

Diagnostica microbiologica

Partizione principale

- **Diagnostica diretta**
 - Trova e identifica l'agente
 - **Isolandolo e identificandolo** →
 - Dimostrando la presenza di suoi prodotti specifici
 - Tossine
 - Antigeni
 - Acidi nucleici
- **Diagnostica indiretta**
 - Cerca le prove di una risposta immunitaria specifica in atto
 - Aumento del titolo anticorpale verso antigeni specifici dell'agente causale
 - Reperto di anticorpi ad alto titolo
 - Reperto di anticorpi della classe IgM, o di anticorpi sIgA, o a bassa avidità

Prelievo

- Campioni oro-faringei
- Liquido pleurico
- Sangue
- Urine
- Campioni ostetrici
- Escreato o lavaggio bronchiale
- Liquido peritoneale
- Liquido cefalo rachidiano

Tappe per la diagnostica microbiologica

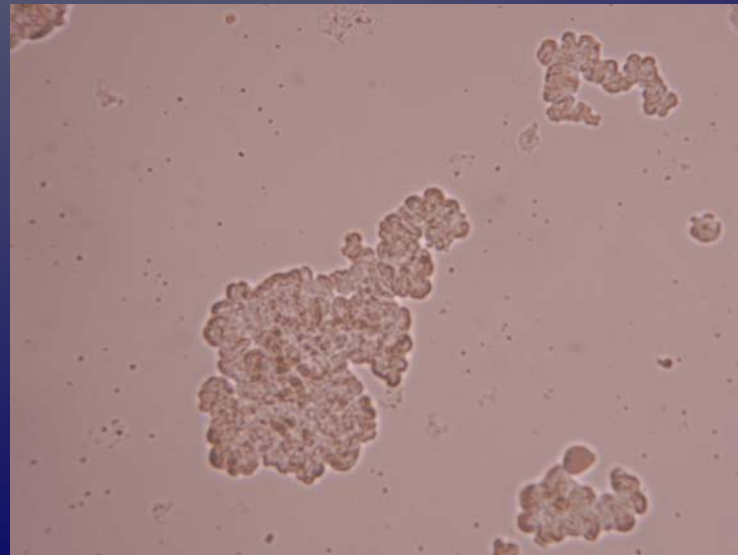
- Esame diretto
- Isolamento e coltura
- Saggi biochimici per l'identificazione
- Antibiogramma
- Ricerca anticorpale (diagnosi sierologica)

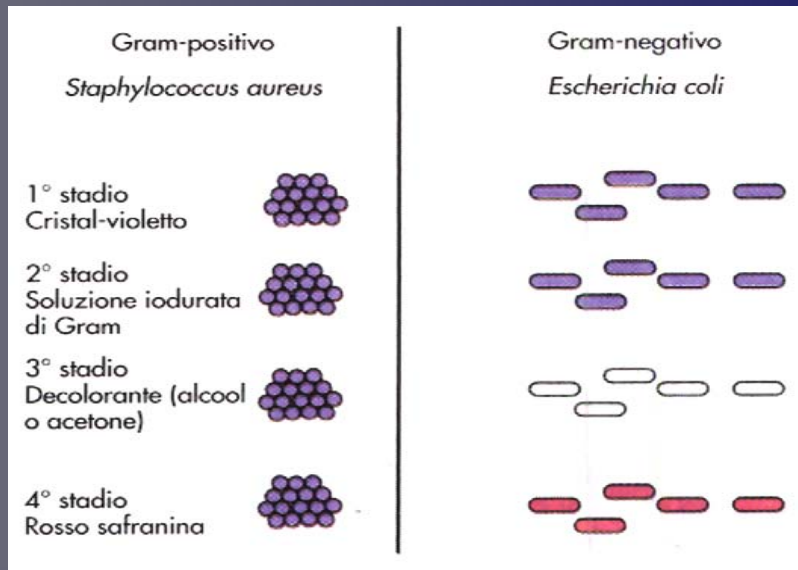
Esame diretto

- Osservazione al microscopio
- Colorazione

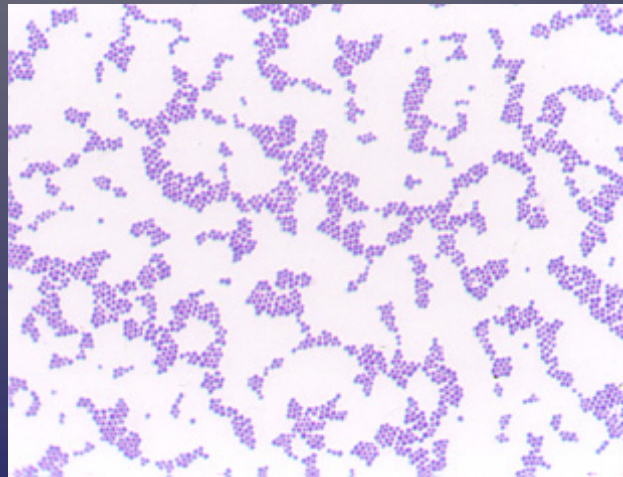
Morfologia delle colonie

- Aspetto macroscopico
- Aspetto microscopico (100x)



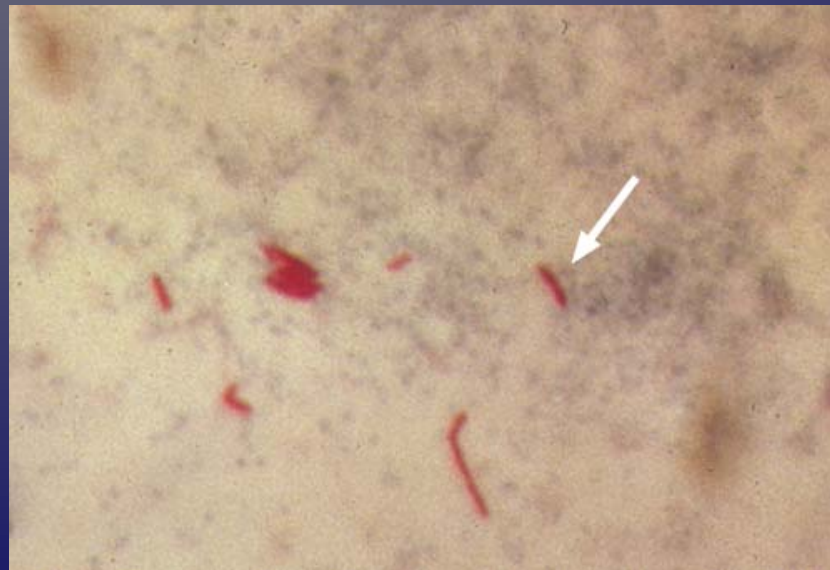


**Colorazione
di Gram**



- ZIEHL-NEELEN o acido resistenza

- L'acido resistenza è una proprietà dei micobatteri. Una volta colorati non si decolorano con soluzioni alcool-acide che sono al contrario in grado di decolorare tutti gli altri batteri



Isolamento e coltura

- Crescita *in vitro* e identificazione dell'agente infettivo

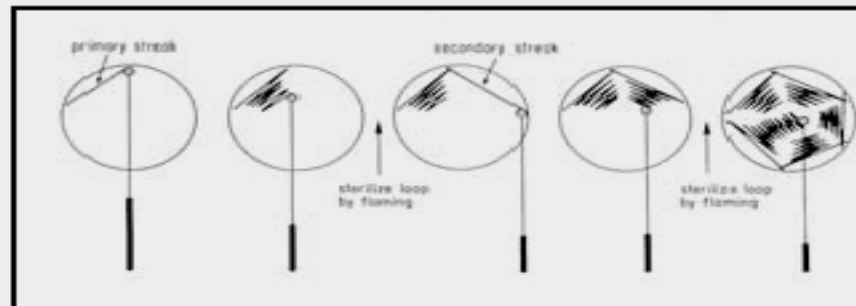
Identification



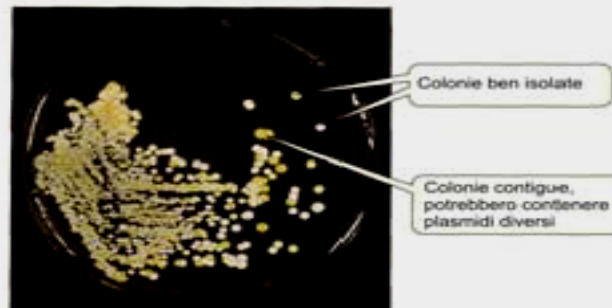
Clonazione iniziale

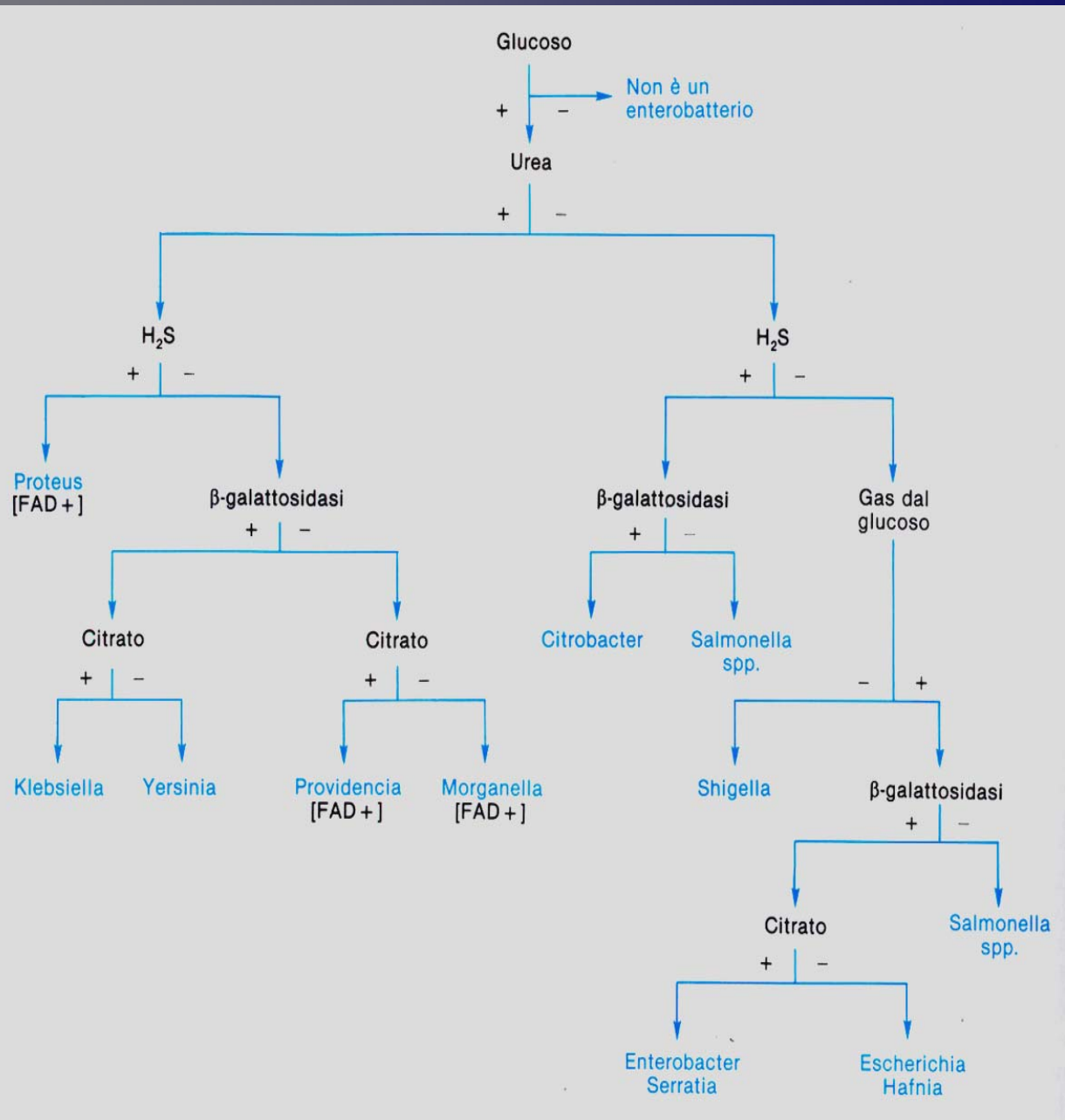
Per ottenere una coltura batterica omogenea e pura si deve inoculare il terreno con una singola colonia ben isolata. Infatti:

- I ceppi mutanti accumulano mutazioni spontanee, seppur a bassa frequenza
- Se i batteri ospitano un plasmide, bisogna essere certi di lavorare con una popolazione omogenea di cellule.



La classica procedura dello **striscio su piastra** è ancor oggi la tecnica più valida. Lo scopo è quello di ottenere una diluizione spinta della coltura di partenza.





Chiave diagnostica
 utile per un
 orientativo
 riconoscimento dei
 principali generi di
 enterobatteri

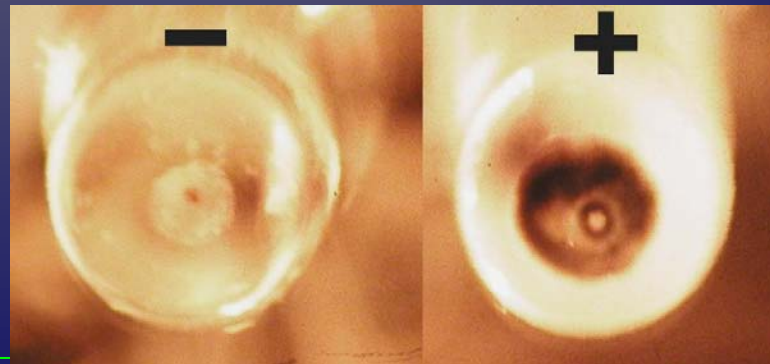
Ureasi

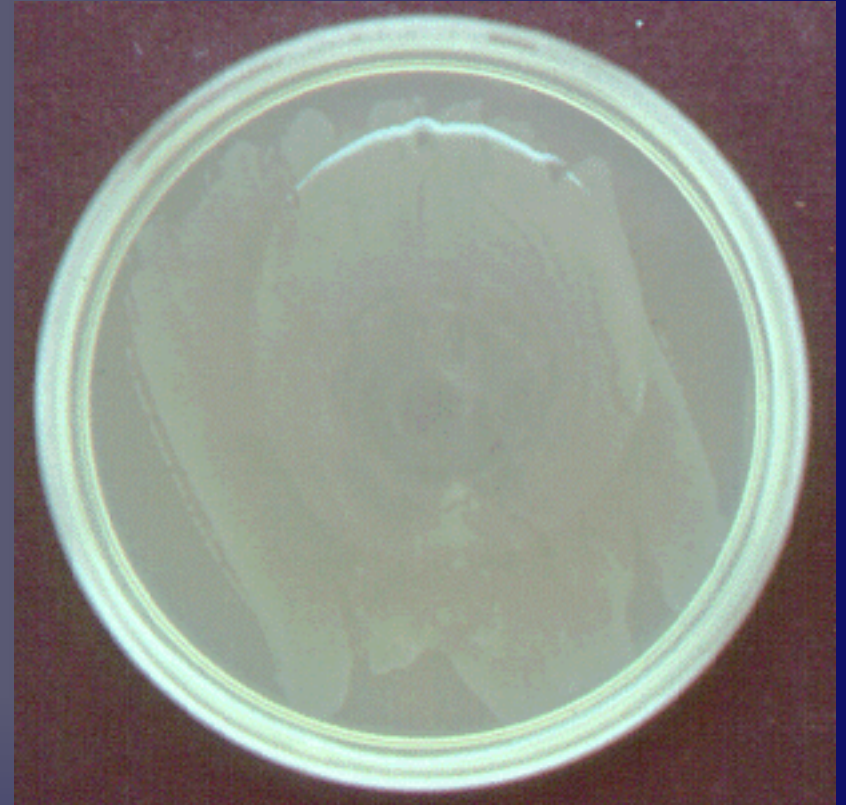
- Alcuni micobatteri sono in grado di idrolizzare l'urea
- L'avvenuta idrolisi è indicata dal viraggio di un idoneo indicatore
 - 3 giorni



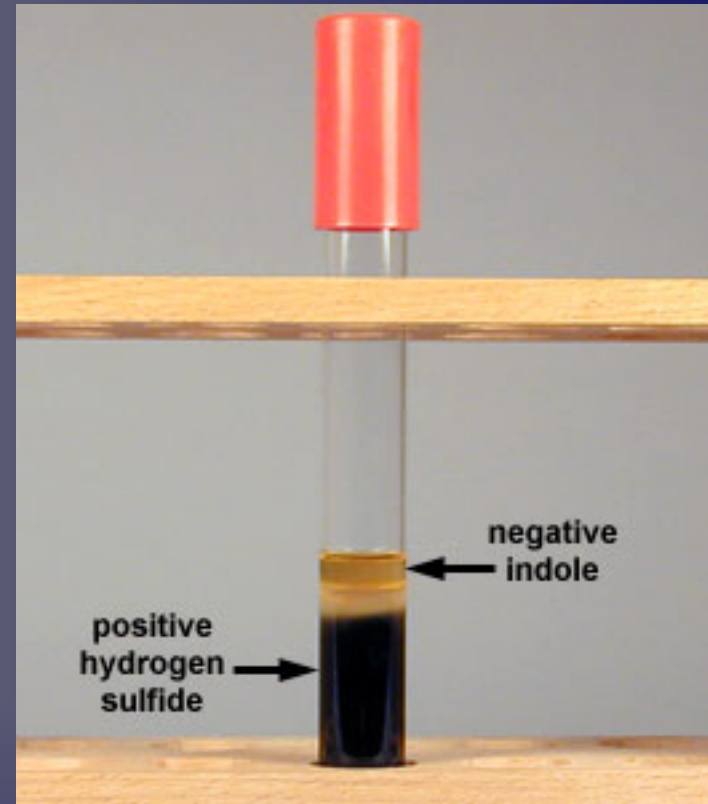
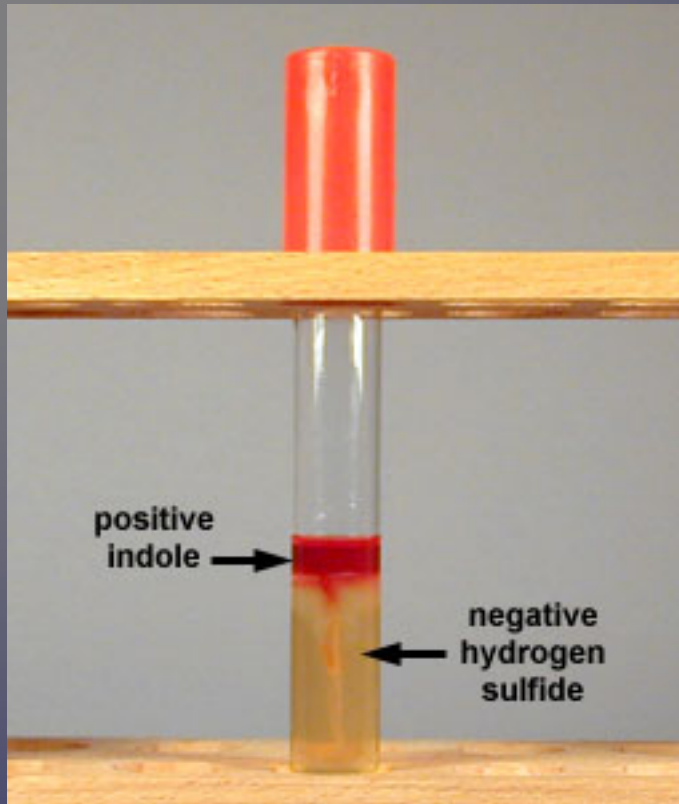
Riduzione del tellurito

- La capacità di ridurre il tellurito di potassio a tellurio metallico si evidenzia dalla formazione di un precipitato nero
 - 10 giorni





•Catalasi

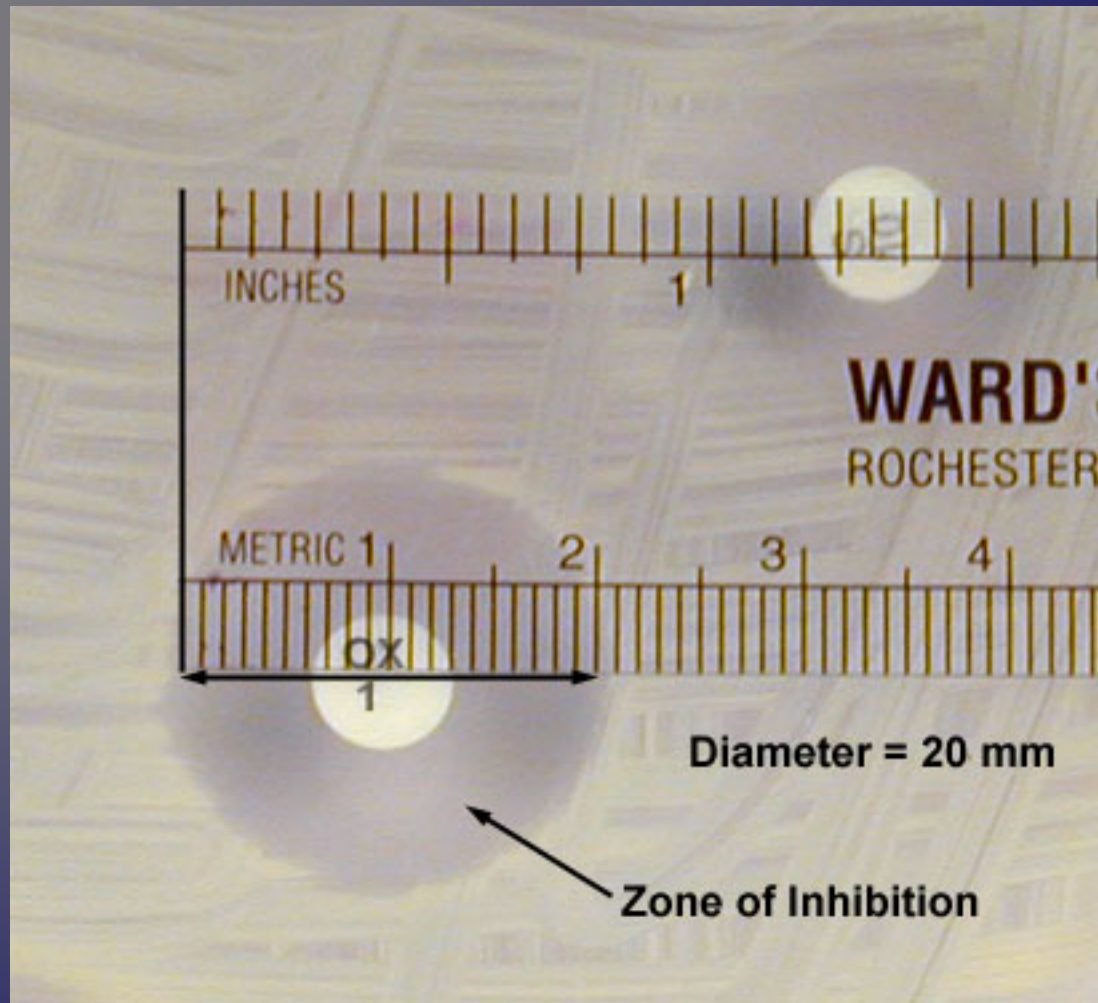




Antibiogramma

- Test per l'individuazione degli antibiotici nei confronti dei quali il nostro isolato è sensibile e/o resistente





Diagnosi sierologica

- I test sierologici misurano la risposta anticorpale sierica del paziente in seguito ad una infezione. I principali:
- Saggi di agglutinazione
- Reazione di fissazione del complemento
- ELISA o immunoenzimatico
- Immunofluorescenza diretta e indiretta
- Western blot

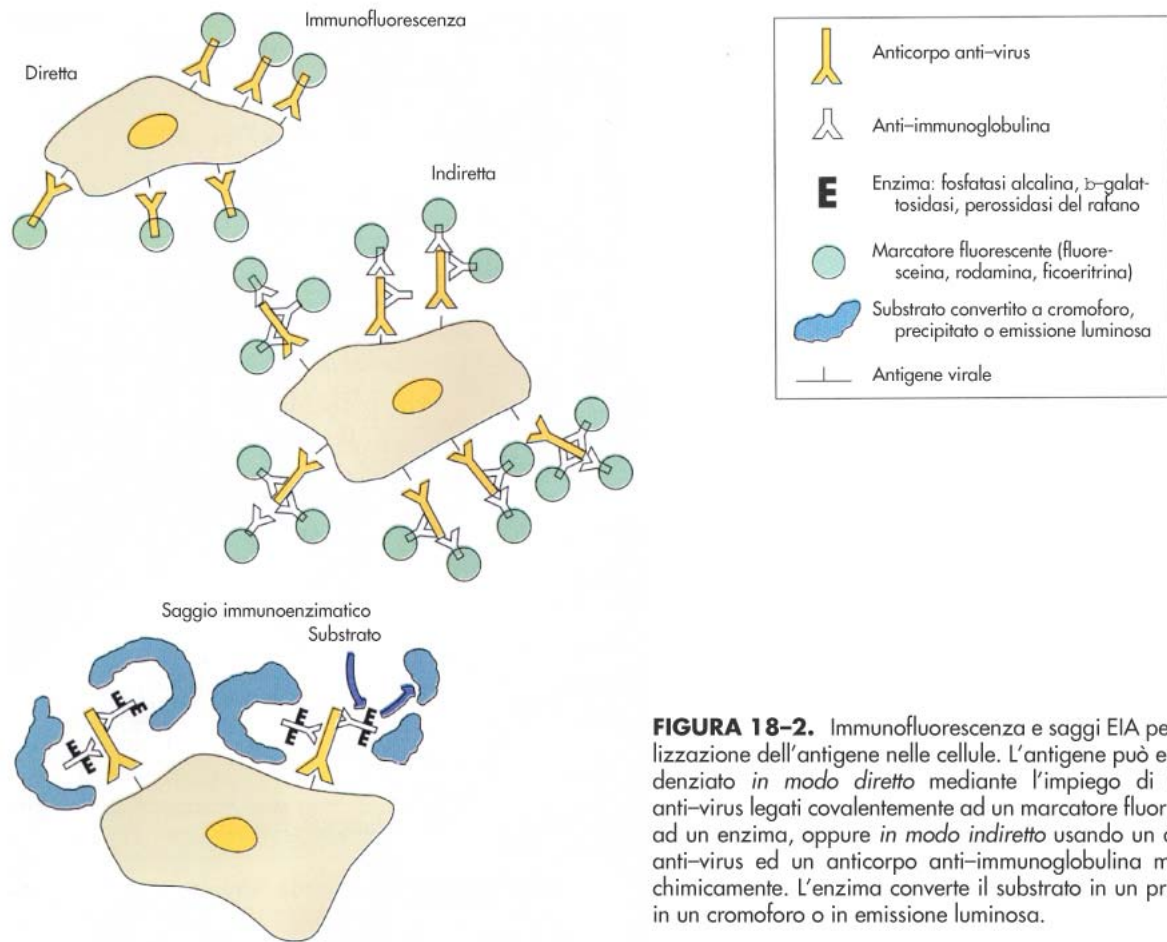


FIGURA 18-2. Immunofluorescenza e saggi EIA per la localizzazione dell'antigene nelle cellule. L'antigene può essere evidenziato *in modo diretto* mediante l'impiego di anticorpi anti-virus legati covalentemente ad un marcatore fluorescente o ad un enzima, oppure *in modo indiretto* usando un anticorpo anti-virus ed un anticorpo anti-immunoglobulina modificato chimicamente. L'enzima converte il substrato in un precipitato, in un cromoforo o in emissione luminosa.

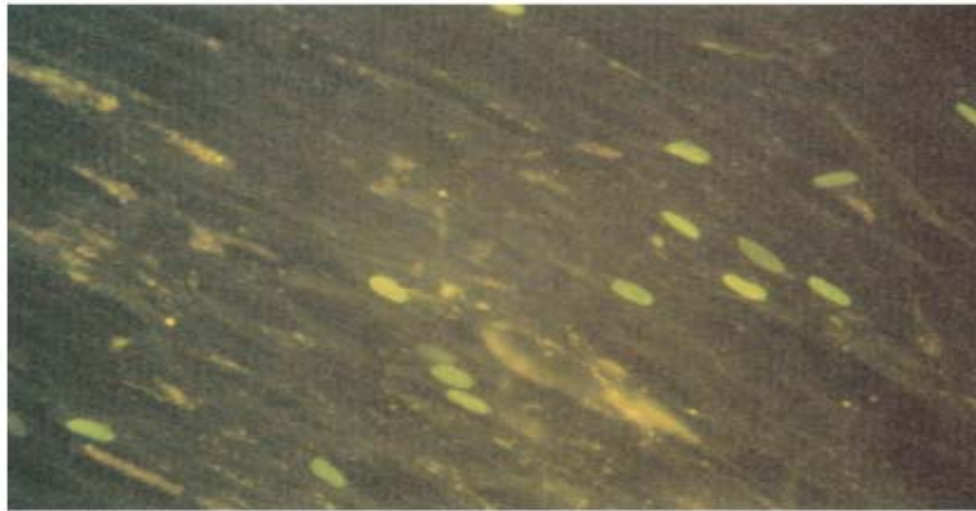
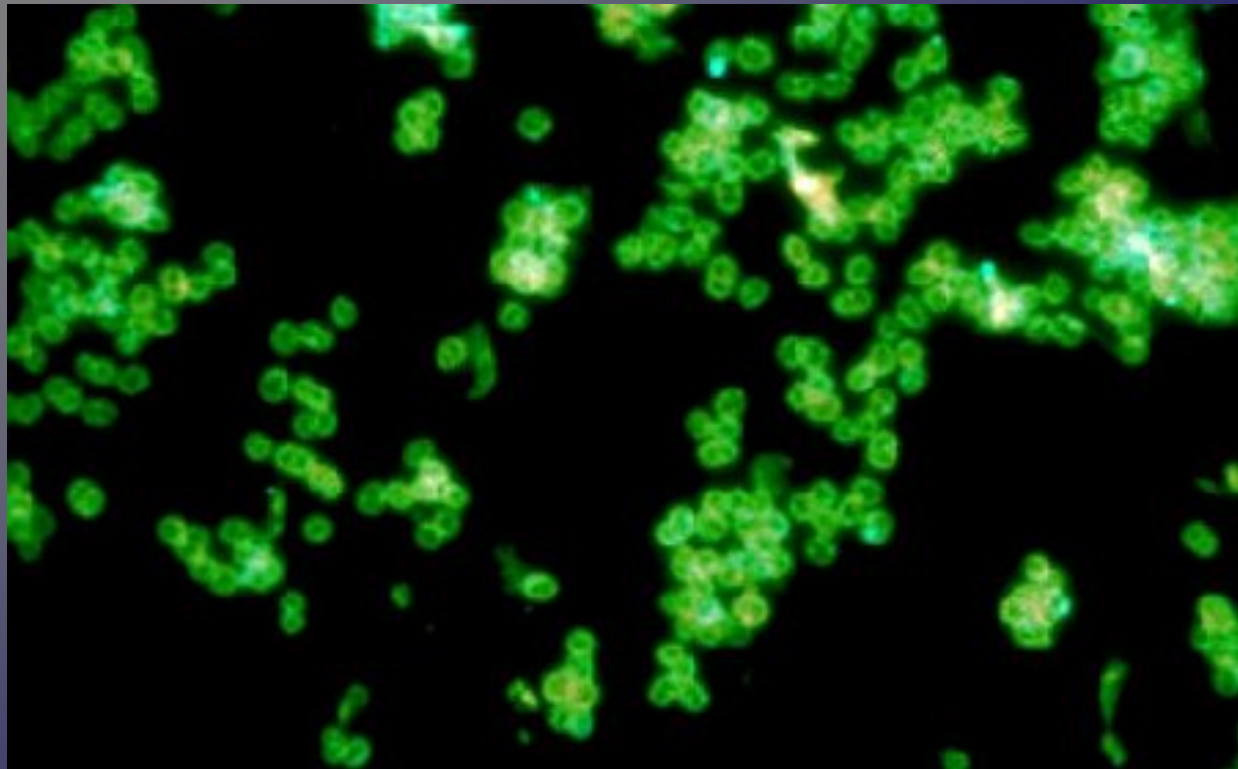


FIGURA 18-3. Localizzazione mediante immunofluorescenza di fibre nervose infettate dal virus dell'herpes simplex in una sezione di encefalo di paziente affetto da encefalite erpetica. (Da Emond RT, Rowland HAK: *A color atlas of infectious diseases*, ed 2, London, 1987, Wolfe).

Murray - Rosenthal - Kobayashi - Pfaller
Microbiologia
EdiSES



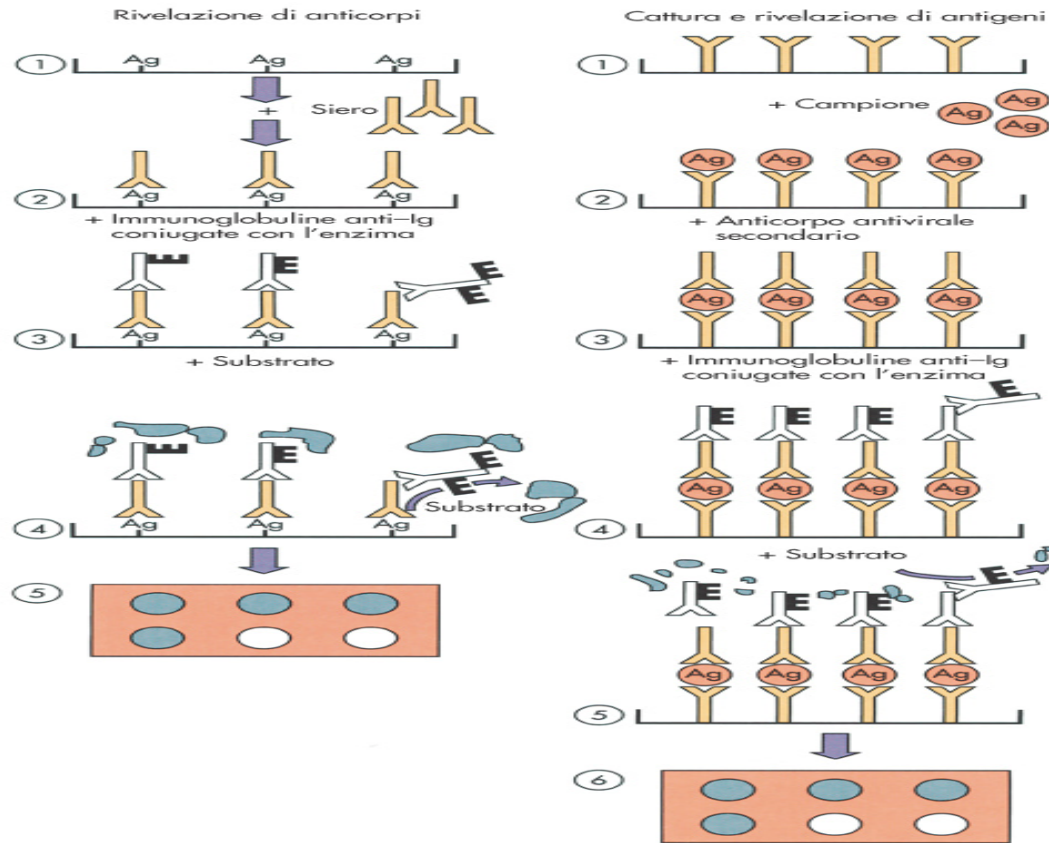


FIGURA 18-5. Saggi EIA per la titolazione di antigeni o di anticorpi. *A*, Rivelazione di anticorpi. 1, L'antigene virale, ottenuto da cellule infettate, virioni o mediante tecniche di ingegneria genetica, viene fissato ad una superficie. 2, Viene aggiunto il siero del paziente che si lascia legare all'antigene. Il siero non legato viene lavato via. 3, Viene aggiunto anticorpo anti-immunoglobuline umane coniugato ad un enzima e l'anticorpo non legato viene poi lavato via. 4, Si aggiunge il substrato che 5, viene convertito in un cromoforo, in un precipitato o in emissione luminosa. *B*, Cattura e rivelazione dell'antigene. 1, Anticorpi anti-virus vengono fatti adsorbire ad una superficie. 2, Viene aggiunto il materiale in esame contenente l'antigene, e l'antigene che non si lega viene poi lavato via. 3, Viene aggiunto un secondo anticorpo antivirale per evidenziare l'antigene catturato. 4, Si aggiunge un anticorpo anti-immunoglobulina umana coniugato ad un enzima, si lava e 5, si aggiunge il substrato, che 6, viene convertito in un cromoforo, un precipitato o un'emissione luminosa.

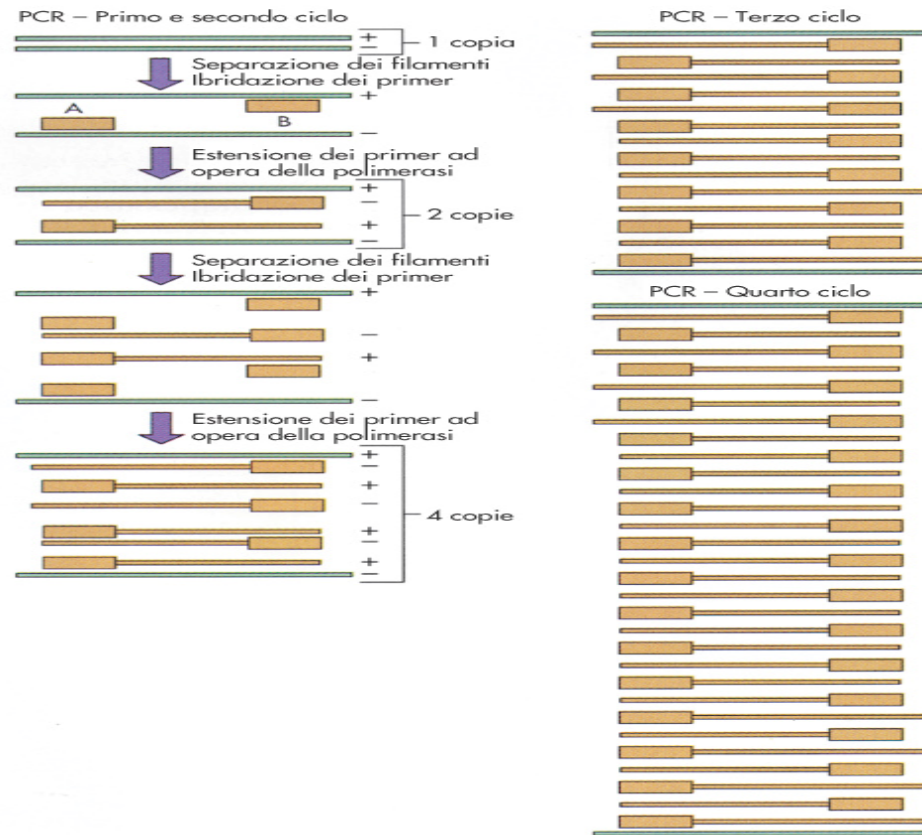


FIGURA 17-4. Reazione a catena della polimerasi (PCR). È un metodo rapido utilizzato per amplificare una sequenza nota di DNA. Un campione viene mescolato con una DNA polimerasi stabile al calore, con un eccesso di deossiribonucleotidi trifosfati e con due oligomeri di DNA (**primers**), complementari alle estremità della sequenza bersaglio da amplificare. La miscela viene riscaldata per denaturare il DNA e, quindi, raffreddata per permettere il legame dei primer al DNA bersaglio e l'estensione dei primer mediante la polimerasi. Il ciclo si ripete per 20–40 volte. Dopo il primo ciclo, solo la sequenza delimitata dai primer viene amplificata. Nella tecnica **RT-PCR**, anche l'RNA può essere amplificato dopo la sua conversione in DNA ad opera di una trascrittasi inversa. A e B, Oligomeri di DNA usati come primer; + e -, filamenti di DNA. (Modificato da Blair GE, Blair Zajdel ME: *Biochem Educ* 20: 87–90, 1992).

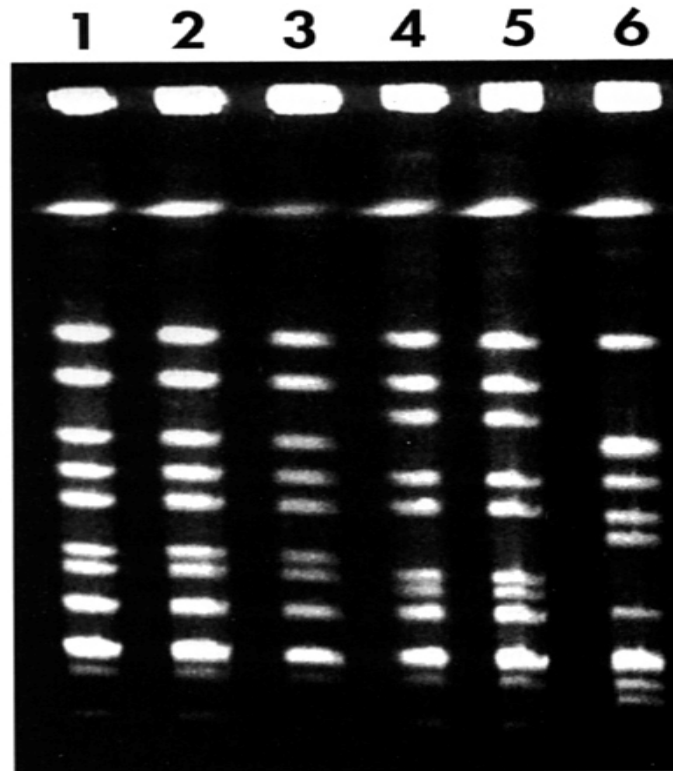


FIGURA 17-1. Analisi mediante RFLP di DNA, proveniente da ceppi batterici separati mediante elettroforesi in gel a campo pulsante. Le linee 1, 2 e 3 mostrano DNA digerito con Sma I isolato da due membri di una stessa famiglia ammalati di fascite necrotizzante e dal loro medico (faringite). Le linee 4, 5 e 6 raffigurano il DNA di un ceppo di *Streptococcus pyogenes* non correlato. (Per gent. conc. del Dr. Joe Di Persio, Akron, Ohio).