

2.2 Possiamo contare il numero di virus?

Oggi vedremo alcune delle procedure utilizzate per determinare il numero di virus in un dato volume e stabilire così la loro concentrazione. Questo è chiamato "quantificazione". La quantificazione virale è essenziale in ricerca e sviluppo, per la preparazione di vaccini, o per conoscere la quantità di virus che aggiungiamo alla coltura del tessuto. Ma anche nella diagnosi, per valutare la risposta del paziente alla terapia antivirale.

Sono stati descritti vari metodi per quantificare il virus. valutano la loro infettività, o loro acido nucleico o le loro proteine, o contano anche direttamente il numero di particelle. In questo video ci accingiamo a parlare di alcuni di loro.

Uno dei metodi più comuni per la quantificazione del virus è il saggio della placca, soprattutto con i virus che lyse le cellule infette. Si compone di infettare le colture del tessuto organizzato in pozzi o in piastre, con diluizioni del virus del campione. Un primo passo è quello di rimuovere il medio di coltura per facilitare il contatto ottimo tra i virus e le cellule. Dopo una breve incubazione, le culture sono coperti con agar semi-solido. Si tratta di impedire che i virus si diffondono liberamente, così esso infetterà solo cellule adiacenti a quelle già infetti. Dopo pochi giorni vedremo aree circolari trasparenti in via di sviluppo, un segno che i virus sono lisate le cellule. Queste sono le cosiddette "placche". Il numero delle placche dipende il numero dei virions di inoculo, e si presume che ogni placca è stata costituita da una particella virale nel campione. Essi sono contati manualmente, solitamente con l'occhio nudo, essendo più facile vederli dopo la rimozione de l'agar semisolido e colorazione delle cellule, ad esempio, con la viola di cristallo. Il risultato è espresso in unità, formanti placca o PFU / ml. Per calcolare questo valore la cosa migliore consiste nell'aggiungere la sospensione virale in triplice copia e fare la media dei tre valori. Infine, abbiamo solo bisogno di dividere questo valore per la diluizione utilizzata e il volume aggiunto alla piastra, come si può vedere nell'esempio dell'immagine.

Vi domanderete come fare questo test se il virus non causano lisi, giusto? Il trucco consiste nell'utilizzare anticorpi specifici contro le proteine virali, contrassegnato con un colorante fluorescente. Questo tipo di test con reagenti etichettati staremo a vedere il video 4.2. È un metodo più veloce rispetto al saggio della placca, poiché i risultati possono essere visti tra 24 e 72 ore dopo l'infezione. Ma è più costoso, come avremo bisogno di altri reagenti.

Il TCID50 quantifica la quantità di virus necessaria per distruggere o causare qualsiasi altro tipo di effetto citopatico nel 50% delle cellule o colture infettate. È considerato più accurato rispetto ai metodi precedenti perché le concentrazioni che producono effetto al 100% possono variare ampiamente, e il valore del 50% è il più preciso. Viene applicata una formula matematica, che si discuterà in video 4.1, che è usato per molte altre misure, tali da determinare la dose infettante 50, ecc. Il valore di TCID50 differisce dal valore di analisi della placca, e statisticamente una unità TCID50 è equivalente a 0,69 PFU unità.

La concentrazione virale può anche essere quantificata determinare la quantità di proteine, totale e specifica, di un virus. Questo può essere fatto attraverso de tecniche di emoagglutinazione, il Western Blot, o test immunologici o ELISA. Parliamo di maggior parte di queste tecniche in altri video.

Alcuni laboratori di utilizzano altre tecniche, come la seguente.

Per quantificare il virus tramite flusso cytometry (di cui parleremo in video 4.4) vengono utilizzati due diversi fluorocromi: uno per contrassegnare i proteine virali e un altro per contrassegnare l'acido nucleico virale. PCR quantitativa, che vedremo il video 3.3, misura il RNA, entrambi associati ai virions e non associati. Infine, inoltre possiamo quantificare la quantità di virus utilizzando il microscopio elettronico a trasmissione che abbiamo appena visto nel video precedente.

Utilizzando uno qualsiasi di questi sistemi possiamo quantificare approssimativamente il numero di virioni per millilitro. Un altro concetto interessante è quello del MOI che significa molteplicità di infezione. Questo è il numero dei virions di essere aggiunto per cella durante l'infezione. Così, se aggiungiamo 1 milione di virus a 1 milione di cellule, il MOI è uno.

Come si può vedere, diverse strategie possono essere seguite per la quantificazione del virus. Qui abbiamo parlato di alcuni pochi, ma ci sono molti altri.

La ringrazio molto per la vostra attenzione.