



Dipartimento MI

METODO DI PROVA

RICERCA DI ANTICORPI ANTI-*Opisthorchis* NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA

Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette

MI-07

rev. 3

Pag. 1 di 12

INDICE

1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	PRINCIPIO DEL METODO	2
3	BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI	4
4	DEFINIZIONI	4
5	APPARECCHIATURA DI PROVA	4
6	REATTIVI E MATERIALI	5
7	PROCEDIMENTO	6
	7.1 Preparazione del campione e dei campioni di controllo	6
	7.2 Esecuzione della prova	7
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	7
9	CARATTERISTICHE DEL METODO	8
10	MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	8

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

Redazione Responsabile di Sezione	Verifica Responsabile Assicurazione Qualità	Direttore	Approvazione Direttore	Data
				31/05/2019
Descrizione delle modifiche: eliminata bilancia analitica; inserimento centrifuga refrigerata; inserimento Antibiotico/Antimicotico; modifica tempo di conservazione delle soluzioni 4.2.2, 4.2.3; modifica soluzione di Penicillina/Streptomina o Antibiotico/Antimicotico; modifica sistema di concentrazione dell'antigene escretore/secretore e relativo protocollo.				

 <p>Dipartimento MI</p>	<p style="text-align: center;">METODO DI PROVA</p> <p style="text-align: center;">RICERCA DI ANTICORPI ANTI-<i>Opisthorchis</i> NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA</p> <p style="text-align: center;">Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette</p>	<p style="text-align: center;">MI-07</p> <p style="text-align: center;">rev. 3</p> <p style="text-align: center;">Pag. 2 di 12</p>
--	--	---

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'opistorchiasi 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'opistorchiasi 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 (ESA) di *O. felineus*, parzialmente purificati, vengono adesi sulla parete dei pozzetti di una micropiastra di polistirene in condizioni adatte a conservare l'antigene nel suo 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 all'antigene adsorbito.

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

Una seconda incubazione consente al coniugato di legarsi agli anticorpi specifici anti-*Opisthorchis* che si sono eventualmente legati all'antigene adeso 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.



Dipartimento MI

METODO DI PROVA

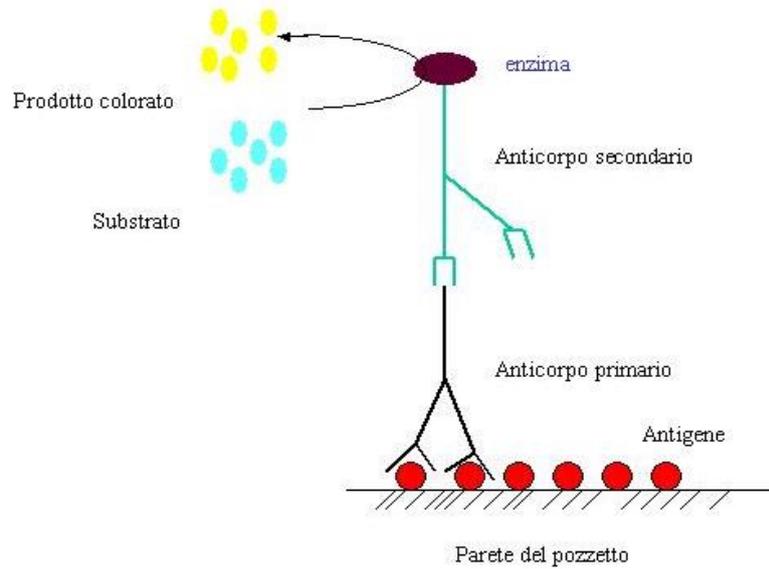
RICERCA DI ANTICORPI ANTI-*Opisthorchis* NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA

Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette

MI-07

rev. 3

Pag. 3 di 12



 <p>Dipartimento MI</p>	<p>METODO DI PROVA</p> <p>RICERCA DI ANTICORPI ANTI-<i>Opisthorchis</i> NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA</p> <p>Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette</p>	<p>MI-07</p> <p>rev. 3</p> <p>Pag. 4 di 12</p>
--	--	---

3 BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

Nöckler K, Dell K, Schuster R, Voigt WP. Indirect ELISA for the detection of antibodies against *Opisthorchis felineus* (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. 2008. Human illnesses caused by *Opisthorchis felineus* flukes in Italy. *Emerg Infect Dis.* 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. 2011. Investigation on *Opisthorchis felineus* occurrence and life cycle in Italy. *Vet Parasitol.* 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, 2012. A large outbreak of *Opisthorchis felineus* 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* 31:1089-1093.

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

4 DEFINIZIONI

4 DEFINIZIONI

4.1 Acronimi

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

5 APPARECCHIATURA DI PROVA

- 5.1 Lavatore automatico di piastre per microtitolazione
- 5.2 Incubatore, 37± 2°C
- 5.3 Lettore di micropiastre ELISA, 450 nm
- 5.4 pH-metro, scostamento massimo risoluzione ± 0,3 pH
- 5.5 Bilancia analitica, 0,0001-160 g risoluzione 0,0001/0,001g oppure bilancia tecnica, 0,001÷310 g risoluzione 0,001/0,01g
- 5.6 Frigorifero, 1÷8°C
- 5.7 Congelatore, ≤ - 50°C
- 5.8 Congelatore, ≤ -15°C
- 5.9 Agitatore magnetico

 <p>Dipartimento MI</p>	<p>METODO DI PROVA</p> <p>RICERCA DI ANTICORPI ANTI-<i>Opisthorchis</i> NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA</p> <p>Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette</p>	<p>MI-07</p> <p>rev. 3</p> <p>Pag. 5 di 12</p>
--	--	---

- 5.10 Agitatore Vortex
- 5.11 Micropipette (0.5-10 μ L, 15-300 μ L, 5-1000 μ L)
- 5.12 Sistema di filtrazione dell'acqua di grado analitico, se mancante, si provvederà all'utilizzo dell'acqua di grado analitico
- 5.13 Dispensatore Multipette Eppendorf®

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 e agitare su vortex fino al completo discioglimento 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 $1\pm 8^{\circ}\text{C}$, la soluzione deve essere utilizzata entro 24 ore.

6.2 Soluzione di lavaggio

Tween 20	1 mL
Acqua distillata e deionizzata	fino a 2000 mL

La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso come di seguito riportato. In una beuta da 2 litri aggiungere 1,999 litri di acqua distillata e deionizzata 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 $1\pm 8^{\circ}\text{C}$, 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 50,00 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 distillata e deionizzata	fino 100 mL

Preparare la soluzione sotto cappa. La soluzione può essere conservata a temperatura ambiente per 6 mesi.

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

 <p>Dipartimento MI</p>	<p>METODO DI PROVA</p> <p>RICERCA DI ANTICORPI ANTI-<i>Opisthorchis</i> NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA</p> <p>Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette</p>	<p>MI-07</p> <p>rev. 3</p> <p>Pag. 6 di 12</p>
--	--	---

KH ₂ PO ₄	0,34 g
Na ₂ HPO ₄	1,21 g
NaCl	8,0 g
Acqua distillata e deionizzata	fino 1000 mL

Aggiungere i componenti sopra specificati in circa 750 mL di acqua distillata e deionizzata. Mescolare mediante agitatore magnetico fino a completa dissoluzione. Controllare il pH (7.3 ± 0.2) e portare a volume. Conservare a 1÷ 8°C. Stabilità: 6 mesi.

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

L'antigene congelato, conservato a -50°C (5.7), deve essere diluito immediatamente prima dell'uso in tampone carbonato pH 9,6 ± 0,2 per raggiungere la concentrazione finale di 2 µg/mL. Per la produzione dell'antigene si rimanda all'allegato A del presente metodo.

Il tampone carbonato pH 9,6 ± 0,2 da utilizzare per la diluizione dell'Ag E/S deve essere preparato come segue:

Na ₂ CO ₃	1,12 g
NaHCO ₃	2,92 g
Acqua distillata e deionizzata	fino a 1000 mL

Conservare a temperatura ambiente. Stabilità 6 mesi.

6.7 Sieri di controllo positivi per anticorpi anti-*Opisthorchis* provenienti da soggetti con opistorchiasi 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 anti-IgG umana coniugati con horseradish perossidasi. Prima dell'utilizzo il materiale liofilizzato deve essere reidratato con acqua distillata e deionizzata, agitando su vortex fino alla sua completa dissoluzione. In questo stato può essere conservato refrigerato (1÷8°C) per una settimana. Per determinare la diluizione ottimale di lavoro del coniugato, si utilizzano le diluizioni di lavoro raccomandate dal fornitore per l'utilizzo in ELISA. Se nessuna delle suddette diluizioni risulta ottimale, si procede alla preparazione di altre diluizioni del reagente 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 deve essere aliquotato e conservato congelato a ≤ -50°C. In queste condizioni resta stabile per almeno 5 anni. 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÷8°C) ed utilizzarlo entro 24 ore.

6.12 Dispositivi Combitips per dispensatore Multipette Eppendorf®

7 PROCEDIMENTO

7.1 Preparazione del campione e dei campioni di controllo **Errore. Il segnalibro non è definito.**

Scongelare i campioni di siero, i 4 sieri di controllo negativi e i 4 sieri di controllo positivi. Effettuare tale operazione collocandoli in frigorifero a 1÷8°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, i sieri di controllo negativi e i sieri di controllo positivi. Effettuare la

 <p>Dipartimento MI</p>	<p>METODO DI PROVA</p> <p>RICERCA DI ANTICORPI ANTI-<i>Opisthorchis</i> NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA</p> <p>Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette</p>	<p>MI-07</p> <p>rev. 3</p> <p>Pag. 7 di 12</p>
--	--	---

diluzione 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÷8°C fino al momento dell'uso. Stabilità: 1 giorno

7.2 Esecuzione della prova

Prelevare dal frigorifero a 1÷8°C le micropiastre necessarie per l'uso.

Dispensare in ciascun pozzetto 100µL di Ag E/S diluito (6.6) per mezzo di una Multipette Eppendorf® munita di Combitips (5.12) ed incubare 1 ora a 37°C.

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

Aggiungere 200 µL 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 100 µL di ciascuno dei controlli positivi diluiti in duplicato nei pozzetti PS1, PS2, PS3 e PS4, dei controlli negativi diluiti nei pozzetti NS1, NS2, NS3 e NS4, dei campioni diluiti, e 100 µL di soluzione di diluizione (6.1) nei pozzetti BIANCO 1 e BIANCO 2.

Incubare per 30 minuti a 37°C.

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 controlli negativi; SS1-SS39: campioni di siero 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).

Aggiungere ad ogni pozzetto 100 µL di coniugato diluito (6.11) ed incubare 1 ora a 37°C.

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 in lettore per micropiastre (5.3).

8 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

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

 Dipartimento MI	METODO DI PROVA RICERCA DI ANTICORPI ANTI-<i>Opisthorchis</i> NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-07 rev. 3 Pag. 8 di 12
--	--	--

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 $< 17\%$

Perché 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 (I_e 17%);
- il valore di densità ottica dei campioni di controllo positivi deve essere maggiore di 1,0 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.

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.

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.

Per il comportamento generale da adottare da parte degli operatori fare riferimento ai manuali emessi dal Servizio di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro dell'Istituto, a disposizione del personale dei laboratori e anche visionabili sul sito www.iss.it/inet/spsl/index (*Manuale per gli operatori che lavorano nei laboratori a carattere chimico e biologico; Manuale operativo per la gestione dei rifiuti prodotti all'interno dell'ISS*).

 <p>Dipartimento MI</p>	<p>METODO DI PROVA</p> <p>RICERCA DI ANTICORPI ANTI-<i>Opisthorchis</i> NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA</p> <p>Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette</p>	<p>MI-07</p> <p>rev. 3</p> <p>Pag. 9 di 12</p>
--	---	---

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 granulatin-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.

Manuale della Qualità paragrafo 4.13: Controllo delle registrazioni

Modulo MO/MI-07/01 Produzione di antigeni escretori/secretori di *O. felineus*

Modulo MO/MI-07/02 Determinazione concentrazione proteica antigeni escretori/secretori di *O. felineus*

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±1°C con 4-5% CO₂

Spettrofotometro UV/VIS

Congelatore ≤-15°C

Frigorifero, 1÷8°C

Congelatore ÷-50°C

Cappa a flusso laminare

Cella di concentrazione a pressione Amicon® oppure sistema di filtrazione MILLIPORE Labscale™ TFF System

 <p>Dipartimento MI</p>	<p style="text-align: center;">METODO DI PROVA</p> <p style="text-align: center;">RICERCA DI ANTICORPI ANTI-<i>Opisthorchis</i> NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA</p> <p style="text-align: center;">Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette</p>	<p style="text-align: center;">MI-07</p> <p style="text-align: center;">rev. 3</p> <p style="text-align: center;">Pag. 10 di 12</p>
--	--	--

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 Fosfato salino tamponato (PBS), pH 7.3 ± 0.2

KH ₂ P04	0.34 g
Na ₂ HP04	1.21g
NaCl	8.0 g
Acqua distillata e deionizzata	fino 1000 mL

Dissolvere i componenti in 750 mL di acqua deionizzata mediante agitazione magnetica. Controllare il pH (7.2±0.2) e portare la soluzione al volume finale. Sterilizzare per filtrazione con filtro 0.22 µm (4.2.8). Una volta preparato conservare in frigo ed utilizzare entro sei mesi.

4.2.2 PBS con antibiotici 5 x:

PBS (4.2.1)	950 mL
soluzione Penicillina/Streptomicina o Antibiotico/Antimicotico (4.2.5)	50 mL

Una volta preparato conservare in frigorifero ed utilizzare entro due mesi.

4.2.3 Terreno RPMI completo

RPMI 1640 (4.2.6)	480 mL
HEPES 1M (4.2.7)	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

Una volta preparato conservare in frigorifero ed utilizzare entro due mesi.

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

4.2.5 Terreno di cultura RPMI 1640.

4.2.6 Soluzione tampone HEPES 1 M.

4.2.7 Filtri da 0,22 µm, sterili con contenitore.

Filtri Amicon [®]YM-3

4.2.8 Provette per concentrazione per ultrafiltrazione.

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.

4.2.12 Vermi adulti di *O. felineus* in sospensione.

 <p>Dipartimento MI</p>	<p>METODO DI PROVA</p> <p>RICERCA DI ANTICORPI ANTI-<i>Opisthorchis</i> NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA</p> <p>Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette</p>	<p>MI-07</p> <p>rev. 3</p> <p>Pag. 11 di 12</p>
--	--	--

4.2.13 Piastre per colture cellulari di 6 pozzetti.

4.2.14 Provette a fondo conico da 15 e 50 mL.

4.2.15 Piastre da 96 pozzetti.

5 MODALITÀ' OPERATIVE

- a) Preriscaldare le soluzioni 4.2.2 e 4.2.3 a circa 37°C.
- b) Lavare 5 volte i parassiti mediante sedimentazione in una provetta sterile a fondo conico da 50 mL con PBS con antibiotici 5x (4.2.2). 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.
- c) Determinare il numero di parassiti (4.2.12) mediante conta al microscopio.
- d) Risospendere i parassiti in terreno RPMI 1640 completo (4.2.3). Effettuare tali operazioni sotto cappa a flusso laminare.
- e) Distribuire 2-5 vermi/5 mL in piastre per coltura cellulare da 6 pozzetti.
- f) Incubare le piastre in incubatore con 5% CO₂.
- g) 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.
- h) Eliminare i parassiti non vitali operando nella cappa a flusso laminare. Prelevare il surnatante e trasferirlo in provette sterili a fondo conico da 50 mL. Riempire di nuovo le piastre contenenti i parassiti vitali con nuovo terreno RPMI 1640 completo (4.2.3) e incubare le piastre in incubatore. Le operazioni comprese fra i punti "g" ed "h" devono essere effettuate con cadenza giornaliera fino a quando i parassiti restano vitali.
- i) Filtrare il surnatante attraverso un filtro da 0,22 µm (4.2.7).
- j) Mantenere Ag E/S così ottenuto a +4°C fino alla fase di concentrazione (punto "k") fino a 24 ore, se il volume di coltura ottenuto è inferiore a 500 mL procedere con il congelamento.
- k) Riempire la provetta per concentrare (4.2.8) con 15 mL di Ag E/S filtrato (punto i).
- l) Porre la provetta per concentrare in centrifuga refrigerata (temperatura 4÷8°C), centrifugare a 3000 g per 30 minuti.
- m) Recuperare l'eluato in provette da 50 mL (4.2.14) e conservarlo a +4°C fino al punto "p".
- n) Ripetere i punti da "k" a "m" fino ad esaurimento di Ag E/S (punto "i").
- o) Controllare il volume di Ag E/S presente all'interno della cella di concentrazione, se risulta concentrato fino a 100 volte rispetto al volume di partenza, procedere con il punto "p", in caso contrario centrifugare ulteriormente (punto l).
- p) Concentrare da 50 a 100 volte il terreno filtrato in provetta di concentrazione per ultracentrifugazione (4.2.8). Effettuare tale operazione in camera fredda (temperatura ≤ 8÷5°C)
- q) La soluzione ottenuta può essere dializzata (4.2.10) verso PBS (4.2.1) a + 4°C per un minimo di 4 ore.
- r) Verificare con spettrofotometro che il rapporto di densità ottica (DO) a 280nm/260nm sia > 1.
- s) Determinare la concentrazione proteica mediante il metodo di Bradford (4.2.9).
- t) Aggiungere alla soluzione 1 µL/mg di cocktail di inibitori di proteasi (4.2.11).

~~Se il pool intermedio contiene ≤ 5 mg di proteine totali, conservare in congelatore in attesa di raggiungere un minimo di 5 mg di proteine provenienti dall'unione di altri pool intermedi, per~~

 <p>Dipartimento MI</p>	<p>METODO DI PROVA</p> <p>RICERCA DI ANTICORPI ANTI-<i>Opisthorchis</i> NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELISA INDIRECTA</p> <p>Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette</p>	<p>MI-07</p> <p>rev. 3</p> <p>Pag. 12 di 12</p>
--	--	--

~~passare successivamente al punto “v” della procedura~~

~~Se il pool intermedio ottenuto ha una concentrazione proteica ≥ 5 , questo costituisce un unico lotto (numero di lotto/anno) che deve essere aliquotato in provette ad una concentrazione di proteine totali pari a 0,1-2,5 mg/provetta e conservato in congelatore.~~

~~L'antigene deve essere quindi liofilizzato e conservato in frigorifero. Controllare visivamente l'assenza di umidità nell'interno delle provette, così conservato la stabilità minima è di 5 anni.~~

- 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 di lotto/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 (punto “w”).
- w) L'antigene verrà quindi liofilizzato e conservato in frigorifero. Controllare visivamente l'assenza di umidità nell'interno, così conservato la stabilità minima è di 5 anni.

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, stabilità mediante osservazione microscopica diretta ad ingrandimento 400x come specificato al punto 5 g);
- b) presenza di vermi vitali (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 k.

6 REGISTRAZIONE ED ARCHIVIAZIONE

Registrare la preparazione di ogni lotto di antigene nel modulo *MO/MI-07/01: Produzione di antigeni escretori/secretori di *Opisthorchis felineus**. Una volta compilato, il modulo deve essere conservato in accordo alle modalità e responsabilità definite al p.to 4.13: Controllo delle registrazioni, del Manuale della Qualità.

7 MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE

I dispositivi individuali di protezione sono rappresentati da guanti monouso e camici. Per il comportamento generale da adottare da parte degli operatori fare riferimento ai manuali emessi dal Servizio di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro dell'Istituto, a disposizione del personale dei laboratori e anche visionabili sul sito www.iss.it/inet/spsl/index (Manuale per gli operatori che lavorano nei laboratori a carattere chimico e biologico; Manuale operativo per la gestione dei rifiuti prodotti all'interno dell'Istituto).