

4.1 Protezione contro i virus studiati in un tubo (Seroneutralizzazione)

Benvenuto a un nuovo blocco di video di questo corso, in cui parleremo la diagnosi di infezione virale attraverso la risposta immunitaria che virus causano nell'ospite. Iniziamo vedendo come valutare il ruolo protettivo di anticorpi. Questa operazione viene eseguita utilizzando il test di siero neutralizzazione o neutralizzazione virale.

Come sapete, per un virus di infettare una cellula riconoscimento deve avvenire tra il recettore cellulare e alcune molecole o epitopi sulla superficie del virus. Bene, alcuni anticorpi possono circondano queste molecole virali e impedire che sono riconosciuti dal recettore. Questi anticorpi sono chiamati anticorpi neutralizzanti e sono molto importanti perché effettivamente bloccare il progresso dell'infezione, così sono protettivi. Simile a tutti gli anticorpi, essi sono molto specifici, e se le molecole virali variano, essi non li riconosce e cessano di essere protettivo.

La prova di neutralizzazione è considerata la tecnica che meglio rispecchia la correlazione in vivo e in vitro tra virus e anticorpi. Si tratta di una tecnica quantitativa così faremo diluizioni del siero del problema e aggiungiamo una quantità costante di virus. Dopo incubazione per consentire l'antigene ed anticorpo di reagire, le miscele vengono aggiunti a un sistema suscettibile per vedere l'infettività residua del virus. Sistemi sensibili possono essere animali da esperimento, uova con embrione o cella, dove non neutralizzato virus producono un effetto riconoscibile, come la morte, lesioni, l'effetto citopatico, emoagglutinazione, formazione di sincizi, ecc.

Ci sono diversi modi per preparare diluizioni del siero, ma differiscono solo nelle proporzioni. Qui ci accingiamo a fare diluizioni seriali. Abbiamo bisogno di preparare una batteria di 10 tubi, a cui aggiungere 250 μ l di terreno di coltura. Poi aggiungiamo 250 μ l di siero al primo tubo, abbiamo mescolare bene e passare 250 μ l della miscela del tubo seguente, e così via. Ogni volta che andiamo da un tubo di quello successivo abbiamo diluire la quantità di anticorpi presenti nel siero di metà. Vale a dire nel primo tubo la diluizione è 1:2, nel successivo 1:4, nel prossimo 1:8, e così tutto il senso al tubo 10 dove sarà 1:1024. Dobbiamo seguire la stessa procedura con i sieri di controllo positivi e negativi. Successivamente, aggiungere 250 μ l di appropriato concentrazione di virus nelle 10 tubi (che ci porta indietro a diluire da metà della quantità di anticorpi), abbiamo agitare ed incubare per 60 minuti a 37°C per consentire l'eventuale neutralizzazione degli anticorpi nel siero di reagire con gli epitopi del virus che sono riconosciuti dalle cellule del recettore.

Come ho detto prima, neutralizzazione può essere testato in animali da esperimento, uova o nella coltura del tessuto. Qui ci accingiamo a farlo nella coltura del tessuto. Trasferire 100 μ l di ciascuna miscela di siero-virus da quadruplicato pozzetti di una piastra a 96 pozzetti in cui abbiamo coltivato le cellule suscettibili al virus e noi Incubare piastre 2 o 3 giorni o il tempo necessario per osservare la effetto citopatico con il microscopio. Se ci sono anticorpi neutralizzanti nel siero non ci sarà alcun effetto. Naturalmente, dobbiamo confrontare i risultati del siero problema con i controlli positivi e negativi.

Questo metodo quantitativo ci permette di determinare il cosiddetto titolo anticorpale, in questo caso di neutralizzare il titolo di anticorpi, che è definito come il denominatore della diluizione più alta in cui c'è completa neutralizzazione dell'effetto citopatico nel 50% dei pozzi. Per determinare questo applichiamo una formula statistica. Così, dopo aver inserito i dati nella formula il risultato indica quanto abbiamo bisogno di diluire il siero per ottenere una protezione nel 50% dei pozzi, animali, o uova, a seconda del sistema che abbiamo usato.

Questa formula è molto utile, ed esso è frequentemente usato per trovare la concentrazione di virus che produce morte o infezione nel 50% degli animali (dose letale 50, o infettiva dose 50, rispettivamente), nel 50% dei pozzi (che è il TCID 50), ecc.

Come si può vedere, la sieroneutralizzazione o test de neutralizzazione virale è un po' più lento e laborioso che le tecniche che vedremo nel seguente video, ma è molto sensibile e specifico ed è considerato un "gold standard" test per qualsiasi titolazione sierologica.

La ringrazio molto per la vostra attenzione.