

# FLUO ANAPLASMA ph. HORSE

Kit IFA for the detection of anti-Anaplasma phagocytophilum IgG antibodies in equine serum or plasma

## INSTRUCTIONS FOR USE



### INTENDED USE

The FLUO ANAPLASMA ph. HORSE kit is intended for the semiquantitative detection of IgG antibodies to Anaplasma phagocytophilum in equine serum or plasma by indirect immunofluorescence assay.

### TEST PRINCIPLE

Substrate slides consist of Teflon-masked wells containing mixed neutrophils cells, approximately 20-30% of which are infected with Anaplasma phagocytophilum and contain the characteristic cytoplasmic morulae. Equine sera are diluted in buffered saline and incubated in the individual slide wells to allow reaction of patient antibody with Anaplasma ph. antigens on the wells. Slides are then washed to remove unreacted serum proteins, a fluorescence-labelled FITC anti-equine IgG (conjugate) is added. This conjugate is allowed time to react with antigen-antibody complexes. The slides are washed again to remove unreacted conjugate.

The resulting reactions can be visualized using standard fluorescence microscopy, where a positive reaction is seen as sharply defined apple-green fluorescent morulae within the cytoplasm of 20-30% of the cells in each field. A negative reaction is seen as a fluorescence unlike that seen in the positive control well. Positive reactions may then be retested at a higher dilution to determine the highest reactive (endpoint titer).

### TEST COMPONENTS

- 10 x 12 wells substrate slides;
- 1 vial of FITC anti-horse IgG conjugate-ready for use;
- 1 vial of positive control-ready for use;
- 1 vial of negative control- ready for use;
- 1 vial of mounting medium-ready for use;

### MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

PBS buffer (phosphate buffered saline 1X pH 7.2-7.4); test tubes for serum dilutions; precision pipettes and tips; 24x50 mm coverslips; fluorescence microscope with filter system for FITC (fluorescein isothiocyanate, excitation wavelength 465-495, barrier filter 515-555) and 400X magnification; +37°C incubator; humid chamber for slides.

### STORAGE

Kit components should be stored at +2-8°C. Bring them to room temperature (+20-25°C) before performing the test.

### SAMPLE

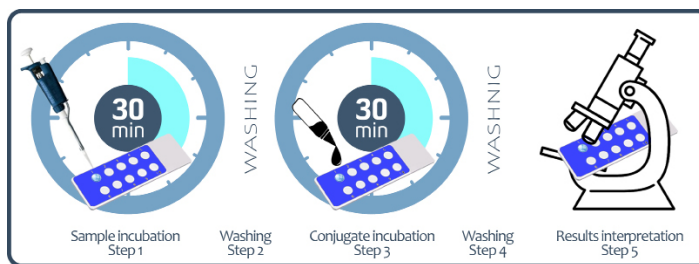
Equine serum or plasma. Allow sample to clot and separate serum by centrifugation. Transfer serum aseptically to a tightly closing sterile container. Store at +2-8°C. If testing is to be delayed longer than 5 days, freezing the sample at -20°C or colder is recommended. Acute specimens should be drawn at the onset of illness; convalescent specimens should be obtained at two and four weeks intervals to check for titer changes.

### TEST PROCEDURE

- Prepare **1:50** screening dilution for all untested sera. For sera found positive on a previous assay run, prepare serial two-fold dilution in PBS starting from the dilution 1:50.
- The positive and negative controls are ready to use. Do not dilute them. For each serum dilution to be tested add 20 µl to one slide well and record the location for later reference. For each assay run include the negative control and the positive control (20 µl).
- Place slides in a humid chamber and incubate for 30 minutes at +37 °C.
- Remove humid chamber from incubator.
- Washing step: Tap remaining serum dilutions gently from the slides and shake the slides gently for 5 minutes in PBS. Repeat this step for another 5 minutes with fresh PBS. Briefly rinse the slides with distilled water. Tap remaining water gently from the slides and, if necessary, dry the Teflon mask between the wells with absorbent paper or cotton bud sticks. However, do not allow the antigen wells to dry out. If using a washing bottle, do not focus the stream directly onto the antigen wells.
- Add to each slide well 1 drop (20 µl) of conjugate, then return slides to the humid chamber for another 30 minutes incubation at +37 °C. Incubation should be in the dark to protect the photosensitive conjugate.
- Repeat washing steps as previously described.
- Add 2 drops of mounting fluid to each slide and place the coverslip on, carefully removing air bubbles caught under the coverslip.
- Evaluate the slides at 400X magnification, comparing each well to the visual intensity and appearance of the Leishmania seen in the positive and negative control wells. Slides may be stored at +2-8°C in the dark for up to 7 days.

### RESULTS

For the evaluation, a fluorescence microscope with a filter system for FITC and 400X magnification is required. The fluorescence pattern (form, density etc.) of the Negative and Positive Control is considered as reference pattern. Patterns of reactivity different than those seen in the controls must be considered non-specific, which means negative.



**Negative test result at 1:50 screening dilution:** report as negative for Anaplasma ph. IgG antibodies.

**Positive test result at  $\geq$  1:50 screening dilution:** a positive reaction appears as a bright, sharp, regular stained inclusion bodies (morulae) seen in the cytoplasm of infected neutrophils.

IgG titers of 1:50 or higher are considered to reflect infection at an undetermined time. A further dilution of the positive samples is recommended to determine the highest dilution that is still positive (endpoint titer).

An acute infection (2 to 4-fold titer increase) can only be determined by the titer determination of a coupled serum test (2 samples in an interval of 2-3 weeks).

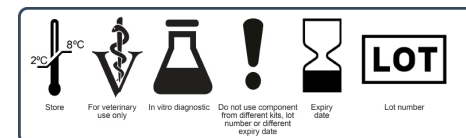
The prevalence of Anaplasma ph. IgG antibodies varies depending upon the geographic region and population being tested. Serological test results should be always interpreted in conjunction with case history and clinical symptoms.

### QUALITY CONTROL

The negative control serum and the positive control serum should be assayed with each daily run. The negative control well is an example of a non-reactive serum, with either uniform red counterstain or slight, but uniform greenish staining. The fluorescence intensity of the positive control is an example of medium intensity fluorescence. If one of the controls does not react as specified, the assay run should be considered invalid, reagent components and procedural steps should be re-checked, and the assay repeated.

### PRECAUTIONS

For veterinary use only. Follow the instructions carefully. Since no testing can assure the absence of infectious agents, these reagents, as well as all serum specimens and equipment coming in contact with these specimens, should be handled with good laboratory practices to avoid skin contact and ingestion. The substrate slides are prepared with chemically inactivated antigens. However, the slides should be considered potentially infectious and handled accordingly. Conjugate is photosensitive, for protection store in the dark and return to storage after use. Conjugate contains Evans blue dye, avoid ingestion and skin contact. Do not use after the expiration date.



**FLUO ANAPLASMA ph. HORSE**

Kit IFA per la ricerca degli anticorpi IgG anti-Anaplasma phagocytophilum nel siero o plasma di cane

**ISTRUZIONI PER L'USO****UTILIZZO**

Il kit FLUO ANAPLASMA ph. HORSE può essere utilizzato per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgG anti-Anaplasma phagocytophilum in campioni di siero o plasma di cavallo con tecnica di immunofluorescenza indiretta.

**PRINCIPIO DEL TEST**

I vetrini sono suddivisi in pozzetti coperti da Teflon contenenti neutrofilii, dei quali circa il 20-30% sono infettati con Anaplasma ph. e contengono le caratteristiche morule citoplasmatiche. 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 gli antigeni di Anaplasma fissati sul vetrino. I vetrini vengono quindi lavati per rimuovere le proteine del campione 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 morule ben definite, di colore verde fluorescente, presenti nel citoplasma delle cellule infettate. Le reazioni negative si presentano con una fluorescenza differente rispetto al controllo positivo. I campioni positivi possono essere nuovamente analizzati a diluizioni maggiori per determinarne il titolo anticorpale.

**COMPONENTI DEL KIT**

- 10 vetrini x 12 pozzetti;
- 1 flacone di coniugato FITC anti-horse IgG - pronto per l'uso;
- 1 flacone di controllo positivo -pronto all'uso;
- 1 flacone di controllo negativo -pronto all'uso;
- 1 flacone di liquido di montaggio -pronto all'uso;

**MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL KIT**

PBS (tampone fosfato salino 1X pH 7,2-7,4); provette e tubi per la diluizione dei campioni; pipette di precisione e puntali; coprivetrini 24x50 mm; microscopio a fluorescenza con filtro per FITC (eccitazione 465-495 nm, filtro 515-555) con ingrandimento 400X; incubatore a +37°C; camera umida per incubare i vetrini.

**CONSERVAZIONE**

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**

Campioni di siero o plasma. Dopo il prelievo, 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 **1:50** in PBS dei campioni non sottoposti a precedenti analisi. Per i sieri risultati positivi in precedenti analisi, preparare 1:2 diluizioni seriali in PBS, partendo dalla diluizione 1:50.
- Il controllo positivo ed il controllo negativo sono pronti all'uso partendo dalla diluizione 1:50. Non devono essere diluiti prima dell'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 il controllo negativo e il controllo positivo (20 µl).
- Porre i vetrini nella camera umida e incubare a +37°C per 30 minuti.
- Rimuovere la camera umida dall'incubatore.
- 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 (20 µl) per ogni pozzetto dei vetrini, porre i vetrini nella 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 400X, paragonando l'intensità della fluorescenza di ogni pozzetto con quella dei pozzetti di controllo positivo e negativo. I vetrini possono essere conservati al buio a +2-8°C fino a 7 giorni.

**RISULTATI**

Per leggere i risultati utilizzare il microscopio a fluorescenza con filtro FITC all'ingrandimento di 400X.

Il pattern di fluorescenza (forma, densità, etc.) del controllo negativo e positivo deve essere considerato il modello di riferimento. Modelli di reattività diversi da quelli presenti nei controlli devono essere considerate reazioni non specifiche (risultato negativo).

**Campioni negativi alla diluizione di screening 1: 50:** negativi per anticorpi anti-Anaplasma ph.

**Campioni positivi alla diluizione di screening  $\geq$  1:50:** il titolo di IgG specifiche ad una diluizione di 1:50 o superiore è considerato indicativo di un'infezione verificatasi da tempo indeterminato. Si consiglia un'ulteriore diluizione dei campioni positivi per determinare la massima diluizione ancora positiva (endpoint titer). Un'infezione acuta (aumento del titolo da 2 a 4 volte) può essere determinata dalla valutazione del titolo di 2 campioni prelevati dallo stesso animale in un intervallo di 2-3 settimane.

La presenza di anticorpi anti-Anaplasma ph. dipende dalle regioni geografiche e dalle popolazioni analizzate. L'interpretazione dei risultati dei test dovrebbe sempre essere basata su anamnesi, sui dati clinici ed esami di laboratorio aggiuntivi.

**CONTROLLO QUALITA'**

Il controllo negativo e il controllo positivo devono essere ripetuti in ogni analisi. Il controllo negativo è un esempio di siero non reattivo, sia con colorazione rossa di fondo o con debole e uniforme colorazione grigiastra. 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. Poiché nessun test può assicurare l'assenza di agenti infettivi, i componenti del test ed i campioni in esame 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, evitare l'ingestione e il contatto con la pelle. Non utilizzare i componenti del kit dopo la data di scadenza.

