

4.2 La tecnica più usata per la diagnosi virale

Benvenuti. In diverse tecniche sierologiche la quantità di anticorpi può essere quantificato più veloce nel test di neutralizzazione virale Abbiamo visto nel video precedente, anche se non possiamo valutare la protezione che hanno. Queste tecniche hanno in comune che uno dei due reagenti, l'antigene o, più frequentemente, l'anticorpo, sono contrassegnati con una molecola, che può essere fluorescente, un isotopo radioattivo, un metallo pesante, o un enzima. A seconda il marcatore Essi sono chiamati in un modo o in altro, anche se il principio è sempre lo stesso. In questo video vedremo i test che utilizzano enzimi come indicatori, in particolare uno chiamato ELISA, e non andate a pensare che è perché qualcuno con quel nome inventato.

In tutti i test che utilizzano marcatori, prima dobbiamo assorbire o si legano gli anticorpi o antigeni una superficie che li detiene, chiamato in fase solida, e il processo di adsorbimento o fissazione viene chiamato "rivestimento". Nel caso di ELISA, la fase solida può essere una lastra di polistirolo, che in genere ha 96 pozzetti a fondo piatto. Dopo aver rivestito e lavato i pozzi, il campione da testare viene aggiunto in duplice copia, cioè in due pozzi. Il campione può essere antigene virale, se la piastra è rivestita con gli anticorpi, o siero se è rivestito con antigene virale. Noi incubare a temperatura adeguata per favorire l'unione dell'antigene-anticorpo, solitamente a 37°C. Laviamo con cura ma accuratamente, per rimuovere i reagenti che non vengono mantenute in fase solida. Continuiamo l'aggiunta di reagenti, incubazione e lavaggio come molte volte come richiesto dal protocollo di ogni tipo particolare di ELISA. Il penultimo reagente è solitamente il "coniugato", quali sono gli anticorpi legati ad un enzima; Ciò significa che essi sono "etichettati", Dopo un altro incubazione e lavaggio, aggiungiamo il substrato dell'enzima.

Gli enzimi più comunemente usati sono perossidasi, fosfatasi alcalina e luciferasi. In tutti i casi produrrà una reazione colorata o incolore, cui intensità dipende dalla quantità dell'enzima presente nel pozzo. Quantifichiamo questa intensità con lo strumento corrispondente.

Come sempre, non dobbiamo dimenticare di includere i controlli positivi e negativo. Vediamo alcuni tipi di ELISA.

ELISA indiretto

Nell'ELISA indiretto rivestiamo il pozzo con l'antigene, aggiungiamo il siero in esame, vale a dire, campione, e il coniugato che in questo caso sono gli anticorpi anti-immunoglobuline della stessa specie come il campione, marcati con l'enzima. Questo anticorpo è chiamato anticorpo secondario. Si sa che si deve incubare e lavare tra ogni fase. Se sono presenti anticorpi specifici, colore si svilupperà con l'aggiunta del substrato dell'enzima.

ELISA competitivo

ELISA competitivo è una tecnica ELISA che può essere adattato per rilevare gli anticorpi o antigeni. Prima vediamo come è fatto per quantificare gli anticorpi. Il primo passo consiste nell'aggiungere il siero problema per una quantità costante di virus, che è l'antigene. Dopo l'incubazione, la miscela viene aggiunto per la pozzetti sensibilizzati con anticorpi. Se c'erano molti anticorpi nel campione ci sarà poco libero virus per legare gli anticorpi nel pozzo. L'ultimo passaggio consiste nell'aggiungere un coniugato anti-virus, e ovviamente, il substrato dell'enzima. Nel caso di un campione positivo con alto titolo, ci sarà poco colore segnale ben nel campione. Ecco perché si chiama competitivo.

Potremmo anche fare questo test in modo diverso, rivestimento con l'antigene, anziché con gli anticorpi. In questo caso Ci piacerebbe aggiungere contemporaneamente il siero campione e un

coniugato anti-virus con enzima. Entrambi i tipi di anticorpi competono per l'associazione del virus, quindi, se la titolazione del siero del test è alta, non c'è spazio per il coniugato e dopo il lavaggio e l'aggiunta del substrato non ci coloreranno sviluppo, o questo sarà molto somnesso, come possiamo vedere in questa immagine.

Sono sicuro che ora sai come apportare le modifiche appropriate per rilevare l'antigene virale invece gli anticorpi del siero.

sandwich ELISA

L'ultimo tipo di ELISA che saremo parlando è sandwich ELISA. I pozzi sono coperti con gli anticorpi e il campione è il virus del problema. Se corrisponde con gli anticorpi, esso rimane attaccato al pozzo. Viene rilevato da un coniugato anti-virus: avendo più colore più nei pozzi nel quale il virus più c'è.

Prima di terminare questo video, è conveniente per voi di conoscere che ci sono sistemi che consentono di differenziare animali vaccinati dagli animali infetti, che è molto importante in medicina veterinaria. Per fare questo, il vaccino deve essere progettato in modo che non contiene tutti gli antigeni virali, anche se, naturalmente, deve contenere quelle che stimolano una risposta neutralizzante che abbiamo visto nel video precedente. Questi sistemi sono chiamati DIVA, e ci avvaliamo di due diversi tipi di ELISA. Interrompere il video per vedere la loro ragion d'essere.

Grazie per la vostra attenzione!