizione di 1:50 (EHV-1) e 1:100 (EHV-4).

- Il controllo positivo e negativo sono pronti all'uso, non devono essere diluiti.
- Pipettare 20 µl delle due diverse diluizioni dei campioni da analizzare sui due pozzetti associati del vetrino (EHV-1 e EHV-4) e registrarne la posizione su un foglio. Per ogni analisi includere 1 goccia del controllo negativo e del controllo positivo.
- Porre i vetrini in una camera umida e incubare a 37°C per 30 minuti.
- Rimuovere la camera umida dall'incubatore. Togliere il coniugato dal frigo.
- **Procedura di lavaggio:** Scuotere delicatamente le diluizioni del siero dai vetrini e agitare i vetrini gentilmente per 5 minuti in PBS. Ripetere questo passaggio per altri 5 minuti con PBS fresco. Sciacquare brevemente i vetrini con acqua distillata. Scuotere l'acqua dal vetrino e se necessario asciugare la mascherina di Teflon tra i pozzetti con carta assorbente o cotton fioc. Evitare però che i pozzetti si secchino. Se si usa una spruzzetta evitare di agire direttamente sui pozzetti.
- Aggiungere 1 goccia di coniugato su ogni pozzetto dei vetrini, porre i vetrini in camera umida e incubare a 37°C per 30 minuti. L'incubazione deve avvenire al buio poiché il coniugato è fotosensibile.
- Ripetere le operazioni di lavaggio descritte in precedenza.
- Aggiungere 2 gocce di liquido di montaggio su ogni vetrino e coprire con il coprioggetto facendo attenzione ad evitare la formazione di bolle d'aria.
- Esaminare i vetrini al microscopio a fluorescenza ad ingrandimento 200-400x, paragonando l'intensità della fluorescenza di ogni pozzetto con quella dei pozzetti di controllo positivo e negativo. I vetrini possono essere conservati al riparo dalla luce a 2-8°C fino a 7 giorni.

## RISULTATI

La dimensione, la forma e il colore deve essere paragonata con quelle delle reazioni di controllo positivo e negativo. Modelli di reattività differenti da quella del controllo positivo devono essere considerate reazioni aspecifiche.

**Campioni positivi per EHV-1 alla diluizione di screening (1:50):** il titolo di IgG specifiche a una diluizione di 1:50 o superiore è considerato indicativo di un'infezione presente da tempo indeterminato.

**Campioni positivi per EHV-4 alla diluizione di screening (1:100):** il titolo di IgG specifiche a una diluizione di 1:100 o superiore è considerato indicativo di un'infezione presente da tempo indeterminato.

Questi sieri possono essere nuovamente analizzati per determinarne il titolo in paragone con campioni prelevati in un momento successivo dallo stesso cavallo.