

RICERCA DI ANTICORPI ANTI-*Opisthorchis* NEL SIERO UMANO 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	4
6	REATTIVI E MATERIALI	4
7	PROCEDIMENTO	6
	7.1 Preparazione del campione e dei campioni di controllo	6
	7.2 Esecuzione della prova	6
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	7
9	CARATTERISTICHE DEL METODO	7
10	MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	7

ALLEGATO A PRODUZIONE DI ANTIGENI ESCRETORI/SECRETORI DA VERMI
ADULTI DI *Opisthorchis felinus*

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-*Opisthorchis* sp. nel siero umano.

Il metodo può essere utilizzato per la diagnosi sierologica dell'opisthorchiasi umana.

2 PRINCIPIO DEL METODO

I trematodi parassiti del genere *Opisthorchis* sono trasmessi all'uomo attraverso il consumo di pesci d'acqua dolce appartenenti principalmente alla famiglia Cyprinidae. Il genere *Opisthorchis* comprende le specie *O. felineus* ed *O. viverrini*, la prima diffusa in Europa, Federazione Russa e Siberia, la seconda specie invece diffusa nel Sud-est asiatico (Laos, Cambogia, Thailandia). I parassiti adulti si localizzano nelle vie biliari e causano stanchezza, perdita di peso, diarrea, ed episodi di ittero con o senza febbre. Nelle infezioni croniche si possono sviluppare ipertensione portale, infiammazione e fibrosi dell'epitelio delle vie biliari, compresa la possibile invasione del dotto pancreatico. Il colangiocarcinoma, può sopraggiungere a complicare i quadri tardivi della malattia.

L'opisthorchiasi può essere diagnosticata sia mediante il riconoscimento delle uova del parassita nelle feci, sia mediante metodi sierologici che consentano di rilevare la presenza di anticorpi specifici anti-*Opisthorchis* sp., come ad esempio il metodo ELISA.

Gli antigeni di escrezione/secrezione (Ag E/S) di *O. felineus*, parzialmente purificati, vengono adesi sulla parete dei pozzetti di una micropiastra di polistirene in condizioni adatte a conservarli nel loro stato nativo.

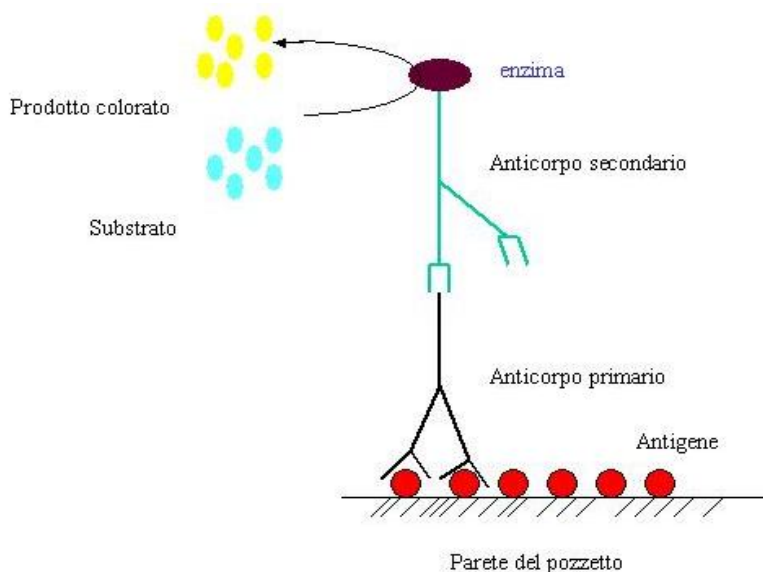
I campioni diluiti dei sieri di controllo e di quelli da saggiare vengono distribuiti nei pozzetti, consentendo agli anticorpi anti-*Opisthorchis* eventualmente presenti di legarsi agli Ag E/S adsorbiti.

L'eccesso di campione non legato è rimosso mediante lavaggio e, successivamente, si aggiungono a ciascun pozzetto anticorpi secondari anti-IgG umana coniugati con perossidasi.

Una seconda incubazione consente al coniugato di legarsi agli anticorpi specifici anti-*Opisthorchis* che si sono eventualmente legati agli Ag E/S adesi alla parete del pozzetto.

L'eccesso di coniugato è eliminato mediante lavaggio e l'attività dell'enzima, rimasto legato agli anticorpi specifici anti-*Opisthorchis*, è misurata aggiungendo un substrato cromogeno. Dopo un'ulteriore incubazione, l'intensità del colore che si sviluppa è rilevata mediante uno spettrofotometro.

Il risultato è interpretato per confronto tra l'intensità del colore che si sviluppa nei pozzetti contenenti i sieri da saggiare e quella dei pozzetti controllo contenenti i sieri di controllo.



3 BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

Nöckler K, Dell K, Schuster R, Voigt WP. Indirect ELISA for the detection of antibodies against *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) in foxes. *Vet Parasitol.* 2003;110:207–15.

Armignacco O, Caterini L, Marucci G, Ferri F, Bernardini G, Natalini Raponi G, Ludovisi A, Bossù T, Gomez Morales MA, Pozio E. Human illnesses caused by *Opisthorchis felinus* flukes in Italy. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:1902-5.

De Liberato C, Scaramozzino P, Brozzi A, Lorenzetti R, Di Cave D, Martini E, Lucangeli C, Pozio E, Berrilli F, Bossù T. Investigation on *Opisthorchis felinus* occurrence and life cycle in Italy. *Vet Parasitol.* 2011; 177:67-71.

Traverso A, Repetto E, Magnani S, Meloni T, Natrella M, Marchisio P, Giacomazzi C, Bernardi P, Gatti S, Gomez Morales MA, Pozio E. A large outbreak of *Opisthorchis felinus* in Italy suggests that opisthorchiasis develops as a febrile eosinophilic syndrome with cholestasis rather than a hepatitis-like syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:1089-1093.

Armignacco O, Ferri F, Gomez Morales M A, Caterini L, and Pozio E. Cryptic and asymptomatic *Opisthorchis felinus* infections. *Am J Trop Med and Hyg.* 88:364-368.

Papalini C, Gomez Morales MA, Mercuri A, Stolaj E, Brancaleoni MG, Fusco Moffa I, Lo Vaglio G, Ludovisi A, Marucci G, Francisci G. A new human opisthorchiasis outbreak in Central Italy: a never ending story. *Infection* 2025; 53:175-181.

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, scostamento massimo risoluzione $\pm 0,3$ pH
- 5.5 Bilancia analitica
- 5.6 Frigorifero, $1 \div 8^\circ\text{C}$
- 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 (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 Multipipette Eppendorf®, se disponibile. In alternativa utilizzare le micropipette.

6 REATTIVI E MATERIALI

- 6.1 Soluzione di diluizione per sieri e coniugato

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

La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso come di seguito riportato.

- Pesare 0,50 g di BSA direttamente in una provetta da 50 mL,
- aggiungere circa 40 mL di tampone PBS,
- agitare su vortex fino alla completa solubilizzazione della BSA,
- aggiungere 0,05 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 $1 \div 8^\circ\text{C}$, la soluzione deve essere utilizzata entro 24 ore.

- 6.2 Soluzione di lavaggio

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

La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso come di seguito riportato:

- In una beuta da 2 litri porre 1,999 litri di acqua,
- aggiungere 1 mL di Tween 20 (controllare visivamente la presenza di eventuali bolle d'aria all'interno della pipetta).
- Mescolare mediante agitatore magnetico finché la soluzione non risulterà limpida.

Se conservata in frigorifero alla temperatura di $1 \div 8^\circ\text{C}$, la soluzione 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 deve essere preparata 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 $1\pm 8^{\circ}\text{C}$, la soluzione 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. La soluzione può essere conservata a temperatura ambiente per 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)

Conservare Ag E/S a temperatura $\leq -50^{\circ}\text{C}$ (5.7), diluire immediatamente prima dell'uso in tampone carbonato (pH $9,6 \pm 0,2$) per raggiungere la concentrazione finale di $2\text{ }\mu\text{g/mL}$. Per la produzione di Ag E/S si rimanda all'allegato A del presente metodo.

Preparare il tampone carbonato (pH $9,6 \pm 0,2$) da utilizzare per la diluizione di Ag E/S come di seguito:

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

Controllare il pH (pH $9,6 \pm 0,2$) e portare a volume.

Conservare a temperatura ambiente. Stabilità 6 mesi.

6.7 Sieri di controllo positivi per anticorpi anti-*Opisthorchis* provenienti da soggetti con opisthorchiasi confermata dalla presenza di uova di *Opisthorchis* nelle feci.

6.8 Sieri di controllo negativi per anticorpi anti-*Opisthorchis* provenienti da soggetti risultati idonei alla donazione di sangue ed emocomponenti secondo i protocolli previsti dal DM 3 marzo 2005 (Gazz. Uff. 13 aprile 2005 n. 85).

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 umana coniugati con perossidasi.

Il reagente può presentarsi sia in formulazione liquida che liofilizzato e può essere conservato congelato (temperatura $<50^{\circ}\text{C}$) fino al momento dell'apertura della confezione.) 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 $1\pm 8^{\circ}\text{C}$ 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.

Il coniugato, 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. 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 e dei campioni di controllo

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

Una volta scongelati conservarli sul bancone di lavoro in ghiaccio. Prima di utilizzarli agitarli mediante vortex.

Diluire 1:200 i campioni di prova, i sieri di controllo negativi e i sieri di controllo positivi. Effettuare la diluizione come segue: in una provetta a fondo conico da 1-2 mL aggiungere 2 μL di siero e 398 μL 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 μL di Ag E/S diluito (6.6) con dispensatore monocanale (5.13), in alternativa utilizzare una 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 μL di soluzione di bloccaggio (6.3) con dispensatore monocanale (5.13), in alternativa utilizzare una micropipetta con puntali 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 duplicato, 100 μL 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 μL 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	SS 29	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 controllo negativi; SS1-SS39: campioni di sieri oggetto d'analisi 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 μL 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).

Aggiungere 100 μL di cromogeno TMB (6.9) ed incubare per 10 minuti a temperatura ambiente.

Bloccare la reazione aggiungendo 50 µL di soluzione di arresto (6.4) ad ogni pozzetto e leggere la reazione a 450 nm nello 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* determinato in sede di validazione del metodo (le 17%);
- 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 sei degli otto controlli presenti nella sessione analitica.

Se anche uno solo dei criteri succitati 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 (I_e) secondo la seguente equazione:

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

Il risultato della prova è **POSITIVO** (presenza di anticorpi anti-*Opisthorchis*) se l'indice di estinzione (I_e) è $\geq 17\%$

Il risultato della prova è **NEGATIVO** (assenza di anticorpi anti-*Opisthorchis*) se l'indice di estinzione (I_e) è $< 17\%$

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, gli operatori che li manipolano dovranno essere dotati di dispositivi individuali di protezione come guanti monouso e camici.

ALLEGATO A

PRODUZIONE DI ANTIGENE ECRETORE/SECRETORE DA VERMI ADULTI DI *Opisthorchis felineus*

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Scopo del presente documento è definire le modalità di produzione di antigeni ES di *Opisthorchis felineus*.

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

2 RIFERIMENTI

Mulvenna J, Sripa B, Brindley PJ, Gorman J, Jones MK, Colgrave ML, Jones A, Nawaratna S, Laha T, Suttiaprapa S, Smout MJ, Loukas A. 2010. The secreted and surface proteomes of the adult stage of the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Proteomics*, 10:1063-78.

Smout MJ, Laha T, Mulvenna J, Sripa B, Suttiaprapa S, Jones A, Brindley PJ, Loukas A. 2009. A granulin-Like growth factor secreted by the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, promotes proliferation of host cells. *PLoS Pathog*, 5(10).

Thuwajit C, Thuwajit P, Uchida K, Daorueang D, Kaewkes S, Wongkham S, Miwa M. 2006. Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product. *World J Gastroenterol*, 14: 3585-3592.

3 DEFINIZIONI

DO Densità ottica

Ag E/S Antigeni di Secrezione ed Escrezione (Ag E/S) di *Opisthorchis felineus*

4 MATERIALE DA UTILIZZARE

4.1 Apparecchiature

Incubatore a 37±1°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, 50-1000 µL)

Pipette da 1, 5, 10, 25 mL

Microscopio invertito

Agitatore magnetico

Centrifuga refrigerata

4.2 Reattivi e materiali

4.2.1 Vermi adulti di *O. felineus* 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 (4.2.6). Conservare alla temperatura di $1\pm 8^{\circ}\text{C}$. Stabilità sei mesi.

4.2.3 PBS con antibiotici 5 x:

PBS (4.2.2)	950 mL
soluzione Penicillina/Streptomicina o Antibiotico/Antimicotico (4.2.5)	50 mL

Sterilizzare per filtrazione con filtro 0,22 μ m (4.2.6). Conservare alla temperatura di $1\pm 8^{\circ}\text{C}$. Stabilità due mesi.

4.2.4 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 (4.2.5)	5 mL

Sterilizzare per filtrazione con filtro 0,22 μ m (4.2.6). Conservare alla temperatura di $1\pm 8^{\circ}\text{C}$. Stabilità due mesi.

4.2.5 Soluzione di Penicillina/Streptomicina o Antibiotico/Antimicotico (confezione 100X).

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

4.2.7 Provette per concentrazione per ultrafiltrazione, cut-off 5kDa.

4.2.8 Dispositivo per dialisi, membrana di 3.500 MWCO.

4.2.9 Reagente per la determinazione del contenuto proteico *in vitro*.

4.2.10 Cocktail di inibitori delle proteasi.

Piastre per colture cellulari di 6 pozzetti.

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 .
- In una provetta sterile a fondo conico da 50 mL, lavare 5 volte i parassiti (4.2.1) trematodi adulti raccolti da criceti infettati sperimentalmente, mediante sedimentazione con PBS con antibiotici 5x (4.2.3). Ad ogni lavaggio agitare delicatamente la provetta per eliminare i batteri aderenti alla superficie dei vermi. In seguito, eliminare la soluzione di lavaggio aspirando con una pipetta.
- Determinare il numero di parassiti (4.2.1) mediante conta al microscopio.
- Sotto cappa a flusso laminare, risospendere i parassiti in terreno RPMI 1640 completo (4.2.4).
- Distribuire 2-5 vermi in ciascun pozzetto di una piastra per coltura cellulare da 6 pozzetti contenente 5 mL di terreno RPMI 1640 completo (4.2.4).
- Incubare le piastre in incubatore con 5% CO₂ alla temperatura di $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Dopo 24 ore di incubazione, controllare le colture al microscopio per verificare la vitalità dei parassiti sulla base dei loro movimenti, e l'assenza di contaminazione batterica e fungina.
- Eliminare i parassiti non vitali.

- i) Sotto cappa a flusso laminare, prelevare il surnatante e trasferirlo in provette sterili a fondo conico da 50 mL. Riempire i pozzetti delle piastre contenenti i parassiti vitali con nuovo terreno RPMI 1640 completo (4.2.4).
 - j) Incubare le piastre in incubatore con 5% CO₂ alla temperatura di 37±1°C.
 - k) Le operazioni comprese fra i punti "g" ed "h" devono essere effettuate con cadenza giornaliera fino a quando i parassiti restano vitali.
 - l) Filtrare il surnatante, contenente gli antigeni escretori/secretori, attraverso un filtro da 0,22 µm (4.2.6), dopo ogni raccolta giornaliera.
 - m) Mantenere Ag E/S così ottenuto alla temperatura di 1÷8°C fino alla fase di concentrazione (punto "n") se effettuata entro le 24 ore, altrimenti procedere con il congelamento.
 - n) Concentrare Ag E/S con provette di ultrafiltrazione con cut-off di 5 KDa (4.2.7) centrifugando a 3000g per 30 minutes in centrifuga refrigerata (temperatura 1÷8°C).
 - o) Procedere con concentrazioni successive finché il volume finale non risulti circa 100 volte inferiore rispetto al volume iniziale.
 - p) Recuperare l'eluato in provette da 50 mL e conservarlo a 1÷8°C fino al momento della dialisi.
 - q) La soluzione ottenuta viene dializzata (4.2.8) verso PBS (4.2.2) ad una temperatura di 1÷8°C per un minimo di 4 ore.
 - r) Verificare con lo spettrofotometro che il rapporto di densità ottica (DO) a 280nm/260nm sia ≥ 1.
 - s) Se il rapporto di D.O. a 280nm/260nm è < 1, la soluzione viene scartata in quanto contaminata da DNA.
 - t) Determinare la concentrazione proteica della soluzione contenente Ag E/S mediante il metodo di Bradford (4.2.9).
 - u) Aggiungere alla soluzione Ag E/S 1 µL/mg di cocktail di inibitori di proteasi (4.2.10).
 - v) Assegnare a ciascuna aliquota un numero identificativo composto da numero progressivo/anno. Le aliquote possono essere congelate o liofilizzate
 - w) Le aliquote di Ag E/S congelate (T< -50°C) sono considerate stabili per 10 anni.
 - x) Le aliquote di Ag E/S liofilizzate e conservate in frigorifero (1÷8°C), sono considerate stabili per 20 anni, in assenza di umidità all'interno della provetta.
 - y) Quando necessario, ricostituire l'aliquota liofilizzata di Ag E/S, con acqua distillata di grado analitico, aliquotare e congelare (T< -50°C). Il prodotto è stabile per 10 anni se non vengono alterate le condizioni di conservazione.
- Le sotto aliquote verranno identificate con numero lotto/anno/data preparazione

5.1 Controllo qualità

Il lotto si considera idoneo per l'utilizzo se tutti i seguenti criteri sono soddisfatti:

- a) assenza di contaminazione batterica e fungina nelle piastre 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 vermi vitali (valutazione effettuata in base alla loro motilità), come specificato al punto 5 g);
- c) rapporto di DO a 280nm/260nm del preparato finale di antigeni ≥ 1, come specificato al punto 5 r).

6 MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE

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