

Saggio immunoenzimatico

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ELISA



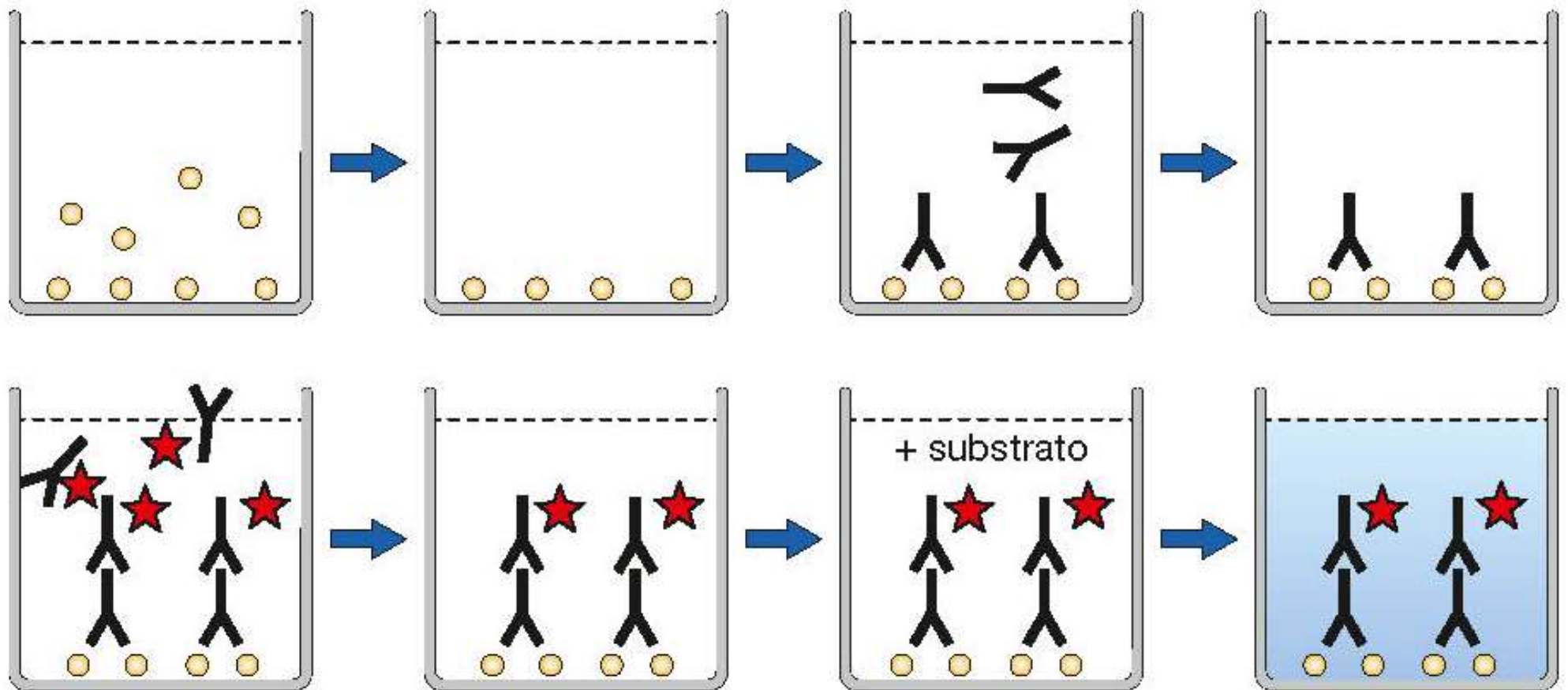
Consideriamo che il pozzetto della multiwell contenga l'anticorpo specifico per l'antigene che ricerchiamo. Si aggiunge il siero-campione che potrebbe contenere l'antigene. Si incuba e si procede al lavaggio per eliminare gli antigeni che non si sono legati.

A questo punto si aggiungono **Anticorpi Secondari** marcati con un **Enzima**.

Questi si fissano all'antigene. Si procede, quindi, al lavaggio e si aggiunge poi uno specifico **Substrato** per l'enzima. Se compare una **Colorazione** significa che la reazione è **Positiva**. L'intensità del colore viene misurata allo spettrofotometro.

Saggio immunoenzimatico
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ELISA

Tecnica ELISA indiretta



Il metodo più utilizzato per la rivelazione dell'avvenuto legame antigene-anticorpo consiste nella coniugazione dell'anticorpo secondario con una molecola che può essere direttamente rivelata.

Anticorpi coniugati ad enzimi

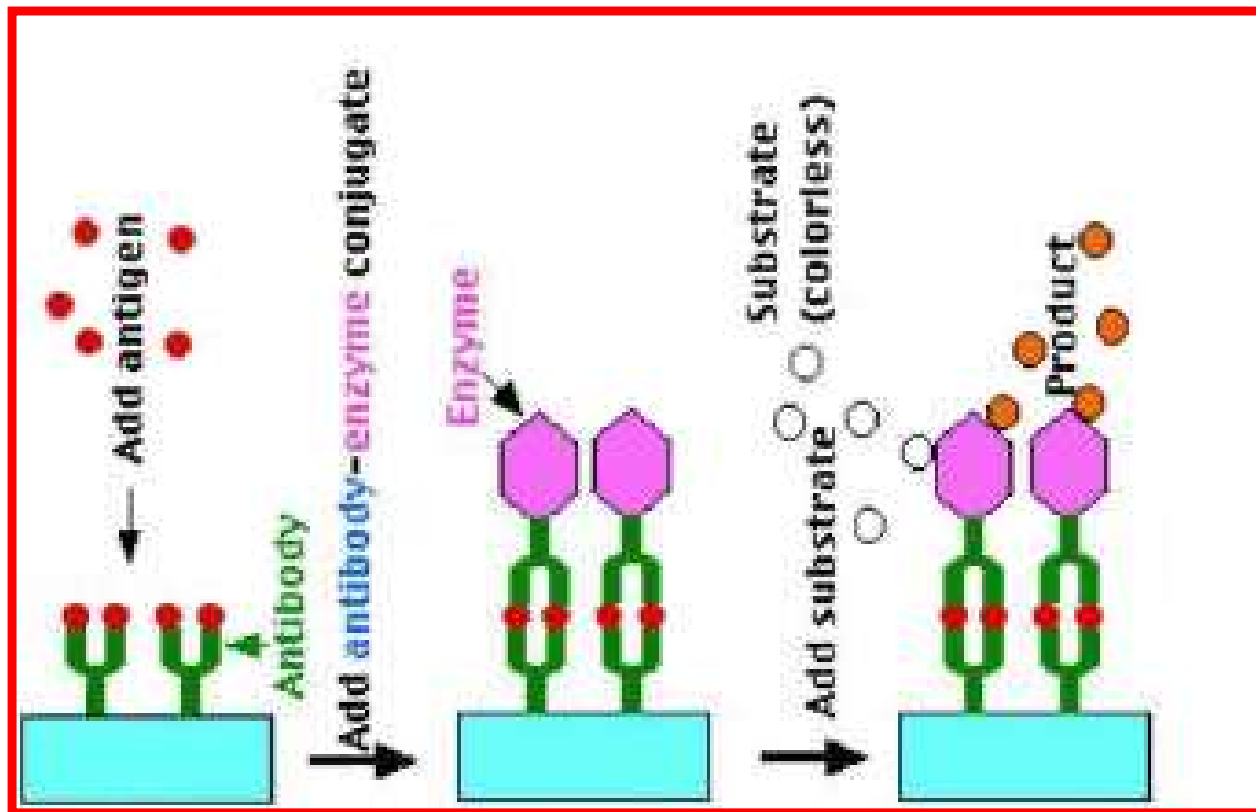
Vengono utilizzati enzimi in grado di convertire un substrato incolore in un prodotto colorato.

- **Alkaline phosphatase**: per anticorpi coniugati alla fosfatasi alcalina si usa in genere il substrato **p-nitrophenylphosphate (pNPP)**, che sviluppa un intenso colore giallo misurabile a 410 nm.

- **Peroxidase**: per gli anticorpi coniugati alla perossidasi si possono scegliere diversi substrati, tra i più utilizzati:

2,2-azinodiethyl-benzthiazoline sulfonate (ABTS), che sviluppa un colore blu-verde misurabile a 410 nm.

o-phenylene diamine (OPD), sviluppa un colore arancio scuro misurabile a 492 nm.



Nel caso in cui l'anti-Ig in eccesso sia stata coniugata alla Perossidasi si aggiunge H_2O_2 e il substrato cromogeno. La Perossidasi riduce l' H_2O_2 e ossida il substrato cromogeno producendo colore.

Nel caso in cui l'anticorpo specifico non sia presente, l'anti-Ig dopo il lavaggio sarà completamente eliminata insieme alla Perossidasi coniugata perciò l'aggiunta di H_2O_2 e del substrato cromogeno non produrrà alcun colore.

Saggio immunoenzimatico diretto

Scopo: questo ELISA viene utilizzato per determinare la presenza e la concentrazione di un antigene in un campione biologico.

Caratteristiche:

- ✓ è veloce ed accurato;
- ✓ utilizzando l'antigene purificato (se disponibile) come standard, permette di determinare la quantità assoluta dell'antigene nel campione analizzato.
- ✓ richiede due anticorpi che riconoscono epitopi diversi sull'antigene.

Questo risultato può essere raggiunto sia utilizzando due anticorpi monoclonali con diversa specificità, o anticorpi policlonali che contengono molteplici specificità e riconoscono regioni o epitopi diversi sull'antigene.

Vantaggi:

- ✓ L'antigene non deve essere purificato.
- ✓ Elevato grado di specificità.

Limite: non tutti gli anticorpi possono essere utilizzati.

Saggio immunoenzimatico indiretto

Scopo: rivelare presenza e concentrazione di anticorpi nel siero e/o plasma

Caratteristiche:

- ✓ è veloce ed accurato;
- ✓ permette di determinare:

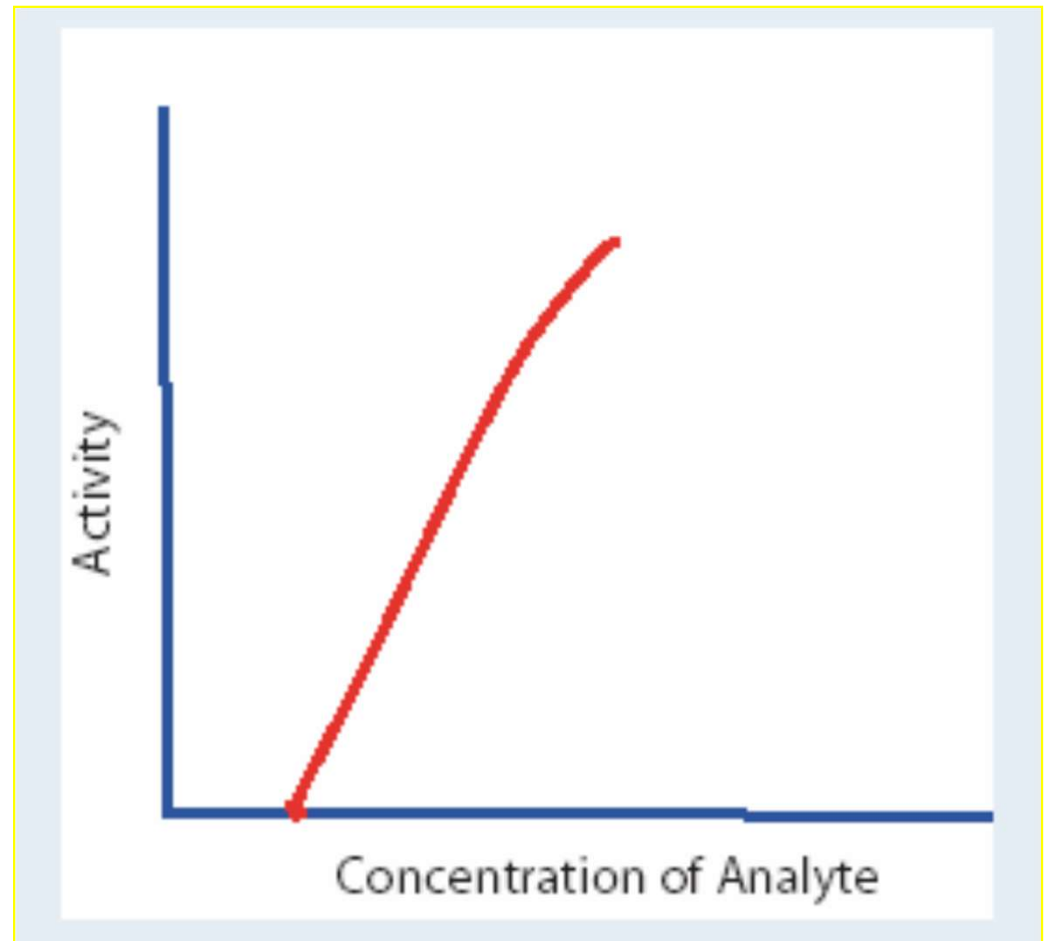
- 1) la presenza di anticorpi contro l'antigene immobilizzato;
- 2) la quantità di immunoglobuline presenti, grazie all'utilizzo di controlli positivi presenti in concentrazioni note.
- 3) Il titolo anticorpale, ovvero la più alta diluizione a cui l'anticorpo è ancora in grado di dare un segnale positivo;

Limite: l'antigene deve essere sempre purificato.

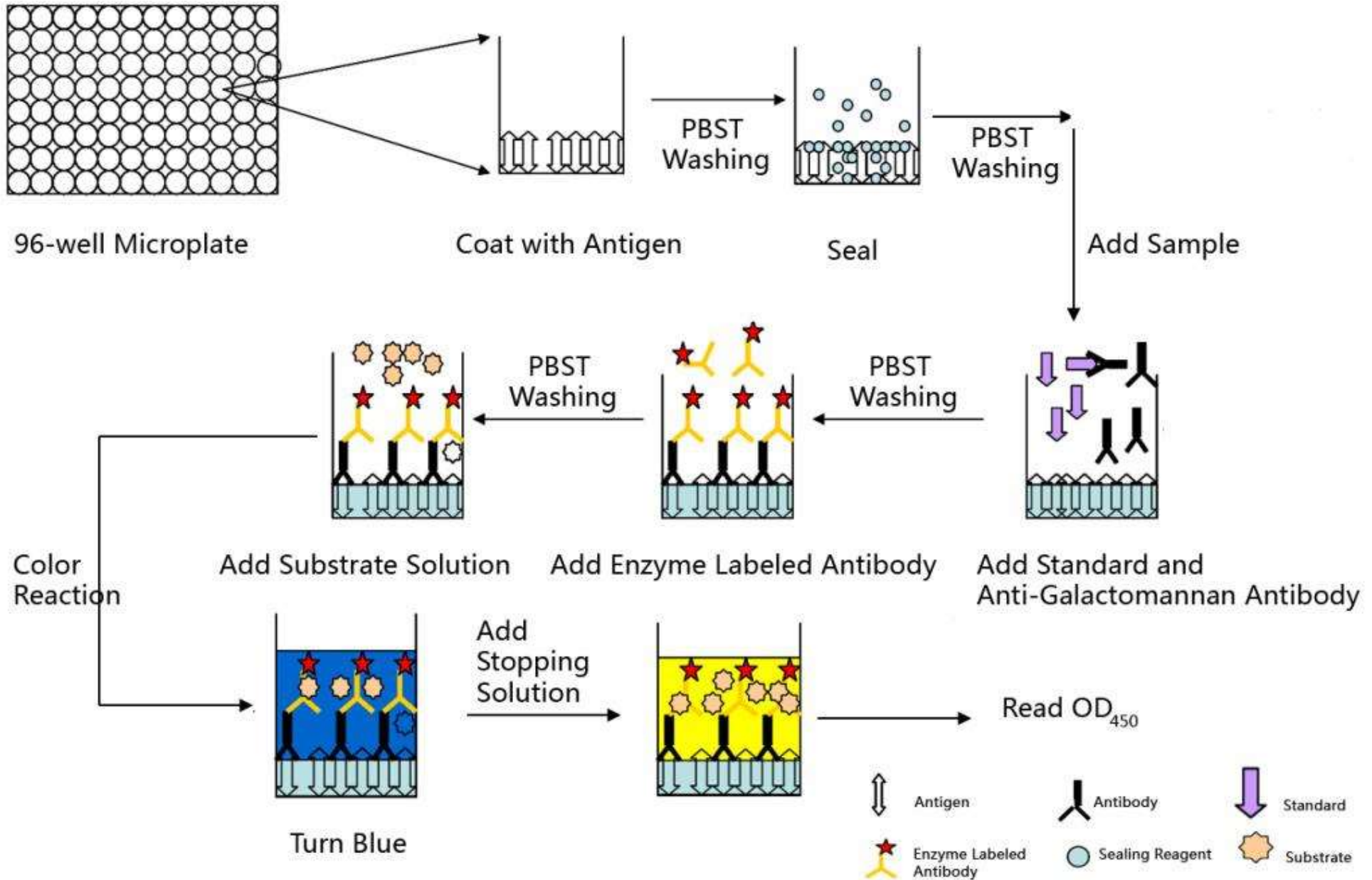
ELISA: quantificazione dei risultati

La quantità di segnale generato dal legame del secondo anticorpo è proporzionale alla quantità di antigene presente nel campione testato.

La quantificazione può essere ottenuta generando una curva standard e comparando l'attività ottenuta con il campione a quella ottenuta sulla curva standard



Platelia Aspergillus- Ag



TEST IMMUNOCROMATOGRAFICI

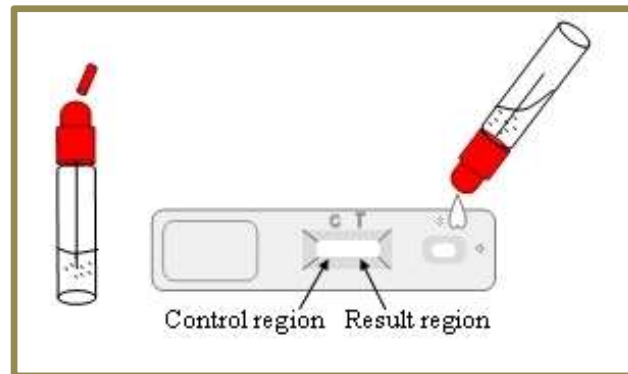
Non invasiva ed altamente sensibile e specifica, sia in fase di diagnosi che di monitoraggio della terapia, è la ricerca degli antigeni dell'*H. pylori* nelle feci.

Tra questi i più utilizzati sono i test rapidi immunocromatografici su card per la rilevazione qualitativa di antigeni di *H. pylori* in campioni fecali.

Una membrana di nitrocellulosa è ricoperta a livello della regione della linea Test con anticorpi diretti contro l'Ag di *H. pylori* da rilevare.

Durante il test il campione, caricato a livello della finestra ovale disciolto nella soluzione buffer, corre per capillarità attraverso la membrana e reagisce con microsfere colorate legate all'anticorpo diretti contro l'Ag.

In caso di presenza dell'antigene nel campione fecale il campione coniugato si ferma a livello della linea Test creando una linea colorata. Una linea verde apparirà sempre a livello della regione Controllo come verifica che sia stato caricato un volume sufficiente di campione, come conferma che sia avvenuto un flusso corretto del campione e come controllo interno dei reagenti.



Diagnosi batteriologica

Diagnosi diretta

Sospetta infezione batterica

Diagnosi indiretta

sangue
feci
urine
biopsie
tamponi
Ecc.

Siero del paziente

Metodo immunologico
ricerca di anticorpi verso
l'agente batterico

immunoenzimatico (EIA)
immunofluorescenza (IFA)

Diagnosi rapida

Esame colturale

Semina su brodo di arricchimento, terreno solido non selettivo e/o selettivo

Isolamento del microrganismo in coltura pura

Identificazione

Biochimica, immunologica, molecolare

Metodo immunologico
(ricerca di antigeni dell'agente batterico)

- Test di agglutinazione
- ELISA
- Immunocromatografia su membrana

Metodo molecolare
(ricerca di sequenze genomiche dell'agente batterico)

- PCR
- Multiplex PCR
- Nested PCR
- NASBA
- Ibridazione su una sonda verso l'agente batterico



antibiogramma

Studio dell'efficacia degli antibiotici

Uno dei test più importanti che viene comunemente eseguito nel laboratorio di microbiologia clinica è la **determinazione dell'efficacia antimicrobica di un farmaco nei confronti di specifici patogeni.**

Nella pratica clinica questo tipo di test è essenziale per:

- ✓ **Stabilire una corretta terapia;**
- ✓ **Verificare quali siano i farmaci più efficaci nei confronti di un certo microrganismo patogeno;**
- ✓ **Fornire una stima della dose terapeutica più opportuna per la cura della malattia infettiva.**

Valutazione della MIC e MBC

Il metodo più corretto per determinare l'efficacia di un antibiotico nei confronti di un microrganismo consiste nello stabilire, per ogni farmaco antibatterico, la concentrazione minima inibente (MIC) e la concentrazione minima battericida (MBC).

MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*):

Corrisponde alla concentrazione minima di antibiotico in grado di inibire la crescita batterica.

MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*):

Corrisponde alla più bassa concentrazione di antibiotico in grado di distruggere (uccidere) i batteri.

Test per la determinazione della sensibilità batterica ai farmaci antimicrobici: Antibiogramma

L'antibiogramma è un test *in vitro*, consigliato ogni volta che ci si deve sottoporre ad una terapia antibiotica, che permette di valutare se un batterio è sensibile a un determinato farmaco antibatterico. Questo strumento evita l'insorgenza della resistenza agli antibiotici e permette l'uso di farmaci mirati in grado di promuovere l'eradicazione completa del ceppo batterico.

Le principali tecniche per eseguire questo tipo di test sono sostanzialmente riconducibili a due metodi principali:



- Metodo dei dischetti di diffusione
- Test di diluizione in brodo

Metodo dei dischetti di diffusione

Nel metodo dei dischetti di diffusione il microorganismo in esame viene coltivato su piastre contenenti terreno solido (agarizzato) su cui sono applicati dischi di carta da filtro contenenti concentrazioni definite di antimicrobico: se il microorganismo cresce normalmente esibisce **RESISTENZA** al farmaco, se invece è **SENSIBILE** si rende visibile attorno al disco un **alone di inibizione**.

Preparazione del test



Si procede allestendo piastre con idoneo terreno solido inoculate con una quantità di batteri (1.5×10^8) sufficiente a dare uno sviluppo confluento che provochi una patina uniforme sul terreno.

- ✓ Mueller-Hinton agar
- ✓ Agar Cioccolato
- ✓ Agar Sangue

Il terreno deve essere omogeneo, in modo che i vari antibiotici possano diffondere con la stessa velocità

ANTIBIOGRAMMA: TEST DI DIFFUSIONE



Subito dopo l'inoculo si depongono sulla superficie della piastra una serie di dischetti di carta assorbente sterili imbevuti di adatte concentrazioni degli antibiotici che si desidera testare.

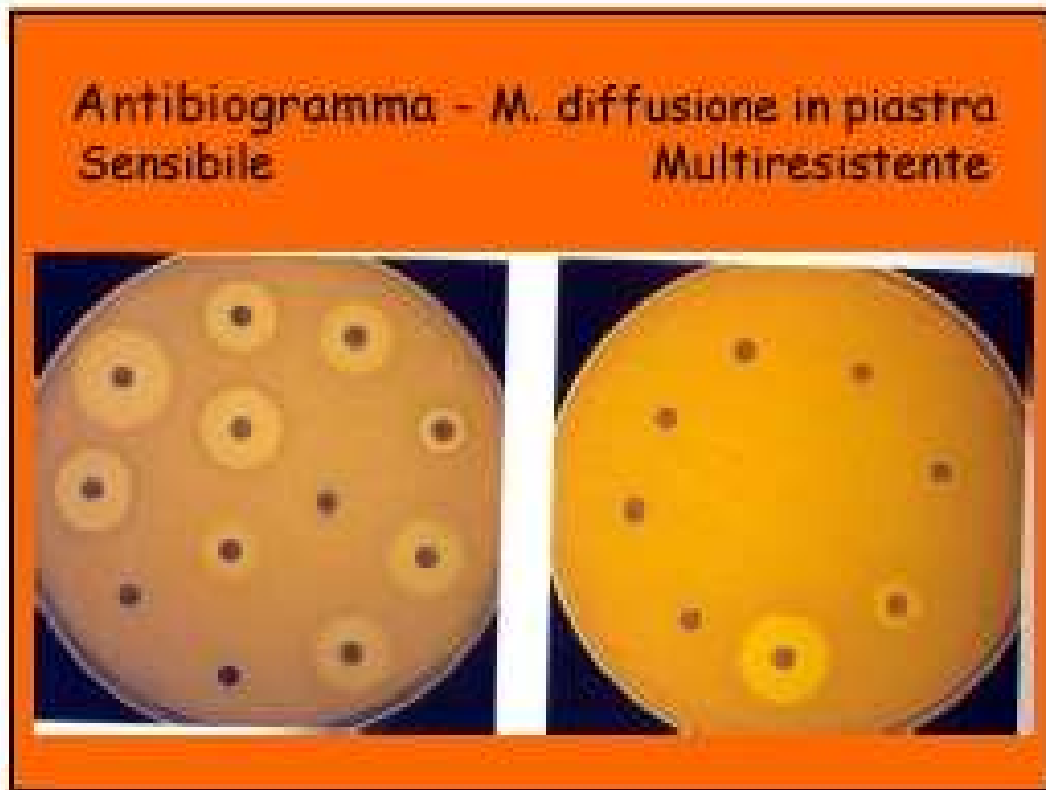
✓ Si divide la piastra in spicchi, uno per ciascun antibiotico, e si deposita al centro di ogni spicchio il dischetto corrispondente, con l'aiuto di una pinzetta sterile.

✓ Si pongono le piastre in incubatore a **37°C per 18-24** ore in aerobiosi o **37°C con il 5-10% CO₂** per anaerobi facoltativi.

✓ Successivamente si valuta la misura del diametro degli aloni di inibizione per ogni antibiotico.

- Durante l'incubazione delle piastre infatti l'antimicrobico diffonde nel terreno in senso radiale verso l'esterno attraverso l'agar, secondo un gradiente di concentrazione.
- Il test può essere influenzato da diversi fattori quali: 1.il tasso di crescita del microrganismo; 2. la diffusibilità del farmaco e 3.da fattori tecnici.
- Allontanandosi dal dischetto, la concentrazione di antibiotico diminuisce e solamente i batteri più sensibili continuano ad essere danneggiati
- I diametri delle zone di inibizione ottenute con vari antibiotici sono convertiti in categorie ovvero: **Suscettibile**, **Intermedio** o **Resistente** riferendosi ad una tabella di riferimento.
- È un metodo **quali-quantitativo**, semplice, rapido ed economico, valido per microrganismi a crescita rapida.
- È il procedimento più comunemente usato in laboratorio, e permette di ottenere una buona valutazione della **MIC**.
- Attualmente il test di diffusione su dischetto più utilizzato è il metodo di **Kirby-Bauer**.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

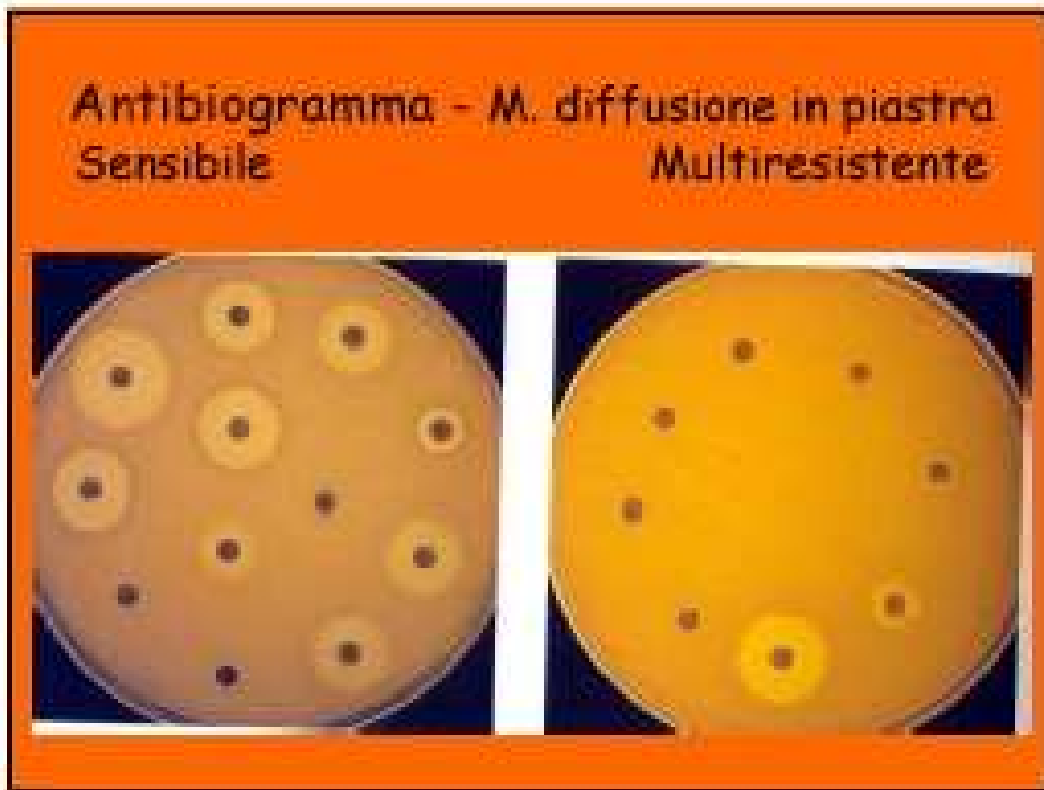


SENSIBILE

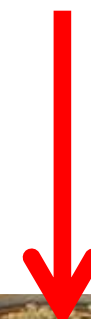


RESISTENTE

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



SENSIBILE



RESISTENTE





Test di diffusione: e-test

Il **test epsilometrico**, detto anche e-test, è una variante oggi molto usata del metodo per diffusione.

Il test si allestisce inserendo nel terreno una o più **strisce di carta bibula** rettangolari (circa 0.4cm x 8cm), contenenti **concentrazioni scalari** dell'antibiotico di cui si vuole saggiare l'attività.

Dopo l'incubazione, si viene ad evidenziare un alone di inibizione a **goccia** intorno alla parte superiore della striscia; in particolare, la base della goccia sarà rivolta verso la parte superiore della striscia con maggior concentrazione di antibiotico,

La punta della goccia sarà rivolta verso la parte inferiore della striscia contenente una minor concentrazione di antibiotico.

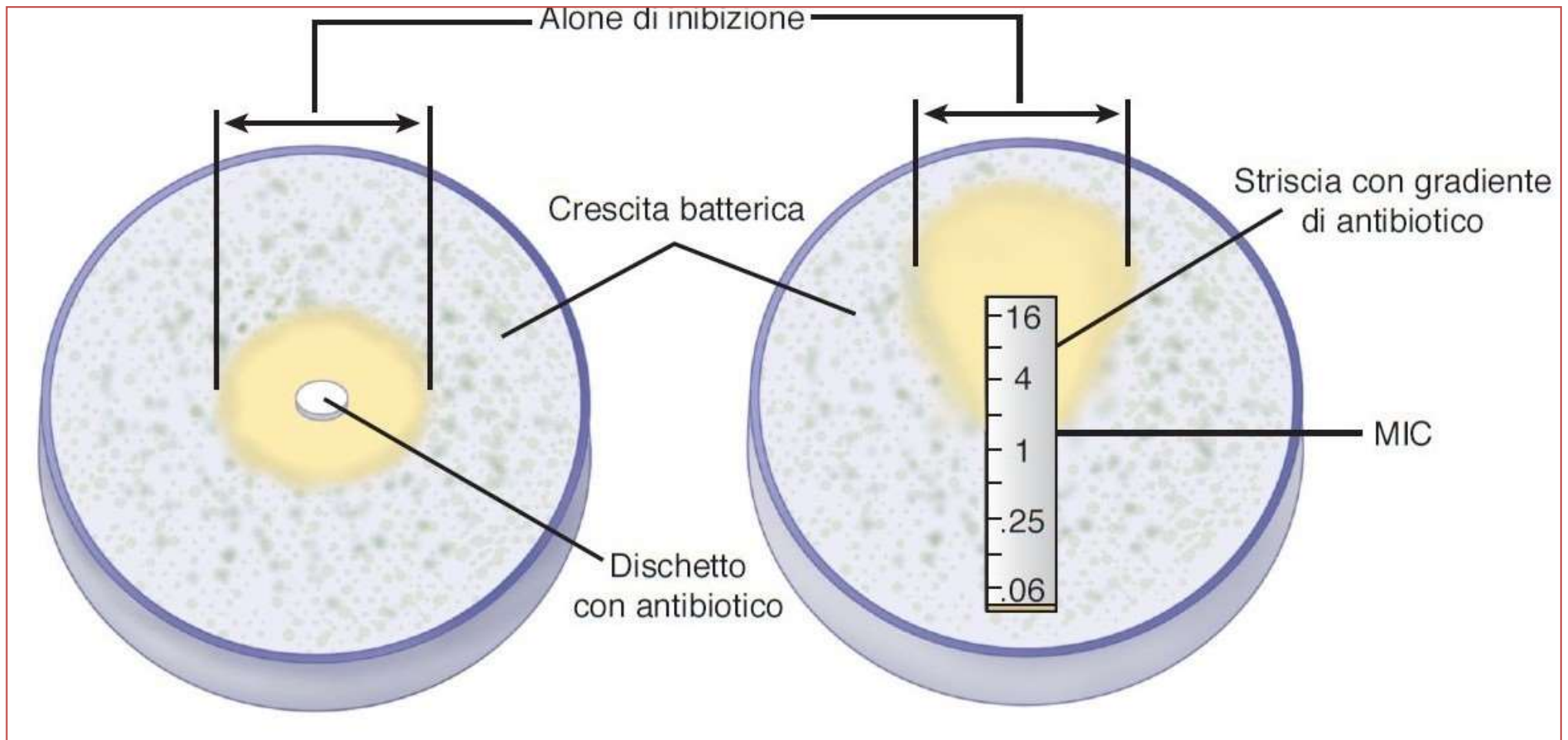
Questo metodo permette di valutare la **MIC** in modo più preciso infatti, il punto in cui la punta della goccia incontra la striscia, corrisponde alla più piccola concentrazione di antibiotico ancora in grado di inibire la crescita batterica.

Il confronto dell'ampiezza delle gocce di inibizione tra strisce contenenti diversi antibiotici, associato alla valutazione dei valori standard, permette la rapida identificazione del farmaco più efficace verso il batterio.

e-test



Test di diffusione



Vantaggi dei Test di diffusione

Nonostante questo approccio sia più lento e più laborioso dei sistemi in brodo automatizzati, ha l'indiscutibile vantaggio di

- **Rilevare la presenza di colonie con morfologie multiple (colture non Pure);**
- **Infezioni miste;**
- **Sub-popolazioni resistenti che appaiono come "colonie interne" all'interno di una zona altrimenti chiara di inibizione.**

Inoltre, è un metodo conveniente e flessibile per batteri aerobi a rapida crescita e batteri anaerobi facoltativi come le *Enterobacteriaceae*, e Stafilococchi, oltre che per batteri con fenotipo mucoide come *Pseudomonas aeruginosa*.

Metodo delle diluizioni progressive

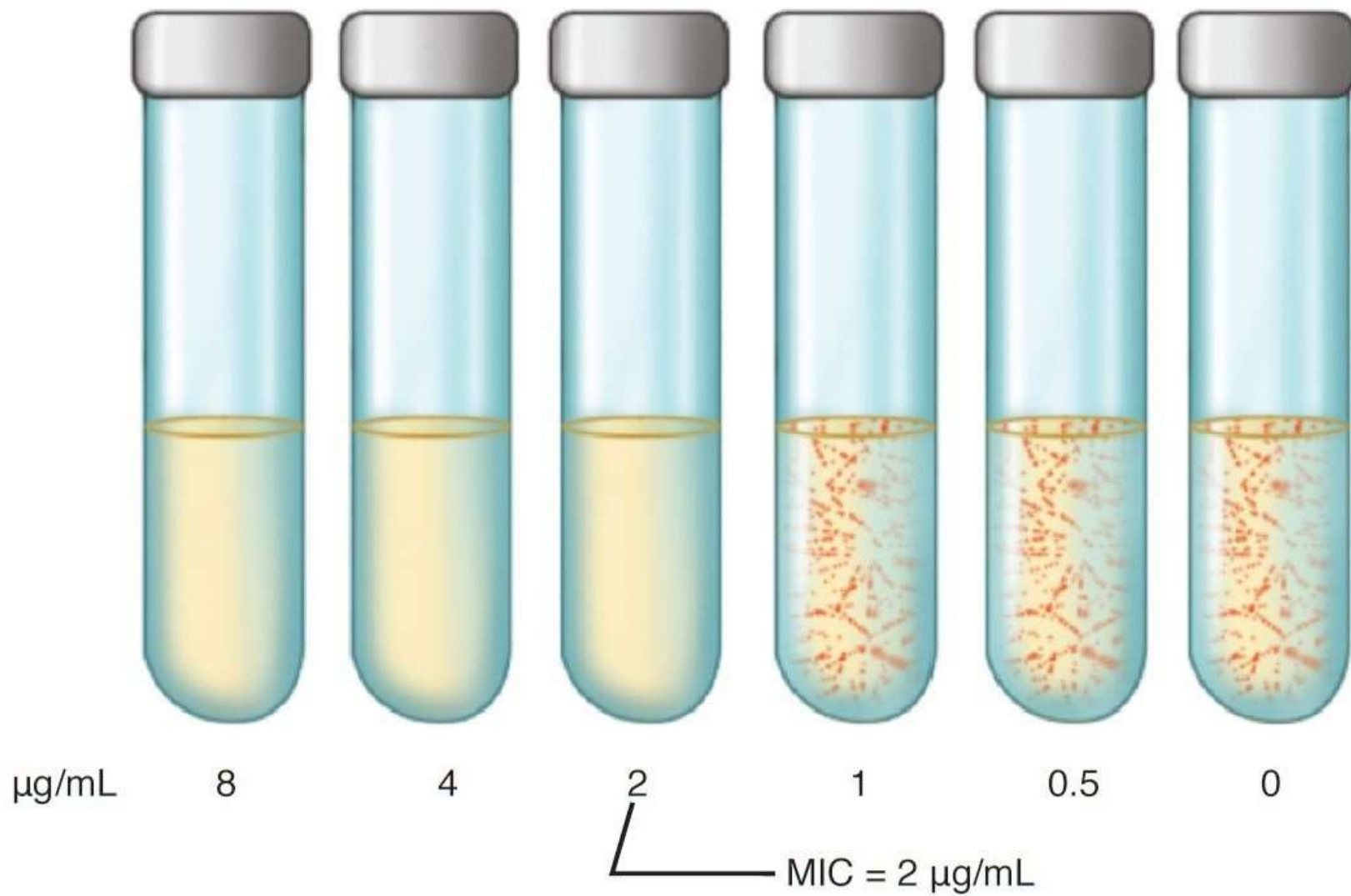
Il test di diluizione determina direttamente la MIC attraverso l'uso di diluizioni seriali dell'agente antimicrobico in Terreno liquido (brodo di coltura), che comprendono un ampio range di concentrazioni incluse quelle significative nella pratica clinica.

- ✓ **Questo metodo è quantitativo e consente di determinare accuratamente oltre alla **MIC** anche la **MBC** (*Minimal Bactericidal Concentration*), ovvero la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di distruggere la totalità dei batteri.**
- ✓ **Il metodo è valido e preciso, ma risulta anche più costoso e di lunga attuazione.**
- ✓ **L'impiego della tecnica manuale è limitato a pochi casi spesso nella ricerca di base.**
- ✓ **Il test oggi è stato completamente automatizzato.**

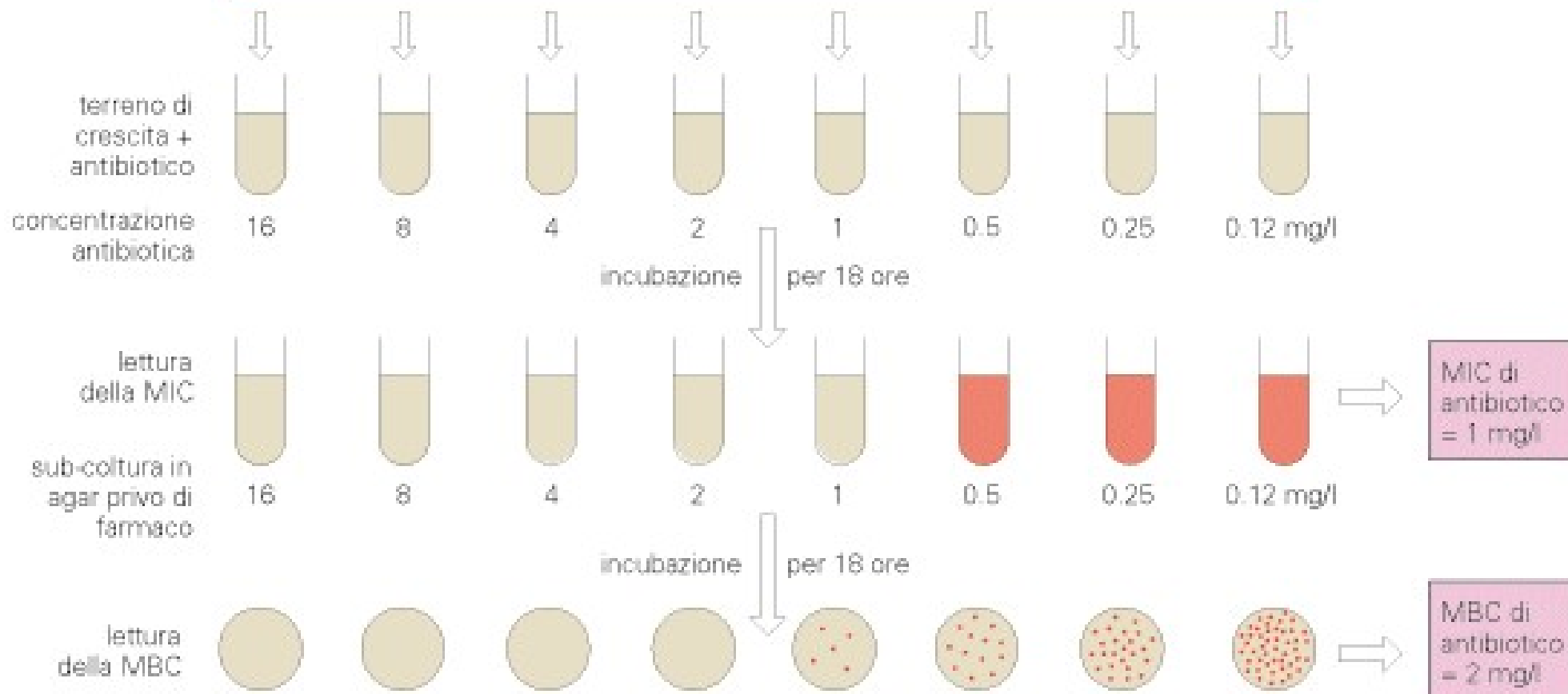
TEST DI DILUIZIONE

- ✓ Nel test di diluizione in brodo di coltura si preparano una serie di provette di terreno contenenti diverse concentrazioni di antibiotico, e le si inoculano con quantità convenzionali dell'organismo da testare a 37°C per 18-24h;
- ✓ L'inoculo batterico di ceppi batterici isolati da paziente è regolata secondo uno standard (da 10^5 a 10^6 batteri/ml) e viene addizionato al brodo di coltura;
- ✓ Dopo incubazione per tutta la notte (o altro tempo predefinito), i tubi sono esaminati per la torbidità determinata dalla crescita batterica;
- ✓ Il primo tubo in cui è visibile assenza di crescita (tubo limpido) corrisponde alla **MIC** per il microrganismo in esame;
- ✓ E' invece possibile calcolare la **MBC** se le provette che non presentano crescita sono sottoposte a subcultura in terreno fresco privo di antibiotico;
- ✓ La concentrazione più bassa di antibiotico alla quale il microrganismo non è in grado di crescere quando viene trasferito in terreno fresco equivale alla **MBC**.

TEST DI DILUIZIONE



inoculo standardizzato del batterio da testare



TEST DI DILUIZIONE: Note

La **Minimum Inhibitory Concentration** (MIC) indica una inibizione della crescita e non che il batterio venga ucciso, sebbene *in vivo* in pratica una lunga inibizione della crescita conduca alla eliminazione del batterio attraverso le difese immunitarie dell'ospite.

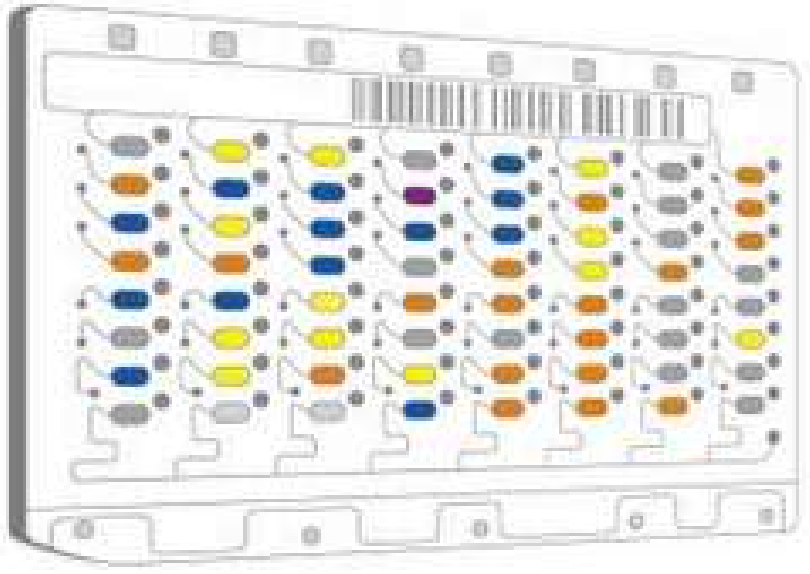
La **Minimum Bactericidal Concentration** (MBC) è generalmente superiore di almeno 2-4 volte il valore della MIC.

Dato che comporta la semina del brodo su agar, la valutazione dell'MBC ha delle limitazioni per il tempo richiesto.

Saggiare l'attività battericida diretta è importante nell'iniziale caratterizzazione e nella valutazione clinica degli agenti antimicrobici ma è raramente necessaria in casi individuali.

Test automatizzati

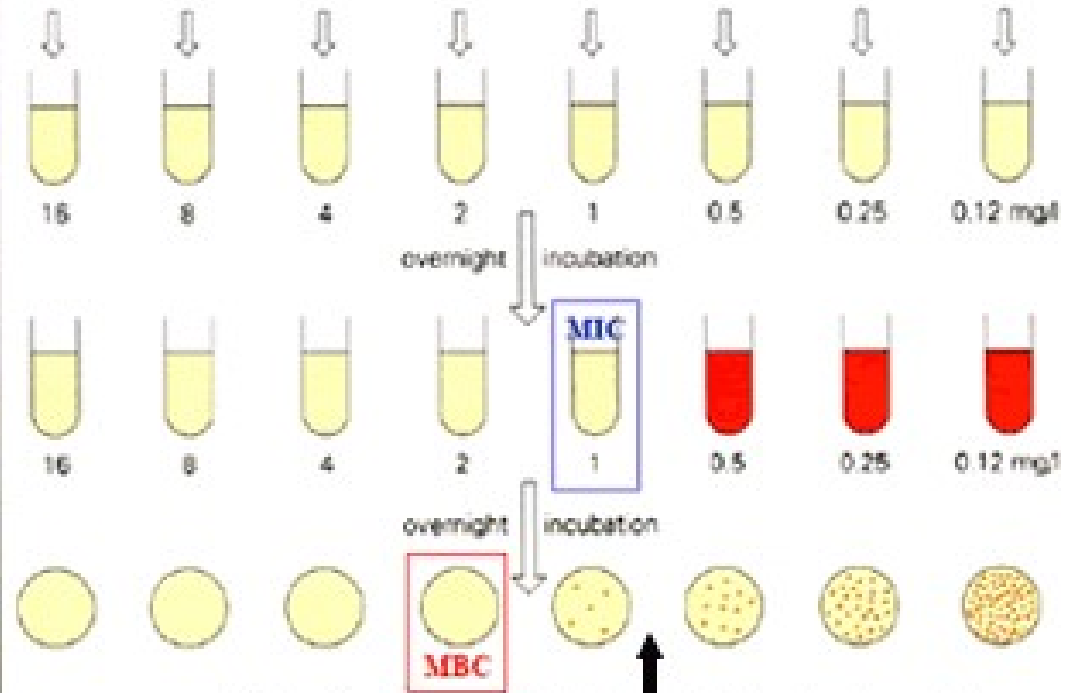
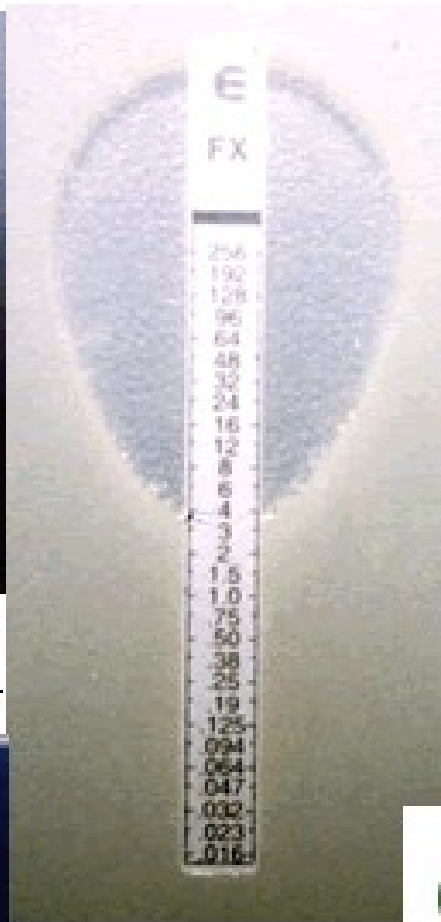
- Oggi sono disponibili strumenti che effettuano in modo rapido versioni automatizzate del test di diluizione in brodo.
- In questi sistemi i batteri sono incubati con l'antimicrobico in unità specializzate che sono lette automaticamente con una certa frequenza.
- Letture multiple e un'aumentata sensibilità nel determinare gli endpoint mediante analisi turbidimetriche o fluorimetriche rendono possibile generare le MIC in meno di 4 ore.
- In laboratori con un volume sufficiente questi metodi non risultano molto costosi rispetto ai metodi manuali, ed i rapidi risultati hanno una maggiore possibilità di influenzare l'outcome clinico, in particolare quando sono interfacciati con sistemi informativi ospedalieri computerizzati.



INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



E-TEST



Metodo delle diluizioni



Metodo di Kirby-Bauer

S

Il microorganismo risponde alle dosi standard di antibiotico somministrato secondo una via opportuna, inclusa quella orale

I

Il microorganismo può essere inibito da concentrazioni di antibiotico raggiunte in seguito a inoculazione parenterale della massima dose di antibiotico possibile

non

R

Il microorganismo risponde alle dosi standard di antibiotico somministrato secondo una via opportuna, inclusa quella orale