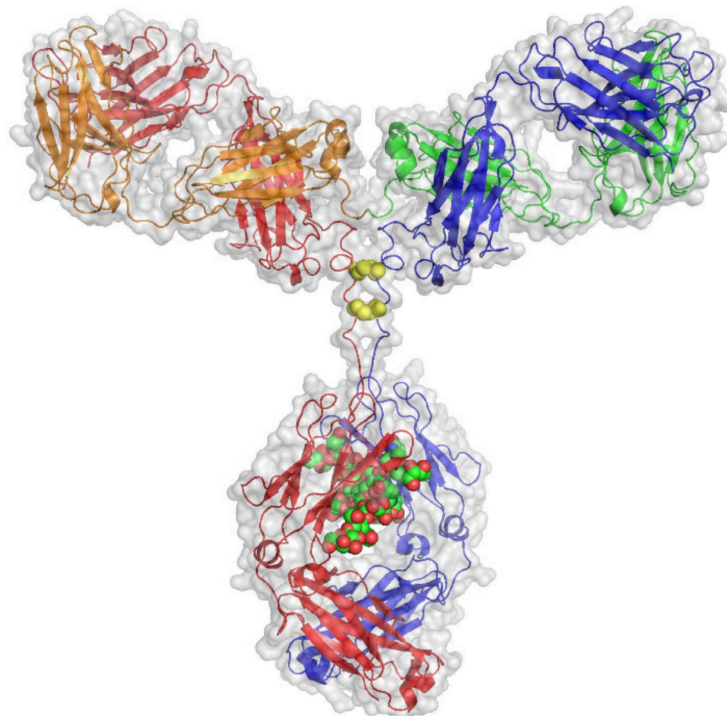




Centro **U**niversità degli Studi di Milano - **S**cuola per la diffusione delle **B**ioscienze

TEST ELISA



Università degli Studi di Milano

TEST ELISA - SAGGIO IMMUNOENZIMATICO

ELISA è un acronimo derivato dall'espressione inglese *enzyme-linked Immunosorbent assay* (saggio immuno-assorbente legato ad un enzima). Si tratta di un versatile metodo d'analisi per determinare la presenza o l'assenza di una specifica proteina bersaglio.

Attraverso una serie di passaggi di lavaggio e di legame, un anticorpo coniugato, o legato ad un enzima, riconoscerà una proteina bersaglio. Quando il substrato viene aggiunto al campione, si verificherà una reazione enzimatica, causando un cambiamento di colore che consente l'identificazione e la quantificazione della proteina bersaglio.

I prodotti colorati possono essere rilevati anche in quantità molto basse mediante lettura colorimetrica per esempio allo spettrofotometro (Fig.1).

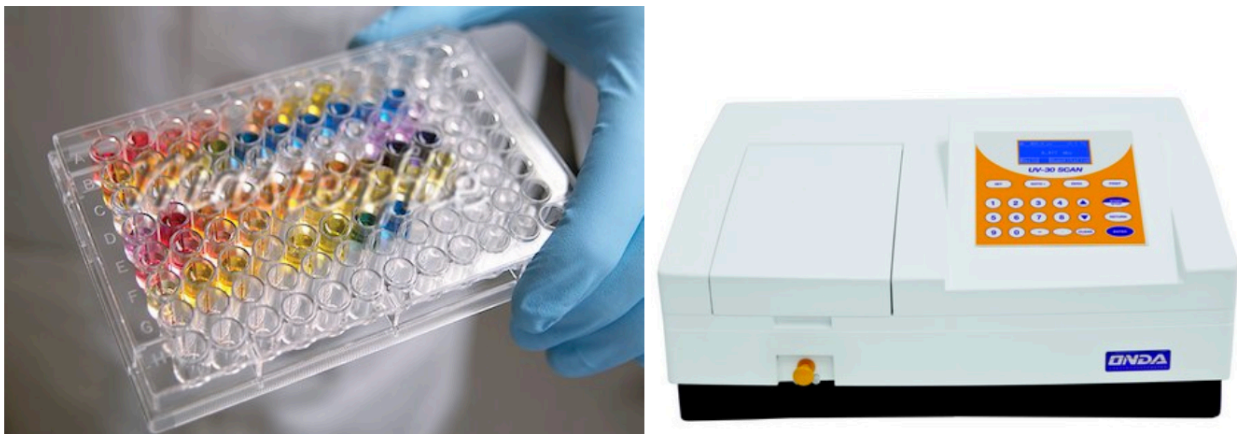


Fig 1. A sinistra piastra in polistirene dove avviene il Test ELISA, a destra uno spettrofotometro

Il dosaggio immunoenzimatico è una delle tecniche più utilizzate in campo clinico, diagnostico e nell'ambito della ricerca scientifica per l'analisi quantitativa di ormoni proteici (ossitocina, insulina, gonadotropina corionica o hCG, ecc.), ormoni steroidei (progesterone, testosterone, estradiolo, ecc.), ormoni aminoacidici (tiroxina, adrenalina, ecc.), farmaci, markers tumorali, citochine, allergeni, tossine nei cibi e numerose altre sostanze.

ANTICORPI

Struttura e funzioni

Gli anticorpi sono proteine plasmatiche indicate anche con i termini di immunoglobuline (Ig) o gammaglobuline (γ G) e rappresentano, nell'uomo, circa il 20% del totale proteico del plasma. Sono presenti nei vertebrati e svolgono funzioni di difesa all'interno del sistema immunitario adattativo che ha, a sua volta, il ruolo di riconoscere sostanze estranee all'organismo e inattivarle. Esistono differenti tipi di anticorpi ma tutti riconducibili a un'unica struttura di base che ricorda la forma di una Y. All'estremità di ogni braccio della Y ci sono due siti identici di legame per l'antigene (Fab region) mentre la regione della coda (Fc region) media molte altre attività dell'anticorpo quali ad

esempio la capacità di legarsi alle cellule fagocitiche (macrofagi, eosinofili ecc.) e di attivare il complemento. Quindi l'azione degli anticorpi non è dovuta solo all'interazione con l'antigene ma anche alle diverse funzioni della regione della coda. Tra le braccia e la coda esiste una regione cerniera (hinge region) flessibile che permette di variare la distanza tra i due siti di legame per l'antigene (Fig. 2). Una molecola di anticorpo è composta da quattro catene polipeptidiche

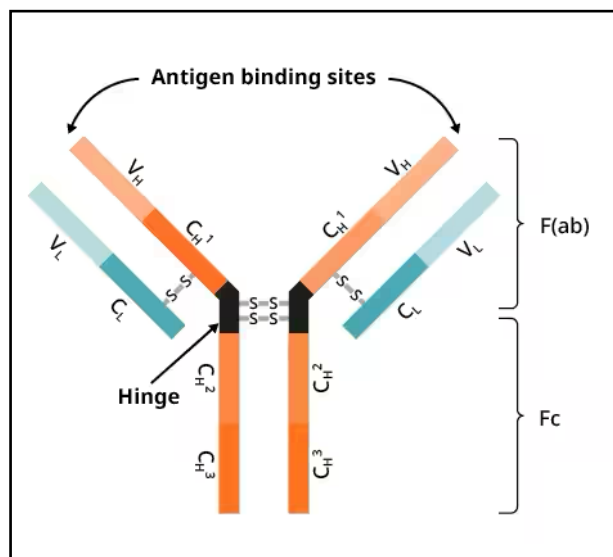


Fig. 2. Molecola di anticorpo

appaiate, identiche a due a due: due catene leggere o catene L (dall'inglese light) formate ciascuna da circa 220 aminoacidi e due catene pesanti o catene H (dall'inglese heavy) composte da circa 440 aminoacidi. Esistono due tipi di catene leggere, designate come κ e λ , e cinque tipi di catene pesanti, α , δ , ϵ , γ e μ che caratterizzano le cinque classi di anticorpi presenti nei mammiferi, rispettivamente IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Fig. 3). Ogni tipo di catena leggera può combinarsi con qualunque tipo di catena pesante. Le quattro catene polipeptidiche sono unite da legami deboli e da ponti disolfuro intercatenari e intracatenari. Ogni catena è

costituita da una porzione costante, o regione C, localizzata dalla parte del gruppo carbossilico terminale e da una porzione variabile, o regione V, disposta dalla parte del gruppo amino-terminale.

Le catene leggere sono formate da due domini: uno nella regione variabile (VL) e l'altro nella regione costante (CL) mentre, in genere, le catene pesanti sono costituite da quattro domini, di cui uno nella regione variabile (VH) e tre in quella costante (CH1, CH2, CH3) (fig.2). Le IgG, IgA e IgD hanno 3 domini costanti e la regione cerniera, mentre le IgM e le IgE sono prive della regione cerniera e hanno cinque domini nelle catene pesanti, di cui uno variabile e quattro costanti. Al dominio CH2 di tutti gli anticorpi si legano residui oligosaccaridici, che portano a definire gli anticorpi come glicoproteine e che ne influenzano alcune attività biologiche (trasporto, secrezione ecc). In corrispondenza delle anse terminali dei domini variabili sia della catena pesante sia di quella leggera ci sono tre piccole regioni ipervariabili (Complementarity Determining Regions o CDR) di circa 5-10 aminoacidi, che formano il vero e proprio sito di legame per l'antigene. Di conseguenza anche le dimensioni del determinante antigenico ovvero della porzione di antigene che entra in contatto con il sito di legame dell'anticorpo, sono generalmente piccole.

Classi di immunoglobuline

Le cinque classi di immunoglobuline presenti nell'uomo hanno la stessa struttura monomerica di base ma differiscono, oltre che nel tipo di catena pesante, anche nella conformazione dell'intera macromolecola. Infatti le immunoglobuline di classe G, D ed E sono monomeri, le IgA comprendono monomeri e dimeri e le IgM sono pentameri (Fig. 3).

Tali differenze conferiscono alle varie classi di anticorpi proprietà funzionali diverse. L'appartenenza ad una classe rispetto che ad un'altra permette agli anticorpi di reagire meglio verso i patogeni per dislocazione (le IgA agiscono prevalentemente nelle mucose), per funzione (solo le IgE possono indurre risposte efficienti verso gli elminti) e per durata (le IgG hanno un'emivita molto più elevata).

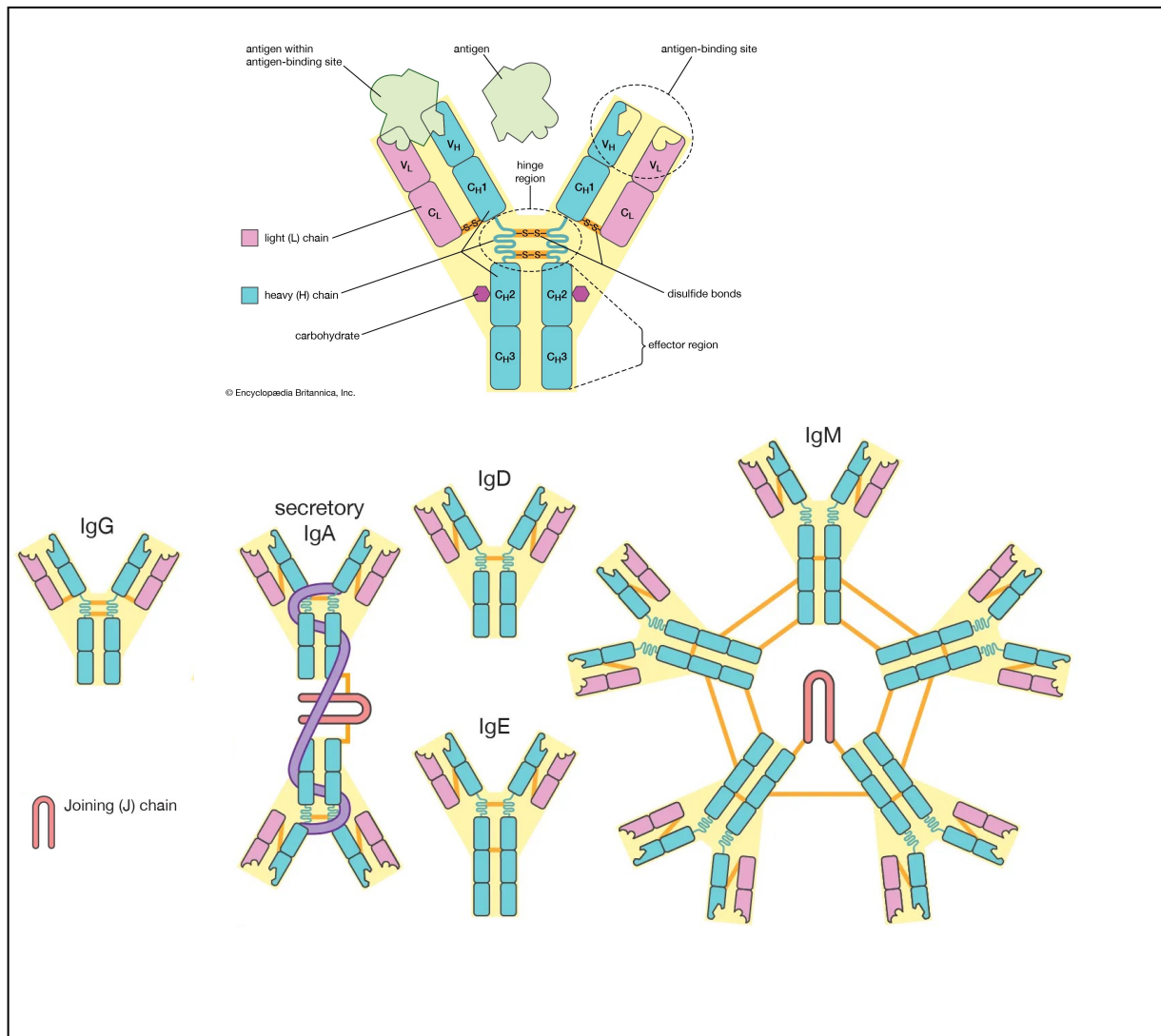


Fig. 3. Rappresentazione della struttura delle cinque classi di immunoglobuline presenti nell'uomo

IgG

Le IgG sono le immunoglobuline più numerose presenti nel siero umano (70-75% circa delle Ig totali) e hanno struttura monomerica. Rappresentano la classe anticorpale più importante nella risposta immunitaria secondaria e favoriscono l'eliminazione dei microrganismi patogeni. Grazie alla capacità di legarsi attraverso il frammento Fc a recettori specifici dei macrofagi possono infatti favorire la fagocitosi e la distruzione dei patogeni (Fig. 4).

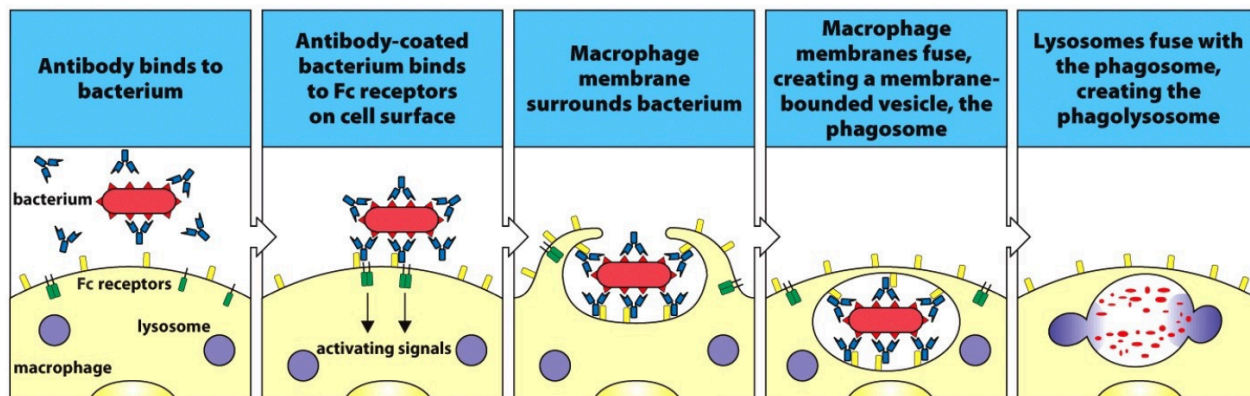


Fig.4. Rappresentazione della modalità attraverso cui gli anticorpi reclutano i macrofagi per l'eliminazione di patogeni

Sono anche in grado di attivare il sistema del complemento che a sua volta porta alla lisi dei patogeni bersaglio.

[Il sistema del Complemento è composto da famiglie di proteine circolanti e di membrana che svolgono un ruolo importante sia nella difesa innata sia acquisita umorale contro i microorganismi].

Inoltre, grazie alla presenza di recettori sulla membrana delle cellule placentali, con cui la coda delle IgG può legarsi, sono le sole in grado di attraversare la placenta ed essere rilasciate nel sangue fetale. I neonati acquisiscono le IgG della madre anche attraverso il latte in quanto possiedono un recettore specifico nell'epitelio intestinale. Il neonato viene protetto per alcuni mesi dopo la nascita.

IgM

Nell'uomo sono circa il 10% delle Ig totali e hanno generalmente una struttura a pentamero, con aspetto a stella. Sono formate da cinque monomeri uniti da un polipeptide di giunzione o catena J (da joining).

Si formano durante il processo di maturazione dei linfociti B; la forma monomerica si inserisce nella membrana dei linfociti B vergini (naïve) come recettore per l'antigene insieme alle IgD. Successivamente al primo incontro con l'antigene, il linfocita B viene attivato e si differenzia in plasmacellula che secerne IgM in forma pentamerica (Fig. 3).

Sono, pertanto, i primi anticorpi prodotti nella risposta immunitaria (risposta primaria), per cui un loro riscontro rispetto a un determinato patogeno indica, generalmente, un'infezione in atto.

IgA

Rappresentano il 15-20% delle Ig sieriche umane ma la loro concentrazione è maggiore nelle secrezioni (saliva, latte materno, lacrime, sudore, secrezioni respiratorie e intestinali).

Le IgA circolanti hanno struttura monomerica. Le IgA secretorie sono, invece, dimeri, costituiti da due monomeri uniti da un frammento J (Fig. 3). La presenza delle IgA a livello delle mucose è fondamentale per impedire ai microrganismi l'adesione e la penetrazione nelle cellule epiteliali.

IgD

Rappresentano meno dell'1% di tutte le Ig plasmatiche. Insieme con le IgM fungono da recettori antigenici sulla membrana dei linfociti B naïve mentre altre loro funzioni biologiche sono ancora poco note.

IgE

Hanno struttura monomerica con 5 domini nella catena pesante (Fig. 3). Sono presenti nel siero solo in tracce. Le IgE sono gli anticorpi coinvolti nelle reazioni allergiche. La parte Fc dell'IgE si fissa al recettore specifico presente sulla membrana dei leucociti basofili e dei mastociti, che sono cellule della reazione infiammatoria localizzate, soprattutto, nel tessuto connettivo della pelle e delle mucose. In questo modo queste cellule diventano recettori per antigeni, chiamati allergeni, normalmente innocui per la maggior parte delle persone.

Dopo la prima esposizione all'antigene, priva di sintomi, vengono prodotte IgE specifiche. A una successiva esposizione allo stesso allergene, questo si lega alle IgE già fissate sulla superficie dei mastociti e dei leucociti basofili, provocando la liberazione di un'ampia gamma di mediatori chimici, come l'istamina. La reazione allergica si manifesta nell'arco di pochi minuti con sintomi diversi a seconda dell'apparato colpito: occhi arrossati, secrezione nasale e starnuti nel raffreddore da fieno, attacchi di tosse e dispnea nell'asma bronchiale, eruzioni cutanee nelle allergie alimentari (Fig. 5).

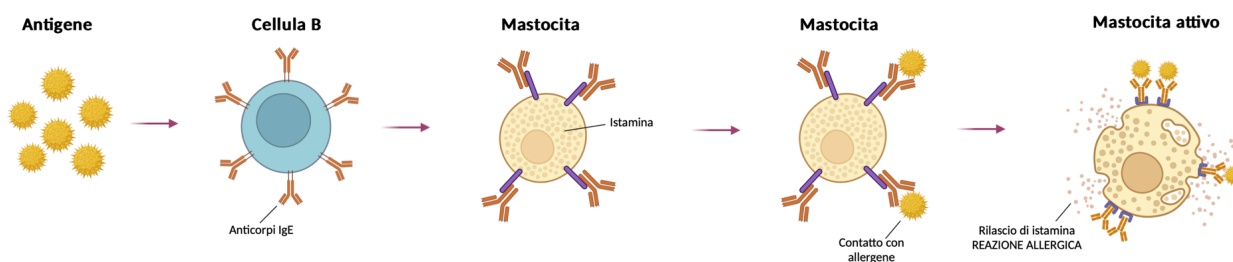


Fig. 5. Schema della reazione allergica: l'allergene causa la produzione, da parte dei linfociti B, di IgE; queste ultime si legano ai mastociti e ai leucociti basofili; una successiva esposizione allo stesso antigene, che si lega alle IgE presenti sulla membrana dei mastociti, determina un loro rilascio di istamina e altre sostanze che causano i classici sintomi delle reazioni allergiche

Legame antigeni-anticorpi

Gli anticorpi si legano solo a specifiche parti degli antigeni denominati determinanti antigenici o epitopi. Un antigene di grosse dimensioni può avere molti epitopi diversi e ogni anticorpo è specifico per uno solo (Fig. 6).

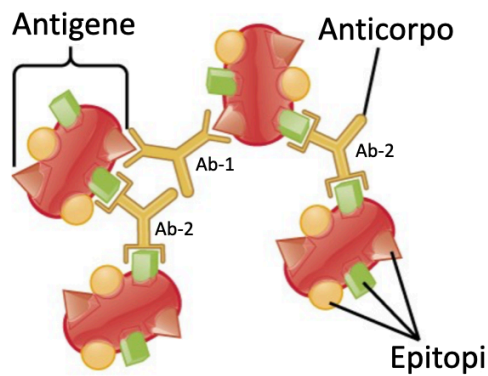


Fig. 6. Antigene con tre epitopi diversi rappresentati da forme e colori diversi. I singoli epitopi vengono riconosciuti da anticorpi diversi (Ab-1, Ab-2)

La natura dei legami anticorpo-antigene è non covalente e di tipo reversibile: ponti H, legami ionici, interazione idrofobiche, interazioni Van der Waals (Fig. 7). La forza complessiva di questi legami è chiamata affinità dell'anticorpo. Una maggiore affinità (espressa in termini della costante di dissociazione) significa che basta una bassa concentrazione di antigene perché il legame avvenga. Durante la risposta secondaria caratterizzata dalla produzione di anticorpi IgG, in sostituzione agli anticorpi IgM caratteristici della risposta primaria, avviene anche la maturazione della affinità degli anticorpi, e vengono selezionati i cloni che producono le IgG con affinità sempre maggiore.

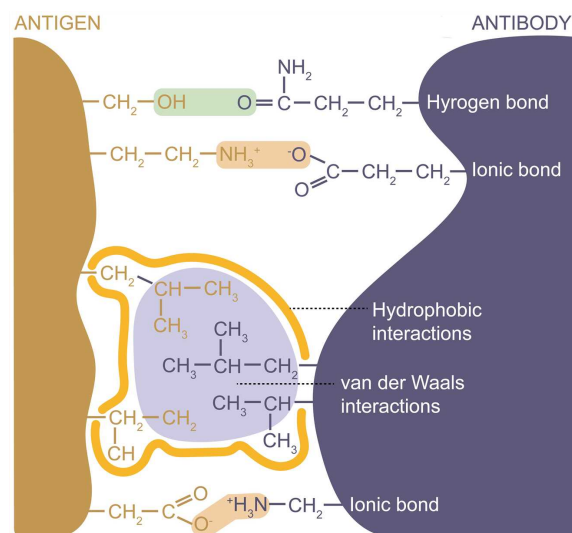


Fig. 7. Natura dei legami antigene-anticorpo

ANTICORPI MONOCLONALI E POLICLONALI

Produzione di anticorpi policlonali

Gli anticorpi policlonali rappresentano un mix eterogeneo di anticorpi dove ciascun anticorpo riconosce diversi epitopi di un particolare antigene. La produzione di anticorpi policlonali inizia tipicamente con l'immunizzazione di un animale con l'antigene bersaglio per stimolare una risposta immunitaria, che comporta la produzione di anticorpi antigene-specifici da parte delle cellule B dell'animale (Fig. 8). Le immunizzazioni dello stesso antigene vengono ripetute a intervalli di diverse settimane per aumentare il numero e l'affinità degli anticorpi antigene-specifici nell'animale. Il siero immunitario risultante (una porzione di sangue contenente gli anticorpi) può essere utilizzato nella sua forma grezza oppure gli anticorpi possono essere isolati mediante purificazione. Gli anticorpi policlonali sono costituiti da una miscela di anticorpi che rappresentano la risposta immunitaria naturale ad un antigene. Pertanto, possono produrre un segnale forte contro l'antigene bersaglio nella loro applicazione e non sono influenzati da un singolo epitopo. Le principali globuline ottenibili con i normali metodi sono IgM ed IgG.

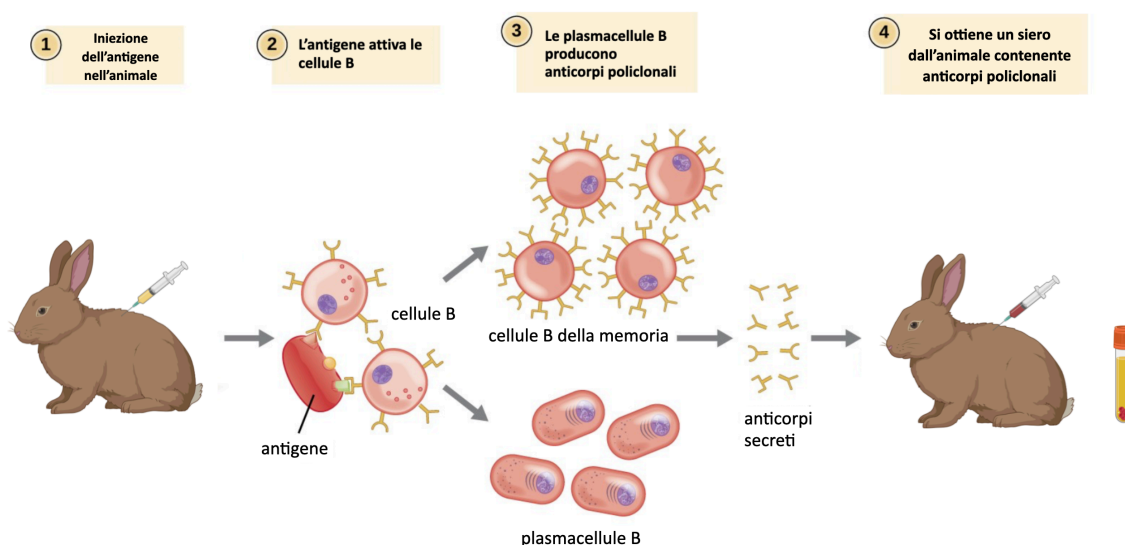


Fig. 8. Produzione di anticorpi policlonali

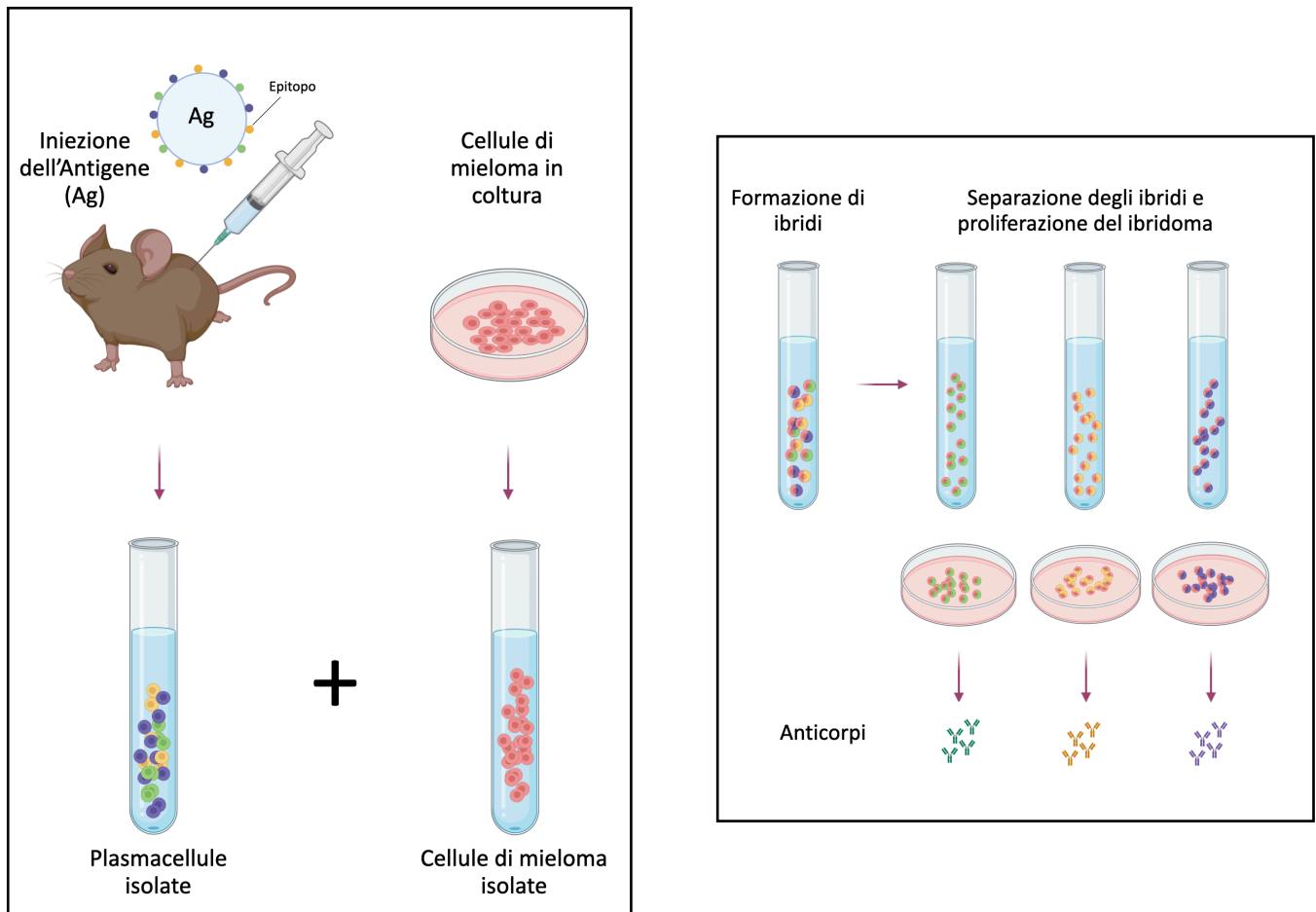


Fig. 9 B. Produzione di anticorpi monoclonali

Produzione di anticorpi monoclonali

A differenza degli anticorpi policlonali, un anticorpo monoclonale deriva da un singolo clone di cellula B e riconoscerà solo un singolo epitopo per antigene (Fig. 9A). Per anticorpi monoclonali si intende una popolazione omogenea di anticorpi prodotti da un clone cellulare (ibridoma) ottenuto per fusione di un linfocita B (proveniente dalla milza o dai linfonodi di un animale immunizzato e con una durata limitata di vita in coltura) con una cellula di mieloma (linea tumorale di plasmacellule che cresce in coltura continuativamente) (Fig. 9B).

Le cellule di ibridoma che producono anticorpi vengono clonate mediante isolamento e messe in coltura con specifici terreni di crescita. Gli anticorpi secreti dalle cellule nei mezzi di coltura possono essere raccolti e utilizzati nella loro forma grezza o purificati mediante purificazione per affinità.

Gli ibridomi possono avere nomi di cloni univoci per identificare il clone esatto. A differenza degli anticorpi policlonali, gli anticorpi monoclonali sono omogenei con specificità definita per un epitopo.

Gli anticorpi monoclonali prodotti utilizzando linee cellulari di ibridomi tendono a subire una deriva genetica nel tempo. Un anticorpo prodotto utilizzando la stessa linea cellulare diversi anni dopo potrebbe presentare lievi variazioni rispetto alla versione originale dell'anticorpo. Pertanto, per preservare l'anticorpo per una fornitura confermata a lungo termine e mantenere la qualità del prodotto, gli anticorpi derivati dall'ibridoma vengono convertiti nel formato ricombinante cioè generati *in vitro*. Il tutto viene fatto clonando, in un vettore di espressione specifico, i geni codificanti per quell'anticorpo.

TEST ELISA

Il saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) viene spesso utilizzato per misurare la presenza e/o la concentrazione di un antigene, anticorpo, peptide, proteina, ormone o altra biomolecola in un campione biologico. È estremamente sensibile, in grado di rilevare basse concentrazioni di antigene. La sensibilità del test ELISA è attribuita alla sua capacità di rilevare le interazioni tra un singolo complesso antigene-anticorpo. Inoltre, l'inclusione di un anticorpo antigene-specifico coniugato ad un enzima consente la conversione di un substrato incolore in un prodotto cromogenico o fluorescente che può essere rilevato e facilmente quantificato. Ci sono diversi tipi di test ELISA: il test diretto dove viene determinata la presenza di un antigene (ELISA DIRETTO; ELISA DIRETTO SANDWICH), e quello indiretto, dove viene rilevata la presenza di anticorpi specifici contro un antigene (Fig. 10).

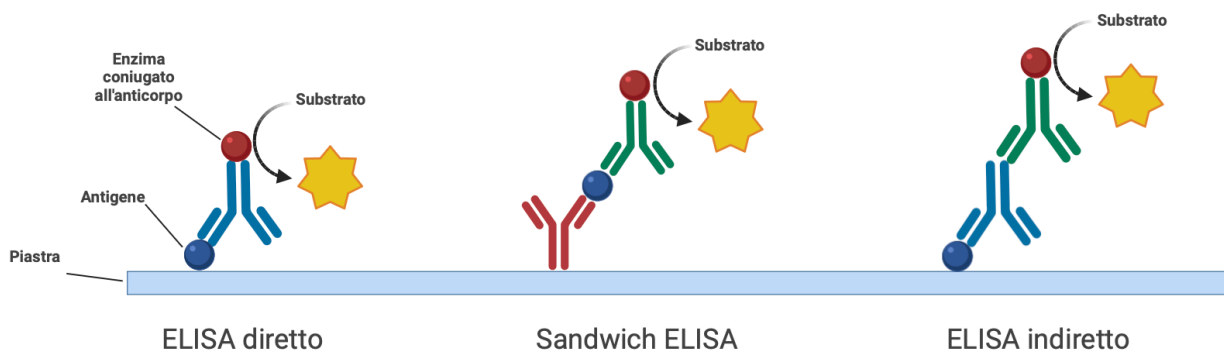


Fig. 10. Tipologie di test ELISA

Test ELISA diretto

Nel test diretto viene determinata la presenza di uno specifico antigene. La prima fase del test, quella di legame, prevede l'aggiunta di antigeni d'interesse nei pozzetti delle piastre di polistirene di utilizzo. Una volta completata la fase di incubazione, il passaggio successivo consiste nel lavare i pozzetti con delle soluzioni saline in modo da togliere eventuali residui di antigene in esubero non

ancorati alla superficie. Nella fase di rilevamento, nei pozzetti viene aggiunto un anticorpo coniugato con un enzima selezionato come ad esempio la fosfatasi alcalina (AP) o la perossidasi di rafano (HRP). Successivamente, la piastra viene nuovamente lavata mediante soluzione salina con aggiunta di un detergente. Come ultimo passaggio viene aggiunto il substrato dell'enzima. L'enzima coniugato provoca un cambiamento di colore nel pozzetto dove si è formato il complesso antigene anticorpo, mediante l'idrolisi dei gruppi fosfato dal substrato nel caso della fosfatasi alcalina o mediante l'ossidazione del substrato con HRP.

Test ELISA "sandwich"

Anche nel test a "sandwich" viene determinata la presenza di uno specifico antigene. Il sandwich ELISA inizia con un anticorpo di cattura aderito ai pozzetti della piastra. Viene definito "sandwich" perché gli antigeni sono racchiusi tra due strati di anticorpi (anticorpi di cattura e rilevamento). Una volta completata la fase di rivestimento con anticorpo di cattura, le piastre vengono lavate con soluzioni saline di lavaggio. Viene successivamente aggiunto l'antigene di interesse. Nella piastra, dopo i dovuti lavaggi, viene aggiunto l'anticorpo di rilevamento coniugato con l'enzima. La piastra viene rilavata e come ultimo passaggio viene aggiunto il substrato dell'enzima all'interno dei pozzetti. L'ELISA sandwich ha la sensibilità più elevata tra tutti i tipi ELISA.

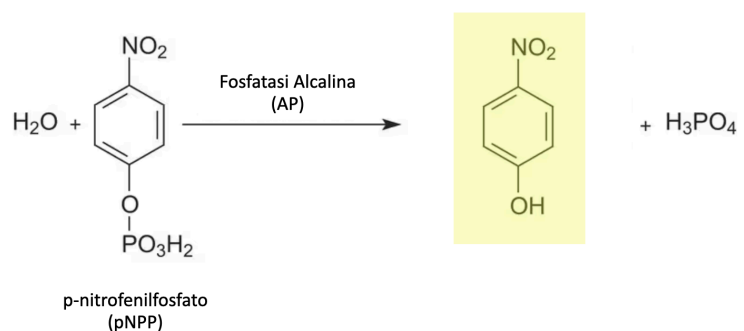
Test ELISA indiretto

Nel test indiretto, viene rilevata la presenza di anticorpi specifici contro un antigene. L'ELISA indiretto richiede due anticorpi, un anticorpo di rilevamento primario che si attacca all'antigene di interesse e un anticorpo secondario, legato a un enzima, complementare all'anticorpo primario. Viene aggiunto per primo l'antigene specifico per l'anticorpo di interesse, poi l'anticorpo che si vuole cercare (anticorpo primario), seguito da una fase di lavaggio, quindi viene aggiunto e incubato l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima. Successivamente, i passaggi sono gli stessi dell'ELISA diretto, che include una fase di lavaggio, l'aggiunta del substrato e il rilevamento di un cambiamento di colore.

ENZIMI E SUBSTRATI

Enzimi coniugati agli anticorpi

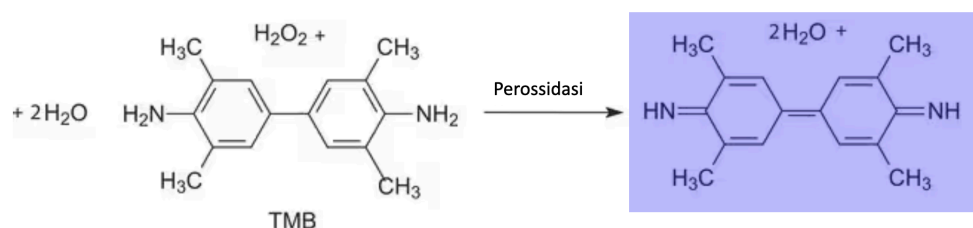
Gli anticorpi di rilevamento utilizzati nei saggi di immunoassorbimento enzimatici vengono coniugati a enzimi che



sono in grado di convertire un substrato incolore in un prodotto colorato.

Gli enzimi più utilizzati sono:

- La **fosfatasi alcalina**: per anticorpi coniugati alla fosfatasi alcalina si usa in genere il substrato p-nitrofenilfosfato (pNPP), che sviluppa un intenso colore giallo misurabile a 405-410 nm.
- La **perossidasi**: per gli anticorpi coniugati alla perossidasi si possono scegliere diversi substrati. TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) che sviluppa un colore blu che ha un'assorbanza massima tra 370 nm e 652 nm; OPD (o-phenylene diamine), sviluppa un colore arancio scuro misurabile a 492 nm; ABTS (2,2-azinodiethyl-benzthiazoline sulfonate), che sviluppa un colore blu-verde misurabile a 405-410 nm.



PRINCIPALI APPLICAZIONI DEL TEST ELISA

Elevata sensibilità e specificità, minor costo, assenza di rischi derivati dall'esposizione a radiazioni, praticità e versatilità sono alcuni elementi che devono essere presi in considerazione nella scelta delle tecniche di analisi.

Tra tutti i metodi attualmente a disposizione i test ELISA rispondono a questi requisiti, oltre a consentire di realizzare, in breve tempo, analisi su grandi numeri di campioni, in modo semplice ed economico, con buona riproducibilità e facilità nell'interpretazione dei risultati.

Lo sviluppo della biologia molecolare e la produzione di anticorpi monoclonali ha permesso, negli ultimi anni, di disporre di reagenti di diagnostica di grande sensibilità e specificità. Il test ELISA è utilizzato, oltre che nella diagnostica, anche nella ricerca.

Malattie infettive

Metodi d'indagine mediante test ELISA

Nel caso si abbia il sospetto di aver contratto una malattia infettiva, per rilevare la presenza o meno del patogeno si può verificare la presenza direttamente degli antigeni o quella degli anticorpi specifici.

L'esame può essere effettuato con un esame del sangue (o di altri fluidi biologici).

Nel caso si voglia rilevare la presenza di anticorpi specifici per un patogeno, utilizzando il metodo indiretto si cercano due tipi di immunoglobuline, le IgM o le IgG.

Le IgM sono degli anticorpi che si producono nella fase acuta della malattia, quindi sono rilevabili da subito. Essi restano attivi per tutta la durata dell'infezione, dopodiché i valori scendono progressivamente, ma la loro presenza continuerà ad essere rilevata nel sangue ancora per 3-4 mesi circa (anche se a volte ci sono casi di persistenza per periodi più lunghi).

Le IgG invece si iniziano a produrre solo 1-2 settimane dopo che è avvenuta l'infezione, ma resteranno presenti nell'organismo per tutta la vita, come 'memoria' dell'infezione avvenuta, e per questo saranno sempre riscontrabili nel sangue.

I risultati possono essere:

IgG assenti IgM assenti: assenza esposizione. In caso di incertezza clinica i pazienti devono essere monitorati nel tempo.

IgG presenti IgM assenti: infezione pregressa.

IgG assenti IgM presenti: infezione in fase molto iniziale.

IgG presenti IgM presenti: infezione acuta.

Alcune malattie infettive che possono essere diagnosticate mediante test ELISA:

HIV, Adenovirus, Bordetella pertussis, Candida albicans, Chagas, Clamidia, Coxiella burnetii, Cocksackie, Citomegalovirus, Dengue, Echinococcus, Epstein-Barr-Virus, FSME, Epatite A, Epatite B, Epatite C, Epatite E, Herpes, Influenza, Legionella pneumophila, Leptospira, Malattia di Lyme, Malaria, Micoplasmi, Parvovirus B19, SARS, Strongyloides, Tetano, Toxoplasma, Treponema pallidum (sifilide), Mycoplasma e Ureaplasma.

Infezione da HIV

I test comunemente utilizzati vengono effettuati dopo un semplice prelievo di sangue.

Il test ELISA non ricerca direttamente il virus nel sangue, ma rileva gli anticorpi anti-HIV, che si sviluppano a seguito dell'infezione. Poiché l'organismo non produce immediatamente gli anticorpi, vi è dunque un periodo in cui il test non è in grado di diagnosticare l'infezione (periodo finestra). A seguito di un comportamento a rischio, l'indicazione è quella di effettuare il test ad un mese di distanza, periodo sufficiente a riscontrare il contagio nella maggioranza dei casi. Se l'esito del test è negativo, l'indicazione è quella di ripetere il test a 3 mesi dal comportamento a rischio per ottenere un risultato definitivo. Se il risultato è positivo significa che la persona è venuta a contatto con il virus, ma potrebbe non avere contratto la malattia.

Sinonimi: Test Hiv-Ab, test di terza generazione.

Il ComboTest, oltre ad individuare gli anticorpi anti-HIV, è in grado di rilevare la presenza di una particolare proteina virale (l'antigene p24) che compare e aumenta significativamente dopo pochi giorni dal contagio. Il Periodo Finestra è in questo caso ridotto a un mese. C'è da precisare che il test dell'antigene p24 è relativo solo all'HIV-1 e non all'HIV-2.

Sinonimi: Test Combinato, Test Hiv-Ag/Ab, test di quarta generazione.

Western Blot (WB): Questo test ricerca gli anticorpi nel siero (come il test ELISA) ma, in più, identifica le diverse specificità degli anticorpi presenti, che è molto importante per stabilire la cura e per un inquadramento generale dell'evoluzione dell'infezione.

Un test ELISA positivo, confermato da un WESTERN BLOT (WB) positivo, esprime con certezza che la persona ha contratto l'infezione.

Test di biologia molecolare: Test per la misurazione della quantità di virus nel sangue (carica virale o viremia) basati sulla tecnica molecolare di amplificazione genica (real time PCR). Estremamente sensibili, tali test sono in grado di individuare la presenza del materiale genetico virale e servono, principalmente, per seguire nel tempo l'andamento dell'infezione nelle persone in cui è già stata accertata (diagnosticata) e per gestire adeguatamente l'eventuale cura (terapia) anti-retrovirale.

La carica virale è infatti un indice del livello di replicazione del virus e, quando la cura è efficace, la carica virale scende al di sotto del valore misurabile dal metodo utilizzato. Questo significa che il virus è mantenuto sotto controllo dalla terapia prevenendo i danni a carico del sistema di difesa dell'organismo (sistema immunitario). L'evidenza di carica virale non misurabile, tuttavia, non indica che l'infezione sia stata eliminata poiché nelle persone in cura il virus si continua a riprodurre seppur a livelli molto più bassi.

L'essere sieropositivi non significa avere l'AIDS. La diagnosi di AIDS si basa infatti su parametri clinici e su esami per valutare quanto velocemente il virus si moltiplica (carica virale), o quanto il sistema immunitario è stato danneggiato (conta dei linfociti CD4+ o tipizzazione linfocitaria).

Tossine

Le micotossine, nel loro significato letterale e più generale, sono sostanze chimiche tossiche prodotte da funghi. Alcune micotossine (amanitina, muscarina, ecc..) sono responsabili dei fenomeni di avvelenamento causati dal consumo di alcune specie di macromiceti, cioè di "funghi". Altre micotossine (aflatossine, tricoteceni, fumonisine, ecc..) sono prodotti da muffe e altre specie microscopiche, e sono responsabili di fenomeni di tossicità acuta e cronica, a causa della loro diffusione come contaminanti di alimenti o, più raramente, ambientali. Si possono accumulare come prodotti secondari di muffe dei generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* che contaminano le colture o le derrate alimentari.

Le micotossine posseggono azione cancerogena, mutagena e teratogena sulla salute umana, come risulta dalla tabella seguente:

Aflatossina B1	Cancerogeno, epatotossico, immunosoppressore
Ocratossina A	Nefrotossico, teratogeno, immunosoppressore, cancerogeno
Fumonisin B1	Neurotossico, cancerogeno, citotossico
Tricoteceni	Immunosoppressore, dermatotossico, emorragico
Zearalenone	Estrogenosimile
Ergotina	Neurotossico

Tabella 2

In generale, i metodi analitici per la determinazione della presenza di micotossine si possono classificare come segue:

- biosensori: l'elemento biologico interagisce con il substrato da analizzare e un sistema di trasduzione (sensore) converte la risposta biochimica in un segnale elettrico;
- metodi cromatografici: tecniche utilizzate per separare, identificare e quantificare i componenti di una miscela;
- test immunologici (ELISA, radioimmunologici, immunofluorescenti, basati su colonna di immunoaffinità).

Sono disponibili test ELISA (test diretto) per la determinazione di diverse micotossine. Sono disponibili test di screening qualitativi per la verifica della presenza o assenza di una determinata micotossina e anche kit quantitativi, che possono anche fornire indicazioni del livello di concentrazione.

TOSSINA	TIPOLOGIA DI CAMPIONE
Aflatossina B1	Granaglie, cereali, foraggi, frutta secca, alimenti e mangimi
Aflatossina M1	Latte, latte in polvere, formaggi
Aflatossina M1, <i>per urina</i>	Urina
Deossinivalenolo (DON)	Granaglie, cereali, foraggi, alimenti e mangimi
Ocratossina A	Granaglie, cereali, foraggi, alimenti e mangimi
	Vini, mosti e succhi d'uva
	Vini, mosti, succhi d'uva e bevande alcoliche e non alcoliche
	Caffè verde, caffè tostato, caffè istantaneo, cacao in polvere, burro di cacao e spezie
	Siero umano e animale, latte umano e animale
Fumonisin (B ₁ , B ₂ , B ₃)	Mais e derivati
Zearalenone	Granaglie, cereali e pane
Tossina T-2	Granaglie, cereali, foraggi, alimenti e mangimi
Staphylococcus aureus e enterotossine	Latte, salsicce, maionese

Tabella 3

Droghe

Sono adatti per eseguire test contro le droghe i seguenti tipi di campioni: sangue, urina, capello e saliva.

Il sangue costituisce la matrice biologica per eccellenza nelle indagini cliniche e forensi. La concentrazione ematica e/o plasmatica della sostanza ricercata, infatti, consente di stabilirne o di escluderne la recente assunzione ed è direttamente correlabile allo status psicofisico del soggetto al momento del prelievo.

L'esame delle urine è un tipo di test semplice, rapido e non invasivo; l'esame può rilevare la sostanza assunta in un arco di tempo che va da alcune ore ad alcuni giorni prima del prelievo.

In caso di positività del test ed in assenza di prelievo ematico o salivare, non vi è comunque la certezza dell'eventuale stato di alterazione psico-fisica in quanto può non essere noto il tempo trascorso tra il momento dell'assunzione della sostanza e quello del prelievo urinario.

Saliva: studi recenti hanno dimostrato che la maggior parte delle droghe d'abuso (oppioidi, amfetamine, cocaina, ecc.) e dei farmaci assunti diffondono nella saliva per trasferimento passivo dal torrente circolatorio. Inoltre, è stato dimostrato che le concentrazioni delle sostanze illecite nella saliva vanno di pari passo con quelle ematiche tranne per il principio attivo della cannabis, il THC, che non diffonde dal sangue alla saliva a causa della sua scarsa idrosolubilità e basicità. L'analisi della saliva consente di determinare una droga d'abuso o un farmaco in un periodo di tempo breve, compreso tra meno di un'ora e 24 ore dall'assunzione, utilizzabile per verificare l'eventuale stato di alterazione psico-fisica del soggetto.

I capelli possono fornire informazioni sull'assunzione di sostanze che non sono altresì disponibili a lungo termine in altri campioni biologici quali sangue ed urina. Il lento metabolismo delle sostanze nel capello ne permette una persistenza a lungo termine. I capelli hanno velocità di crescita variabile tra 0.8 e 1.4 cm/mese, si può così risalire al periodo di assunzione della sostanza. I metalli, gli altri xenobiotici ed i loro metaboliti presenti nell'organismo vengono incorporati in misura variabile nella matrice cheratinica durante la crescita del capello e le loro concentrazioni possono essere correlate ai periodi di tempo (mesi, anni) in cui sono state assunte le sostanze tossiche.

Nell'interpretazione del dato analitico è difficile risalire con assoluta precisione al momento esatto dell'assunzione di una droga d'abuso, tuttavia è possibile che l'analisi segmentale dei capelli nello stesso individuo possa collocare temporalmente la frequenza delle assunzioni, con una certa variabilità legata alla differente velocità di crescita.

Le metodologie analitiche per la determinazione di laboratorio delle sostanze d'abuso, in base ad esigenze analitiche, procedurali, organizzative, ed economiche si distinguono in due gruppi:

- test di screening (iniziali o di I livello);
- test di conferma (o di II livello)

I test di screening permettono la gestione di numerosi campioni in tempi brevi in quanto rispondono prevalentemente a requisiti di economicità, velocità, standardizzazione, efficacia ed efficienza.

Le metodiche immunochimiche attualmente più utilizzate per i test di screening sulle matrici citate sono di diverso tipo ma quello usato su saliva è prevalentemente il test ELISA diretto.

I test di conferma (procedure di estrazione del principio attivo e/o dei suoi metaboliti, in fase liquida o solida, seguite dall'analisi cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa) rispondono prevalentemente a requisiti di specificità e consentono la conferma della positività dei campioni o la verifica di eventuali falsi positivi ai test di screening. Le metodiche cromatografiche utilizzate per i test di conferma sono la gascromatografia o cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa.

Le droghe indagate sono: Anfetamina, Barbiturici, Buprenorfina, Benzodiazepine, Cannabinoidi, Carisoprodol, Fentanyl, Ketamina, Cocaina, Metadone, Metamfetamina, Metilfenidato, Oppiacei/ Morfina, Ossicodone, Fenciclidina, Propossifene, TCA, Tramadolo.

Allergeni

Test cutanei

Il prick test è il test cutaneo utilizzato per determinare se una sostanza specifica provoca infiammazione allergica. Nel prick test alcune gocce di allergene purificato vengono posizionate sulla superficie cutanea e successivamente la cute viene punta leggermente con una lancetta monouso al fine di lasciar penetrare l'allergene attraverso gli strati più superficiali della cute. Se il test è positivo, nel giro di alcuni minuti compare un piccolo rigonfiamento pruriginoso (simile a una puntura di zanzara), nel punto in cui è stato applicato l'allergene.

Test ematici

Questi esami hanno bisogno di tempi più lunghi perché dal prelievo all'elaborazione dei risultati possono passare diversi giorni. Si va a valutare la presenza delle IgE specifiche mediante test immunoenzimatici (ELISA) o immunofluorimetrici (CAP-test).

Determinazione analitica degli allergeni

In data 22 novembre 2011 è stato emanato il nuovo Regolamento Comunitario n. 1169/2011 in materia di etichettatura degli alimenti. Lo scopo principale del regolamento europeo è quello di garantire una maggiore trasparenza nei confronti del consumatore finale riguardo alle caratteristiche del prodotto ed alle relative informazioni.

Il nuovo regolamento impone una etichettatura dei prodotti alimentari chiara, comprensibile e leggibile che deve prevedere anche nell'elenco degli ingredienti la presenza di determinati allergeni evidenziati con caratteri grafici particolari (dimensioni, stile, colore dello sfondo), la specifica degli olii vegetali presenti, ecc. L'indicazione della presenza degli allergeni diventa obbligatoria anche per i prodotti sfusi e per quelli somministrati nei ristoranti, mense e bar.

TEST ELISA SCENARI

TEST HIV

"L'untore con l'Hiv ne ha contagiate 33"(Il tempo 27/04/2016)

È incredibilmente ampio il bilancio delle vittime di Valentino T. . Il 30enne romano accusato di «aver cagionato volontariamente lesioni personali gravissime» avrebbe contagiato con il virus Hiv 33 persone. L'indagato, già dal 2006, era consapevole di essere sieropositivo ma avrebbe avuto circa 50 rapporti sessuali non protetti, con altrettante donne ignare della sua malattia. Nonostante la «consapevolezza di essere affetto dal virus dell'Hiv», come scrivono gli inquirenti, per 9 anni l'uomo avrebbe avuto rapporti sessuali non protetti senza informare le sue partner del rischio a cui andavano in contro.

Il 30 settembre del 2014 Valentino avrebbe inviato a una ragazza, tramite Whatsapp, un falso certificato medico rilasciato dall'ospedale Sant'Eugenio. L'obiettivo dell'indagato, secondo la procura, era quello di assicurare falsamente una ragazza che aveva rifiutato di praticare un rapporto senza utilizzare le opportune protezioni. La vittima successivamente aveva scoperto di aver contratto il virus e lo denunciò. Il 24 novembre è stato messo in prigione in isolamento. La notizia venne riportata in TV e sui giornali. In seguito alla diffusione della notizia si recano in ospedale 2 persone che hanno avuto rapporti sessuali non protetti con le vittime dell'untore per verificare la loro condizione.

In ospedale viene fatto un prelievo di sangue e voi dovete, tramite test ELISA, verificare la sieropositività o negatività del paziente.

Spunto di riflessione:

E' giusto che sia preservato l'anonimato del paziente risultato positivo al test dell'HIV?

GUIDA SOTTO L'EFFETTO DI STUPEFACENTI

Due giovani, uno su automobile e uno su scooter, sono rimasti coinvolti in un incidente stradale in cui sono rimasti lievemente feriti. La polizia stradale intervenuta ha trovato i due giovani in stato alterato. Utilizzando il "Test Antidroga" hanno rilevato la positività dei due giovani.

Il test antidroga è un test immunologico rapido per l'individuazione qualitativa di più droghe e loro metaboliti nella saliva. E' uno dei test notificato presso il Ministero della Salute con una attendibilità del 98% con risultato in 5 minuti dopo la raccolta del campione della saliva. Il test rileva: Oppiacei (40ng/ml), Cocaina (30 ng/ml), Cannabinoidi (THC) (25ng/ml), Anfetamine (40ng/ml), Metanfetamine (40ng/ml) compreso MDMA Ecstasy (50ng/ml) e Ossicodone/Idrocodone (40ng/ml). Questo test fornisce solo un dato preliminare che deve essere poi confermato.

I giovani sono stati condotti presso il locale Pronto Soccorso per eseguire le medicazioni necessarie e per compiere esami approfonditi in grado di verificare la positività alle droghe.

Dovete verificare mediante test ELISA se i due giovani sono sotto l'effetto di cocaina.

Spunto di riflessione:

Preoccupata per "il progressivo dilagare della droga e della cultura dello sballo che sta rappresentando in Umbria una pesante emergenza", il capogruppo dell'Udc, Sandra Monacelli ha presentato una mozione attraverso la quale impegnare la Giunta regionale a "Mettere in atto strumenti di prevenzione nelle scuole, attivando, di concerto con le Asl e gli Istituti scolastici, test antidroga per gli alunni di tutte le classi delle scuole medie inferiori e superiori".

MICOTOSSINE NEL LATTE

Le micotossine sono sostanze tossiche prodotte dal metabolismo di funghi (o muffe). Le muffe del tipo *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* sono le principali produttrici di tossine ritenute dannose. Si sviluppano in particolari condizioni su foraggi insilati, cereali e mangimi.

Effetti sulla salute d'uomo ed animali

Le micotossine possiedono azione cancerogena, mutagena e teratogena sulla salute umana. Le più pericolose sono l'aflatossina B1 (cancerogeno, epatotossico, immunosoppressore) e la fumosinina B1 (neurotossico, cancerogeno, citotossico). Tra gli alimenti d'origine animale, e quindi d'interesse per l'alimentazione umana, il latte e i suoi derivati sono i prodotti più frequentemente contaminati dalla presenza di micotossine, a causa del trasferimento di questi metaboliti dai mangimi contaminati di cui si nutrono le bovine.

Latte con aflatossine (tratto da "Il fatto alimentare")

La vicenda inizia il 12 dicembre 2013 quando la Latteria Soligo di Treviso restituisce alle Latterie Friulane una partita di 3.504 confezioni di latte perché "non conforme" (l'unica tra i dieci acquirenti del medesimo lotto). Il sistema di autocontrollo dell'azienda trevigiana ha rilevato la presenza di aflatossine in quantità cinque volte superiori ai limiti di legge. A questo punto la procura di Udine apre un'indagine che affida al Nucleo anti sofisticazioni dei carabinieri (Nas). Il lavoro di investigazione dura cinque mesi e porta alla luce almeno sei illeciti. Nelle frodi erano coinvolti allevatori e personale del Consorzio Latterie Friulane. Il reato consisteva nel miscelare partite di latte contaminato da aflatossine con latte destinato all'alimentazione umana, in questo modo si diluiva la presenza delle tossine ottenendo un prodotto con valori entro i limiti di legge.

Quando la soglia di concentrazione dell'aflatossina nel latte è superiore a quella consentita, le aziende devono avvisare il Servizio veterinario delle Ausl. Se invece si supera il limite di legge, oltre alla segnalazione all'autorità competente, l'azienda non può per diversi giorni conferire il latte, e quello contaminato va smaltito.

Fai parte dei NAS e devi verificare due partite sospette di latte per verificare la presenza di aflatossina B1 con il test ELISA e stabilire se il latte è innocuo oppure contaminato.

Spunto di riflessione:

Il mais OGM Bt è preservato dall'attacco di funghi e quindi risulta meno contaminato da micotossine.

ALLERGENI

Carmelo, 57 anni, si presenta in pronto soccorso con dolore toracico, nausea, eritema e prurito diffusi. La sintomatologia è comparsa circa 15 minuti dopo l'assunzione di una compressa di amoxicillina/acido clavulanico 1 g per un'odontalgia.

L'amoxicillina è un antibiotico appartenente alla classe dei β -lattamici, gruppo delle penicilline semisintetiche. L'amoxicillina agisce da battericida inibendo la sintesi del peptidoglicano (parete cellulare del batterio). L'acido clavulanico è un inibitore irreversibile delle beta-lattamasi, enzimi che idrolizzano l'anello beta-lattamico dell'amoxicillina e di altri antibiotici beta-lattamici suscettibili a tali enzimi di inattivazione. In pratica l'acido clavulanico, privo di attività antibatterica, consente il dispiegarsi dell'azione antibatterica dell'amoxicillina anche su ceppi produttori di beta-lattamasi che altrimenti sarebbero resistenti a tale antibiotico.

In Pronto soccorso il paziente è immediatamente trattato con corticosteroidi e antistaminici per via endovenosa. Viene svolto il test ELISA sul siero del paziente per individuare la presenza di IgE specifiche verso l'allergene (amoxicillina o acido clavulanico) e verificare se ha avuto una reazione anafilattica da antibiotico.

Sostanze che possono provocare reazioni allergiche: farmaci, alimenti come il latte di mucca, le arachidi, le uova, i crostacei, le noci, il grano, il riso e la soia, pollini acari della polvere, peli di animali (saliva).

N.B. Le etichette alimentari contengono l'elenco degli ingredienti e in neretto i potenziali allergeni.

Spunto di riflessione:

L'abuso di antibiotici e loro conseguenze.