

RICERCA DI ANTICORPI ANTI-Trichinella NEL SIERO DI SUINO MEDIANTE ELISA INDIRECTA

INDICE

1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	PRINCIPIO DEL METODO	2
3	BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI	3
4	DEFINIZIONI	3
5	APPARECCHIATURA DI PROVA	3
6	REATTIVI E MATERIALI	4
7	PROCEDIMENTO	5
7.1	Preparazione del campione e dei campioni di controllo	5
7.2	Esecuzione della prova	5
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	6
9	CARATTERISTICHE DEL METODO	7
10	MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	7
ALLEGATO A PRODUZIONE DI ANTIGENE ECRETORE SECRETORE DA LARVE MUSCOLARI DI <i>Trichinella spiralis</i>		8

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento definisce un metodo immunoenzimatico ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), per la determinazione qualitativa di anticorpi anti-*Trichinella* nel siero di suini.

Il metodo può essere utilizzato per lo screening di popolazioni di suino o per indagini epidemiologiche sulla prevalenza dei contatti suino-*Trichinella*.

2 PRINCIPIO DEL METODO

Gli antigeni di secrezione/escrezione (Ag E/S) di *Trichinella spiralis*, parzialmente purificati, vengono adesi sulla parete dei pozzetti di una micropiastre di polistirene in condizioni adatte a conservare l'antigene nel suo stato nativo.

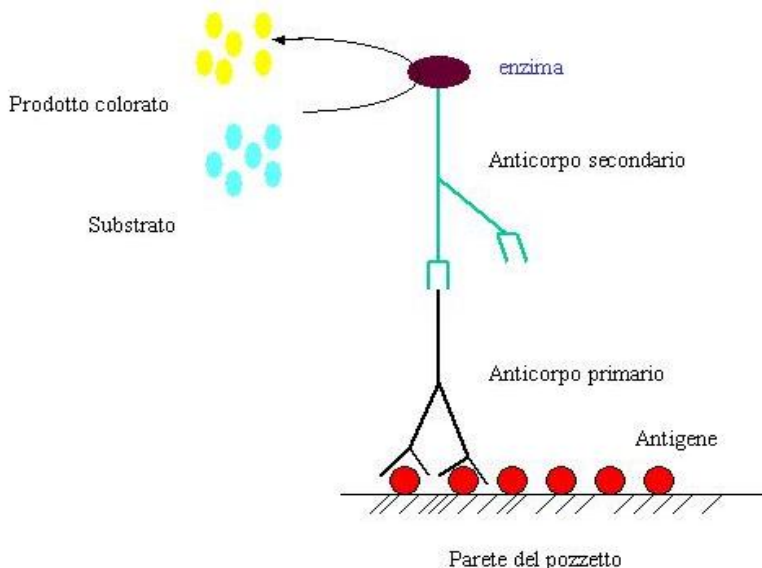
I controlli ed i sieri diluiti dei campioni vengono distribuiti nei pozzetti, consentendo agli anticorpi anti-*Trichinella* eventualmente presenti di legarsi agli Ag E/S adsorbiti.

L'eccesso di campione non legato viene allontanato mediante lavaggio e successivamente si aggiungono a ciascun pozzetto anticorpi secondari anti-IgG di suino coniugati con una perossidasi.

Una seconda incubazione consente al coniugato di legarsi agli anticorpi del suino che si sono eventualmente legati agli Ag E/S adesi alla parete dei pozzetti.

L'eccesso di coniugato viene allontanato mediante lavaggio, l'attività dell'enzima rimasto legato agli anticorpi specifici anti-*Trichinella* del suino viene misurata aggiungendo un substrato cromogeno. Dopo ulteriore incubazione si determina mediante spettrofotometro l'intensità del colore che si sviluppa.

Il risultato viene interpretato per confronto tra l'intensità del colore che si sviluppa nei pozzetti dei campioni e quella dei pozzetti di controllo.



3 BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

Gamble HR, Anderson WR, Graham CE, Murrell KD. 1983. Diagnosis of swine trichinellosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Vet. Parasitol.* 13, 349-361.

OIE/World Organisation for Animal Health, 2018. Trichinellosis (infection with *Trichinella* spp.), Chapter 3.1.20. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. World Organization for Animal Health www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00013.htm.

Gómez-Morales MA, Ludovisi A, Pezzotti P, Amati M, Cherchi S, Lalle M, Pecoraro F, Pozio E; the Ring Trial Participants. 2009. International ring trial to detect anti-*Trichinella* IgG by ELISA on pig sera. *Vet Parasitol.* 166:241-248.

Bruschi F, Gómez-Morales MA, Hill D. 2019. International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *Food and Waterborne Parasitology*, <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2018.e00032>.

4 DEFINIZIONI

4.1 Acronimi

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Ag	Antigene
Ab	Anticorpo
Ag E/S	Antigeni di escrezione/secrezione
BSA	Albumina serica bovina

5 APPARECCHIATURA DI PROVA

5.1 Lavatore automatico di piastre per microtitolazione

5.2 Incubatore, $37 \pm 1^\circ\text{C}$

5.3 Spettrofotometro per micropiastre ELISA, 450 nm

5.4 pH-metro

5.5 Bilancia analitica

5.6 Frigorifero, $1 \pm 8^\circ\text{C}$

5.7 Congelatore, $\leq -50^\circ\text{C}$

5.8 Congelatore, $\leq -15^\circ\text{C}$

5.9 Agitatore magnetico

5.10 Agitatore Vortex

5.11 Micropipette a volume variabile (0.5-10 μL , 15-300 μL , 5-1000 μL)

5.12 Sistema di filtrazione dell'acqua di grado analitico; se non disponibile utilizzare acqua di grado analitico commerciale

5.13 Dispensatore monocanale, se disponibile. In alternativa utilizzare le micropipette.

6 REATTIVI E MATERIALI

6.1 Soluzione di diluizione per sieri e coniugato

BSA	0,50g
Tween 20	0,025mL
Tampone PBS (6.5)	fino a 50 mL

La soluzione è da preparare al momento dell'uso come di seguito riportato.

Pesare 0,50 g di BSA direttamente in una provetta da 50mL, aggiungere circa 40 mL di tampone PBS e agitare su vortex fino alla completa solubilizzazione della BSA. Aggiungere 0,025 mL di Tween 20 (controllare visivamente la presenza di eventuali bolle d'aria all'interno della punta della pipetta), miscelare su vortex e portare a volume.

Se conservata in frigorifero alla temperatura di $1\pm 8^{\circ}\text{C}$ può essere utilizzata entro 24 ore.

6.2 Soluzione di lavaggio

Tween 20	1 mL
Acqua di grado analitico	fino a 2000 mL

La soluzione è da preparare al momento dell'uso come di seguito riportato.

In una beuta da 2 litri aggiungere 1,999 litri di acqua e 1 mL di Tween 20 (controllare visivamente la presenza di eventuali bolle d'aria all'interno della pipetta). Mescolare mediante agitatore magnetico fino a limpidezza della soluzione.

Se conservata in frigorifero alla temperatura di $1\pm 8^{\circ}\text{C}$ può essere utilizzata entro 24 ore.

6.3 Soluzione di bloccaggio

BSA	0,25 g
Tween 20	0,025 mL
Tampone PBS (6.5)	fino a 50 mL

La soluzione è da preparare al momento dell'uso come di seguito riportato.

Pesare 0,25 g di BSA direttamente in una provetta da 50 mL, aggiungere circa 40 mL di tampone PBS e agitare su vortex. Aggiungere 0,025 mL di Tween 20 (controllare visivamente la presenza di eventuali bolle d'aria all'interno della punta della pipetta), miscelare su vortex e portare a volume.

Se conservata in frigorifero alla temperatura di $1\pm 8^{\circ}\text{C}$ può essere utilizzata entro 24 ore.

6.4 Soluzione di arresto

HCl (36,46 g/Mol; d: 1,19)	8,3 mL
Acqua di grado analitico	fino 100 mL

Preparare la soluzione sotto cappa chimica. Conservare a temperatura ambiente. Stabilità 6 mesi.

6.5 Tampone fosfato (PBS), pH $7,3 \pm 0,2$

KH_2PO_4	0,34 g
Na_2HPO_4	1,21 g
NaCl	8,0 g
Acqua di grado analitico	fino 1000 mL

Aggiungere i componenti sopra specificati in circa 750 mL di acqua. Mescolare mediante agitatore magnetico fino a completa solubilizzazione.

Controllare il pH ($7,3 \pm 0,2$) e portare a volume. Conservare a $1\pm 8^{\circ}\text{C}$. Stabilità: 6 mesi.

6.6 Antigeni di escrezione/secrezione (Ag E/S)

Ag E/S liofilizzato, conservato refrigerato (5.6), deve essere reidratato prima dell'utilizzo con acqua di grado analitico e successivamente aliquotato in provette ad una concentrazione proteica di 25 o 50 $\mu\text{g/provetta}$. Le aliquote di Ag E/S reidratato conservate in congelatore a $<-50^{\circ}\text{C}$ (5.7) rimangono stabili per almeno 10 anni. Immediatamente prima dell'uso, Ag E/S deve essere diluito in tampone carbonato

pH $9,6 \pm 0,2$ per raggiungere la concentrazione finale di $5 \mu\text{g/mL}$.

Per la produzione dell'antigene si rimanda all'allegato A del presente metodo.

Preparare il tampone carbonato (pH $9,6 \pm 0,2$) come di seguito riportato:

Na_2CO_3	1,21 g
NaHCO_3	2,92 g
Acqua di grado analitico	fino a 1000 mL

Controllare il pH ($9,6 \pm 0,2$) e portare a volume. Conservare a temperatura ambiente. Stabilità 6 mesi.

6.7 Sieri di controllo positivo per anticorpi anti-*Trichinella* sp. di suino, sieri prelevati da suini infettati sperimentalmente con larve di *Trichinella* spp. Tali sieri sono materiali di riferimento dell'European Union Reference Laboratory for Parasites (EURLP).

6.8 Sieri di controllo negativo per anticorpi anti-*Trichinella*, sieri prelevati da suini domestici e saggiati per la presenza di *Trichinella* mediante digestione cloruro-peptica.

6.9 Cromogeno TMB (3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina).

6.10 Piastre per microtitolazione (o micropiastre per saggio ELISA), a fondo piatto, Nunc.

6.11 Coniugato. Anticorpi secondari anti-IgG di suino coniugati con perossidasi.

Il reagente può presentarsi sia in formulazione liquida che liofilizzato e può essere conservato congelato (temperatura $\leq -50^\circ\text{C}$) fino al momento dell'apertura della confezione.

All'apertura della confezione, il reagente liofilizzato deve essere reidratato con acqua di grado analitico, agitando su vortex fino alla completa solubilizzazione. In questo stato può essere conservato alla temperatura di $1 \div 8^\circ\text{C}$ per una settimana.

Per determinare la diluizione ottimale di lavoro del coniugato, si procede con una curva di titolazione testando diluizioni di lavoro maggiori, minori e uguali a quelle raccomandate dal fornitore per l'utilizzo in ELISA fino a individuare quella alla quale le differenze di densità ottica tra i controlli positivi e negativi sono massime, mantenendo la minima colorazione di fondo, come risulta dal valore di densità ottica del bianco.

in formulazione già liquida oppure risospeso e aliquotato, se conservato congelato (temperatura $\leq -50^\circ\text{C}$) resta stabile per almeno 20 anni. Dopo la data di scadenza la sua idoneità verrà verificata, attraverso i valori di densità ottica rilevati nei controlli positivi e negativi, nelle sedute analitiche nelle quali è utilizzato.

Prima dell'esecuzione del metodo di prova, un'aliquota di coniugato deve essere diluita alla concentrazione ottimale con la soluzione di diluizione di cui al punto 6.1.

Una volta diluito, conservare il coniugato refrigerato ($1 \div 8^\circ\text{C}$) ed utilizzarlo entro 24 ore.

7 PROCEDIMENTO

7.1 Preparazione del campione di prova e dei campioni di controllo

Scongellare i quattro sieri di controllo negativi, i quattro sieri di controllo positivi e i campioni di prova, se congelati. Effettuare tale operazione collocandoli in frigorifero a $1 \div 8^\circ\text{C}$ per almeno 5 ore.

Una volta scongelati conservarli sul banco di lavoro in ghiaccio. Prima dell'utilizzo agitarli mediante vortex.

Diluire 1:50 il campione di prova, il siero di controllo negativo e il siero di controllo positivo. Effettuare la diluizione come segue: in una provetta a fondo conico da 1-2 mL aggiungere $10 \mu\text{L}$ di siero e $490 \mu\text{L}$ di soluzione di diluizione (vedi punto 6.1).

Conservare quindi in frigorifero a $1 \div 8^\circ\text{C}$ fino al momento dell'uso. Stabilità: 1 giorno

7.2 Esecuzione della prova

Prelevare dal frigorifero (temperatura $1 \div 8^\circ\text{C}$) le micropiastre necessarie per l'uso.

Dispensare, in ciascun pozzetto, $100 \mu\text{L}$ di Ag E/S diluito (6.6) con dispensatore monocoloniale (5.13), in alternativa utilizzare micropipetta con puntali ed incubare 1 ora a 37°C (5.2).

Lavare 3 volte mediante lavapiastre automatico (5.1) con soluzione di lavaggio (6.2).

Aggiungere, in ciascun pozzetto, 200 μ L di soluzione di bloccaggio (6.3) ed incubare 1 ora a 37°C.

Lavare 3 volte nel lavapiastre automatico (5.1) con soluzione di lavaggio (6.2).

Dispensare, in duplicato, 100 μ L di ciascuno dei controlli positivi diluiti nei pozzetti PS1, PS2, PS3 e PS4, dei controlli negativi diluiti nei pozzetti NS1, NS2, NS3 e NS4, dei campioni diluiti nei pozzetti SSxx, e 100 μ L di soluzione di diluizione (6.1) nei pozzetti BIANCO 1 e BIANCO 2.

Incubare per 30 minuti a 37°C (5.2).

Schema di distribuzione

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PS1	PS1	SS1	SS5	SS9	SS13	SS17	SS21	SS25	SS29	SS33	SS37
B	PS2	PS2	SS1	SS5	SS9	SS13	SS17	SS21	SS25	SS29	SS33	SS37
C	PS3	PS3	SS2	SS6	SS10	SS14	SS18	SS22	SS26	SS30	SS34	SS38
D	PS4	PS4	SS2	SS6	SS10	SS14	SS18	SS22	SS26	SS30	SS34	SS38
E	NS1	NS1	SS3	SS7	SS11	SS15	SS19	SS23	SS27	SS31	SS35	SS39
F	NS2	NS2	SS3	SS7	SS11	SS15	SS19	SS23	SS27	SS31	SS35	SS39
G	NS3	NS3	SS4	SS8	SS12	SS16	SS20	SS24	SS28	SS32	SS36	BIANCO
H	NS4	NS4	SS4	SS8	SS12	SS16	SS20	SS24	SS28	SS32	SS36	BIANCO

Legenda: PS1-PS4: sieri di controllo positivi; NS1-NS4: sieri di controlli negativi; SS1-SS39: campioni di sieri prova dispensati in duplicato; BIANCO: soluzione di diluizione dei sieri.

Lavare 3 volte nel lavapiastre automatico (5.1) con soluzione di lavaggio (6.2).

Dispensare, in ogni pozzetto, 100 μ L di coniugato diluito (6.11) ed incubare 1 ora a 37°C (5.2).

Lavare 3 volte nel lavapiastre automatico (5.1) con soluzione di lavaggio (6.2).

Dispensare, in ogni pozzetto, 100 μ L di cromogeno TMB (6.9) ed incubare per 10 minuti a temperatura ambiente.

Bloccare la reazione aggiungendo 50 μ L di soluzione di arresto (6.4) ad ogni pozzetto e leggere la reazione a 450 nm in spettrofotometro per micropiastre (5.3).

8 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Affinché i risultati della prova siano considerati validi, tutti i seguenti criteri devono essere soddisfatti:

- il valore di densità ottica dei campioni di controllo negativi non deve essere superiore al valore del *cut off*, 0,338 DO, determinato in sede di validazione del metodo.
- Il valore di densità ottica dei campioni di controllo positivi deve essere maggiore di 0,7 unità di assorbanza
- la differenza in densità ottica tra due misure effettuate su uno stesso campione di controllo positivo in condizioni di ripetibilità stretta deve essere uguale o inferiore a 0,15 unità di assorbanza e su un campione di controllo negativo deve essere uguale oppure inferiore a 0,05 unità di assorbanza, in almeno 6 degli 8 controlli presenti nella piastra della sessione analitica.

Se anche uno solo dei criteri su citati non rientra nei valori specificati, i risultati non devono essere considerati validi e la prova deve essere ripetuta.

Per ogni controllo positivo, controllo negativo e campione di prova calcolare la media tra i due duplicati ($\bar{x}$).

Sottrarre la media dei valori di densità ottica (DO) del bianco da ogni valore medio di densità ottica dei duplicati dei campioni di controllo positivi, negativi e dei campioni di prova.

Selezionare il valore di densità ottica più alto fra quello dei sieri di controllo positivi (SPmax) e per ogni campione calcolare l'indice di estinzione (Ie) secondo la seguente espressione:

$$I_e = \frac{\bar{x}}{SP_{max}} \cdot 100$$

Il risultato della prova è **POSITIVO** (presenza di anticorpi anti-*Trichinella*) se l'indice di estinzione (I_e) è $\geq 18\%$.

Il risultato della prova è **NEGATIVO** (assenza di anticorpi anti-*Trichinella*) se l'indice di estinzione (I_e) è $< 18\%$.

9 CARATTERISTICHE DEL METODO

Il presente metodo è stato caratterizzato in termini di sensibilità, specificità e ripetibilità. I risultati sono stati utilizzati per confermare che il metodo è adatto allo scopo previsto e sono riportati nel relativo fascicolo di validazione, al quale si rimanda.

10 MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE

Il presente metodo di prova può essere eseguito solo da personale autorizzato.

Poiché si manipolano sieri, potenzialmente infetti da patogeni zoonotici, gli operatori che manipolano tali sieri dovranno essere dotati di dispositivi individuali di protezione come guanti monouso e camici.

ALLEGATO A

PRODUZIONE DI ANTIGENI ECRETORI/SECRETORI DA LARVE MUSCOLARI DI *Trichinella spiralis*

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Scopo del presente allegato è definire le modalità di produzione di antigeni di secrezione ed escrezione di *Trichinella spiralis*.

Il prodotto può essere usato come antigene nelle determinazioni sierologiche che hanno come finalità la ricerca di anticorpi anti-*Trichinella* spp.

2 RIFERIMENTI

Gamble HR, Anderson WR, Graham CE, Murrell KD. 1983. Diagnosis of swine trichinellosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. Vet. Parasitol. 13,349-361.

Gamble HR, Rapic D, Marinculic A, Murrell KD. 1988. Evaluation of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis. Vet. Parasitol. 30, 131-137.

OIE/World Organisation for Animal Health, 2018. Trichinellosis (infection with *Trichinella* spp.), Chapter 3.1.20. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. World Organization for Animal Health www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00013.htm.

3 DEFINIZIONI

DO Densità ottica

Ag E/S Antigeni di Secrezione ed Escrezione (Ag E/S) di *Trichinella spiralis*

4 MATERIALE DA UTILIZZARE

4.1 Apparecchiature

Incubatore a 37±2°C con 4-5% CO₂

Spettrofotometro UV/VIS

Congelatore ≤-15°C

Frigorifero, 1÷8°C

Congelatore ≤-50°C

Cappa a flusso laminare

Micropipette a volume variabile (0.5-10 µL, 15-300 µL, 5-1000 µL)

Pipette da 1, 5, 10, 25 mL

Microscopio invertito

Agitatore magnetico

Centrifuga refrigerata

4.2 Reattivi e materiali

4.2.1 Larve muscolari di *Trichinella spiralis* in sospensione

4.2.2 Fosfato salino tamponato (PBS), pH 7,3±0,2

KH₂P04

0,34 g

Na ₂ HP04	1,21g
NaCl	8,0 g
Acqua di grado analitico	fino 1000 mL

Sciogliere i componenti in 750 mL di acqua mediante agitazione magnetica. Controllare il pH ($7,3 \pm 0,2$) e portare la soluzione al volume finale. Sterilizzare per filtrazione con filtro 0,22 μ m (4.2.7). Conservare alla temperatura di $1 \div 8^{\circ}\text{C}$. Stabilità: 6 mesi.

4.2.3 PBS con antibiotici 5x:

PBS (4.2.2)	950 mL
soluzione Penicillina/Streptomicina o Antibiotico/Antimicotico (4.2.6)	50 mL

Sterilizzare per filtrazione con filtro 0,22 μ m (4.2.7). Conservare alla temperatura di $1 \div 8^{\circ}\text{C}$. Stabilità: 2 mesi.

4.2.4 RPMI 1640 con antibiotici 5x:

RPMI 1640	475 mL
soluzione Penicillina/Streptomicina o Antibiotico/Antimicotico (4.2.6)	25 mL

Sterilizzare per filtrazione con filtro 0,22 μ m (4.2.7).

Conservare alla temperatura di $1 \div 8^{\circ}\text{C}$. Stabilità: 2 mesi.

4.2.5 Terreno RPMI completo

RPMI 1640	480 mL
HEPES 1M	5 mL
L-Glutamina 0,2M	5 mL
Sodio piruvato 0,1M	5 mL
soluzione Penicillina/Streptomicina o Antibiotico/Antimicotico (4.2.6)	5 mL

Sterilizzare per filtrazione con filtro 0,22 μ m (4.2.7).

Conservare alla temperatura di $1 \div 8^{\circ}\text{C}$. Stabilità: 2 mesi.

4.2.6 Soluzione di Penicillina/Streptomicina o Antibiotico/Antimicotico (confezione 100x).

4.2.7 Filtri da 0,22 μ m, sterili con contenitore.

4.2.8 Provette per concentrazione per ultrafiltrazione, cut-off 5kDa

4.2.9 Reagente per la determinazione del contenuto proteico in vitro.

4.2.10 Dispositivo per dialisi, membrana di 3.500 MWCO.

4.2.11 Cocktail di inibitori delle proteasi.

Fiasche per colture cellulari.

Provette a fondo conico da 15 e 50 mL.

Piastre da 96 pozzetti.

5 MODALITÀ' OPERATIVE

- Preriscaldare le soluzioni 4.2.2, 4.2.3 e 4.2.4 a circa 37°C .
- Determinare la concentrazione delle larve (4.2.1) mediante conta al microscopio.
- Distribuire le larve, fino ad un massimo di 5×10^5 larve in provette da 50 mL sterili a fondo conico e lavare tre volte mediante sedimentazione con PBS con antibiotici 5x (4.2.3). Ad ogni lavaggio agitare delicatamente la provetta per eliminare i batteri aderenti alla superficie delle larve. Successivamente, eliminare la soluzione di lavaggio aspirando con una pipetta.
- Lavare ancora 5 volte le larve, mediante sedimentazione in una provetta sterile a fondo conico da 50 mL con terreno RPMI 1640 contenente antibiotici 5x (4.2.4). Risospendere le larve in terreno RPMI 1640 completo (4.2.5) per ottenere 25×10^3 larve/mL (partendo da 5×10^5 , risospendere il totale

di larve in 20 mL di terreno RPMI 1640 completo). Effettuare tali operazioni sotto cappa a flusso laminare.

- e) Aliquotare, in fiaschette per coltura cellulare, 20 mL di terreno RPMI 1640 completo (4.2.5) e aggiungere 5 mL della sospensione di larve di cui al punto “d”, ottenendo una concentrazione finale di larve pari a circa 5×10^3 larve/mL.
- f) Incubare le fiaschette in incubatore a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ in 5% CO_2 per 16-18 h. Mantenere le fiaschette in posizione verticale e con il tappo svitato, se le fiaschette sono di tipo non ventilato.
- g) Dopo un massimo di 18 ore, controllare le colture al microscopio per verificare la vitalità delle larve, constatando la presenza di movimento, e l'assenza di contaminazione batterica e fungina.
- h) Sotto la cappa a flusso laminare, trasferire il contenuto delle fiaschette in provette sterili a fondo conico da 50 mL. Lasciare sedimentare le larve controllando visivamente la completa sedimentazione.
- i) Aspirare il surnatante (Ag E/S) e filtrarlo attraverso un filtro da $0,22 \mu\text{m}$ (4.2.7). Scartare le larve.
- j) Mantenere gli Ag E/S così ottenuti alla temperatura di $1 \pm 8^\circ\text{C}$ fino alla fase di concentrazione se effettuata entro le 24 ore, altrimenti procedere con il congelamento. Per procedere con la successiva fase di concentrazione, il volume di partenza deve essere di almeno 150 mL.
- k) Riempire la provetta per concentrare (4.2.8) con 15 mL di Ag E/S filtrato (punto i).
- l) Concentrare gli Ag E/S con provette di ultrafiltrazione con cut-off di 5kDa (4.2.8) centrifugando a 3000 g per 30 minuti in centrifuga refrigerata (temperatura $1 \pm 8^\circ\text{C}$).
- m) Recuperare l'eluato in provette da 50 mL e conservarlo a $1 \pm 8^\circ\text{C}$ fino al punto “p”.
- n) Ripetere i punti da “k” a “m” fino ad esaurimento della soluzione di Ag E/S (punto i).
- o) Procedere con centrifugate successive finché il volume finale presente sulla cella di concentrazione delle provette per concentrazione non risulti di circa 10 mL.
- p) Determinare la concentrazione proteica sia di Ag E/S che dell'eluato, con il reagente per la determinazione proteica (4.2.9).
- q) Verificare con spettrofotometro che il rapporto di densità ottica (DO) a 280nm/260nm sia ≥ 1 .
- r) Se il rapporto di DO a 280nm/260nm è < 1 , la soluzione viene scartata in quanto contaminata da DNA.
- s) Dializzare (4.2.10) Ag E/S concentrato verso PBS (4.2.2) ad una temperatura di $1 \pm 8^\circ\text{C}$ per un minimo di 4 ore.
- t) Aggiungere agli Ag E/S $1 \mu\text{L}/\text{mg}$ di cocktail di inibitori di proteasi (4.2.11).
- u) Se la concentrazione proteica è < 1 mg di proteine totali, conservare Ag E/S prodotto in congelatore in attesa di una successiva produzione per raggiungere un minimo di 1 mg di proteine.
- v) Se la concentrazione proteica è ≥ 1 mg, la produzione di Ag E/S costituirà un lotto di antigene (numero progressivo/anno) che verrà aliquotato in provette ad una concentrazione di proteine totali pari a 0,5 mg/provetta e conservato in congelatore fino al momento della liofilizzazione.
- w) Assegnare a ciascuna aliquota un numero identificativo composto da numero progressivo/anno. Le aliquote possono essere congelate o liofilizzate.
- x) Le aliquote di Ag E/S congelate ($T < -50^\circ\text{C}$) sono considerate stabili per 10 anni.
- y) Le aliquote di Ag E/S liofilizzate e conservate in frigorifero ($1 \pm 8^\circ\text{C}$), sono considerate stabili per 20 anni, in assenza di umidità all'interno della provetta.

Quando necessario, ricostituire l'aliquota liofilizzata di Ag E/S in 100 μL di acqua di grado analitico così da ottenere la concentrazione di $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Allestire sotto aliquote da 10 μL così da avere una concentrazione di 50 $\mu\text{g}/\text{aliquota}$. Queste sotto aliquote vengono identificate con numero lotto/anno/data preparazione. Una aliquota da 50 μg è sufficiente per analizzare una piastra ELISA completa. Le aliquote possono essere congelate ($T < -50^\circ\text{C}$). Il prodotto è stabile per 10 anni se non vengono alterate le condizioni di conservazione.

5.1 Controllo qualità

Il lotto di Ag E/S si considera idoneo per l'utilizzo se tutti i seguenti criteri sono soddisfatti:

- a) assenza di contaminazione batterica e fungina nelle fiaschette di coltura al termine del periodo di incubazione, stabilita mediante osservazione microscopica diretta ad ingrandimento 400x come specificato al punto 5 g);
- b) presenza di larve vitali (motilità), come specificato al punto 5 g);
- c) rapporto di DO a 280nm/260nm del preparato di antigene finale ≥ 1 , come specificato al punto 5 q).

6 MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE

Il metodo deve essere eseguito da operatori addestrati. I dispositivi individuali di protezione sono rappresentati da guanti monouso e camici.