

CONTROLLO DI QUALITA'

Il controllo negativo e il controllo positivo devono essere ripetuti per ogni analisi giornaliera. Il controllo negativo è un esempio di siero non reattivo, sia con una colorazione rossa di fondo sia con una trascurabile e uniforme colorazione verde. L'intensità di fluorescenza alla diluizione 1:20 può essere utilizzata come livello cut-off, necessario affinché un paziente possa essere giudicato positivo. 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.

Il controllo negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza o una fluorescenza grigio-verde. Utilizzando il filtro giallo mostra cellule colorate in rosso in seguito all'aggiunta di Blu di Evans.

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.

FLUO HEPATITIS contagiosa

Kit per la determinazione degli anticorpi
anti-*Hepatitis contagiosa* nel siero
o plasma di cane

UTILIZZO

Il kit FLUOHEPATITIS può essere utilizzato per la determinazione qualitativa o semi-quantitativa delle IgG di cane dirette verso *Hepatitis contagiosa canis* (HCC). Il kit permette di effettuare 100 determinazioni qualitative o 25 semi-quantitative.

PRINCIPIO DEL TEST

I vetrini sono suddivisi in pozzetti coperti da Teflon contenenti cellule infettate con HCC inattivato. 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 HCC e con quelle non infettate 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 cane 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. Utilizzando il filtro giallo esse rimangono colorate in rosso al contrario del controllo positivo. I campioni positivi possono essere nuovamente analizzati a diluizioni maggiori per determinarne il titolo anticorpale.

COMPONENTI DEL KIT

- 10 vetrini da 10 pozzetti
- 1 flacone di coniugato
- 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 fosfato salino
- 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) e ingrandimento 400X
- 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. Conservare a 2-8°C. 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 diluizioni 1:40 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 1:40.
- I controlli positivo e negativo sono pronti all'uso.
- Pipettare 20 µl di ogni diluizione dei campioni da analizzare su un pozzetto del vetrino e registrarne la posizione su un foglio. Per ogni analisi includere anche il controllo negativo e il 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. Lavare delicatamente i vetrini con PBS. Asciugare l'eccesso di PBS picchiettando il margine del vetrino su carta assorbente. Ripetere l'operazione 5 volte evitando che i vetrini si asciughino.
- 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.
- Pipettare 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 per 7 giorni.

RISULTATI

La valutazione dei risultati deve essere effettuata utilizzando il filtro verde e quello giallo. Utilizzando il filtro verde tutti i campioni positivi presenteranno cellule colorate positivamente. Utilizzando il filtro giallo tutti i sieri negativi presenteranno cellule colorate in rosso con il colorante Blu di Evans. 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 alla diluizione di screening (1:40): il titolo di IgG specifiche a una diluizione di 1:40 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 precedente o successivo dallo stesso cane.

Campioni negativi alla diluizione di screening (1:40): campioni negativi per anticorpi anti-HCC.

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