

# CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA PER LE MALATTIE ESOTICHE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Via Campo Boario – 64100 Teramo

IZS TE B2.1.6 SOP013

TITOLO: Ricerca di anticorpi contro il virus della Bluetongue  
mediante ELISA competitiva

PAG. 1/6

REVISIONE N. 02

CODICE DESTINATARIO:

## RICERCA DI ANTICORPI CONTRO IL VIRUS DELLA BLUETONGUE MEDIANTE ELISA COMPETITIVA

|      |                         |                 |                         |                   |                        |          |
|------|-------------------------|-----------------|-------------------------|-------------------|------------------------|----------|
| 02   | TREDICESIMA<br>EDIZIONE | B. BONFINI      | M. TITTARELLI           | L. RICCI          | N. D'ALTERIO           | 20.09.19 |
| 01   | DODICESIMA<br>EMISSIONE | M. TITTARELLI   | M. TITTARELLI           | L. RICCI          | M. MATTIOLI            | 07.07.16 |
| 00   | UNDICESIMA<br>EMISSIONE | B. BONFINI      | M. TITTARELLI           | L. RICCI          | F. ARNOLFO             | 20.01.15 |
| REV. | DESCR.<br>REVISIONE     | PREPARATA<br>DA | VERIFICATA<br>DAL RESP. | VERIFICATA<br>UAQ | APPROVATA<br>DIRETTORE | DATA     |

# CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA PER LE MALATTIE ESOTICHE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Via Campo Boario – 64100 Teramo

IZS TE B2.1.6 SOP013

TITOLO: Ricerca di anticorpi contro il virus della Bluetongue  
mediante ELISA competitiva

PAG. 2/6

REVISIONE N. 02

## 1. CAMPO DI APPLICAZIONE

La seguente procedura viene applicata per la ricerca di anticorpi contro il virus della Bluetongue nei sieri di ruminanti mediante ELISA competitiva (c-ELISA) con il Kit di produzione dell'IZS A&M (Bluetongue antibody test kit c-ELISA rec VP7).

## 2. SCOPO

Questa procedura ha lo scopo di descrivere le modalità operative e le responsabilità per la ricerca di anticorpi contro il virus della Bluetongue (Febbre catarrale dei ruminanti) nei sieri di ruminanti mediante ELISA competitiva.

La procedura è stata redatta con lo scopo che tutte le attività ad essa connesse vengano svolte in modo omogeneo e controllato.

## 3. TERMINI E DEFINIZIONI

**MAb:** anticorpo monoclonale.

**VP7:** proteina strutturale dello strato intermedio del capsido virale.

## 4. RIFERIMENTI

OIE Manual for Terrestrial Animals *Cap 3.1.3 par B 2.3 2014.*

Foglio illustrativo "Bluetongue antibody test kit c-ELISA rec VP7", *Rev. 05 del 15/07/2019.*

IZS TE AQ SOP024 "Misure igieniche, comportamenti e precauzioni da rispettare nelle prove microbiologiche, virologiche e chimiche".

IZS TE B1 SOP009 " Accettazione e refertazione dei campioni di sangue inviati per prove sierologiche".

IZS TE B2.1.6 SOP014 "Gestione dei campioni nel reparto di sierologia".

IZS TE B2.1.6 SOP037 "Terminologia, validazione e controllo dei metodi di prova sierologici".

## 5. PROCEDURA

### 5.1 Responsabilità

Il Responsabile di Reparto ha la responsabilità di garantire e verificare la corretta applicazione della presente procedura e di affidare l'esecuzione della prova al personale *tecnico* che abbia ricevuto specifico addestramento nel campo.

Il personale incaricato ha la responsabilità della corretta applicazione della seguente procedura in tutte le sue fasi.

# CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA PER LE MALATTIE ESOTICHE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Via Campo Boario – 64100 Teramo

IZS TE B2.1.6 SOP013

PAG. 3/6

TITOLO: Ricerca di anticorpi contro il virus della Bluetongue  
mediante ELISA competitiva

REVISIONE N. 02

## 5.2 Precauzioni

*Applicare i comportamenti, le precauzioni e le misure igieniche generali descritti nella procedura IZS TE AQ SOP024, per quanto riguarda l'abbigliamento e l'uso delle apparecchiature in un laboratorio di prova.*

Prestare particolare attenzione nel manipolare la soluzione substrato di TMB e la soluzione di bloccaggio H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, che sono irritanti per la pelle e per gli occhi. *Gli altri reagenti utilizzati nella prova non presentano rischi e, pertanto, non sono necessarie precauzioni particolari.*

*Tutte le informazioni riguardanti la pericolosità dei reagenti in uso sono riportate sulle schede di sicurezza conservate nel Reagentario presente in reparto.*

## 5.3 Materiali/Apparecchiature/Reagenti

### 5.3.1 Materiali

- Puntali per pipette monocanale e multicanale
- Vaschette portareagenti con fondo a "V"
- Flaconi o vials di vario volume
- Coperchi per micropiastre

### 5.3.2 Apparecchiature

- Agitatore per micropiastre
- Lavatore per micropiastre (opzionale)
- Pipette multicanale a volume variabile da 30-300 µl
- Micropipette automatiche a volume variabile da 10-100 µl e da 100-1000 µl
- Pipette graduate da 5, 10 e 25 ml
- Pipet-aid
- Lettore fotometrico per micropiastre ELISA
- Agitatore per provette tipo Vortex
- Frigorifero a 5 ± 3 °C

### 5.3.3 Reagenti

- Kit prodotto da IZS A&M contenente:
  - Micropiastre, a 96 pozzetti in strip, attivate con proteina ricombinante VP7 del virus della Bluetongue
  - Siero di controllo positivo per Ab-BTV (C++) liofilizzato
  - Siero di controllo negativo per Ab-BTV (C-) liofilizzato
  - Anticorpo monoclonale coniugato con perossidasi (MAb-HRP)
  - Soluzione di lavaggio concentrata 25x
  - Soluzione di diluizione
  - Soluzione substrato
  - Soluzione stop

Rispettare le istruzioni nel foglietto illustrativo al paragrafo "Conservazione, stabilità e precauzioni".

- Acqua osmotizzata

# CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA PER LE MALATTIE ESOTICHE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Via Campo Boario – 64100 Teramo

IZS TE B2.1.6 SOP013

TITOLO: Ricerca di anticorpi contro il virus della Bluetongue  
mediante ELISA competitiva

PAG. 4/6

REVISIONE N. 02

## 5.4 Modalità operative

### 5.4.1 Operazioni preliminari

- Prima di iniziare la prova, porre i sieri da esaminare e tutti i componenti del kit a temperatura ambiente (17 - 28 °C).
- Agitare delicatamente i reagenti prima dell'uso;
- Ricostituire i sieri di controllo, positivo e negativo, secondo le indicazioni riportate sulle boccette;
- Preparare la soluzione di lavaggio diluendo una parte della soluzione di lavaggio concentrata 25x in 24 parti di acqua *osmotizzata* considerando che per lavare ogni micropiastra occorrono circa 250 ml di soluzione di lavaggio diluita;
- Disporre i sieri in esame contenuti nelle provette micronic nel rack portaprovette, considerando che in ogni micropiastra possono essere esaminati 45 campioni in duplicato e che 6 pozzetti vengono utilizzati per i controlli. Si riporta di seguito un esempio di distribuzione di sieri in esame nella piastra:

|   | 1   | 2   | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A | Bo  | Bo  | 6  | 6  | 14 | 14 | 22 | 22 | 30 | 30 | 38 | 38 |
| B | C++ | C++ | 7  | 7  | 15 | 15 | 23 | 23 | 31 | 31 | 39 | 39 |
| C | C-- | C-- | 8  | 8  | 16 | 16 | 24 | 24 | 32 | 32 | 40 | 40 |
| D | 1   | 1   | 9  | 9  | 17 | 17 | 25 | 25 | 33 | 33 | 41 | 41 |
| E | 2   | 2   | 10 | 10 | 18 | 18 | 26 | 26 | 34 | 34 | 42 | 42 |
| F | 3   | 3   | 11 | 11 | 19 | 19 | 27 | 27 | 35 | 35 | 43 | 43 |
| G | 4   | 4   | 12 | 12 | 20 | 20 | 28 | 28 | 36 | 36 | 44 | 44 |
| H | 5   | 5   | 13 | 13 | 21 | 21 | 29 | 29 | 37 | 37 | 45 | 45 |

Legenda schema:

- Bo: controllo del 100% di reazione
  - C++: controllo positivo
  - C--: controllo negativo
- Compilare gli schemi riproducenti i pozzetti della micropiastra come descritto nella IZS TE B2.1.6 SOP014.
  - In caso di problemi con la rete e/o con la fornitura elettrica, possono essere utilizzati schemi cartacei, come descritto nella IZS TE B2.1.6 SOP014.

### 5.4.2 Prova principale

- Porre 50 µl di soluzione di diluizione nei pozzetti A1 e A2 (Bo), 50 µl di controllo positivo nei pozzetti B1 e B2 (C++) e 50 µl di controllo negativo nei pozzetti C1 e C2 (C--).

# CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA PER LE MALATTIE ESOTICHE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Via Campo Boario – 64100 Teramo

IZS TE B2.1.6 SOP013

PAG. 5/6

TITOLO: Ricerca di anticorpi contro il virus della Bluetongue  
mediante ELISA competitiva

REVISIONE N. 02

- Agitare la micropiastra, coprirla ed incubarla a temperatura ambiente per 2 ore.
- Trascorso il periodo di incubazione, effettuare 4 lavaggi con la soluzione di lavaggio diluita nel seguente modo:
  - vuotare la micropiastra e dispensare 300 µl di soluzione di lavaggio in tutti i pozzetti;
  - ripetere questa operazione per le altre tre volte;
  - dopo l'ultimo lavaggio percuotere la micropiastra su tampone di carta assorbente per eliminare eventuali residui.
- Preparare la soluzione diluita di anticorpo coniugato con perossidasi diluendolo 1:100 con soluzione di diluizione, considerando che per ogni micropiastra ne occorrono 5 ml (la soluzione diluita di anticorpo coniugato con perossidasi va protetta dalla luce).
- Dispensare 50 µl di soluzione diluita di anticorpo coniugato con perossidasi in tutti i pozzetti.
- Agitare la micropiastra, coprirla ed incubarla a temperatura ambiente, al riparo dalla luce, per 1 ora.
- Trascorso il periodo d'incubazione, vuotare le micropiastre ed effettuare 4 lavaggi con la soluzione di lavaggio diluita, dispensando ad ogni ciclo 300 µl di soluzione di lavaggio diluita.
- Dispensare 100 µl di soluzione substrato in tutti i pozzetti.
- Agitare la micropiastra, coprirla ed incubarla a temperatura ambiente, al riparo dalla luce, per 30 minuti.
- Trascorso il periodo di incubazione, arrestare la reazione enzimatica dispensando 50 µl di soluzione stop in tutti i pozzetti.
- Agitare la micropiastra e misurare la densità ottica (D.O.) di tutti i pozzetti utilizzando il lettore fotometrico per micropiastre alla lunghezza d'onda di 450 nm.

## 5.5 Interpretazione dei risultati

- Calcolare il valore medio delle D.O. dei pozzetti A1 e A2 (Bo, controllo del 100% di reazione).
- Calcolare il valore medio delle D.O. dei pozzetti B1 e B2 (controllo positivo)
- Calcolare il valore medio delle D.O. dei pozzetti C1 e C2 (controllo negativo)
- Calcolare per il siero di controllo negativo, la percentuale di competizione con la seguente formula:

$$PC(C-) = \frac{D.O. \text{ media } C-}{D.O. \text{ media } Bo} \times 100$$

La prova è valida se contemporaneamente vengono soddisfatte le seguenti condizioni:

- Il valore medio delle D.O. del Bo è maggiore o uguale a 1,400
- la percentuale di competizione del siero di controllo negativo (PC C-) è maggiore del 65%
- Il valore medio delle D.O. del controllo positivo è minore o uguale a 0,200
- Calcolare la percentuale di competizione dei campioni in esame con la seguente formula:

# CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA PER LE MALATTIE ESOTICHE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Via Campo Boario – 64100 Teramo

IZS TE B2.1.6 SOP013

TITOLO: Ricerca di anticorpi contro il virus della Bluetongue  
mediante ELISA competitiva

PAG. 6/6

REVISIONE N. 02

$$PC = \frac{D.O. \text{ campione}}{D.O. \text{ media Bo}} \times 100$$

I sieri esaminati sono positivi se presentano una  $PC \leq 50$ .

I sieri esaminati sono negativi se presentano una  $PC > 50$ .

Se i risultati ottenuti dall'esame in doppio del campione da testare sono discordanti (positivo/negativo) il campione deve essere ripetuto.

Come descritto nella procedura IZS TE B2.1.6 SOP037, se i valori in PC delle due repliche del campione in esame si discostano di un valore superiore al 10%, nell'intervallo di PC compreso tra il 40% e il 60%, il campione deve essere ripetuto.

I risultati devono essere acquisiti nel Sistema Informativo dell'attività diagnostica, come descritto nella procedura IZS TE B2.1.6 SOP014.

I sieri risultati positivi alla tecnica ELISA presso l'IZS A&M devono essere consegnati al Reparto Virologia per essere confermati mediante sieroneutralizzazione virale.

I sieri risultati positivi alla tecnica ELISA presso gli altri II.ZZ.SS. devono essere inviati al CESME con scheda di accompagnamento SBT05 in aliquote da 1 ml per essere confermati mediante ELISA e sieroneutralizzazione virale.

*Eliminare i reagenti ed i materiali utilizzati e smaltire i campioni esaminati, seguendo le indicazioni riportate su IZS TE B2.1.6 SOP014 "Gestione dei campioni nel reparto di sierologia".*

## 6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Nel rapporto di prova i sieri saggiati mediante ELISA competitiva vengono definiti "positivi", se alla lettura hanno dato esito positivo; i sieri vengono definiti "negativi" se alla lettura hanno dato esito negativo.

## 7. VALIDAZIONE DEL METODO

I dati relativi alla determinazione del cut-off, specificità, sensibilità, ripetibilità e riproducibilità del metodo sono riportati nel dossier di validazione disponibile nel reparto di *Immunologia e Sierologia*.