



Istruzioni per l'uso

Valido a partire da 06.09.2023

Medizym® anti-GAD M

REF 3507

Saggio immunoenzimatico per la determinazione degli anticorpi contro la decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD₆₅) nel siero umano



Medipan GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow OT Dahlewitz
Germania

Telefono: +49 33708 4417 0
Fax: +49 33708 4417 25

info@medipan.de
www.medipan.de



1 Destinazione d'uso

Il Medizym® anti-GAD M è un immunodosaggio quantitativo per la determinazione degli anticorpi contro la decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD₆₅) nel siero umano.

Il saggio Medizym® anti-GAD M è inteso come ausilio nella diagnosi del diabete mellito di tipo 1 in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

L'immunodosaggio è progettato per l'uso professionale manuale nella diagnostica *in vitro*.

2 Rilevanza diagnostica

Il diabete mellito di tipo 1 è una malattia autoimmune cronica in cui le cellule beta produttrici di insulina delle isole di Langerhans nel pancreas vengono distrutte. La conseguenza di questa distruzione è una ridotta produzione di insulina, che si traduce in alti livelli di zucchero nel sangue come il diabete mellito. Le predisposizioni genetiche e le infezioni virali sono considerate fattori di rischio, ma le cause esatte non sono state ancora del tutto chiarite.

La distruzione delle cellule beta produttrici di insulina del pancreas si basa sulla presenza di anticorpi contro le cellule insulari (ICA), che sono diretti contro diversi antigeni delle cellule delle isole pancreatiche, come l'acido glutammico decarbossilasi (GAD₆₅), la tirosina fosfatasi (insulinoma -associato all'antigene 2, IA2), il trasportatore di zinco 8 (ZnT8) e contro l'insulina. Gli anticorpi delle cellule insulari (ICA) possono essere rilevati nel 70-80% dei pazienti con diabete mellito. I diversi anticorpi di solito compaiono mesi o anni prima del verificarsi di livelli elevati di zucchero nel sangue e sono quindi considerati anche importanti marcatori prognostici per identificare i pazienti con un aumentato rischio di sviluppare diabete mellito di tipo 1. Il rilevamento combinato di anticorpi contro GAD₆₅, IA2, ZnT8 e l'insulina è considerata un metodo importante per la diagnosi del diabete mellito di tipo 1 all'inizio della malattia.

La decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD) catalizza la sintesi del neurotrasmettitore GABA nel cervello e nelle cellule beta. Sono note due isoforme dell'enzima: GAD₆₅ con un peso molecolare di 65 kDa e GAD₆₇ con 67 kDa. Gli anticorpi diretti contro GAD₆₅ sono rilevati nella maggior parte dei pazienti con diabete mellito di tipo 1 e in un gran numero di pazienti nella fase prediabetica. Al contrario, i pazienti con la

rarissima sindrome dell'uomo rigido neuromuscolare hanno anticorpi contro entrambe le isoforme GAD.

3 Principio del saggio

L'ELISA competitivo (saggio immuno-assorbente legato ad un enzima) è un saggio immunologico per la determinazione di anticorpi specifici. I pozzetti della piastra per microtitolazione sono rivestite con antigeni specifici per il saggio. Se nel campione del paziente sono presenti anticorpi, questi si legano agli antigeni. Un secondo antigene biotinilato lega l'anticorpo fisso immobilizzato. Il saggio utilizza la capacità degli anticorpi di agire in modo bivalente con antigeni immobilizzati e solubili. La streptavidina coniugata con l'enzima perossidasi rileva il complesso immunitario generato. Un substrato incolore viene convertito in un prodotto colorato dalla perossidasi. L'intensità del segnale del prodotto di reazione è proporzionale all'attività anticorpale del campione. Dopo l'arresto della reazione, l'intensità del segnale del prodotto di reazione viene misurata fotometricamente.

4 Componenti del saggio

Componente	Descrizione
Piastra per microtitolazione A [MP] 1 pezzo	12 strisce per microtitolazione separabili (pronte all'uso), 8 pozzetti per striscia, ogni pozzetto rivestito con GAD umano ricombinante ₆₅
Calibratore 0 - 5 [CAL] 6 x 1,0 mL	Diluizioni colorate di siero umano (pronte all'uso; contengono ProClin 950) Le attività anticorpali sono indicate nel certificato di controllo della qualità.
Controllo positivo CII [CONTROL +] 1 x 1,0 mL	Diluizione colorata di siero umano (pronta all'uso; contiene ProClin 950) L'attività dell'anticorpo è indicata sul certificato di controllo di qualità.
Diluyente campione C [DIL] 1 x 20 mL	Soluzione colorata (pronta all'uso; contiene ProClin 950)
GAD₆₅ -Biotina H [START] 1 x 0,2 mL	Reagente iniziale concentrato GAD ₆₅ biotinilato (contiene azoturo di sodio)
Diluyente per GAD₆₅ - Biotina J [BUF H] 1 x 20 mL	Soluzione (pronta all'uso; contiene ProClin 950)
Streptavidina-perossidasi (SA-POD) D [CONJ] 1 x 0,2 mL	Streptavidina concentrata coniugata con perossidasi di rafano (100x)
Diluyente per SA-POD G [BUF D] 1 x 20 mL	Soluzione (pronta all'uso; contiene ProClin 950)
Tampone di lavaggio B [WASHB] 1 x 100 mL	Soluzione concentrata (10x; contiene ProClin 950)
Substrato E [SUB] 1 x 15 mL	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (pronto all'uso)
Soluzione d'arresto F [STOP] 1 x 15 mL	0,25 M Acido solforico (pronto all'uso)
Foglio adesivo 2 pezzi	-
Certificato CQ 1 pezzo	-
Istruzioni per l'uso 1 pezzo	-

5 Materiale necessario ma non fornito

- Comuni attrezzature di laboratorio
- Pipette di precisione (5 - 1000 µL), pipette multicanale (100 - 1000 µL) e puntali monouso.
(100 - 1000 µL) e puntali per pipette monouso

- Cilindri graduati (100 - 1000 mL)
- Provette per la preparazione delle diluizioni
- Miscelatore a vortice o altri rotatori
- Lavatore di piastre per microtitolazione o lavatore a pettine
- Lettore di piastre per microtitolazione con filtri ottici per 450 nm e 620 nm o 690 nm
- Carta assorbente
- Acqua distillata o deionizzata

6 Conservazione e stabilità

Una volta ricevuti, tutti i componenti del saggio devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C, preferibilmente nella confezione originale del kit. Se conservati correttamente nei loro contenitori originali, tutti i componenti sono stabili fino alla data di scadenza.

7 Informazioni generali

Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*. Le istruzioni per l'uso devono essere lette attentamente prima dell'uso. Esse sono valide solo per il presente prodotto con la composizione indicata e devono essere seguite rigorosamente per garantirne risultati affidabili. Eventuali deviazioni possono portare a risultati errati. I componenti non devono essere scambiati con reagenti di lotti diversi o di altri produttori.

La contaminazione dei reagenti deve essere evitata utilizzando tecniche aseptiche durante il prelievo dai contenitori. Dopo l'uso, le fiale di reagente devono essere chiuse ermeticamente con i rispettivi tappi. La contaminazione incrociata di campioni o reagenti può portare a risultati incoerenti e deve essere evitata utilizzando tecniche di pipettaggio coerenti.

L'esposizione dei reagenti alla luce forte deve essere evitata per tutta la durata della procedura di analisi e della conservazione.

Un lavaggio insufficiente comporta una scarsa precisione e segnali di misura elevati. Dopo ogni fase di lavaggio, il liquido residuo deve essere completamente rimosso.

8 Preparazione

8.1 Preparazione dei reagenti

La piastra per microtitolazione e tutti i reagenti, eccetto il concentrato di GAD₆₅-Biotina (H), devono essere portati a temperatura ambiente (RT: da 18 °C a 25 °C) per almeno 30 minuti prima dell'uso. Tutti i componenti liquidi devono essere miscelati delicatamente per garantirne l'omogeneità.

8.1.1 Piastra per microtitolazione

La piastra per microtitolazione è sigillata in un sacchetto di alluminio. Le strisce reattive non utilizzate devono essere sempre conservate in frigorifero e protette dall'umidità con l'essiccante nella busta di alluminio opportunamente sigillata. Se richiuse con cura, le strisce reattive possono essere utilizzate per 8 settimane dall'apertura.

8.1.2 Calibratori

I calibratori sono pronti all'uso e non devono essere ulteriormente diluiti. I calibratori devono essere utilizzati per ogni saggio.

8.1.3 Controlli

Il controllo positivo è pronto per l'uso e non deve essere ulteriormente diluito. I controlli devono essere utilizzati in ogni analisi. I laboratori possono anche convalidare i propri campioni di controllo e utilizzarli in alternativa.

8.1.4 GAD₆₅-Biotina (H) e diluente (J)

Una quantità sufficiente di soluzione GAD₆₅-Biotina deve essere preparata diluendo x mL di GAD₆₅-Biotina (H) con y mL di diluente per GAD₆₅-Biotina (J) direttamente prima dell'uso. Il concentrato deve essere conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino al momento dell'uso. Per i volumi esatti di diluizione x e y vedere il certificato di analisi fornito con il kit. Il rapporto di diluizione per il trattamento manuale e automatico può essere diverso. La soluzione di GAD₆₅-Biotina preparata deve essere utilizzata entro un giorno e non deve essere conservata.

8.1.5 Streptavidina-perossidasi (D) e diluente (G)

Una quantità sufficiente di soluzione di streptavidina-perossidasi deve essere preparata diluendo il concentrato SA-POD (D) 1 + 99 (ad es. 0,1 mL di concentrato SA-POD con 9,9 mL di diluente per SA-POD (G)). La soluzione SA-POD preparata è stabile fino a 4 settimane a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

8.1.6 Tampone di lavaggio

Il tampone di lavaggio è concentrato e deve essere diluito 1:10 con acqua distillata prima dell'uso (ad es. 100 mL + 900 mL). È necessario preparare una quantità sufficiente di soluzione di lavaggio. La soluzione di lavaggio diluita può essere conservata a 2 °C-8 °C fino a 30 giorni.

8.1.7 Substrato

Il substrato è pronto all'uso. È necessario evitare l'esposizione della soluzione del substrato alla luce.

8.1.8 Soluzione d'arresto

La soluzione d'arresto è pronta all'uso.

8.2 Preparazione dei campioni

8.2.1 Materiale campione

Si raccomanda l'uso di siero appena raccolto da sangue prelevato mediante venipuntura. Si deve evitare l'uso di campioni itterici, lipemici, emolitici o contaminati da batteri. Le sostanze insolubili devono essere rimosse dal campione mediante centrifugazione. I campioni non devono essere inattivati termicamente.

8.2.2 Conservazione dei campioni

I campioni possono essere conservati a 2 °C - 8 °C fino a tre giorni. La conservazione a lungo termine richiede -20 °C. È necessario evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti. Per un uso multiplo, i campioni devono essere aliquotati e conservati a -20 °C.

9 Prestazioni del saggio

9.1 Schema di pipettaggio

Si raccomanda il seguente schema di pipettaggio:

	1	2	3	4
A	CAL 0	Campione 2		
B	CAL 1	Campione 3		
C	CAL 2	Campione 4		
D	CAL 3	Campione 5		
E	CAL 4	...		
F	CAL 5	...		
G	CII	...		
H	Campione 1	...		

9.2 Procedura

È necessario rispettare i tempi e le temperature di incubazione indicati ed evitare significativi sbalzi temporali durante il pipettaggio dei campioni e dei reagenti. La piastra per microtitolazione deve essere agitata brevemente dopo l'aggiunta dei reagenti.

Fase	Descrizione
1. Aggiunta del tampone di diluizione	Aggiungere 100 µL di tampone di diluizione pronto all'uso nei pozzetti dei campioni dei pazienti; lasciare vuoti i pozzetti dei calibratori e dei controlli.
2. Aggiunta di calibratori, controlli e campioni	Aggiungere 50 µL di calibratori, controlli e campioni non diluiti pronti all'uso per pozzetto.
3. Incubazione	Coprire la piastra e incubare per 60 min a temperatura ambiente agitando a > 500 rpm su un agitatore per piastre.
4. Preparazione dei reagenti	Preparare volumi sufficienti di reagenti (B, D/G, H/J).
5. Ciclo di lavaggio	Aspirare la soluzione e lavare 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio con un tempo di immersione di almeno 5 secondi ciascuno; asciugare battendo la piastra per microtitolazione su carta assorbente per rimuovere eventuali gocce residue.
6. Aggiunta del reagente di partenza	Aggiungere 100 µL di soluzione diluita di GAD ₆₅ -Biotina (preparata da H e J) in ogni pozzetto.
7. Incubazione	Coprire la piastra e incubare per 60 min a TA agitando a > 500 rpm su un agitatore per piastre.

8. Ciclo di lavaggio	Aspirare la soluzione e lavare 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio con un tempo di immersione di almeno 5 secondi ciascuno; asciugare battendo la piastra per microtitolazione su carta assorbente per rimuovere eventuali gocce residue.
9. Aggiunta del coniugato	Aggiungere 100 µL di SA-POD diluito (preparato da D e G) in ogni pozzetto.
10. Incubazione	Coprire la piastra e incubare per 20 min a TA agitando a > 500 rpm su un agitatore per piastre.
11. Ciclo di lavaggio	Aspirare la soluzione e lavare 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio con un tempo di immersione di almeno 5 secondi ciascuno; asciugare battendo la piastra per microtitolazione su carta assorbente per rimuovere eventuali gocce residue.
12. Aggiunta di substrato	Aggiungere 100 µL di substrato pronto all'uso in ogni pozzetto e agitare brevemente la piastra.
13. Incubazione	Coprire la piastra e incubare per 20 min al buio a TA senza agitare.
14. Aggiunta della soluzione d'arresto	Aggiungere 100 µL di soluzione d'arresto pronta all'uso in ogni pozzetto e agitare brevemente la piastra.
15. Analisi	Leggere la densità ottica (DO) a 450 nm rispetto a 620 o 690 nm entro 30 minuti dall'arresto della reazione.

9.3 Automazione

L'elaborazione automatizzata dei saggi immunologici deve essere eseguita in modo analogo all'uso manuale e convalidata dall'utente.

10 Valutazione del saggio

10.1 Tracciabilità metrologica

L'immunodosaggio è calibrato utilizzando il preparato di riferimento internazionale dell'OMS codice NIBSC 97/550. I risultati quantitativi sono espressi in UI/mL.

10.2 Valutazione quantitativa

Per la generazione di una curva di calibrazione, i segnali ottici (densità ottica, DO) dei calibratori vengono tracciati rispetto alle loro attività anticorpali e correlati mediante un adattamento logistico a 4 parametri (4 PL). Le attività anticorpali dei campioni sconosciuti possono essere derivate direttamente dai loro segnali ottici utilizzando la curva di calibrazione generata.

10.3 Criteri di validità

I saggi sono validi solo se sono soddisfatti i seguenti criteri di validità:

- DO CAL 0 < CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4 < CAL 5
- DO CAL 5 > 1,2
- Il controllo positivo deve essere valutato positivo e presentare un'attività anticorpale all'interno dell'intervallo di validità indicato nel certificato di controllo di qualità.

Se questi criteri non sono soddisfatti, il saggio non è valido e deve essere ripetuto.

10.4 Risoluzione dei problemi

In caso di saggi non validi, occorre verificare le date di scadenza e le condizioni di conservazione, i tempi e le temperature di incubazione e l'esatta calibrazione di tutti gli strumenti utilizzati. Se non è stato possibile identificare un motivo per cui il saggio non è valido, si prega di contattare il fornitore o il produttore del prodotto.

10.5 Intervalli di riferimento

Gli intervalli di riferimento sono indicati di seguito:

	Interpretazione
Attività anticorpale < 5 UI/mL	negativo
Attività anticorpale ≥ 5 UI/mL	positivo

A causa delle diverse sieroprevalenze nelle singole regioni, ogni laboratorio deve verificare gli intervalli di riferimento con analisi proprie e adattarli, se necessario.

10.6 Interpretazione dei risultati dei saggi

Un risultato positivo del saggio indica la presenza di anticorpi specifici. Un risultato negativo indica l'assenza di anticorpi specifici, ma non

esclude la possibilità di una reazione autoimmune. In caso di risultati incerti, non è possibile effettuare una valutazione affidabile.

10.7 Limiti del metodo

Nella rara malattia neurologica, la sindrome della persona rigida (SPR), il 60% circa dei pazienti presenta nel siero gli anti-GAD65. Gli anti-GAD65 di pazienti con SPR hanno titoli molto più elevati rispetto a quelli dei pazienti con diabete di tipo 1. Per questo motivo i sieri dei pazienti con sospetto di SPR devono essere prediluiti 1:50 o 1:100 con sieri negativi agli anti-GAD65. Gli anti-GAD65 sono presenti anche nel liquido cerebrospinale di pazienti con SPR.

L'interpretazione dei risultati dei saggi deve sempre essere considerata in combinazione con il quadro clinico del paziente. La diagnosi non deve basarsi sui risultati di un solo metodo diagnostico. Tutti i risultati clinici e di laboratorio devono essere valutati per formulare una diagnosi. Per la conferma, è necessario eseguire ulteriori indagini.

11 Caratteristiche delle prestazioni

11.1 Caratteristiche delle prestazioni analitiche

11.1.1 Sensibilità e specificità analitica

Il limite del bianco (LoB) è stato determinato mediante analisi multiple del diluente del campione. Il limite di quantificazione (LoQ) è stato correlato a un coefficiente di variazione intersaggio del 20%.

	Sensibilità analitica
Limite del vuoto (LoB)	< 0,5 UI/mL
Limite di quantificazione (LoQ)	< 1,0 UI/mL

11.1.2 Precisione

La precisione dei risultati del saggio è stata valutata mediante la determinazione della variazione intra- e inter-saggio attraverso l'analisi di più campioni con diverse attività anticorpali.

	Precisione intrasaggio		Precisione intersaggio	
	UI/mL	CV (%)	UI/mL	CV (%)
Campione 1	17	9,0	15	9,1
Campione 2	80	6,1	76	5,5
Campione 3	183	5,7	186	5,3

11.1.3 Intervallo di misura

L'accuratezza, l'esattezza, la precisione, la linearità e il recupero dei risultati del saggio sono stati osservati nell'intervallo di misura del saggio dal LoQ al calibratore superiore in studi completi. I campioni con risultati del saggio superiori al calibratore superiore devono essere riportati come >max. I campioni con risultati del saggio inferiori al LoQ devono essere indicati come <min. Se si osservano risultati del saggio superiori al calibratore superiore, i campioni possono essere analizzati a una diluizione superiore. L'attività anticorpale risultante deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione aggiuntivo.

11.2 Caratteristiche delle prestazioni diagnostiche

11.2.1 Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state valutate analizzando i campioni di siero di 74 pazienti con diabete mellito di tipo I e 57 campioni di donatori di sangue non selezionati.

	Prestazioni diagnostiche
Sensibilità	90,5 %
Specificità	94,7 %

12 Avvertenze e precauzioni

Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* da parte di personale qualificato, autorizzato e addestrato. Tutti i componenti del saggio e i campioni umani devono essere maneggiati con cura in quanto potenzialmente pericolosi. È necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio (BPL) e a tutte le normative pertinenti.

Nel caso in cui il prodotto sia danneggiato o le informazioni sul prodotto, compresa l'etichettatura, siano errate o non corrette, si prega di contattare il produttore o il fornitore.

Questo prodotto contiene preparati di origine umana e/o animale. Qualsiasi materiale derivato da fluidi corporei umani o da organi utilizzati per la preparazione dei componenti è stato testato ed è risultato negativo

all'HBsAg (Antigene di superficie del virus dell'epatite B) e agli anticorpi anti-HIV e anti-HCV. Tuttavia, tutti i componenti e tutti i campioni dei pazienti devono essere trattati come potenzialmente pericolosi in conformità alle leggi nazionali e alle linee guida appropriate sulla sicurezza biologica.

Poiché il prodotto contiene materiali potenzialmente pericolosi, è necessario seguire le seguenti precauzioni: Non fumare, mangiare o bere durante la manipolazione del materiale del kit o dei campioni. Evitare il contatto diretto con il materiale del kit o con i campioni indossando guanti protettivi, camice da laboratorio e occhiali di sicurezza. Non pipettare mai il materiale per bocca. Pulire prontamente le fuoriuscite e lavare accuratamente la superficie interessata con un decontaminante. Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.

Alcuni reagenti contengono ProClin (< 1,0%) come conservante, possono causare sensibilizzazione cutanea (H317) e non devono essere ingeriti o lasciati entrare in contatto con la pelle o le mucose (P280, P333+P313).

Alcuni reagenti contengono azoturo di sodio (< 0,1%) come conservante e non devono essere ingeriti o lasciati entrare in contatto con la pelle o le mucose. La possibile formazione di azoturi di metalli pesanti negli scarichi deve essere evitata mediante un sufficiente risciacquo con acqua.

È necessario osservare le informazioni contenute nella scheda di sicurezza relative ai possibili pericoli, alle misure di primo soccorso, alle misure da adottare in caso di rilascio involontario di grandi quantità, alla manipolazione e allo stoccaggio, ai dispositivi di protezione individuale, alle informazioni sullo smaltimento e alle informazioni sulla tossicologia.

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utilizzatore e/o il paziente.

13 Smaltimento

Per la decontaminazione e lo smaltimento è necessario attenersi alle raccomandazioni del CDC e alle linee guida e normative ambientali locali e nazionali pertinenti. I campioni, i materiali potenzialmente contaminati e i rifiuti infettivi devono essere decontaminati, ad esempio mediante autoclave per 20 minuti a 121 °C.

14 Riferimenti

- Batstra MR, Anstoot HJ, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using β -cell autoantibodies. Clin. Lab. 2001, 47, 497 – 507.
- Seissler J, Hatzigelaki E, Scherbaum WA: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 2001, 109, Suppl 2, 304 – 16.
- Pozzilli P, Manfrini S, Monetini L: Biochemical markers of type 1 diabetes, clinical use. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 2001; 235, 38 – 44.
- Schernthaner G, Hink S, Kopp HP et al.: Progress in the characterization of slowly progressive autoimmune diabetes in adult patients (LADA or type 1.5 diabetes). Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 2001, 109, Suppl 2, 94 – 108.
- Winter WE, Harris N, Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. Clinical Diabetes 2002, 20, 183 – 91.

15 Simboli

	Produttore
	Marchio di conformità CE
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Numero di catalogo
	Identificatore univoco del dispositivo
	Codice lotto
	Limite di temperatura
	Data di scadenza
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Contiene un numero sufficiente di <n> saggi
	Non riutilizzare
	Attenzione
	Avvertenze
	Rischio biologico
	Tenere lontano dalla luce del sole
	Piastra per microtitolazione
	Calibratori
	Controllo positivo
	Reagente di partenza
	Diluente per il reagente iniziale
	Coniugato
	Diluente per il coniugato
	Tampone di lavaggio
	Substrato
	Soluzione d'arresto

16 Modifiche

Modifiche alle attuali istruzioni per l'uso	
Versione attuale	010/09.2023
Sintesi delle modifiche	Chiarimento delle condizioni di stoccaggio del componente H nel capitolo 8; chiarimento delle frequenze di scuotimento nel capitolo 9.