

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il controllo positivo deve avere un colore blu nettamente distinguibile dal controllo negativo, che deve risultare incolore.

Positivi: si evidenzierà lo sviluppo del colore azzurro. L'intensità di colore può variare in base alla quantità di antigene presente nel campione.

Negativi: non si avrà colorazione. Porre la piastra su una superficie bianca per facilitare la lettura.

CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Conservare i reagenti tra 2-8°C e non utilizzarli dopo la data di scadenza. Non congelare i componenti del kit.

Il substrato cromogeno è fotosensibile, evitare l'esposizione diretta alla luce.

Il substrato cromogeno prima dell'uso è incolore, un'eventuale colorazione indica una degradazione del reagente, che dovrà essere eliminato.

AVVERTENZE

- ◆ Leggere attentamente le istruzioni.
- ◆ Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente prima dell'utilizzo. Non mescolare reagenti di kit diversi. Non usare i componenti dopo la data di scadenza e non mescolare componenti di lotti diversi.
- ◆ Usare un puntale diverso per ogni campione.
- ◆ Inserire sempre il controllo positivo e negativo ad ogni analisi.
- ◆ Usare esclusivamente campioni di siero o plasma. Alcuni campioni emolitici o lipemici possono dare una lieve colorazione di fondo. In questi casi è necessario ripetere il test dopo aver ottenuto un campione di qualità migliore.
- ◆ Leggere i risultati dopo 10 minuti e non oltre i 15 minuti.

FILARCHECK

*Test ELISA per la determinazione degli antigeni
di *Dirofilaria immitis* nel siero
o plasma di cane*

INTRODUZIONE

La filariosi cardiopolmonare è un'infestazione elmintica a diffusione cosmopolita: il parassita infatti è presente in tutti i continenti con frequenze fortemente variabili. Responsabili della filariosi cardiopolmonare del cane sono i nematodi *Dirofilaria immitis*, localizzati nella maggior parte dei casi nel cuore e nell'arteria polmonare e sue diramazioni.

Il ciclo del cane inizia con la puntura della zanzara (insetto vettore): le larve possono permanere nel derma per 3-6 giorni, poi raggiungono i capillari ematici e linfatici ed infine il cuore o l'arteria polmonare dove si svilupperanno in forme adulte.

La diagnosi di laboratorio della filariosi cardiopolmonare si basa attualmente sulla ricerca e identificazione delle microfilarie e sulla ricerca degli antigeni rilasciati dagli adulti di *D. immitis* nel torrente circolatorio.

Con la ricerca antigenica è possibile rivelare anche la cosiddetta "fase occulta" dovuta alla possibile soppressione delle microfilarie indotta da farmaci o dal sistema immunitario dell'ospite. Inoltre si è rivelata importante ai fini dell'efficacia del trattamento filaricida. Infatti la negativizzazione del test antigenico, effettuato a un intervallo appropriato dalla terapia (in genere 4 mesi), fornisce una prova obiettiva del successo del trattamento macrofilaricida.

DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL TEST

Il test si basa su una reazione ELISA. Ai pozzetti della piastra è adeso un anticorpo monoclonale diretto verso l'antigene circolante di *D. immitis*; il siero di cane viene deponso all'interno dei pozzetti. Se nel siero è presente l'antigene si formerà il complesso antigene-anticorpo (Ag/Ab) fissato alla fase solida. Nel secondo passaggio si aggiunge nel pozzetto un anticorpo coniugato con perossidasi (Ab*) diretto verso un epitopo diverso dello stesso antigene, che si legherà al complesso antigene-anticorpo. Dopo il lavaggio si aggiunge il substrato cromogeno che, in presenza dell'enzima del complesso Ag/Ab/Ab*, darà una reazione di colore azzurro visibile. Se l'antigene non è presente nel siero di cane non si formerà il complesso Ag/Ab e i componenti del siero verranno allontanati nel primo lavaggio.

PRELIEVO DEI CAMPIONI

Prelevare il sangue dall'animale sospetto e centrifugarlo per ottenere il siero o il plasma. E' preferibile utilizzare siero o plasma fresco non emolitico. Conservare a 2-8 °C per non più di 5 giorni oppure congelarlo a -20°C: in tal caso si può utilizzare anche dopo vari mesi.

Usare esclusivamente campioni di siero o plasma. Alcuni campioni emolitici o lipemici possono dare una lieve colorazione di fondo. In questi casi è necessario ripetere il test dopo aver ottenuto un campione di qualità migliore.

CONTENUTO DEL KIT

- 1 piastra a 96 o 48 pozzetti, divisa in file di 8 pozzetti ciascuna. E' utilizzabile anche un singolo pozzetto per volta.
- 1 flacone contenente anticorpo anti-*D. immitis* coniugato con perossidasi. Pronto all'uso.
- 1 flacone contenente controllo positivo pronto all'uso.
- 1 flacone contenente controllo negativo pronto all'uso.
- 1 flacone contenente 100 ml di soluzione di lavaggio 10x.
- 1 flacone contenente substrato cromogeno pronto all'uso.
- 100 o 50 puntali.
- 1 pipetta.
- 1 libretto di istruzioni.

La piastra è chiusa all'interno di un sacchetto contenente una bustina di dissecante; i pozzetti inutilizzati devono essere riposti all'interno del sacchetto chiuso accuratamente, con il dissecante.

INFORMAZIONI SUI LAVAGGI

I lavaggi devono essere effettuati con una pipetta multicanale, dispensando 300 µl in ogni pozzetto, o con una spruzzetta, avendo cura di riempire fino all'orlo tutti i pozzetti ed evitando la formazione di schiuma.

Dopo i tempi di incubazione, i lavaggi devono essere effettuati seguendo le seguenti istruzioni:

- Svuotare il contenuto dei pozzetti rovesciando energicamente la piastra
- Capovolgere la piastra su una carta assorbente tamponando
- Dispensare 300 µl di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
- Agitare delicatamente la piastra, evitando la contaminazione tra un pozzetto e l'altro
- Rovesciare energicamente la piastra per svuotare i pozzetti
- Ripetere la sequenza descritta per 5 volte
- Non lasciare i pozzetti asciutti più tempo di quello strettamente necessario

SOLUZIONE DI LAVAGGIO

Diluire una parte del concentrato fornito nel kit con 9 parti di acqua distillata o deionizzata. La soluzione concentrata 10x può presentare un precipitato sul fondo della bottiglia, che può essere solubilizzato portando la soluzione a temperatura ambiente o ponendola a 37°C per 15 minuti circa. Si consiglia di diluire tutto il contenuto della bottiglia (100 ml), poiché la soluzione diluita è stabile a 2-8°C per un anno.

PROCEDIMENTO DI ANALISI

1. Calcolare il numero necessario di pozzetti: predisporre 1 pozzetto per il controllo negativo, uno per il controllo positivo e uno per ciascun campione da analizzare.
2. Lasciare i pozzetti e i reagenti a temperatura ambiente per almeno 20 minuti prima di iniziare il test.
3. Dispensare 1 goccia del controllo positivo e 1 goccia del controllo negativo nei primi due pozzetti. Aggiungere 30 µl di ogni campione negli altri pozzetti utilizzando la pipetta fornita nel kit con un puntale differente per ogni campione.
4. Aggiungere 2 gocce di coniugato in ogni pozzetto e agitare delicatamente in modo da miscelare uniformemente la soluzione nei pozzetti.
5. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
6. Lavare la piastra 5 volte come descritto in precedenza.
7. Aggiungere 2 gocce del substrato cromogeno in ogni pozzetto e agitare delicatamente in modo da miscelare uniformemente la soluzione nei pozzetti.
8. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti al buio.
9. Leggere i risultati.