

## LABORATORIO VIROLOGIA

### - ISOLAMENTO IN COLTURA CELLULARE

L'isolamento in coltura cellulare si può effettuare perché si possono rilevare delle alterazioni morfologiche che i virus possono comportare quando questi ultimi vengono messi in coltura: l'effetto citopatico è il più facile da riconoscere. Ma possiamo essere anche nella condizione in cui i virus non sono coltivabili e quando iniziano la crescita all'interno della cellula non danno effetti citopatici importanti (come il caso dell'epatite B e C che sono virus che danno infezione a livello del fegato: sembrerebbe facile prendere una coltura di cellule epatiche, mettere il virus in vitro e farlo crescere ma non è così poiché quando vengono messi in vitro in contatto con cellule permissive e sensibili, in questo caso non fanno replicarsi). Quindi se consideriamo il fatto che ci sono virus che non hanno capacità di crescere in coltura cellulare, possiamo verificare la loro presenza tramite la rilevazione degli antigeni virali delle proteine perché, indipendentemente dal fatto se sappia produrre la lisi della cellula e uscire da essa, se ha iniziato il ciclo replicativo ha prodotto delle proteine: è quindi un virus che inizia a replicarsi ma non ce la fa ad uscire dalla cellula e quindi non produce effetto citopatico. In questo caso si rileva l'espressione degli antigeni virali (come già detto) o la produzione degli acidi nucleici la produzione degli acidi nucleici (tramite sonde a DNA o RNA).

**RIPASSO EFFETTO CITOPATICO:** in una piastra Petri è cresciuta una coltura cellulare, se aggiungiamo un campione contenente il virus e le cellule sono sensibili e permissive le cellule iniziano a gonfiarsi perché il virus inizia a produrre le proteine e il volume della cellula aumenta. Le cellule si arrotondano e si arriva al volume di scoppio: la cellula si apre, permettendo la liberazione del virus nel terreno di coltura; esso avrà altre cellule in cui replicarsi e può iniziare altri cicli replicativi. Possiamo anche essere nella condizione in cui non è rilevabile l'effetto citopatico ma un arrotondamento delle cellule e non lo scoppio e come detto prima, è il caso più complesso per poter stabilire se il virus si sta replicando o no. Man mano che le cellule invecchiano la loro morfologia cambia quindi non è semplice stabilire se il rigonfiamento sia la causa della replicazione o semplicemente l'invecchiamento delle cellule.

Nel caso di effetto citopatico possiamo fare una conta attraverso la diluizione al punto finale o conta delle lesioni locali. Nel primo caso abbiamo la possibilità di fare diluizioni del virus.

La titolazione si può fare nel momento in cui si ha un effetto citopatico o che dà un altro effetto evidente, si può quantificare il virus (quantificare non significa quantificare la componente del virus, ma quantificarlo in base alla loro capacità di interagire con le cellule viventi. I metodi di quantificazione/titolazione in virologia sono metodi che prevedono la crescita del virus in una coltura cellulare e abbiamo due metodi diversi: **metodo delle diluizioni al punto finale** e **metodo della conta delle lesioni locali**.

Quantificare i virus vuol dire ottenere il titolo virale: il numero di unità virali presenti per unità di misura.

### -METODO DELLA DILUIZIONE AL PUNTO FINALE

Prevede di preparare una serie di diluizioni della sospensione virale iniziale e andare ad utilizzare le diluizioni per infettare ospiti sensibili e permissivi e vedere quindi gli effetti della replicazione del virus. Il titolo si calcola ammettendo che l'ultima diluizione del virus sia ancora in grado di dare un effetto positivo e che contenga almeno un'unità virale. (soffermarsi sulle definizioni per il test a crocette). La sospensione virale deve essere diluita, una diluizione 1:10, 1:100, 1:1000 etc.. (possono essere scritti anche come  $1/10$  o  $10^{-1}$ ). Iniziamo con diluire 1:10 prendendo 1mL di sospensione virale e 9mL di un diluente: la soluzione meno impattante sulle cellule è il terreno di coltura e si utilizza al posto di soluzione saline che potrebbero non avere i giusti componenti per mantenere in vita le cellule. Quindi avremo  $1\text{mL}+9\text{mL}=10^{-1}$ , quando si prepara la successiva sospensione  $10^{-2}$ , si utilizza la diluizione  $10^{-1}$  per preparare  $10^{-2}$ : la  $10^{-2}$  è 10 volte più diluita rispetto a  $10^{-1}$  e quindi basterà prendere 1mL della sospensione già diluita 1:10, unirla a 9mL di terreno di coltura delle cellule per diluirla ulteriormente 1:10 e arrivare ad 1:100. Fare però  $1\text{mL}+9\text{mL}$  di terreno vuol dire diluire 1:10 e ottenere 10mL di virus ma 10mL di sospensione virale possono essere molte rispetto al lavoro che voglio fare perché spesso in laboratorio si lavora con microlitri e non mL:

- Se volessi diluire 1:10 la sospensione virale ed ottenere un volume finale di 500micro come si può procedere? (voglio diluire 1:10 ma non voglio 10mL ma 500microlitri) Risposta: 450microlitri di coltura e 50microlitri di terreno virale.  
Poiché diluire 1:10 vuol dire avere 1 volume di virus più 9 volumi di terreno di coltura quindi se devo fare 1+9 volumi ed arrivare a 500microlitri vuol dire che farò 50microlitri di virus più 450microlitri di terreno: questo vuol dire mantenere il rapporto 1+9 ma ottenere una quantità di virus più bassa (meglio non fare una soluzione in quantità maggiore, come per esempio preparare 10mL quando ne servono 500microlitri, perché ciò che va buttato è difficile da smaltire).

Una volta effettuato le diluizioni, vado ad inoculare nel mezzo di coltura che può essere rappresentato da:

- Colture cellulari= TCID
- Uova embrionate=EID
- Animali da laboratorio=LD

Questi sono i sistemi viventi che possono essere utilizzati per fare una titolazione. Stabilire il titolo virale significa andare a vedere quali sono gli effetti del virus sui sistemi viventi (colture cellulari, uova embrionate e animali da laboratorio). Le colture cellulari sono i sistemi più utilizzati, però dobbiamo prendere in considerazione di avere altri sistemi viventi come le uova embrionate o gli animali da laboratorio. Quando cambio il mezzo di coltura cambio anche l'unità di misura (TCID, EID, LD), che in virologia racconta qualcosa che riguarda la metodica utilizzata per ottenere quel risultato.

**ESEMPIO:** Se vado a vedere che il titolo virale è  $10^5$  e poi metto dietro la sigla TCID o EID o LD, vuol dire che a colui che va a leggere il risultato non solo gli dico quanto è elevato il titolo della mia sospensione virale ma gli racconto anche come ho eseguito il test:

- Se metto TCID vuol dire che ho preso in considerazione la dose infettiva che dà effetto citopatico, quindi il mio collega che legge il mio lavoro scientifico già sa che ho utilizzato una coltura cellulare

- Se metto EID (egg infective dose) il mio collega già sa che ho ottenuto il mio risultato utilizzando delle uova embrionate
- Se metto LD (letal dose) il mio collega sa che ho utilizzato degli animali da laboratorio

Ovviamente vanno specificati il tipo di coltura cellulare, la specie delle uova che ho utilizzato o di quale animali si tratta. Però andando ad indicare il risultato con queste unità di misura, definisco il mezzo di coltura che ho utilizzato.

*Stabilita qual è l'unità di misura con la quale voglio esprimere il risultato della titolazione vediamo come si leggono i risultati:*

abbiamo una piastra vista dall'alto nella quale abbiamo inserito le cellule (in posizione 1A ho il primo pozzetto, in posizione 2A ho il secondo pozzetto e così via...): abbiamo inoculato il nostro virus in colture cellulari. Che cosa ho messo in questi pozzetti:

- ✓ Nella fila A in 1, 2, 3, 4 e 5 ho messo il virus diluito di  $10^{-1}$
- ✓ Inoculo la diluizione  $10^{-2}$  nella fila B, quindi avrò il pozzetto 1,2,3, 4 e 5 dove ci saranno una serie di repliche del virus diluito  $10^{-2}$ .
- ✓ Lo stesso avviene per  $10^{-3}$  nei 5 pozzetti della fila C
- ✓  $10^{-4}$  nei 5 pozzetti della riga D
- ✓ E così via

Aspettiamo 3 giorni circa affinché il virus possa dare un effetto citopatico (siamo nella condizione ideale per fare questo tipo di titolazione poiché abbiamo un virus che nelle nostre cellule dà un effetto citopatico). Dopo i 3 giorni vado a vedere dove è presente e dove non è presente l'effetto citopatico e mi costruisco in un foglio uno schema della mia piastra dove riporto i risultati: posso segnare con i "+" e con i "-" i pozzetti nei quali ho visionato l'effetto citopatico. Andando a leggere gli effetti della diluizione  $10^{-1}$ , vediamo che sono segnati una serie di + : vuol dire che il virus diluito  $10^{-1}$  mi ha dato effetto citopatico sul pozzetto 1,2,3,4 e 5 (ho un effetto citopatico sul 100% delle mie colture cellulari) . Diluisco il virus ( $10^{-2}$ ) e ottengo sempre 5 pozzetti con effetto citopatico e quindi il 100%, lo stesso sulla fila C e D. Mano a mano che diluisco il virus arrivo ad un certo punto, come a  $10^{-5}$  (fila E) che io ho 3 pozzetti con effetto citopatico e 2 pozzetti senza effetto citopatico (ho il 60% di positività). Diluisco di nuovo ( $10^{-6}$ ) e arrivo ad ottenere solo uno dei 5 pozzetti che ho infettato con un effetto citopatico e poi arrivo a  $10^{-7}$  (fila G) in cui l'effetto citopatico non c'è più: a furia di diluire il virus le particelle virali sono sempre di meno e arrivo ad un punto in cui non ci sono più particelle virali e non c'è più effetto citopatico. La *fila H* è il **controllo cellule**, ci sono delle colture cellulari non infettate da un virus per vedere la differenza: l'effetto citopatico lo riconosco perché posso fare un confronto (per esempio le cellule senza virus hanno un effetto ottimo e sano, mentre le cellule infettate da virus sono rotte). Esempio con gli animali da laboratorio: se infetto gli animali da laboratorio e ho il controllo negativo (colui che non è stato infettato sta bene), tutti quelli che muoiono è a causa del virus. Se nell'esperimento vedessi morire anche gli animali che non sono stati infettati da virus non posso dire che quelli infettati e morti sono morti a causa del virus perché magari c'è un'altra causa (magari c'è un altro patogeno). Quindi devo avere sempre un confronto con una coltura cellulare, un animale da laboratorio o con un uovo embrionato dove non è stato inoculato il virus, dipende dall'esperimento che facciamo.

A questo punto vado a stabilire il **titolo** che è il reciproco della diluizione più elevata, alla quale il virus è ancora in grado di dare il 100% dei casi positivi. Vado a vedere:  $10^{-1} \rightarrow 100\%$ ,  $10^{-2} \rightarrow 100\%$ ,

$10^{-3} \rightarrow 100\%$ ,  $10^{-4} \rightarrow 100\%$ ,  $10^{-5} \rightarrow 60\%$ . **Quindi se il titolo è il reciproco dell'ultima diluizione che mi dà ancora il 100% di positività vuol dire che il mio titolo virale è il reciproco di  $10^{-4}$ , ovvero  $10^4$ .**

Il titolo è pari a  $10^4$  e come unità di misura, se il test l'ho effettuato su una coltura cellulare, scriverò che il titolo è pari a  $10^4$  TCID ( $10^4$  l'ho ottenuto allestendo una titolazione in coltura cellulare): ho trovato il titolo virale.

Ammettiamo che il giorno che faccio l'esperimento ho poche colture cellulari, e quindi devo cambiare esperimento: posso scegliere di effettuare la titolazione utilizzando solo  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$ .

Posso anche avere pochi animali da laboratorio e quindi devo fare una scelta e un numero inferiore di diluizioni. Abbiamo saltato le diluizioni pari, e prendiamo come titolo il reciproco della diluizione più elevata alla quale il virus dà un effetto positivo nel 100% dei casi, avrei un titolo pari a  $10^3$  TCID poiché nel mio esperimento non ho considerato  $10^{-4}$  poiché non ho potuto allestire tutte le diluizioni. Questa definizione del titolo come reciproco della diluizione più elevata e che mi dà il 100% dei casi potrebbe farmi incorrere in dei problemi di interpretazione dei risultati perché al 100% corrisponde più di una diluizione. Esempio: una mattina arrivo in laboratorio e le cellule sono molto numerose, riesco a fare le diluizioni che avevo pensato e anche di più come  $10^{1.5}$  etc... Così potrei avere un altro risultato ancora, ma il 100% non corrisponde ad una singola diluizione ma corrisponde a più diluizioni. **Negli ultimi anni si tende ad utilizzare il titolo come quantità di virus che dà un effetto nel 50% dei substrati esaminati perché in questo caso la diluizione è unica ed è molto più precisa, e non dipende da come opera l'operatore.**

Il 50% dei casi non è facile da individuare immediatamente, tenendo conto dell'esempio della tabella notiamo che  $10^{-5}$  corrisponde a 60% delle positività e  $10^{-6}$  al 20%: mi aspetto che il titolo che mi dà il 50% degli effetti sia compreso tra  $10^5$  e  $10^6$ . È intuitivo perché se il 100% di positività corrisponde a  $10^4$ , il 60% corrisponde a  $10^5$ , il 20% corrisponde a  $10^6$ , vuol dire che il mio titolo (ovvero la quantità di virus che mi dà l'effetto nel 50% dei casi deve essere intermedio tra  $10^5$  e  $10^6$ : sarà  $10^{5.25}$  qualcosa)

Con un calcolo si stabilisce il valore esatto che si trova tra  $10^5$  e  $10^6$ : **il calcolo della distanza proporzionale**. La distanza proporzionale è quel "virgola qualcosa" che bisogna stabilire. DP (distanza proporzionale) si calcola facendo la percentuale che sta al di sopra del 50% (che nel nostro caso era 60%) meno 50 il tutto diviso la percentuale che sta al di sopra del 50% meno la percentuale che sta al di sotto del 50% (che nel nostro caso è 20). Svolgendo i calcoli uscirà 0.25.

**Il titolo** (dose citopatica al 50%) (inoltre quando si indica la dose citopatica e non si prende il 100% ma il 50% si mette come pedice 50%  $\rightarrow$  DC50%) **DC/TCID** (è la stessa cosa) **50% è uguale a  $10^{5.25}$ .**

Questo è univoco: se diluisco il virus  $10^{5.25}$  volte ottengo nelle mie colture cellulari il 50% di positività e il 50% di effetto negativo (assenza di effetto citopatico).

(lo svantaggio del metodo della diluizione al punto finale è che trattandosi di un metodo che prevede la lettura dei risultati dopo coltivazione, è un metodo lento per ottenere i risultati poiché devo aspettare che il virus cresca)

## TITOLAZIONE MEDIANTE TEST DI EMOAGGLUTINAZIONE (E.A.)

Questo test si basa sempre su titolazione mediante diluizione a punto finale. Il suo vantaggio è che non bisogna aspettare la crescita del virus perché è un test che si basa sulla capacità di alcuni virus di legare i globuli rossi, non avviene la replicazione virale poiché i globuli rossi per questi virus sono sensibili ma non permissivi: è inutile aspettare 3-4 giorni poiché i virus non entrano nella cellula ma creano dei ponti che permettono di vedere l'effetto dell'emoagglutinazione. Alcuni virus hanno sulla loro superficie delle glicoproteine (emoagglutinina) che possono legare i globuli rossi di diverse specie (quelli utilizzati di più sono quelli di pollo, possono essere anche di tacchino, di cavia, umani di gruppo 0). Quando un virus viene messo in contatto con i globuli rossi essi si depositano sul fondo del pozzetto occupando tutto lo spazio che hanno a disposizione, in assenza di virus invece i globuli rossi si depositano sul fondo del pozzetto vanno uno sopra l'altro, addossandosi e finendo al centro del pozzetto. (I pozzetti sono ad U, anche se possono essere a V).

## ALLESTIMENTO DI UNA PROVA DI TITOLAZIONE VIRALE MEDIANTE EMOAGGLUTINAZIONE

### SLIDE 14

I globuli rossi vengono forniti da delle ditte: il sangue prelevato viene fornito in una soluzione di Alsever che mantiene di globuli rossi. Il prelievo di sangue si fa in una provetta eparinata per evitare la coagulazione del sangue dato che servono dei globuli rossi liberi). Quando il sangue arriva in laboratorio viene centrifugato e nella parte superiore avrò la componente liquida (soluzione di alsever e plasma) e nella parte sottostante avrò le emazie che verranno diluite in soluzione fisiologica alla concentrazione dello 0.5%. A questo punto si prepara in una piastrina una serie di diluizioni del virus (ricordare cosa detto prima sulle diluizioni nella provetta, la stessa cosa succede nelle piastrine), si diluisce di 2 in 2: avrò una sospensione virale che è molto concentrata nei primi pozzetti e sempre più diluita nei pozzetti successivi. (vedere i pozzetti nella slide 12)

Dalla piastrina (slide 15) vedo che nei primi pozzetti avrò la formazione di un precipitato a margini frastagliati: se il virus dà emoagglutinazione, i globuli rossi si andranno a depositare sul fondo della piastrina e si depositeranno su tutta la superficie a disposizione. Successivamente a furia di diluire il virus, si arriva ad un certo punto che il virus non è più in grado di formare i ponti: i globuli rossi quindi si depositano in fondo e guardando dall'alto la piastrina si vedono i globuli rossi che formano un precipitato a margini netti. È un effetto che si vede ad occhio nudo, e l'operatore potrà dire che l'emoagglutinina è riuscita a legarsi diluendo il virus fino a 1:64, da 128 in poi il virus non è più in grado. Quindi il titolo virale, essendo il reciproco dell'ultima diluizione che mi dà ancora un effetto (in questo caso l'effetto è quello emoagglutinante), è il reciproco di 1:64, 64.

In questo caso l'unità di misura è UEA (unità emoagglutinanti) e riporto il volume sul quale ho eseguito il test. In questo caso il titolo virale è 64 UEA/50 microlitri. Se volessi esprimere il titolo virale su 1mL e non su 50microlitri, bisogna chiedersi 64UEA/50microlitri a quante unità emoagglutinanti corrispondono in 1mL? Si fa il rapporto tra 1000 e 50 (50microlitri quanto è più piccolo rispetto a 50mL? ), il risultato è 20 e quindi 1mL è 20 volte più grande rispetto a 50microlitri. Quindi se ho 64 unità emoagglutinanti in 50microlitri in 1mL avrò 64 unità emoagglutinanti moltiplicate per 20: 1280.

### -METODO DELLA CONTA DELLE PLACCHE

Si utilizza quando facciamo una prova in vitro dei farmaci antivirali. Il metodo fu messo appunto per il virus dei batteri (batteriofagi che sono in grado di produrre la lisi nelle colture cellulari batteriche),

negli ultimi anni è stato messo appunto anche per i virus animali che prende anche il nome di metodo di Dulbecco. Gli stessi principi alla base del metodo della conta delle placche possono essere utilizzati anche per virus che danno lesioni locali diverse da quelle litiche come la conta dei foci di iperproliferazione.

### -METODO PER I VIRUS DEI BATTERI

Si parte sempre dalle diluizioni: prendiamo la sospensione virale e si fanno delle diluizioni. A questo punto devo avere una coltura di batteri: se prendo un terreno agarizzato e per spatolamento faccio la semina di batteri, ottengo una patina. I terreni agarizzati prima di essere incoluati con i batteri sono lucidi poi la crescita batterica li opacizza e fa sì che la parte superiore di un terreno agarizzato nel quale sono state seminate le cellule batteriche diventa una patina opaca. Quando vado a mettere il virus sulla patina opaca di batteri esso entra dentro le cellule, le rompe e crea un buco su questa patina, compaiono delle zone dove ho la lisi cellulare che risultano essere delle aree trasparenti (le così dette placche) conto le placche di lisi e posso determinare il titolo virale.

SLIDE 19: ricapitola ciò che è stato detto → ho la diluizione dei fagi e posso seminarli sulla coltura cellulare: metto ad incubare e ho le placche di lisi (aree trasparenti sulla regione opaca). In questo caso le diluizioni a cosa servono? Immaginiamo di andare a diluire  $10^{-1}$  un virus molto concentrato, le placche di lisi saranno una vicino all'altra e sovrapposte perché se ho tanto virus di conseguenza ho tante placche di lisi. Quindi bisogna preparare tante diverse diluizioni ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ...) e notiamo che da  $10^{-1}$  in poi il numero delle placche di lisi andrà a diminuire. Poiché in questo caso **NON** vado a vedere qual è l'ultima diluizione che mi dà le placche di lisi, ma come dice il nome stesso del test, bisogna contare le placche di lisi sulla diluizione che mi dà la possibilità di avere delle placche distinte fra di loro (di solito le placche si contano quando sono più di 30 e devono essere meno di 300). Quindi si sceglie una piastra dove le placche sono ben separate fra loro e dove sono più di 30 e meno di 300: si procede poi con la conta. Il titolo del virus si definisce come il rapporto tra il numero delle placche contate (al numeratore) e il volume utilizzato per fare l'infezione (in mL) (al denominatore), il tutto moltiplicato per la diluizione che era stata utilizzata per infettare la piastrina dove siamo andati a fare la conta delle placche. Ottengo un risultato in PFU (unità formanti placche) / ml

Dulbecco modificò questo test, anche se l'inizio lo lasciò uguale: si fanno le diluizioni della sospensione virale che vengono preparate all'inizio, poi devo avere delle piastrine che contengono le colture cellulari e sopra il monostrato delle cellule, una volta infettate con il virus, si versa un terreno di coltura semisolido (terreno che contiene i nutrienti che servono alle colture cellulari). Si lascia tutto ad incubare a 37 gradi per 4-5 giorni e il virus che lisa la cellula, poiché il terreno di coltura è semisolido, non può muoversi quindi determina la lisi delle cellule vicine. Se avessi messo un terreno liquido, il virus sarebbe potuto andare in qualsiasi punto della piastra ad infettare un'altra cellula. Noi vogliamo che il virus rimanga vicino alla cellula che ha infettato la prima volta perché quando un virus esce da una cellula ed infetta una cellula vicina crea una placca di lisi e solo se rendo solido il terreno, so che ad una placca di lisi corrisponde un virione. La differenza con i batteriofagi è che sotto i batteri c'era un terreno agarizzato e ciò indicava che il virus una volta uscito dalla cellula poteva andare solo sulla cellula vicina poiché non aveva un fluido dove diffondersi. Nel caso delle colture cellulari animali avrei rischiato di vedere un virus che esce da una cellula e che va a diffondersi in qualsiasi altra cellula della coltura. Ciò mi impedisce di pensare che ad una placca di lisi corrisponde un virione. Invece Dulbecco, coprendo con un terreno di coltura semisolido le cellule

intrappolò il virus e quando esso esce dalla cellula che ha infettato, potrà andare solo sulla cellula circostante. Mentre le placche di lisi nell'esempio dei batteri erano facili da vedere perché erano dei puntini trasparenti su un fondo opaco, in questo caso sono più complesse da contare: si vedono male. Dulbecco risolse questo problema aggiungendo alle cellule un colorante vitale: alla fine dell'infezione (dopo l'incubazione), toglie il terreno semiagarizzato (semisolido) e mette sulle cellule un colorante vitale (esso si chiama così perché può essere incorporato solo dalle cellule vive: quindi si procede con la colorazione di tutte le cellule vive del monostrato ad eccezione delle placche di lisi (poiché corrispondono a cellule morte a causa della replicazione virale). Avremo il fondo di cellule vive con un colore molto acceso sul quale si potranno visionare i puntini bianchi trasparenti che corrispondono alle placche di lisi. A questo punto si contano le placche di lisi e si calcola il titolo in unità formanti placca: quindi al numeratore il numero delle placche e al denominatore il volume utilizzato per effettuare l'infezione e oltre al volume aggiungiamo la diluizione alla quale ho contato quel numero di placche di lisi.

Un buon farmaco antivirale non deve avere effetto citolitico nelle cellule e che ha la capacità di ridurre del 50% le placche di lisi. Come si effettua l'esperimento? Faccio una titolazione, un'infezione e vedo il titolo (l'unità formanti placca).

### **IDENTIFICAZIONE DI UN VIRUS IN CULTURA**

Sul virus che si replica e non fa vedere l'effetto citopatico non possiamo dire che non si sta replicando, quindi dobbiamo trovare un modo per poter evidenziare un virus che ho messo in coltura. Per identificarlo si fa il test dell'immunofluorescenza.

### **IL TEST IMMUNOFLUORESCENZA**

L'anticorpo è una proteina prodotta dai linfociti B ed è una proteina che ha la capacità di legarsi con una molecola che si chiama antigene (è una qualsiasi molecola non nostra che noi riconosciamo come estranea: per esempio una proteina virale per noi è un antigene), se il nostro organismo incontra delle proteine virali i nostri linfociti B li riconoscono e producono un anticorpo. Perché si parla di proteine e non di lipidi o acidi nucleici? Perché il nostro organismo sa riconoscere molto bene le molecole che sono costituite da una ripetizione di molecole più complesse dal punto di vista strutturale, come appunto le proteine. I linfociti B sanno riconoscere un pezzo di proteina virale e nei suoi confronti sanno creare un anticorpo specifico. In laboratorio si sfrutta il legame specifico che si crea tra antigene ed anticorpo.

Quindi se non vedo l'effetto citopatico posso sempre andare a vedere se il virus ha prodotto le sue proteine all'interno delle cellule: se il virus produce delle proteine virali esse sono espresse e spesso esposte sulla superficie della cellula. Se prendiamo le cellule infettate e le facciamo aderire ad un vetrino portaoggetti, possiamo aggiungere l'anticorpo specifico per quel virus → ESEMPIO: voglio far crescere in coltura cellulare un virus come il citomegalovirus, prendo la coltura cellulare, metto dentro il citomegalovirus, aspetto qualche giorno che il virus si replichi, prendo le cellule infettate e le fisso sul vetrino e a quel punto prendo l'anticorpo anti-citomegalovirus e lo utilizzo per rilevare la presenza di quel virus: infatti se io ho il citomegalovirus nelle mie cellule ed esso ha espresso un antigene, l'anticorpo si andrà a legare all'antigene (sfrutto il legame antigene-anticorpo). L'anticorpo che utilizziamo viene fissato ad una molecola fluorescente che può emanare una fluorescenza se viene colpita da un raggio ultravioletto. Il vetrino, una volta preparato non si va ad osservare ad un microscopio ottico ma a fluorescenza che è fatto come quello ottico ma al posto

della lampadina che illumina il preparato ha una lampada ultravioletto: quando la lampada colpisce il vetrino eccita la sostanza fluorescente ed essa emette una colorazione. Ciò appena detto è un **sistema diretto**.

Nel **sistema indiretto** si parte sempre da una cellula nella quale sono espressi gli antigeni, mettiamo l'anticorpo che non è legato al fluorocromo. Si mette un anti-anticorpo marcato con il fluorocromo, esso riesce a riconoscere come antigene il primo anticorpo che è stato messo. (immaginiamo che un topo in seguito ad infezione da citomegalovirus sviluppi anticorpi specifici: se l'anticorpo di topo lo vado ad inoculare in un'altra specie animale come il coniglio, l'anticorpo del topo viene riconosciuto come non-self. Quindi se inoculo in un animale gli anticorpi prodotti da una specie diversa essa viene riconosciuta come estranea: ecco come riesco a produrre l'anticorpo anti-anticorpo. Se il primo anticorpo che utilizzo è un anticorpo di topo quando utilizzo un altro anticorpo esso si legherà a quello del topo.

Il difetto della coltivazione del virus in cellule sono i tempi, quindi ultimamente sono stati messi in funzione dei sistemi chiamati "sistemi di isolamento rapidi in coltura cellulare" / "shell vial".

Generalmente si inocula il virus e poi si aggiunge un terreno di coltura per le cellule che altrimenti andrebbero a morire, in questo caso quando metto il virus a contatto con le cellule faccio una centrifugazione delle provette/piastrine poiché lo stress meccanico della centrifugazione aiuta l'ingresso del virus all'interno della cellula. Successivamente si può usare l'immunofluorescenza: se utilizzo un anticorpo anti-proteina virale precoce sono in grado di rilevare la presenza del virus molto velocemente, senza aspettare che si replichi e che buchi le cellule; ma posso capire se il virus è presente o no perché vado a esaminare attraverso il microscopio a fluorescenza la presenza non di una proteina qualsiasi ma della più precoce.

## INDIVIDUARE GLI ANTIGENI VIRALI NEL MATERIALE PATOLOGICO

- **IMMUNOFLUORESCENZA**
- **SAGGI IMMUNOENZIMATICI** (per gli antigeni solubili) si ricercano gli antigeni su campioni biologici liquidi (terreni che trasportano tamponi, urine) nel quale possono essere presenti virus o batteri: in questo caso si effettua una procedura che si chiama **TEST ELISA**, è un test immunoenzimatico e che prevede l'utilizzo di anticorpi. Immaginiamo di dover fissare un virus che si trova in un liquido, e abbiamo bisogno di qualcosa che lo leghi in maniera specifica: un anticorpo. Abbiamo un pozzetto di una piastrina, sulla quale viene legato un anticorpo virus-specifico. Questo anticorpo viene chiamato anche anticorpo di cattura poiché viene immobilizzato sul fondo di una piastrina ed è un anticorpo virus-specifico che quando aggiungo il campione biologico può catturare il virus.

Se prima per vedere la reazione ottenuta utilizzavo un anticorpo marcato con un fluorocromo, nei test EIA sono chiamati immunoenzimatici perché ciò che utilizzo come sistema di rilevazione sono anticorpi non marcati con fluorocromo ma marcati con un enzima: quindi avrò l'anticorpo di cattura (il virus che si lega), successivamente aggiungo l'anticorpo specifico contro il virus, coniugato con l'enzima, poi si effettua un lavaggio della piastrina che porta via tutto ciò che non

si è legato (l'anticorpo con l'enzima non verrà rilasciato). **QUESTO E' IL TEST SANDWICH:** è come un panino dove i due anticorpi fanno il pane e la stellina quindi il virus e il prosciutto. Ho l'anticorpo, l'antigene e l'anticorpo a cui è legato un enzima. Successivamente aggiungo un substrato dove agisce l'enzima che modifica la struttura del substrato in modo tale che il substrato cambia colore: è un substrato cromogeno, ovvero è una molecola incolore che acquisisce la colorazione solo quando su di questa agisce l'enzima. Quindi avrò, in caso di presenza del virus, un colore (di solito giallo): avremo pozzetti colorati dove è presente l'antigene e dei pozzetti incolore dove l'antigene non è presente. Sulla base della densità ottica che restituisce il lettore ottico, possiamo stabilire se il test è positivo o meno.

Test per il covid è il classico test immunocromatografico e la lettura è sempre la stessa: una linea su C (controllo) che deve risultare positiva altrimenti il test non è valido e poi una linea su T (test) che si può presentare o meno a seconda della positività o negatività del campione. Anche qui avviene una colorazione, partiamo da una carta bibula che è interamente incolore. Nella finestra vengono depositate delle gocce di campione che va a fluire sulla carta bibula e gli anticorpi rilevatori che vi sono stati messi sono anticorpi anti-N (anti nucleoproteina), in questo si spostano e vanno a formare degli immunocomplessi. Quando il campione inizia a fluire si inizia a legare gli anticorpi iniziale (il virus si lega agli anticorpi messi all'inizio sulla carta bibula) e questi anticorpi vanno a legarsi a quelli che sono stati depositati lungo la linea: ci saranno anticorpi che formano l'immunocomplesso con l'antigene e si bloccano sulla linea t e poi ci sono anticorpi liberi che andranno a legarsi agli anti-anticorpi che sono sulla seconda striscia (vedremo sempre la striscia C perché ci saranno sempre abbastanza anticorpi liberi). Nella prima linea, sono ci sono gli anticorpi specifici per il virus si verrà a formare l'immunocomplesso solo se è presente il virus.

### **INDIVIDUAZIONE DEGLI ANTIGENI VIRALI MEDIANTE AGGLUTINAZIONE**

Se l'anticorpo lo leghiamo sulla superficie di particelle di lattice e quindi facciamo un complesso particella di lattice-anticorpo e poi aggiungiamo il virus (l'antigene che viene riconosciuto dall'anticorpo con il quale abbiamo legato le particelle di lattice), si forma l'agglutinazione, una sorta di reticolato facile da riconoscere perché le particelle sensibilizzate al lattice con gli anticorpi per quel particolare virus vanno a formare un deposito granuloso che si vede bene ad occhio nudo.

**VISIONE DEL TEST ELISA, su unistudium il link del pdf**

