

DIAGNOSTICA VIRALE

Diagnostica Virale in Laboratorio

Può essere eseguita in maniera:

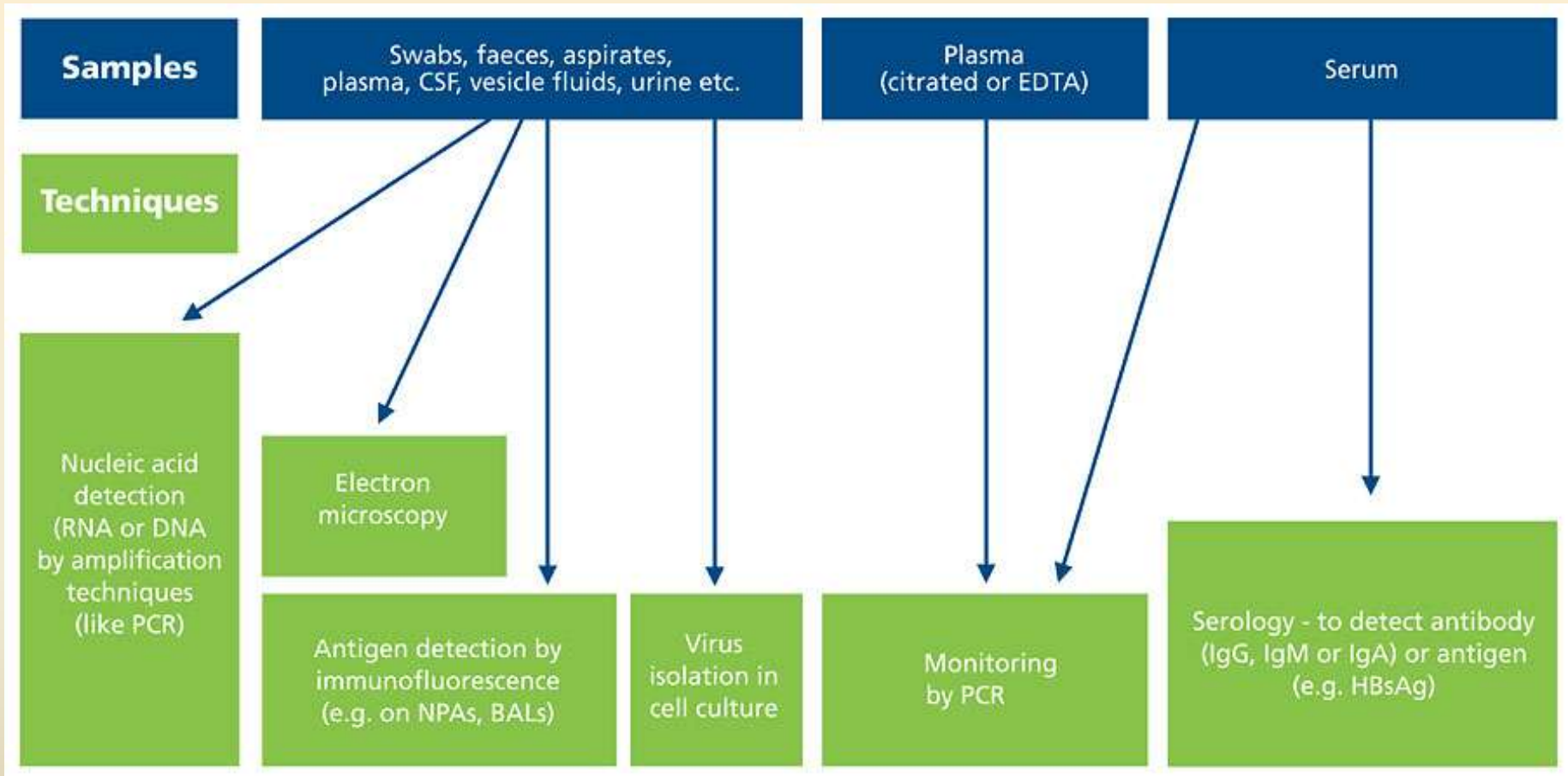
- **DIRETTA**: ricerca ed identificazione del virus o dei suoi componenti nel materiale patologico
- **INDIRETTA**: dimostrando una risposta immunitaria specifica e significativa

Fino a pochi anni fa le tecniche erano limitate alle colture cellulari e ad un pannello ristretto di reazioni sierologiche.

L'avvento di tecnologie molecolari molto sensibili (PCR e derivati), e di reagenti ottenuti mediante biotecnologia (es. sonde, mAbs) ha consentito di effettuare le analisi in modo molto più veloce, affidabile, in massima sicurezza.

T. DIRETTE

T. INDIRETTE



NB – Materiale “giusto” al momento “giusto”.

Metodi DIRETTI in diagnostica virologica

- **Microscopia** aspetto istologico
 corpi di inclusione
- **Microscopia Elettronica §** morfologia delle particelle virali
 immunoelettromicroscopia
- **Colture cellulari §** isolamento e identificazione virale (CPE)
- **Rivelazione proteine virali** immunofluorescenza, ELISA ecc.
- **Rivelazione genoma virale** ibridazione con sonde specifiche
 PCR, ecc.

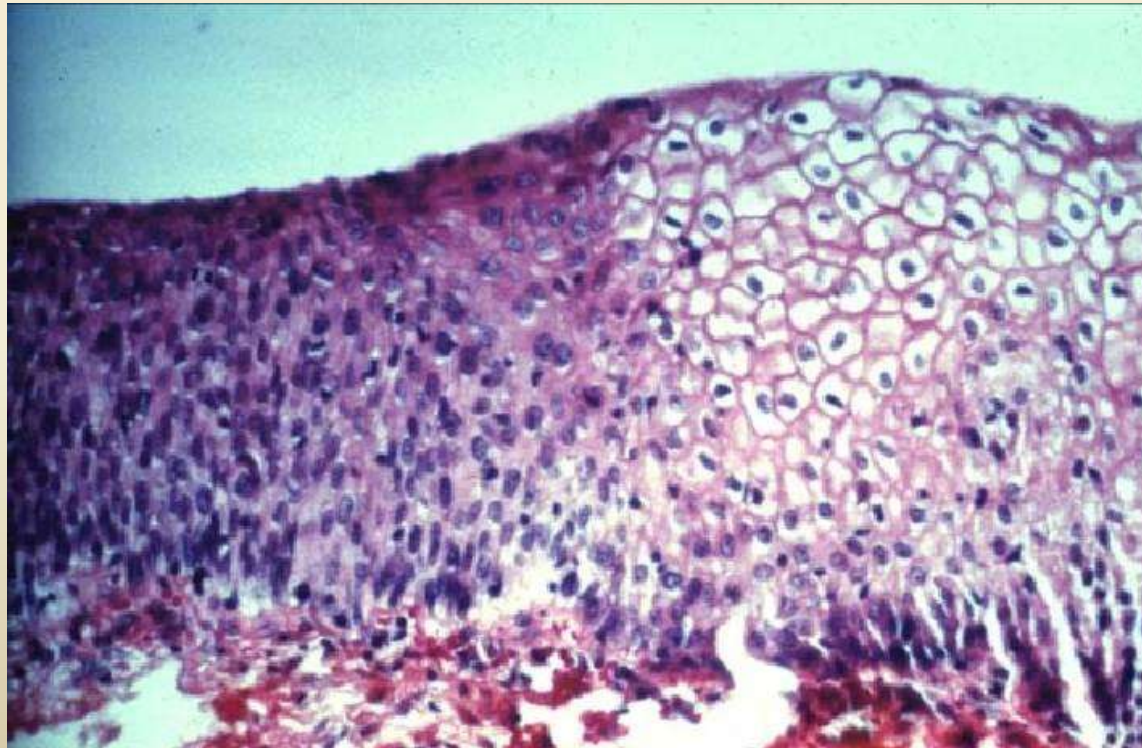
§ Si tratta di tecniche oggi scarsamente usate nella diagnostica

Microscopia:

Esame istologico, Corpi inclusione

Tecnica ancora impiegata direttamente sul materiale patologico, per rivelare tipiche strutture legate all'infezione virale.

Es. **INCLUSIONI** da virus della rabbia (corpi del Negri) o **COILOCITOSI** (Pap test, infezione genitale da HPV).

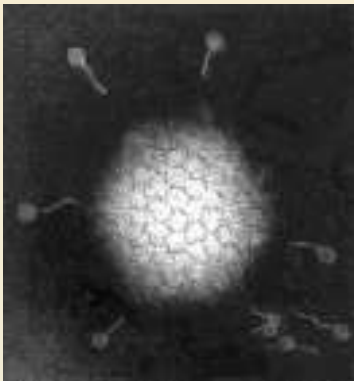


Coilocitosi da HPV nella mucosa cervicale

Microscopia elettronica

Praticamente **non usata per scopi diagnostici**, ma tuttora importante per identificare virus sconosciuti.

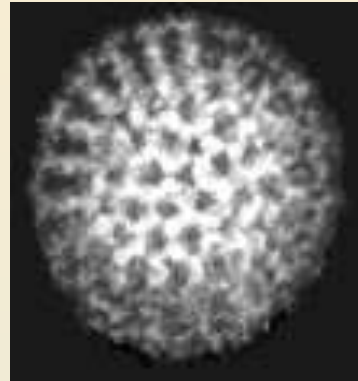
Necessaria la presenza di alta carica virale (almeno 10^6 particelle virali per ml). Di solito, usati ingrandimenti di 50,000 - 60,000 X.



Adenovirus



Coronavirus



Rotavirus

NB: Le particelle virali sono mostrate a ingrandimenti diversi.

diam. approx:

Adenovirus 100 nm

Coronavirus 130 nm

Rotavirus 70 nm

Svantaggi della Microscopia Elettronica:

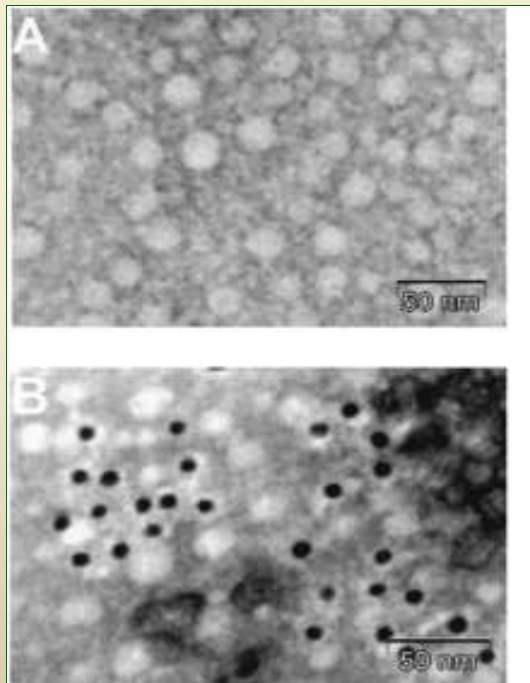
Non consente l'identificazione precisa della specie, ma solo della famiglia

- Costi per l'apparecchio
- Costi di manutenzione
- Personale specializzato
- Bassa sensibilità


Immunolettromicroscopia

Sensibilità e specificità della ME possono essere aumentate mediante immunolettro-microscopia.

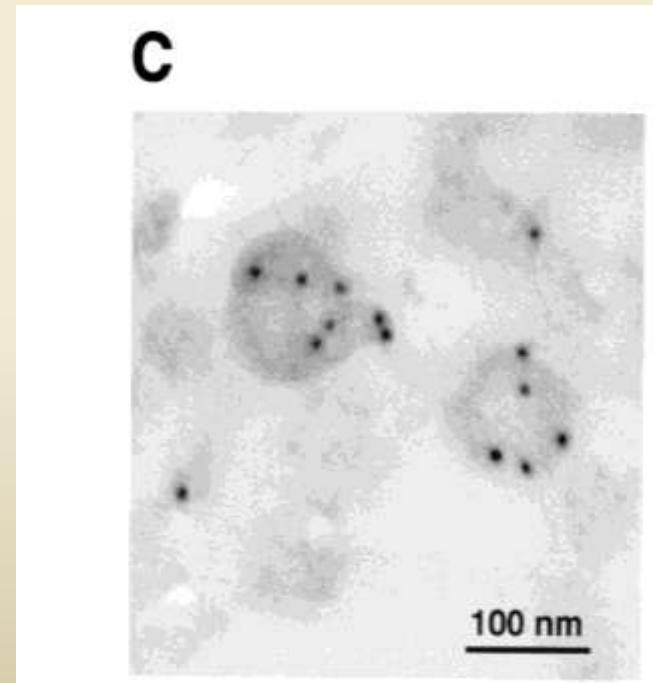
Il campione viene trattato con anticorpo specifico marcato con metalli pesanti elettroni-opachi prima della ME. La ME diventa così specifica e più sensibile .



HCV



HHV-8



Isolamento del virus in colture cellulari

**Campione giusto al momento giusto.
Trasporto immediato.**

Il materiale clinico deve essere raccolto nei SITI di replicazione/eliminazione, in fase ACUTA INIZIALE, considerando che il picco della replicazione virale solitamente precede di 2-3 giorni la sintomatologia.

Il campione, centrifugato per eliminare cellule e batteri, viene diluito, risospeso in terreno di coltura (con aggiunta di antibiotici e antimicotici), e inoculato su opportune colture cellulari.

La presenza del virus è rivelata dal CPE. che compare, a seconda del tipo e della quantità di virus, fra 1 giorno e 2-3 settimane.

Tabella 11.2 Materiali biologici da saggiare per eseguire l'isolamento dei principali virus¹

Virus	Campioni da prelevare
Adenovirus	Secrezioni respiratorie*, leucociti, urina, tamponi congiuntivali
Citomegalovirus ⁴	Urina, saliva, secrezioni respiratorie*, leucociti
Enterovirus, poliovirus, echovirus, Coxsackievirus A ^{2, 4} e B, virus dell'epatite A ⁴	Feci o tamponi rettali, tamponi faringei, liquor ³
Virus di Epstein-Barr ⁴	Linfociti, saliva
Herpes simplex	Liquido delle vescicole, tamponi congiuntivali
HIV ⁴	Plasma, linfociti
Influenza (A e B)	Secrezioni respiratorie*
Morbillo	Secrezioni respiratorie*, saliva, lavaggi congiuntivali, urina (cellule), linfociti
Parainfluenza	Secrezioni respiratorie*
Parotite	Liquor, saliva, urina
Parvovirus	Sangue ⁴ Secrezioni respiratorie*
Respiratorio sinciziale	Secrezioni respiratorie*
Rinovirus	Secrezioni respiratorie*
Rosolia	Secrezioni respiratorie*, urina, tamponi congiuntivali
Rotavirus ⁴	Feci o tamponi rettali
Varicella-zoster	Liquido delle vescicole o materiale di scarificazione

COLTIVAZIONE DEI VIRUS *IN VITRO*

I virus sono parassiti intracellulari obbligati = non possono moltiplicarsi all'esterno di una cellula vivente

I virus vengono coltivati in laboratorio per tre motivi principali:

- **DIAGNOSI** dell'infezione;
- **RICERCA**;
- **PRODUZIONE** di antigeni per vaccini.



Per crescere i virus in laboratorio è necessario impiegare **ANIMALI, UOVA EMBRIONATE** o **COLTURE CELLULARI**.

Ora le colture cellulari hanno generalmente sostituito gli altri metodi (con l'eccezione delle uova embrionate, usate per il vaccino antiinfluenzale).

Gli animali sono utilizzati quasi esclusivamente a scopo di ricerca.

NB – Ancora adesso ci sono virus che non possono essere cresciuti in laboratorio.

Coltivazione dei Virus in colture cellulari

1949: prima volta che un virus, il **poliovirus**, è stato propagato con successo in colture di cellule eucariote.

Enders, Weller, Robbins: premio Nobel, 1954



When John Enders was informed, 50 years ago this month, that he was the sole recipient of the Nobel Prize in Medicine or Physiology for 1954, he declined the honor. He wrote to the Swedish authorities that he would accept the prize only if it could be shared with “those who did the work.” It was agreed that Thomas Weller and Frederick Robbins would be corecipients with Enders. This act, one of the most gracious in the history of the Nobel Prize, reveals the profound decency and modesty of John Enders.

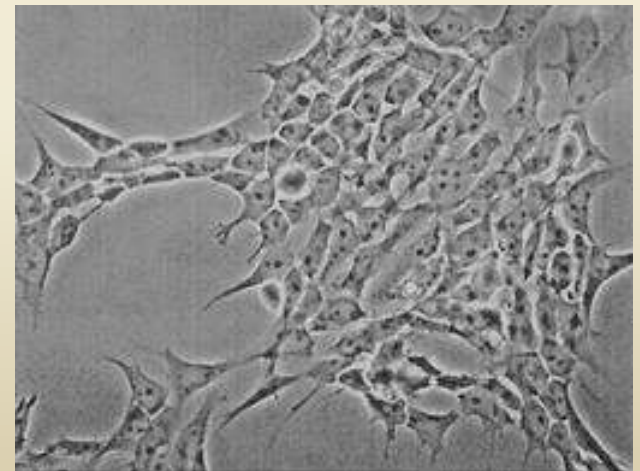
COLTURE CELLULARI

Sono state sviluppate solo dopo l'avvento degli antibiotici. Le cellule crescono in un opportuno terreno e devono essere preparate e mantenute in ambiente sterile, per evitare crescite di batteri e funghi. Negli ultimi anni ci sono stati notevoli progressi grazie alla messa a punto di terreni di coltura sempre più idonei.



Il terreno di coltura per cellule contiene una soluzione di SALI a concentrazioni fisiologiche, GLUCOSIO, AMINOACIDI, VITAMINE essenziali e ANTIBIOTICI; è tamponato a pH 7,2-7,4.

Viene aggiunto SIERO FETALE BOVINO a al 10-20% per fornire integratori necessari per l'accrescimento delle cellule. La composizione del terreno varia a seconda del tipo di cellula, e vengono spesso aggiunti specifici fattori di crescita. Al momento dell'infezione, il terreno di coltura viene sostituito con un terreno di mantenimento con ~ 1-5% di siero, che permette soltanto una scarsa moltiplicazione delle cellule.



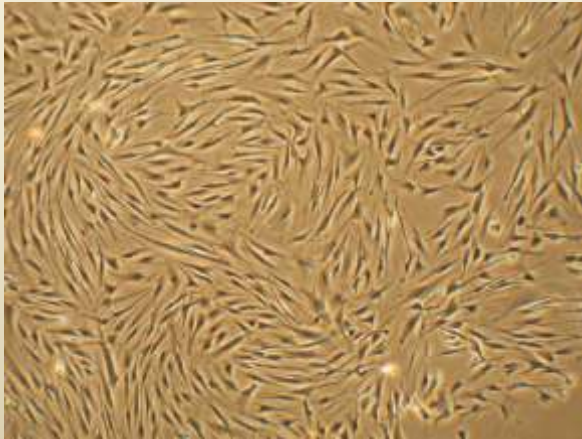
Colture cellulari in incubatore ad atmosfera controllata – 5% CO₂



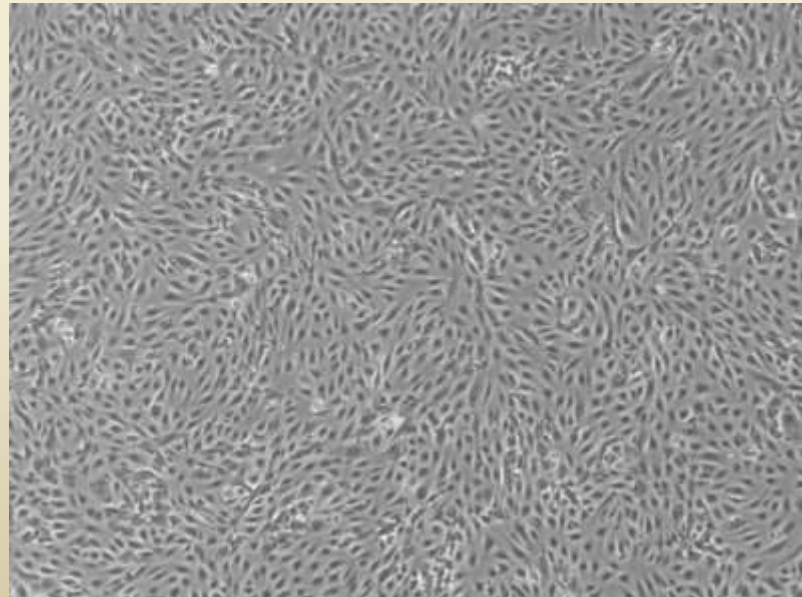
Colture cellulari PRIMARIE

Sono preparate **a partire da un organo animale o umano**. Sono normali cellule diploidi. Le cellule crescono formando uno strato continuo (confluente), dello spessore di una singola cellula (monostrato). Quando si raggiunge la confluenza, le cellule non crescono più (inibizione da contatto), e devono essere passate in altre fiasche (tripsinizzate).

Le colture primarie hanno una **VITA FINITA** (al massimo qualche decina di generazioni), dopo di che la capacità moltiplicativa si arresta e le cellule degenerano (senescenza e apoptosi).



Coltura di fibroblasti



Coltura di cellule endoteliali (HUVEC)

Procedimento per ottenere una coltura primaria di cellule di rene

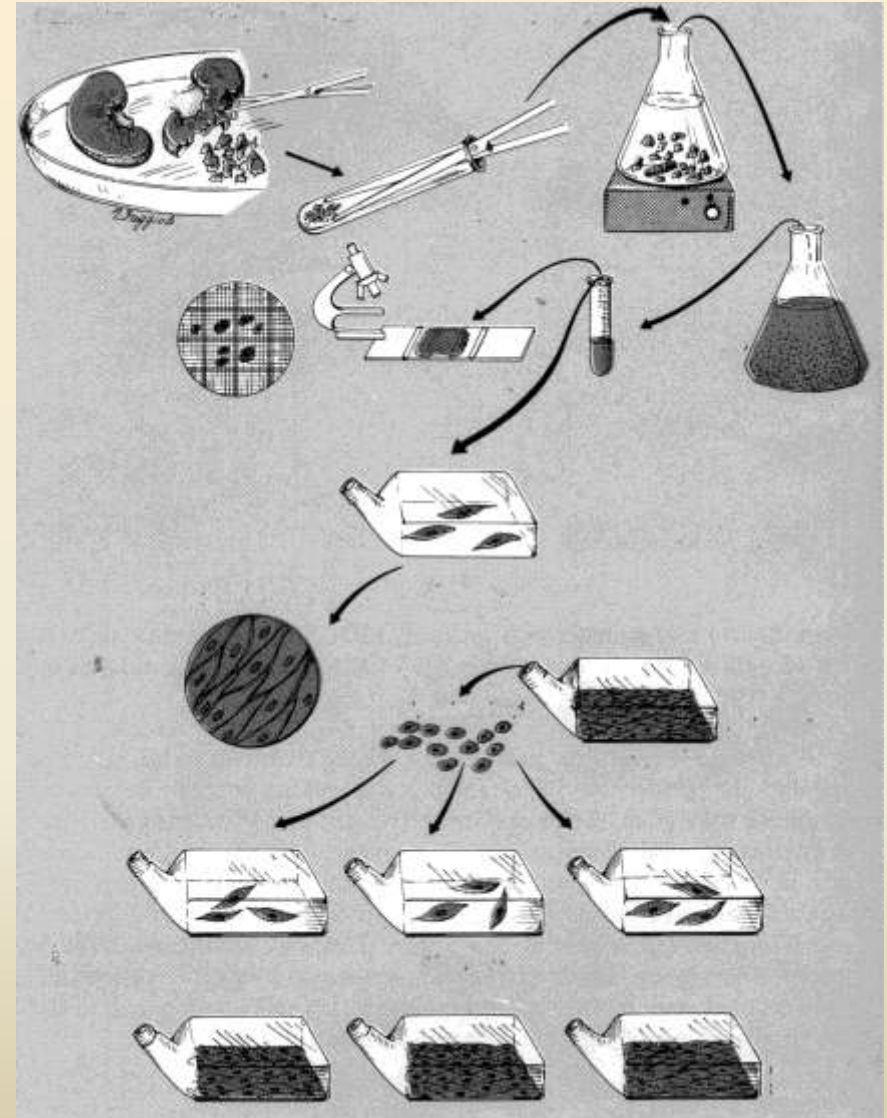
Il tessuto di origine viene raccolto asepticamente (1) e suddiviso in piccoli frammenti (2).

La digestione con enzimi proteolitici (tripsina) (3) lo riduce ad una sospensione di singole cellule (4), che vengono centrifugate per eliminare la tripsina (5) e contate (6), e incubate a 37° C in fiasche di plastica nel terreno di coltura (7).

In pochi giorni, le cellule formano uno strato continuo (8): coltura primaria.

A questo punto la crescita cellulare si arresta (inibizione da contatto) e le cellule possono essere usate per coltivare i virus oppure espanse mediante tripsinizzazione (9) e diluizione in altre fiasche.

Si formano così nuovi monostrati confluenti, che costituiscono le colture secondarie (10).

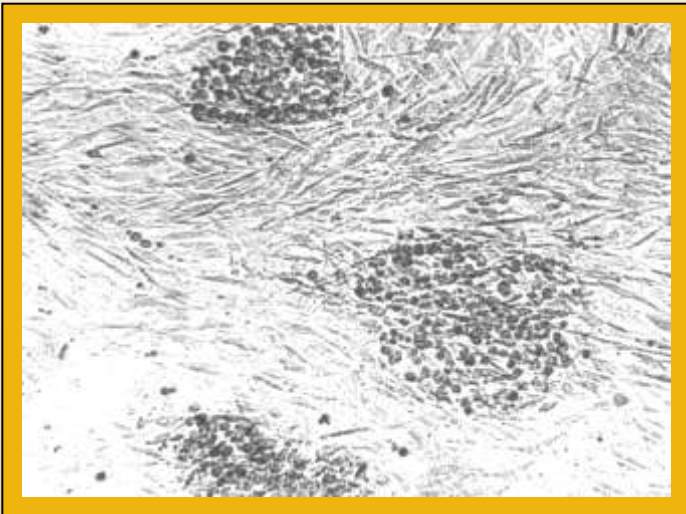


LINEE CELLULARI

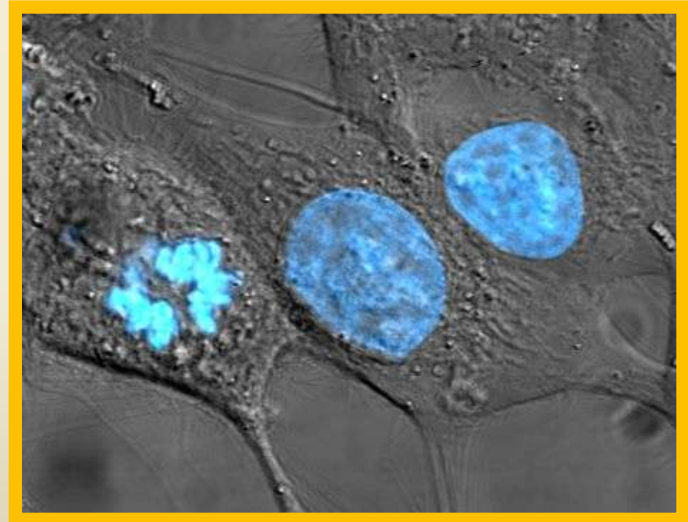
Le linee cellulari continue sono in grado di propagarsi indefinitamente, senza degenerare. Possono **derivare da un tumore o da cellule normali che sono state “trasformate”** (con virus o con sostanze chimiche) così da comportarsi come cellule derivate da un tumore. Spesso sono poliploidi.

Caratteristiche principali:

1. Sono immortalizzate
2. Hanno perso l'inibizione da contatto
3. Hanno cambiato la morfologia

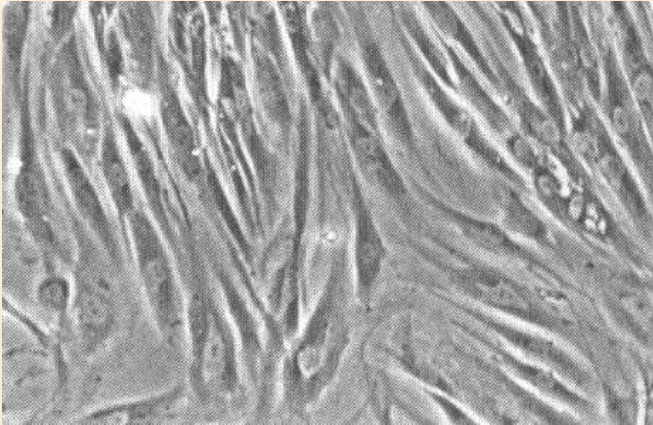


Foci di cellule trasformate da Rous Sarcoma Virus

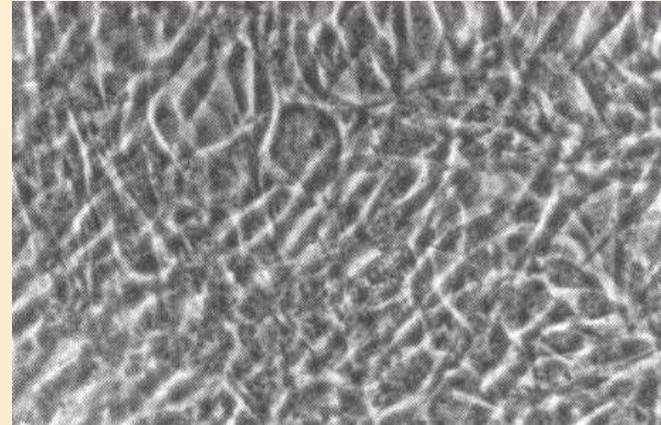


Cellule **HeLa**. Tra le prime linee cellulari umane. Il loro nome deriva da Henrietta Lacks, che morì del tumore cervicale, da cui queste cellule sono originate.

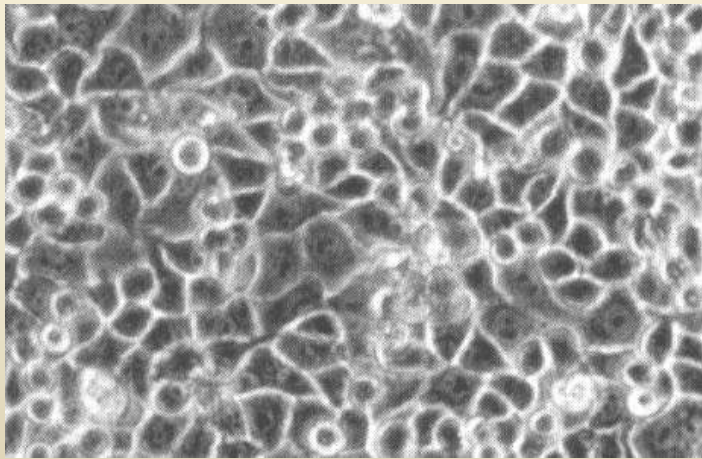
Diversi tipi di cellule usate in virologia



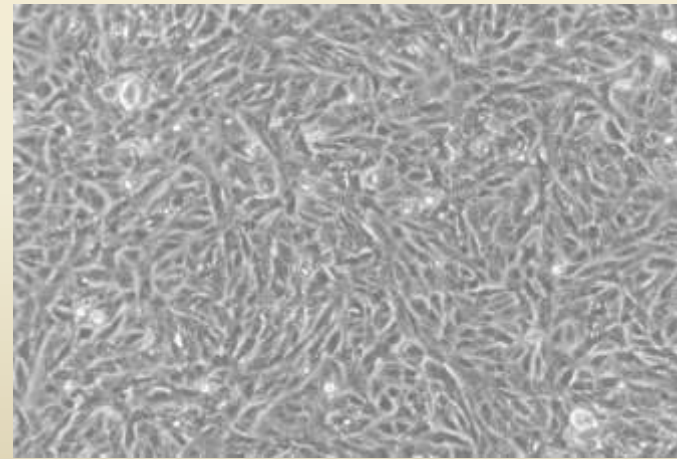
Fibroblasti umani (primari)



Fibroblasti di topo immortalizzati (linea)



**Linea di cellule umane tumorali
(HeLa)**



**Linea di cellule epiteliali di scimmia
(Vero)**

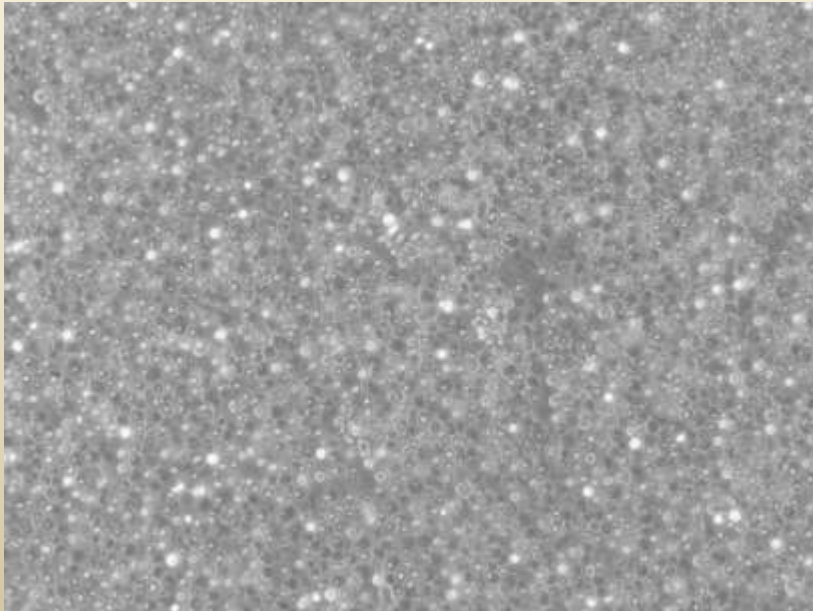
Colture in sospensione

Tutte le cellule (primarie o linee) **derivate da sangue periferico** non crescono in adesione, ma in sospensione (galleggiando nel terreno).

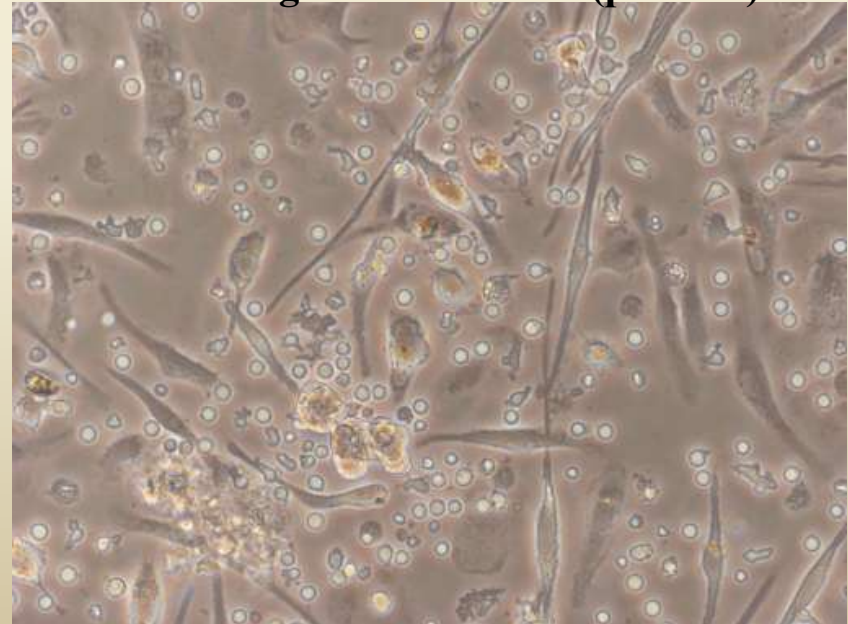
I linfociti maturi generalmente non crescono *in vitro*. I linf B possono però essere immortalizzati dal EBV, e allora si moltiplicano indefinitamente. I linf T possono crescere *in vitro* per un periodo di tempo limitato in presenza di IL-2.

I monociti attivati sono dotati di capacità adesive (analogamente a quanto succede *in vivo*).

PBMC (primari)



Macrofagi attivati umani (primari)

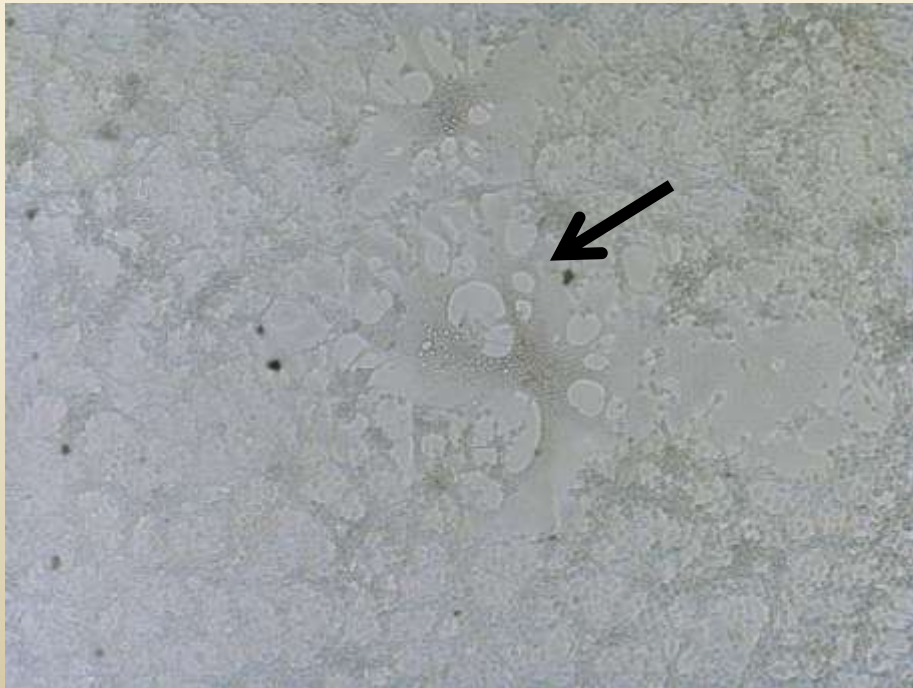


Esempi di utilizzo di colture cellulari

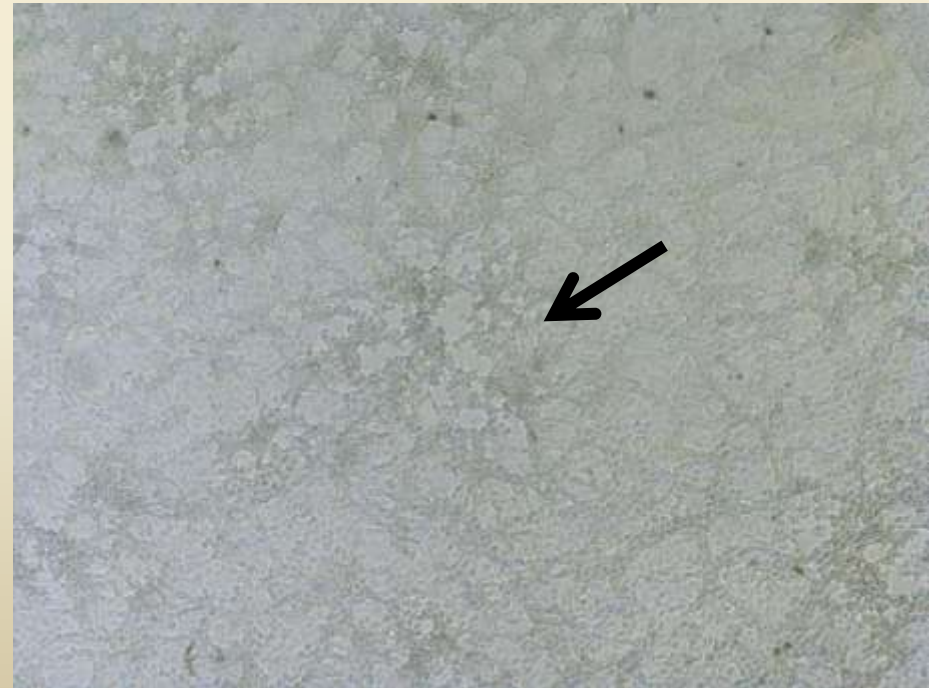
Isolamento e identificazione virus:

Cellule epiteliali infettate con due diverse varianti di HSV-1 (syn e LV).

CPE - syn



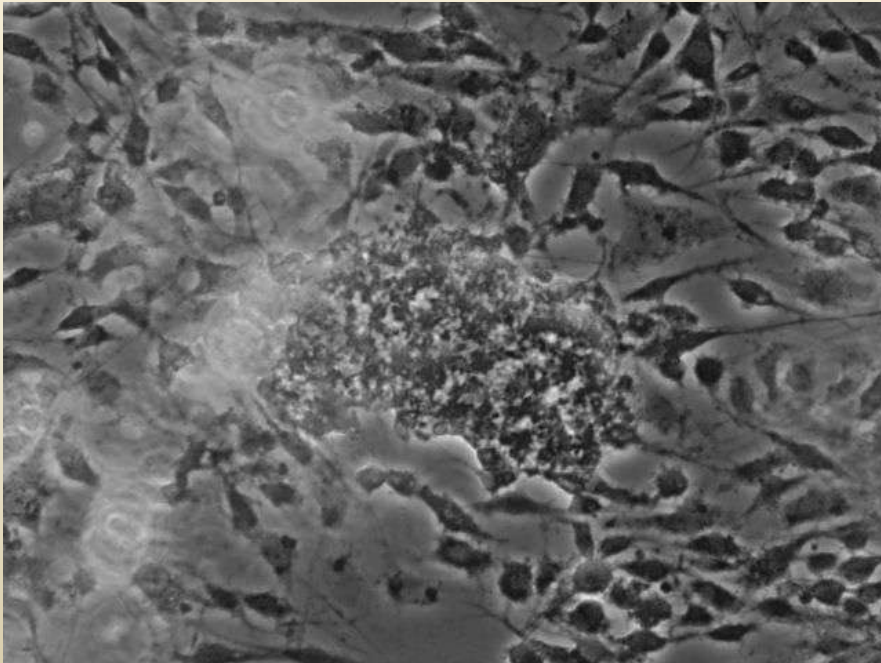
CPE - LV



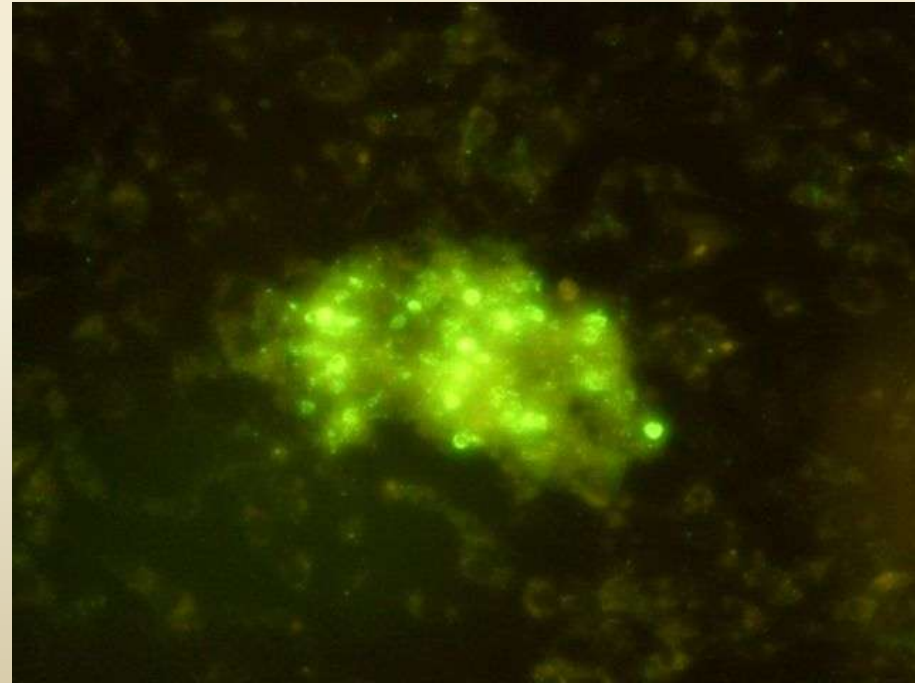
Esempi di utilizzo di colture cellulari

Identificazione virus: ricerca Ag virali (IFA)

**Cellule tiroidee umane (linea)
infettate con HHV-6**



**Cellule tiroidee umane (linea)
infettate con HHV-6 (IFA)**



Esempi di utilizzo di colture cellulari

Identificazione effetti biologici virus
(angiogenesi in vitro su BME)

HUVEC (primarie)

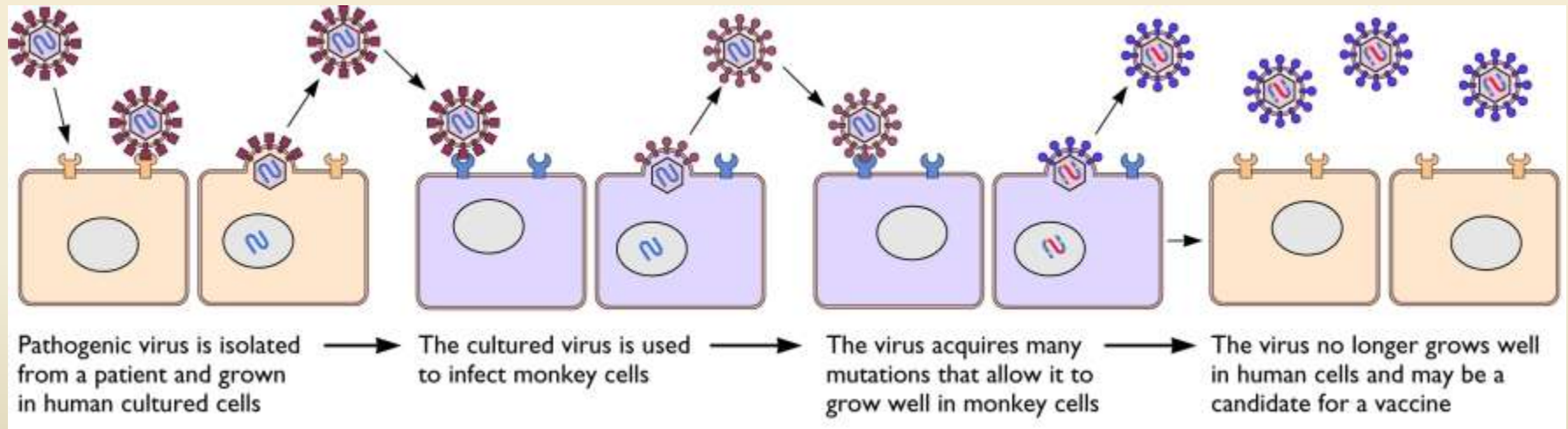


HUVEC (primarie) + HHV8

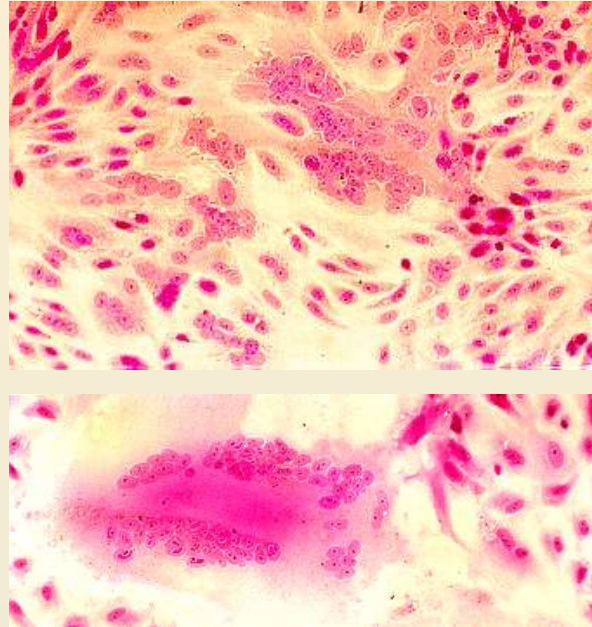


Esempi di utilizzo di colture cellulari

Attenuazione di virus mediante coltivazione in cellule di ospite diverso.



Colture cellulari - CPE



virus respiratorio sinciziale
(alto) e morbillo (basso).

Il CPE è indicativo del virus, ma virus diversi possono dare CPE simili!!

La conferma dell'identità del virus può essere poi eseguita con tests di neutralizzazione, inibizione dell'emoassorbimento, o immunofluorescenza.

Svantaggi delle colture cellulari

- **Fino a 4 settimane per avere il risultato**
- **Spesso bassa sensibilità, dipendente anche dalle condizioni del campione**
- **Rischio di contaminazione batterica**
- **Sensibilità a sostanze tossiche presenti nel campione**
- **Molti virus non crescono in coltura: es. HBV, HPV, parvovirus, ecc.**
- **Necessità di linee cellulari diverse per diversi virus e difficoltà nell'approvvigionamento di cellule primarie**

**Poco usate per la diagnosi di routine.
Molto usate per l'ISOLAMENTO virale e la
RICERCA**

Titolazione dei virus

In laboratorio, sia a scopo di ricerca che, per esempio, per la preparazione di vaccini, è necessario **TITOLARE l'attività infettante** dei virus, cioè determinare quante particelle virali infettanti sono presenti.

Si possono usare vari metodi, a seconda del virus.

N.B. Il numero di particelle infettanti è sempre inferiore al numero totale di virioni: durante la replicazione virale la maggior parte delle particelle che si formano è defettiva.

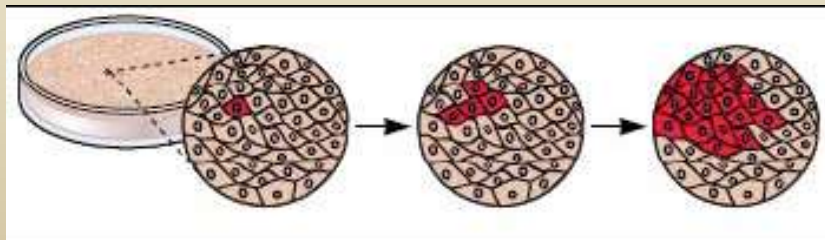
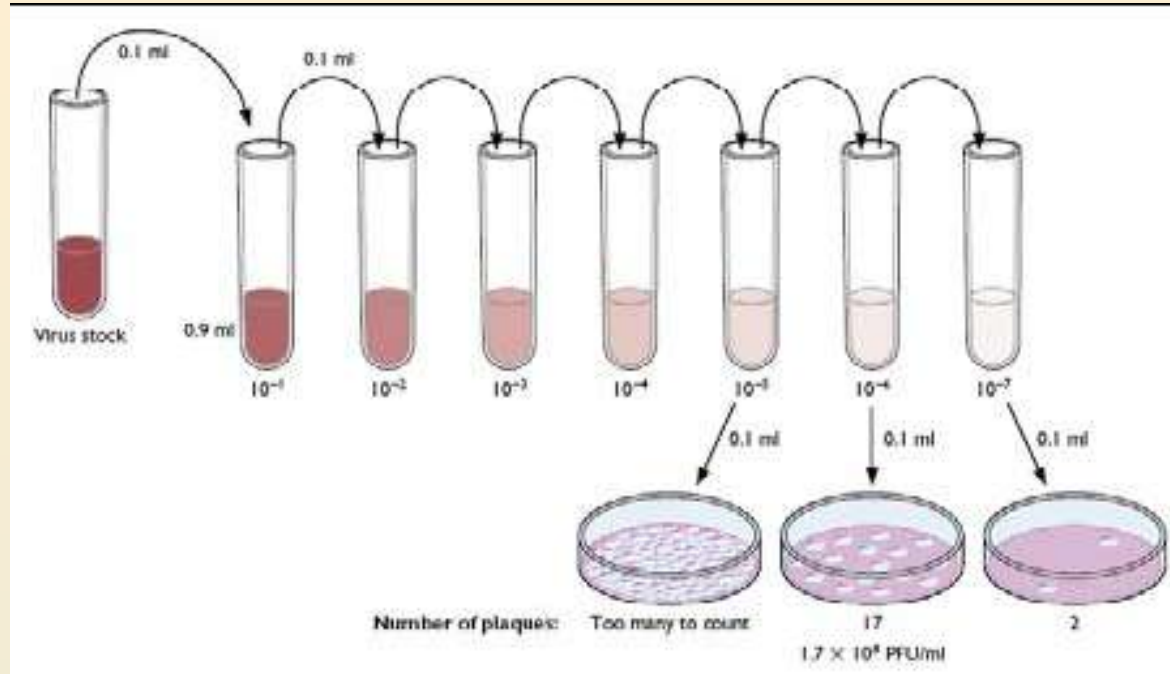
Il rapporto particelle infettanti/totali può essere anche 1:200

Titolazione dei virus – conta delle placche

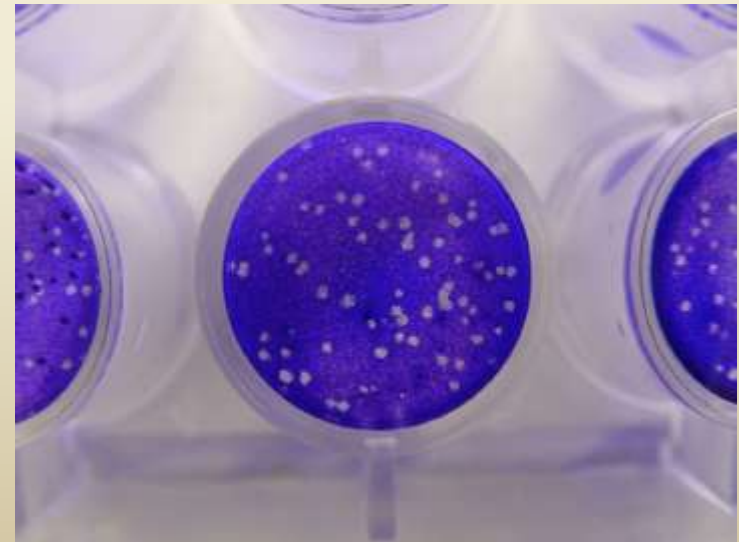
Il virus viene diluito serialmente (di 10 in 10)

Le diluizioni vengono seminate su cellule permissive. Dopo l'assorbimento, viene aggiunto terreno semi-solido o con Ab, per impedire la diffusione del virus nel terreno. Il virus può infettare solo le cellule contigue a quella infettata inizialmente.

La diffusione per contiguità dal virus causa la distruzione localizzata del tappeto cellulare, visibile come una "placca"



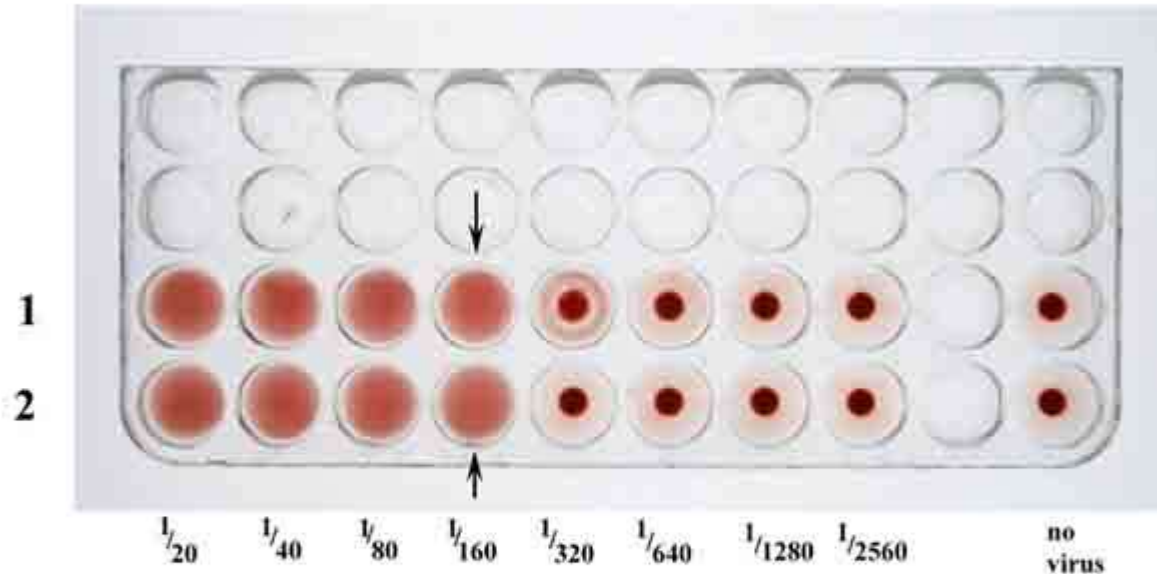
Il titolo viene espresso in PFU (plaque forming unit)



Titolazione dei virus - emoagglutinazione

L'emoagglutinazione sfrutta il fatto che molti virus hanno sulla superficie una **proteina che si lega ai globuli rossi**. Normalmente, i globuli rossi si depositano al fondo della provetta, formando un cerchio molto netto. Se è presente il virus, ogni particella virale si può legare a più cellule, formando una specie di rete, che si deposita sul fondo di tutta la provetta. Si fanno diluizioni del virus, ed il titolo è l'ultima diluizione in grado di agglutinare

Haemagglutination assay (HA assay)



1 and 2 are duplicates

The arrows show the last well in which haemagglutination was seen. This well contains 1 HAU (U=unit).

As 0.2ml of influenza stock was assayed, the HA titre of the stock is $160 \times 5 = 800$ HAU/ml

Rivelazione di PROTEINE virali

Enzimi ed altre proteine prodotte durante la replicazione possono essere rilevate mediante test **biochimici**, **immunologici** e **molecolari**.

RIQUADRO 51-4. Test per la ricerca di proteine virali

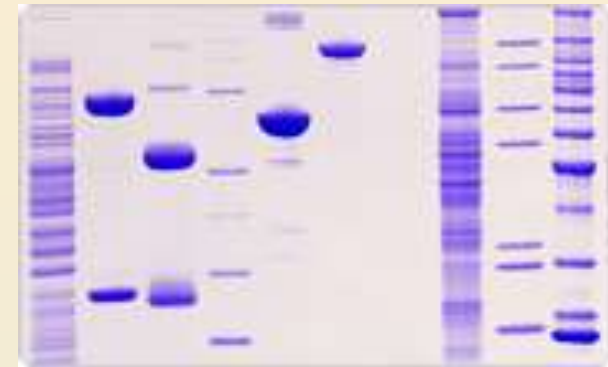
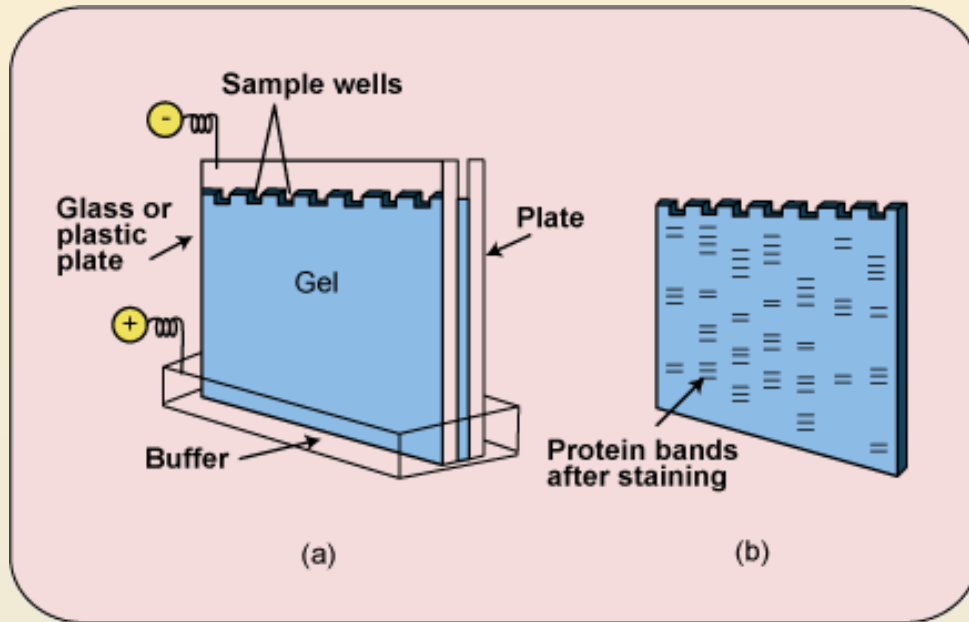
Proteine

→ Profili proteici (elettroforesi)

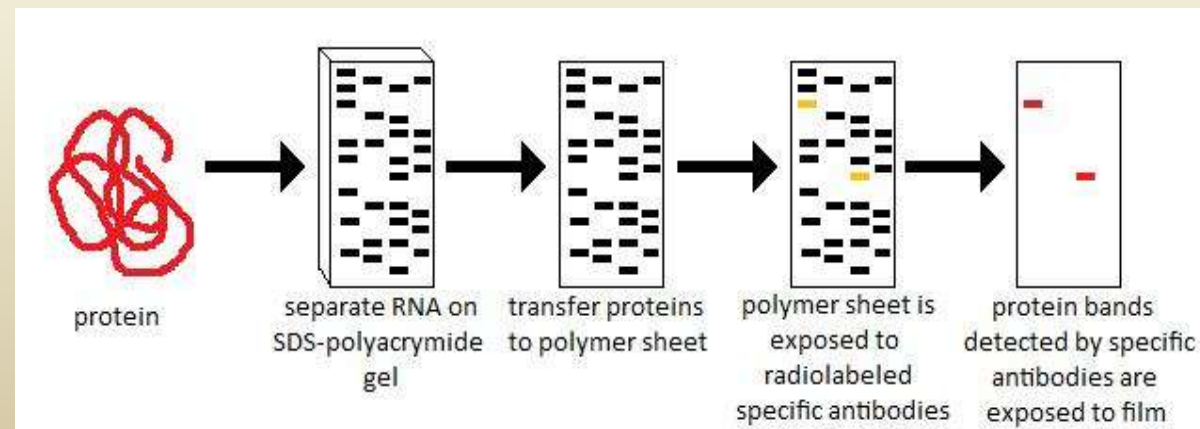
→ Attività enzimatiche (ad esempio, trascrittasi inversa)

→ Rilevamento di antigeni (ad esempio, fluorescenza indiretta, ELISA, Western blot)

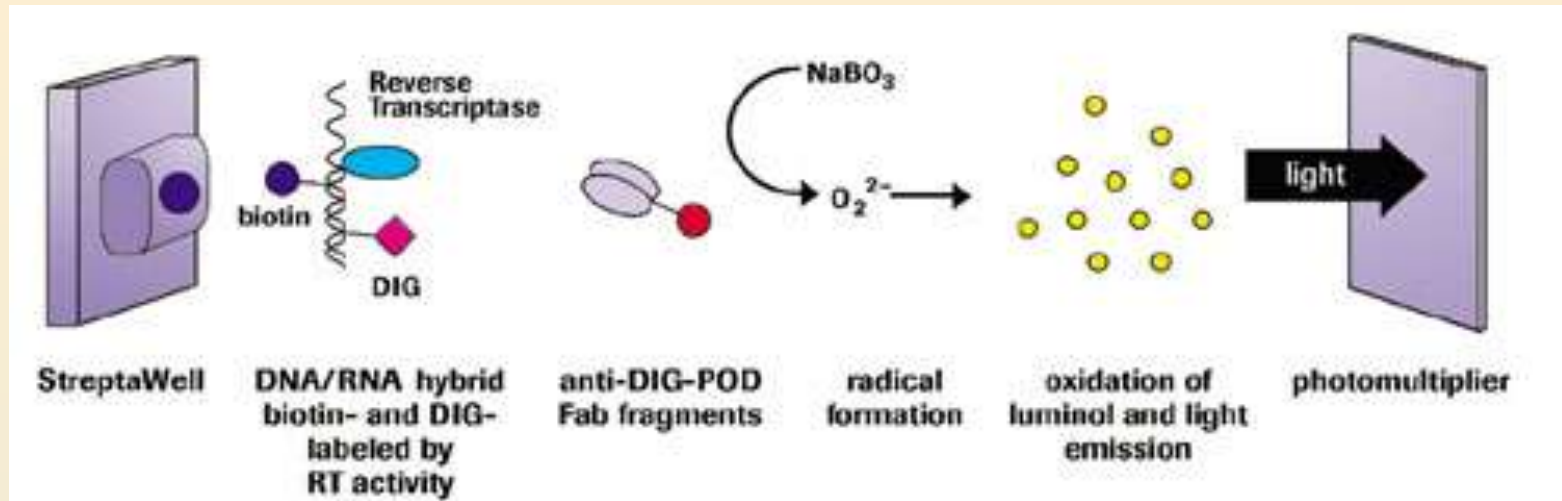
1.PROFILI PROTEICI: Elettroforesi di proteine



All'analisi elettroforetica può essere abbinato il Western blot, per il riconoscimento specifico dell'antigene evidenziato.



2. Attività enzimatiche



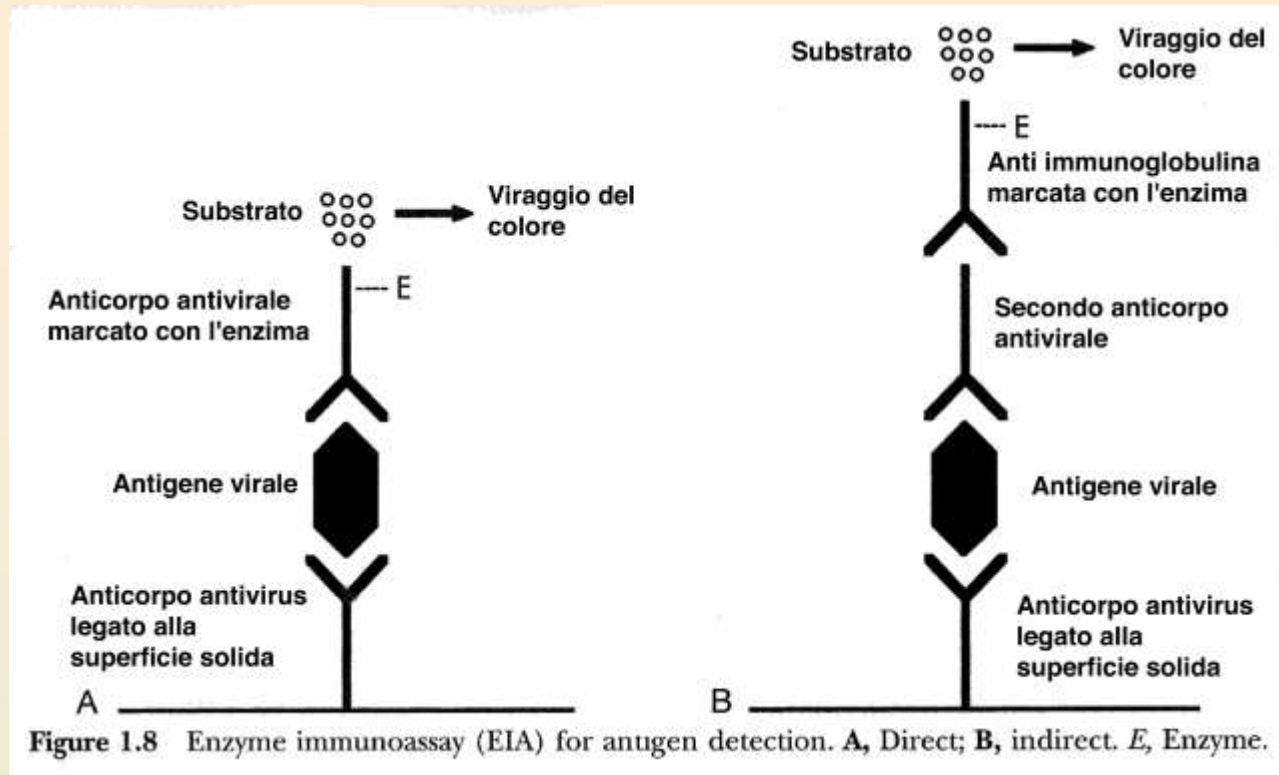
Es: **saggio colorimetrico RT**. La capacità di produrre DNA usando RNA come stampo è evidenziata dalla formazione di un ibrido (stampo e primer forniti dal kit). I nucleotidi incorporati sono marcati con **digoxigenina** e **biotina**.

La identificazione e quantificazione del DNA sintetizzato (parametro della attività RT) viene effettuata mediante saggio **ELISA**: pozzetti coated con streptavidina legano la biotina (legata al DNA). Viene poi aggiunto un Ab anti-digoxigenina coniugato all'enzima perossidasi (anti-DIG-POD).

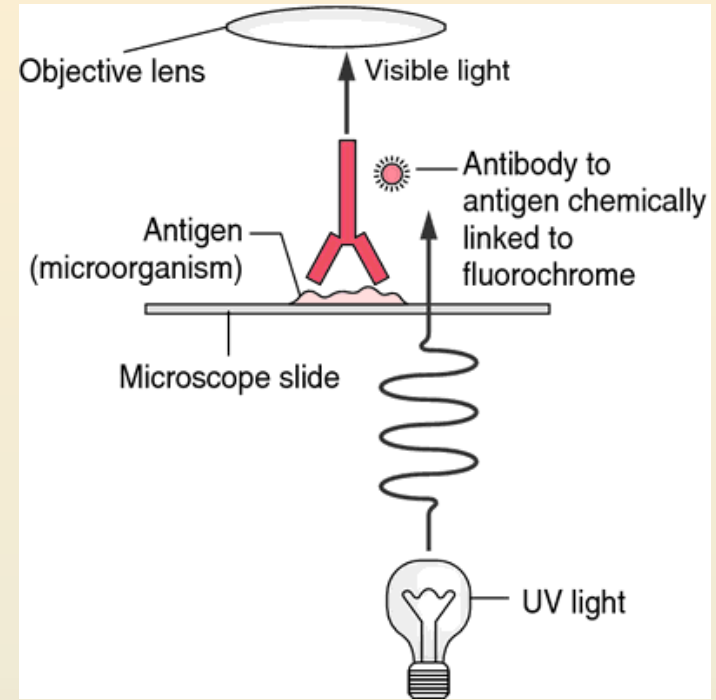
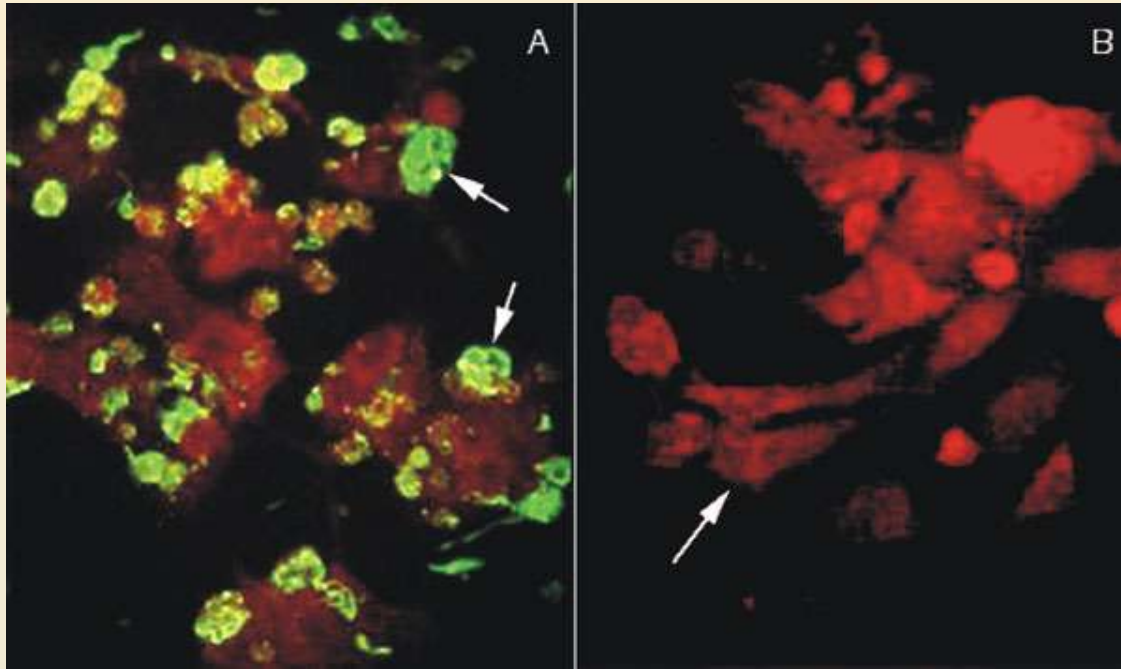
Infine, viene aggiunto il substrato ABTS per la POD. L'enzima catalizza l'ossidazione del substrato che produce una reazione colorata. L'assorbanza del campione, determinata usando un ELISA reader, è direttamente correlata alla attività RT del campione.

In alternativa può essere usato un substrato (luminolo) che emette fotoni, e la misurazione viene effettuata al luminometro.

3. Rilevamento di Ag virali - ELISA



3. Rilevamento di Ag virali - IFA



Rilevamento di ACIDI NUCLEICI virali

Sono test specifici, sensibili e veloci, che **permettono di rivelare anche virus che non stanno replicando**: devono quindi essere giustamente interpretati!

Acidi nucleici

Profili di taglio di endonucleasi di restrizione

Dimensione dell' RNA di virus ad RNA segmentato
(elettroforesi)

Ibridazione in situ per genoma a DNA (citochimica)

Southern, Northern e dot blot

PCR (DNA)

Reazione a catena della polimerasi con retrotrascrizione (RNA)

PCR in tempo reale (real time PCR)

Test a DNA a catena ramificata (DNA, RNA) (*)

(*) "Branched DNA" = Basata sulla amplificazione del segnale, non del bersaglio

1. Pattern di digestione con ER

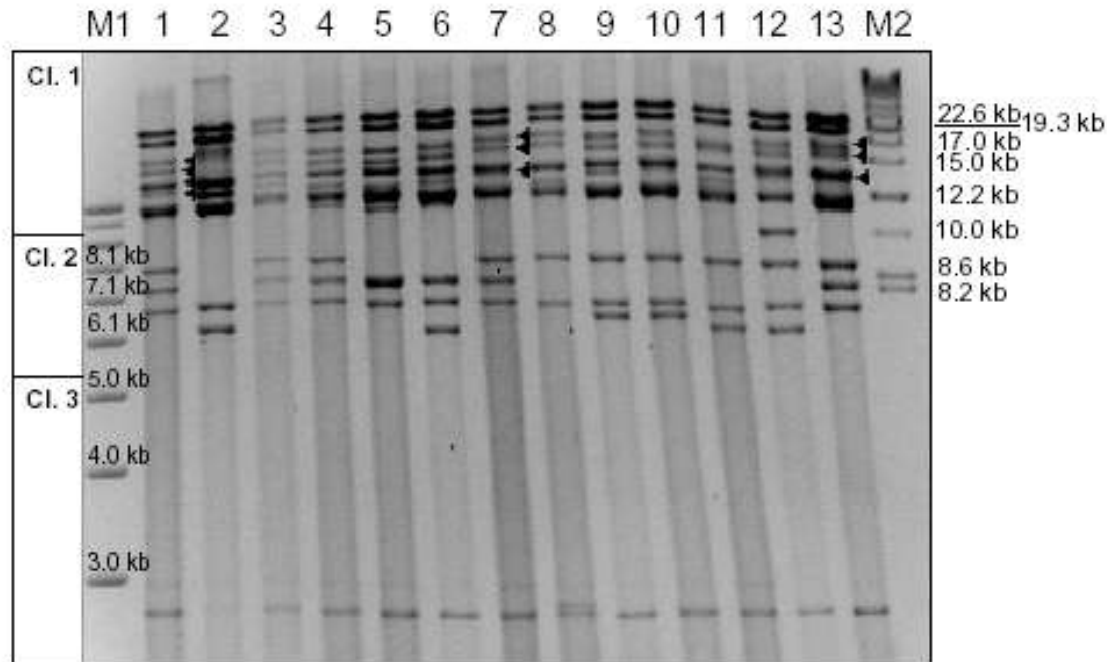


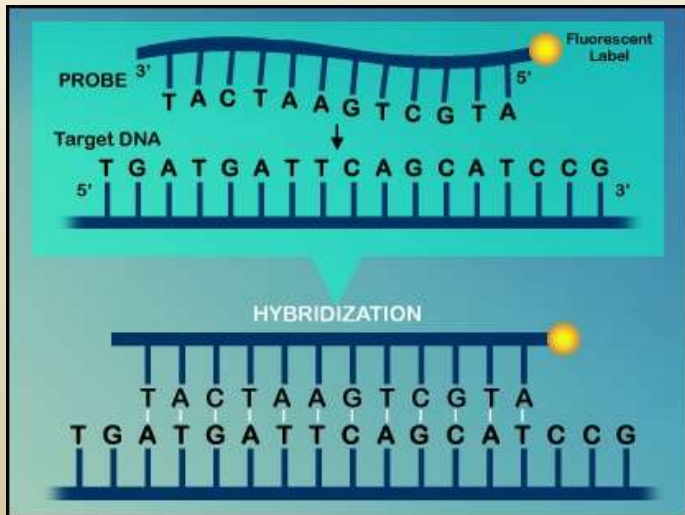
FIGURE 1A. Restriction enzyme analysis of DNA from BoHV-1 strains with *Hind*III. **1:** V214 strain; **2:** Vaccine strain Riemsers; **3:** USA 11 strain; **4:** VI 599/97 strain; **5:** 7624/97 strain; **6:** VI 273/97 strain; **7:** Cu7 strain; **8:** Roma strain; **9:** Vaccine strain Bovilis; **10:** 9389/97 strain; **11:** Miggi strain; **12:** Sm2 strain; **13:** E8 strain; **M1:** 1 kb molecular weight marker; **M2:** High Molecular Weight DNA Markers. **Cl.** Cluster. Arrows indicate the differences between BoHV-1 strains. / *Análisis con enzimas de restricción del ADN de cepas de BoHV-1 con HindIII. 1: Cepa V214; 2: Cepa vacunal Riemsers; 3: Cepa USA 11; 4: Cepa VI 599/97; 5: Cepa 7624/97; 6: Cepa VI 273/97; 7: Cepa Cu7; 8: Cepa Roma; 9: Cepa vacunal Bovilis; 10: Cepa 9389/97; 11: Cepa Miggi; 12: Cepa Sm2; 13: Cepa E8; M1: Marcador de peso molecular de 1 kb; M2: Marcador de ADN de alto peso molecular. Cl. Grupo. Las flechas indican las diferencias entre cepas de BoHV-1.*

2. Ibridazione molecolare

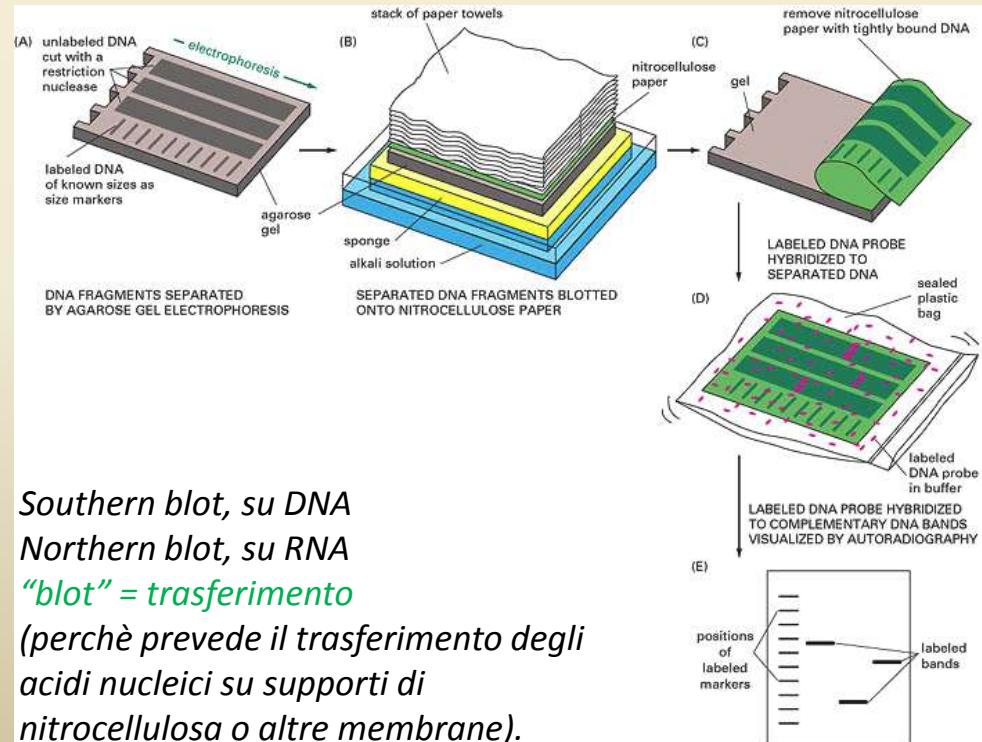
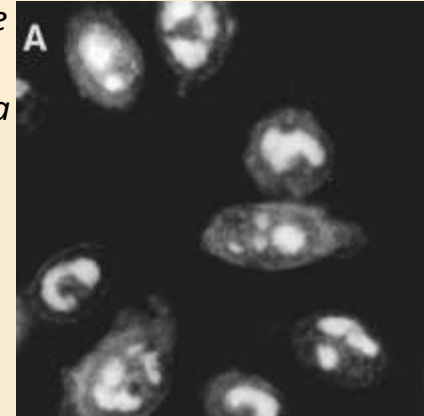
Rivelazione del genoma mediante ibridazione con sonde specifiche.

Può essere effettuata **in situ** (localizzazione cellulare) oppure mediante **Southern/Northern blot** (su DNA o RNA estratto dal campione).

Sonda marcata con radionuclidi o fluorofori.



Cellule infettate con HSV-1, fissate in formaldeide, permeabilizzate con acetone, e incubate con sonda di DNA di HSV-1 marcata con biotina.

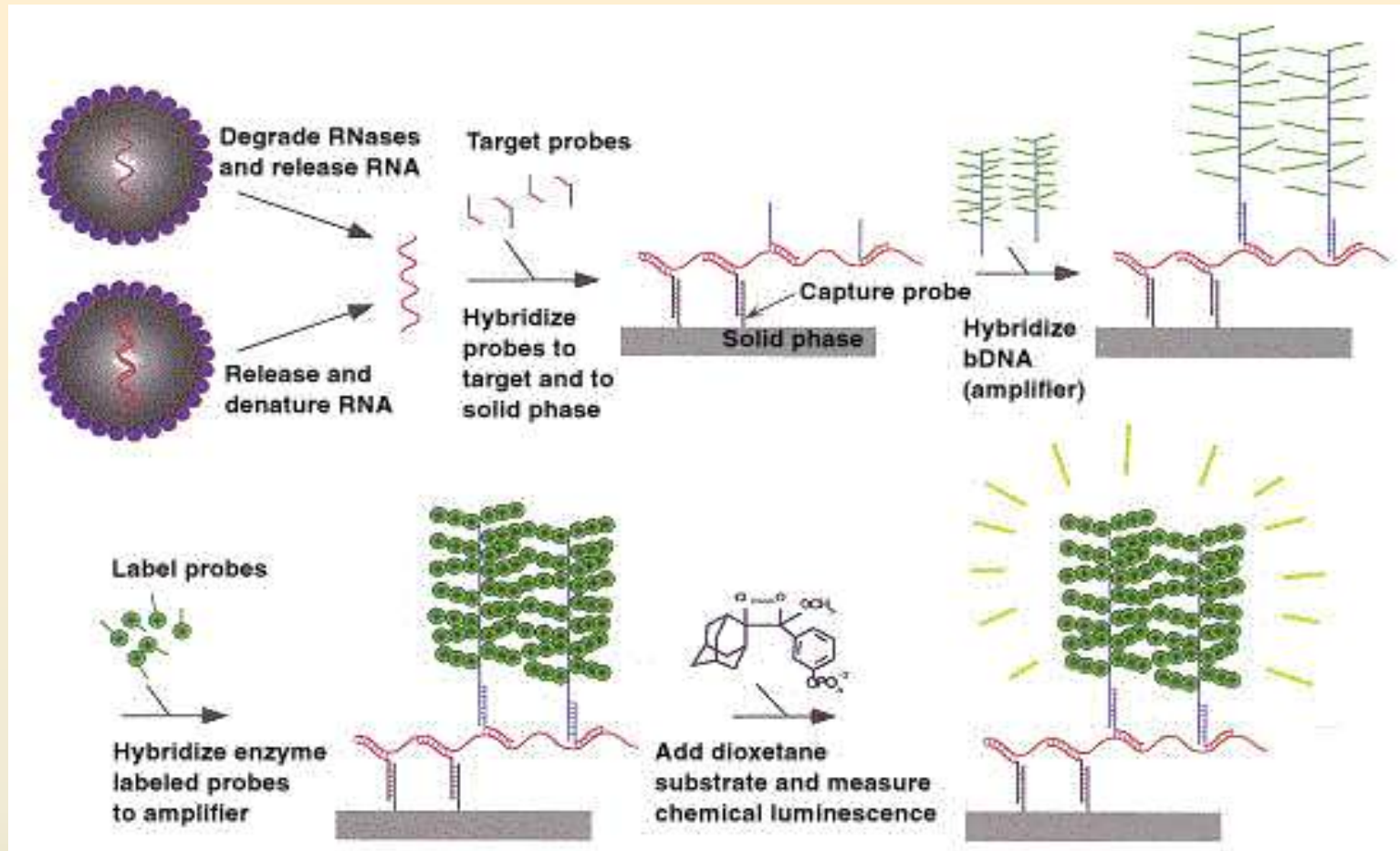


Southern blot, su DNA

Northern blot, su RNA

“blot” = trasferimento

(perchè prevede il trasferimento degli acidi nucleici su supporti di nitrocellulosa o altre membrane).

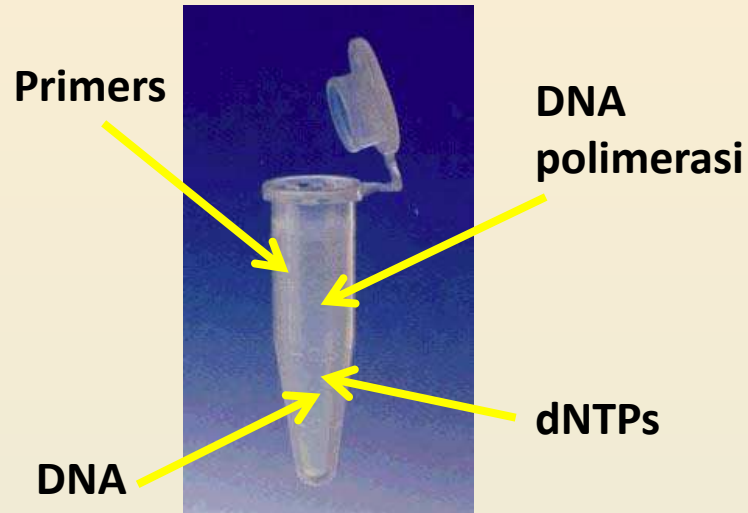
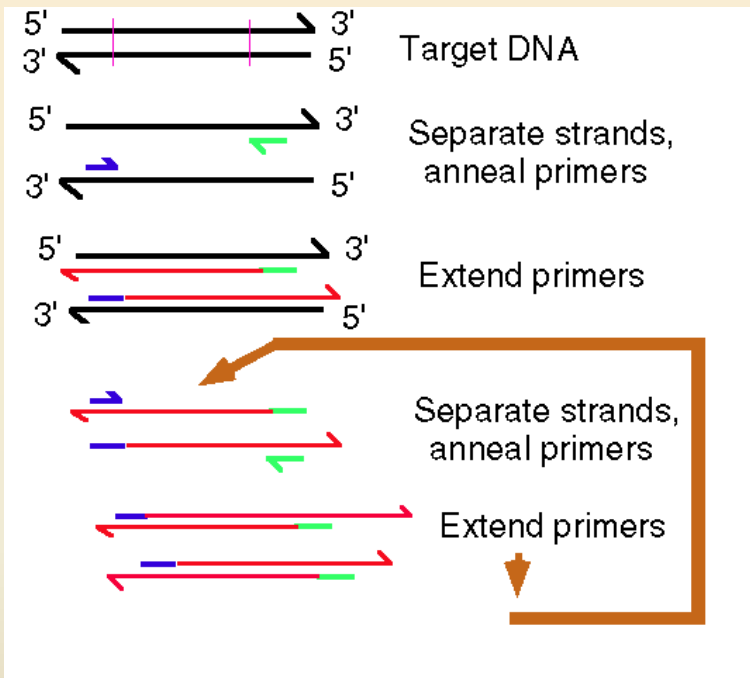


Una variante delle tecniche di ibridazione è la “**Branched DNA**”, che è basata sulla amplificazione del segnale, e non del bersaglio.

3. Amplificazione in PCR

Amplificazione esponenziale delle sequenze bersaglio.

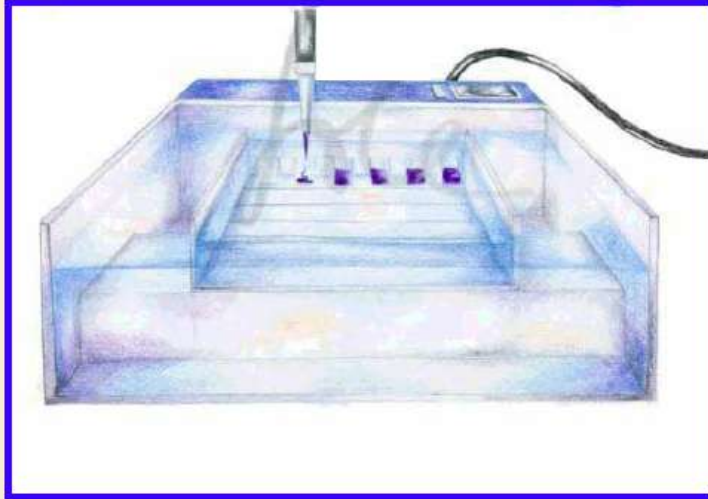
Il template (stampo) può essere DNA, oppure RNA (in questo caso è prima necessario retrotrascriverlo a cDNA).



E' realizzata ripetendo più cicli di amplificazione (20-40 cicli)

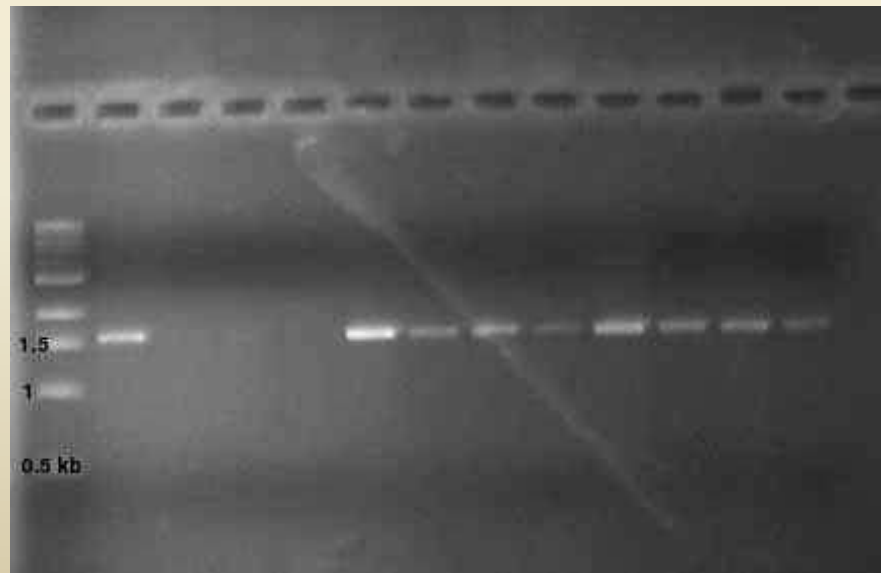
- Denaturazione** : Separazione delle due eliche di DNA da amplificare (95°C), 30 sec.
- Ibridazione**: I primers si ibridano con le sequenze complementari del DNA "target" (55-60°C), 30 sec.
- Estensione**: Sintesi dei due nuovi filamenti di DNA complementari alla sequenza bersaglio mediante la DNA polimerasi (72°C), tempo variabile a seconda della grandezza dell'amplificato.

3. PCR: amplificazione DNA



- 1) Gel di agarosio al 2%.
- 2) Elettroforesi: 100~150 volt.
- 3) Analizzare su un transilluminatore UV la banda del prodotto di amplificazione

MW C+ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Reazione tutto o nulla: risposta solo **QUALITATIVA** (problema contaminazioni)

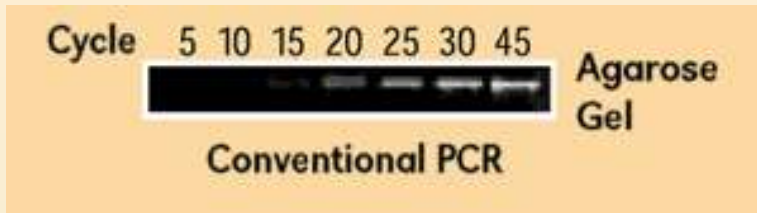
4. QUANTIFICAZIONE acidi nucleici: real time PCR



Sistema che permette l'**amplificazione** e la **quantificazione** con rilevazione della fluorescenza dei prodotti di PCR.

Molto importante non tanto per la diagnosi, quanto per stabilire prognosi e regime terapeutico (**carico virale**).

4. PCR real time: analisi QUANTITATIVA



Monitorare real time (on line) l'andamento della reazione di amplificazione-

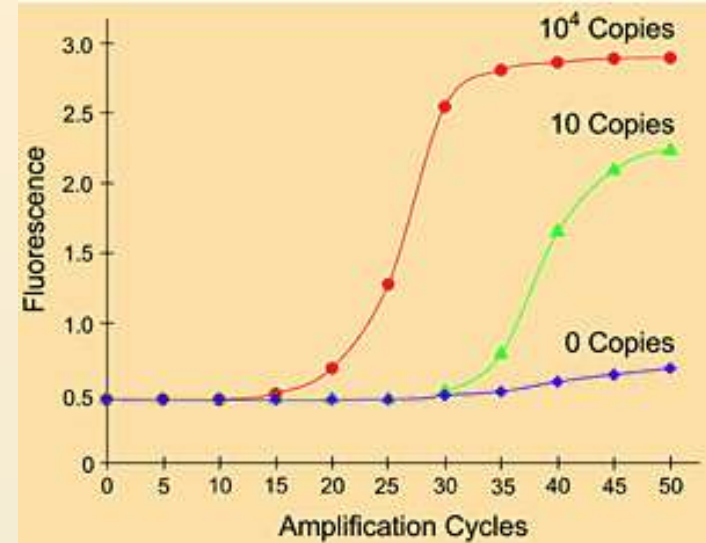


Figure 18: SYBR Green Dye Assay

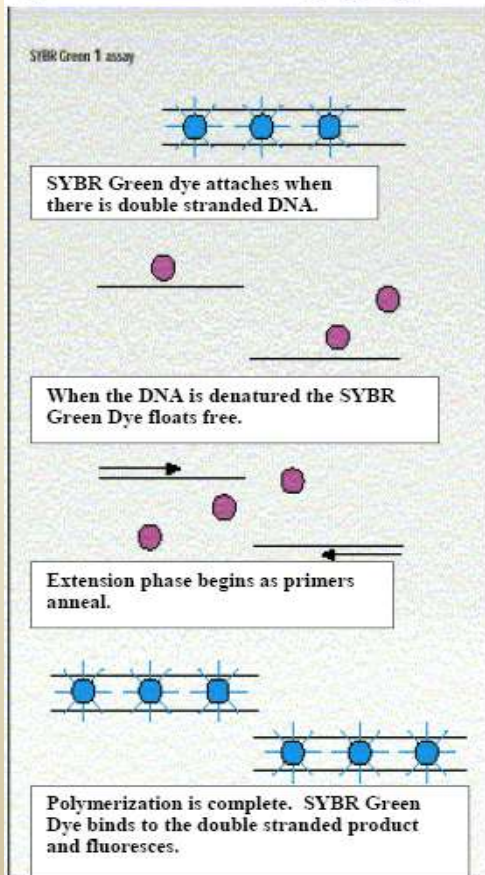
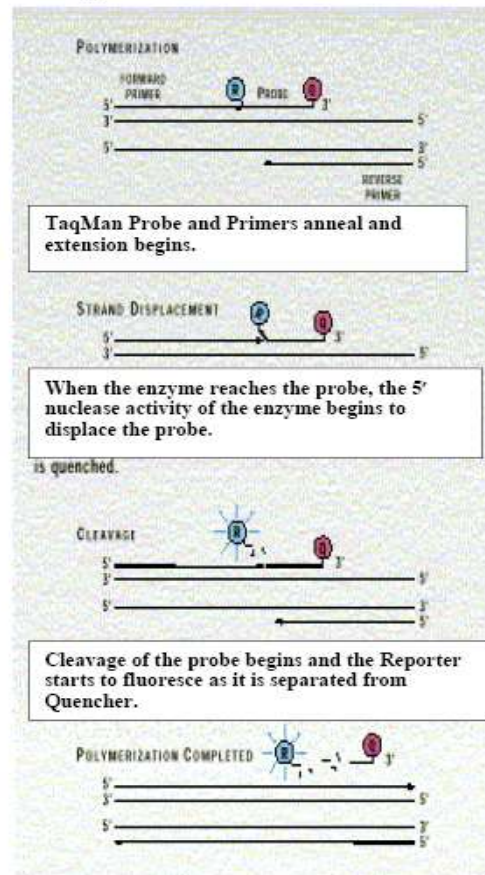
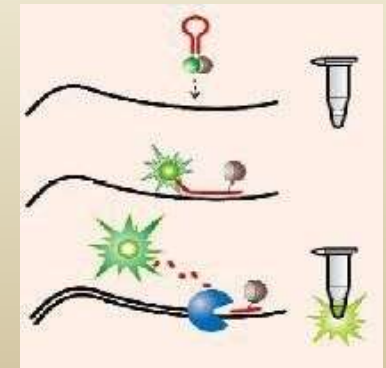


Figure 19: 5' Nuclease



Si possono usare diversi tipi di fluorescenza:

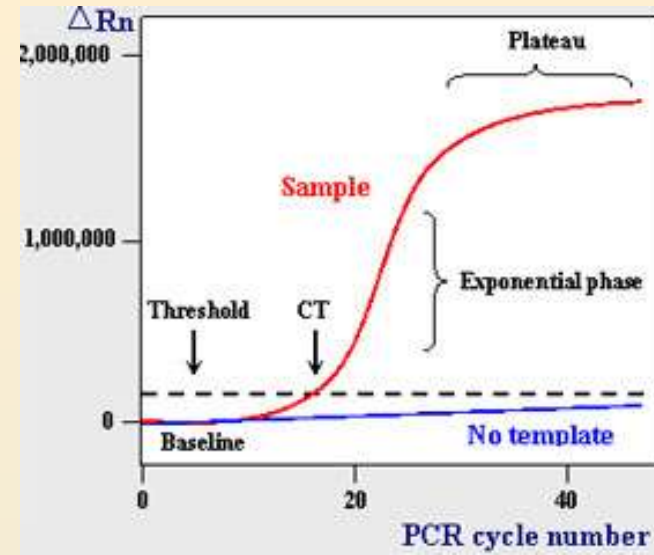
1. **FLUOROFORI** intercalanti il DNA(SYBR GREEN)
2. sonde di idrolisi (**TAQMAN**)



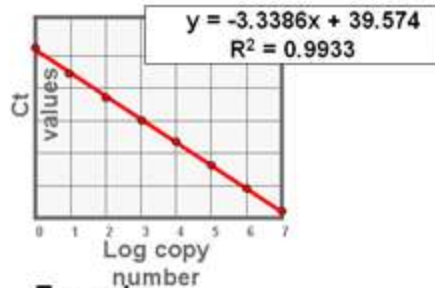
Si ottiene una curva che (rapportata a quantità note = curve standard) consente di misurare per **interpolazione** il n° di molecole bersaglio presenti nel campione.

C_t (ciclo soglia): riflette il n° di cicli a cui la fluorescenza si genera (n° sufficiente di ampliconi generato), ed è inversamente correlato al log del n° iniziale di copie.

SLOPE (pendenza): misura l'efficienza della reazione, si ottiene mettendo in grafico il log del n° di copie e i relativi Ct.



Standard Curve



$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

If slope = -3.32
efficiency becomes 1

Example:

$$\text{Slope} = -3.3386$$

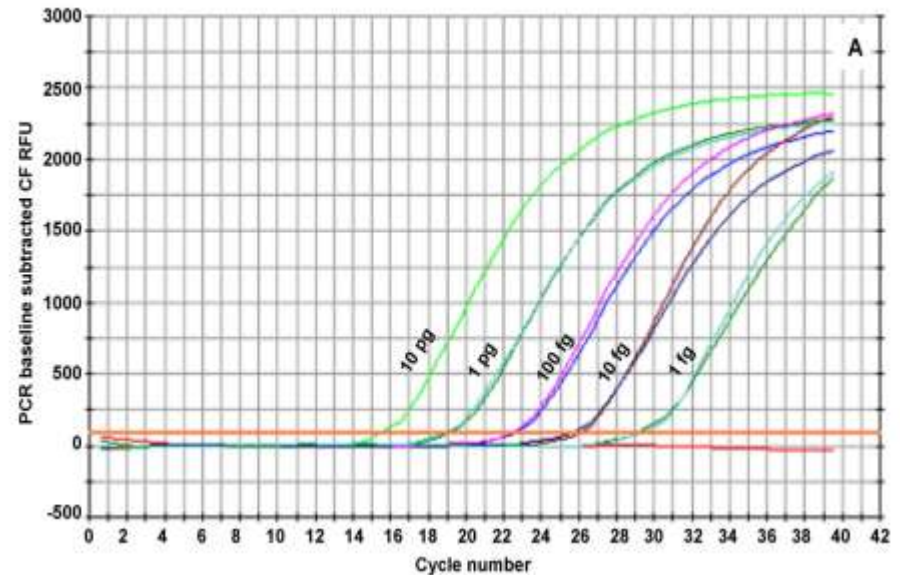
$$E = 10^{(-1/-3.33)} - 1$$

$$= 10^{(0.30)} - 1$$

$$= 1.995 - 1$$

$$= 0.995 \text{ or } 99.5\%$$

Slope	Efficiency
-3.32	100%
-3.5	93%
-3.6	90%
-3.8	83%
-4.0	78%



PCR real time: vantaggi

- Semplicità di automazione
- Flessibilità
- Rapidità di esecuzione
- Elevate sensibilità e specificità
- Elevata riproducibilità

Applicazioni delle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici

TABLE 5. Nucleic acid detection for viral diagnosis

Target	Specimen(s)	Application(s)
Human immunodeficiency virus (HIV) (DNA)	Leukocytes from infant born to HIV-infected mother	Perinatal infection
HIV (RNA)	Plasma	Viral load (prognosis, response to treatment)
Herpes simplex virus	Cerebrospinal fluid (CSF), ocular fluid	Encephalitis, meningitis, retinitis
Varicella zoster virus	CSF, ocular fluid	Encephalitis, meningitis, retinitis
Cytomegalovirus	Leukocytes, plasma, whole blood, CSF, ocular fluid, amniotic fluid	Diagnosis of systemic infection after organ transplantation, encephalitis, radiculomyelitis, retinitis, congenital infection
Epstein-Barr virus	CSF, leukocytes	Primary central nervous system lymphoma in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), posttransplantation lymphoproliferative disorder
Parvovirus B19	Serum, amniotic fluid	Chronic parvovirus B19 infection, aplastic crisis, congenital infection
JC virus	CSF	Progressive multifocal leukoencephalopathy
BK virus	Urine	Hemorrhagic cystitis
Human papillomavirus	Genital secretions	Detection of viral types associated with cervical carcinoma
Enteroviruses	CSF	Meningitis
Hepatitis C virus (qualitative)	Plasma	Diagnosis of infection
Hepatitis C virus (quantitative)	Plasma	Prognosis, monitoring response to therapy
Hepatitis B virus	Serum	Monitoring response to therapy

5. SEQUENZIAMENTO

Il sequenziamento dei prodotti amplificati può fornire una valida informazione sia **sull'identità di un virus** il cui acido nucleico è stato amplificato sia sulla presenza di **mutanti virali** associati a resistenza ai farmaci antivirali.

La sua principale applicazione nella diagnostica virale è il **rilevamento del sottotipo virale** (HBV, HCV, HPV, HIV) e della resistenza ai farmaci anti-HIV e anti-HBV da campioni di plasma da pazienti trattati in fallimento terapeutico.

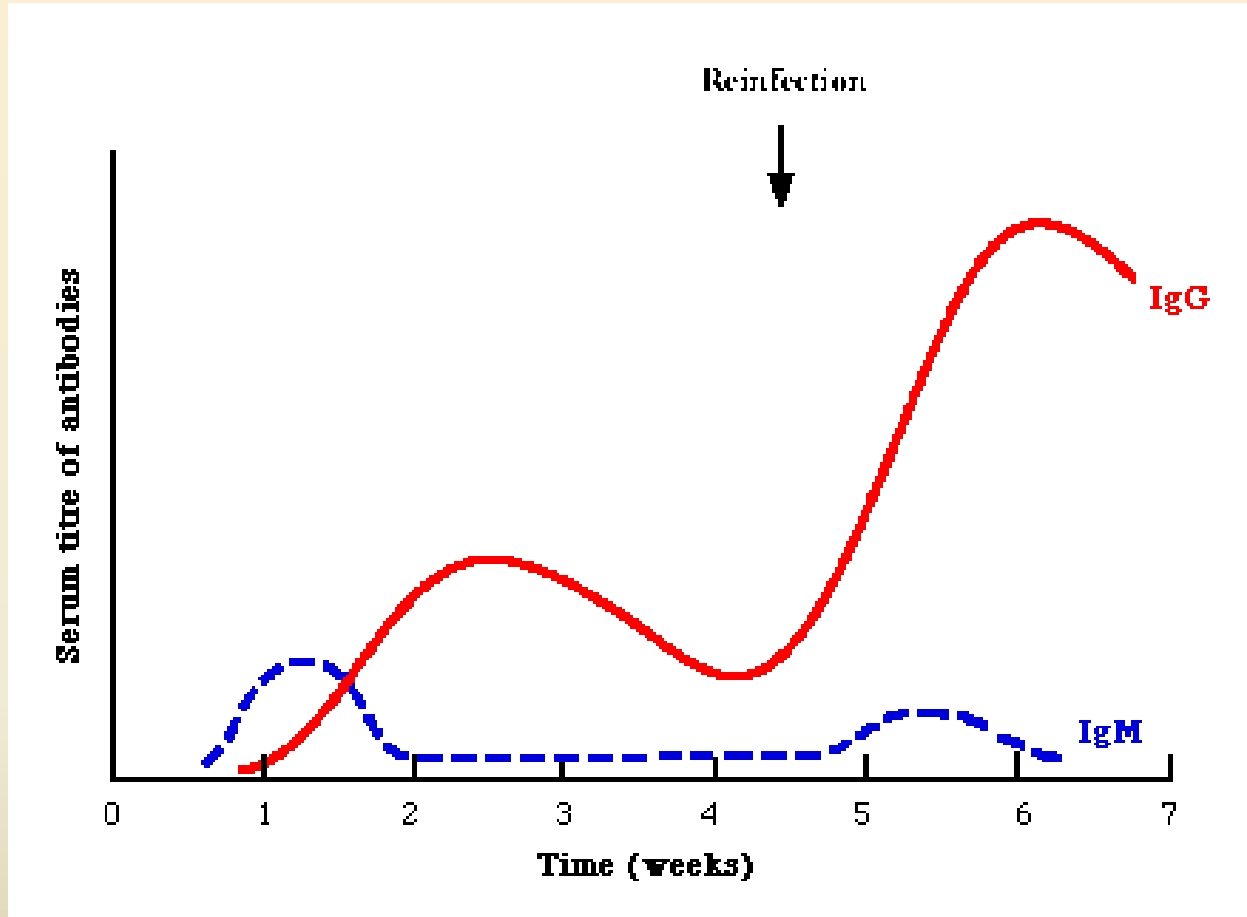
Metodi INDIRETTI in diagnostica virologica

Sierologia

Rivelazione di aumenti di **titolo anticorpale** fra stato acuto e convalescente, o rivelazione di **IgM** durante l'infezione primaria.

Tecniche classiche	Tecniche recenti
1. Fissazione del complemento	1. Saggio radioimmunologico (RIA)
2. Inibizione dell'emoagglutinazione	2. Saggi immunoenzimatici (EIA, ELISA)
3. Immunofluorescenza (IFA)	3. Western Blot (WB)
4. Test di neutralizzazione	4. ELISPOT

Tipico profilo sierologico dopo una infezione acuta



Nella reinfezione, le IgM sono assenti o a bassi livelli

Sierologia

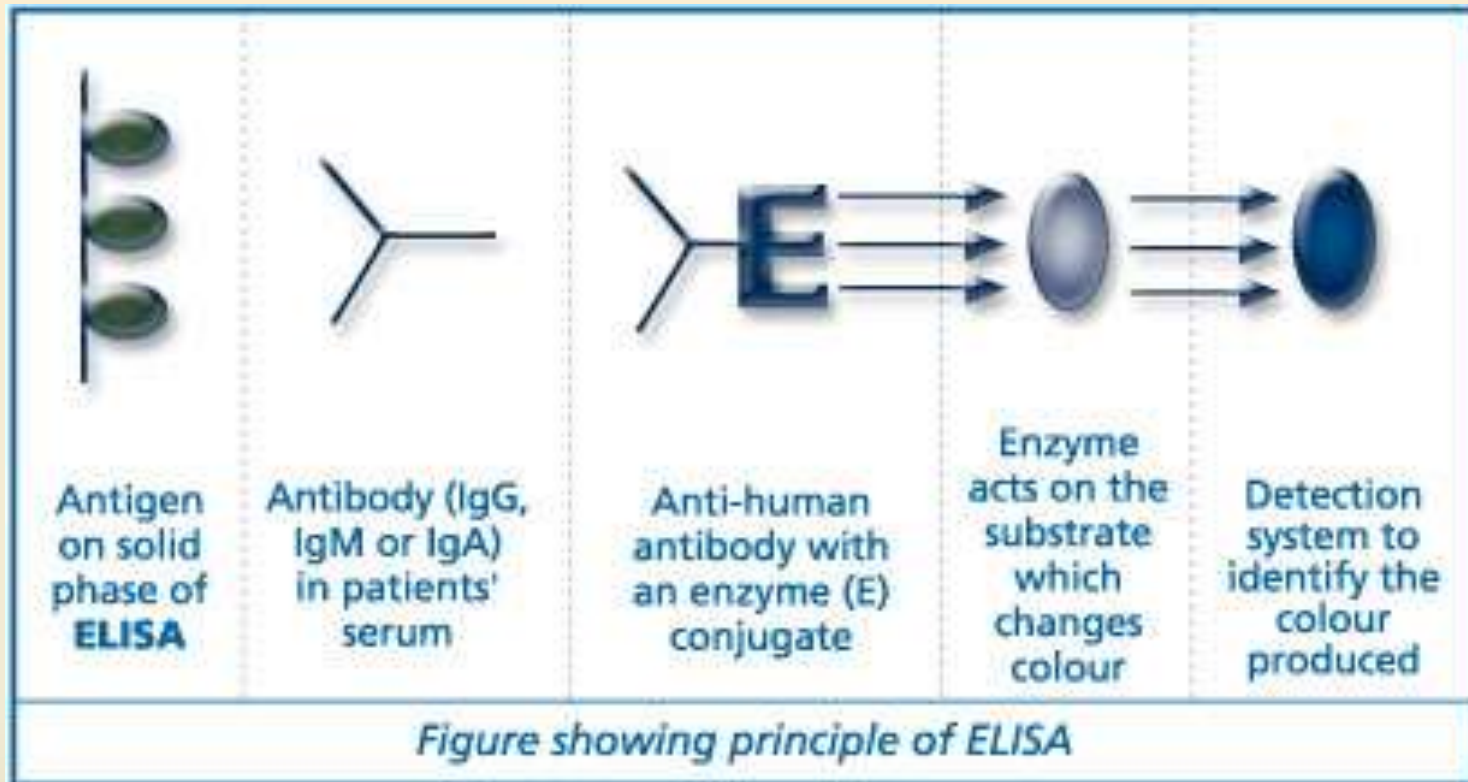
Criteri per diagnosticare una **infezione primaria:**

- **Presenza di IgM**
- **Sieroconversione**
- **Alti titoli di IgG raramente sono diagnostici**

Criteri per diagnosticare una **reinfezione:**

- **Aumento di almeno 1 volta delle IgG fra siero acuto e siero convalescente**
- **Aumento di almeno 4 volte del titolo di IgG**
- **Assenza o lieve aumento di IgM**

Rilevamento Ab - ELISA

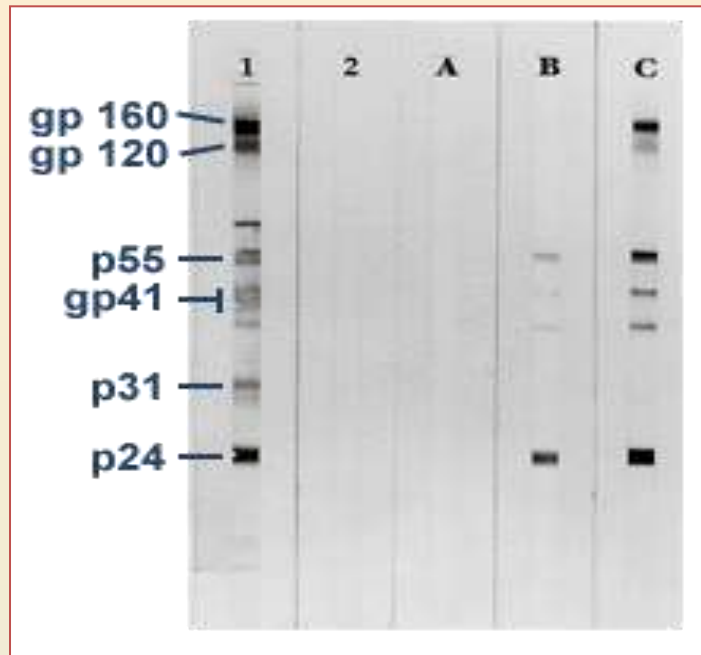


Utilissimo come SCREENING; la diagnosi va di solito confermata con altre tecniche (es. Western blot)

Western Blot

Spesso utilizzato per confermare diagnosi ottenute con altre tecniche (es. ELISA per HIV)

gp 160 = precursore env
gp 120 = env
p55 = gag
gp 41 = env
p31 = RT pol
p24 = core gag



HIV-1 Western Blot

- 1: Controllo positivo
- 2 Controllo negativo
- A = campione negativo
- B = campione incerto
- C = campione positivo

NB: Non basta la presenza di bande per indicare la positività, ma deve verificarsi la presenza di tutte o di alcune bande, con diversi criteri di positività, a seconda dei kit e degli studi

RISULTATO POSITIVO:

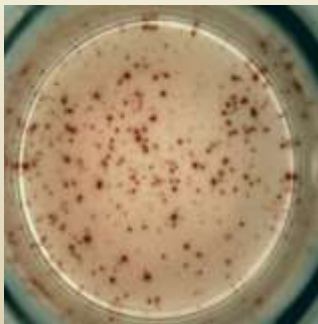
Almeno due bande, di cui 1 verso glicoproteine

OPPURE almeno 3 bande, con reattività verso SIA gag CHE pol CHE env

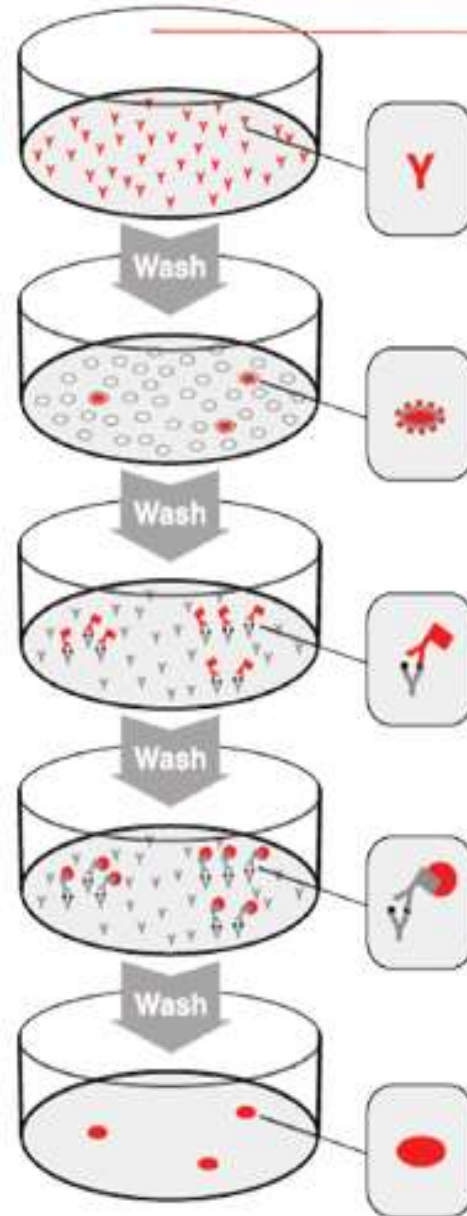
Bande presenti, ma con pattern diverso = il risultato è INCERTO

ELISPOT

ELISPOT è un saggio semplice e sensibile per analizzare specifiche risposte immuni ad antigeni o peptidi. A seconda delle citochine analizzate, il saggio può differenziare i diversi tipi di risposta T (es Th1e Th2).



Assay Principle



The assay is performed in 96-well microtiter plates. In the first step the wells are coated with high affinity monoclonal antibodies (Y) to the cytokine to be investigated.



Cells (up to 250×10^3 /well) are added and incubated for 6–48 hours in the presence of antigen. During this period antigen-specific responding cells (•) release the cytokine (•), which is captured in the immediate vicinity of the cells.

Cells are removed by washing and a biotinylated antibody (A) directed to a second epitope of the cytokine is added.

Streptavidin conjugated with enzyme (•) (ALP or HRP) is added.

Finally, a precipitating substrate for ALP or HRP is added and the plates are incubated until spots (•) emerge at the site of the responding cells. The spots can be examined and counted in a dissection microscope or an image analyser system. Comparison of the number of spots with the number of cells added to each well gives the frequency of responding cells.

Utilità dei risultati sierologici

L'utilità e la significatività dipendono dal patogeno in questione:

- Es, per virus come rosolia e epatite A, la comparsa di sintomi coincide con lo sviluppo di anticorpi. La presenza di IgM o di aumento nelle IgG indica infezione attiva.
- Altri agenti infettanti danno malattia prima della comparsa degli anticorpi. In questi casi, la diagnosi è retrospettiva e quindi non utile clinicamente ma solo anamnesticamente.
- Altri danno malattia molto tempo dopo la comparsa degli Ab (HIV), quindi hanno significato diagnostico.

Problemi della sierologia

- ❑ **Tempo** necessario per avere siero acuto e siero convalescente.
- ❑ Infezioni subcliniche o lievi non sempre danno risposte umorali **rilevabili**.
- ❑ Virus fra loro correlati possono dare **reazioni crociate** (es HSV e VZV, encefalite giapponese e Dengue), dando falsi risultati positivi.
- ❑ Pazienti **immunocompromessi** spesso hanno risposte assenti o ridotte
- ❑ Pazienti che hanno ricevuto di recente trasfusioni possono dare **false risposte positive**, per il trasferimento passivo di anticorpi.
- ❑ Pazienti con mononucleosi infettiva, alcune malattie del connettivo ed autoimmuni possono dare **falsi positivi**