

4.3 Valutazione dell'immunità cellulare in laboratorio

Ciao. Anche se non si tratta di un problema strettamente di virologia, Esaminiamo brevemente il complesso processo attraverso il quale le risposte immunitarie acquisite vengono generate. Quando c'è un'infezione virale, T-linfociti, attivato dopo il riconoscimento dell'antigene virale nella membrana delle cellule, proliferano e si differenziano in due popolazioni differenti: I linfociti T helper o Th, che cooperano con altre cellule così che il progresso della risposta immunitaria, e linfociti T citotossici o Tc, che uccidono le cellule infette. Come questi processi, linfociti secernono molecole, che sono chiamate citochine, che servono come comunicazione tra le cellule del sistema immunitario e richiedono loro di rispondere o di fare la loro funzione.

Beh, per verificare se la risposta cellulare al virus è corretta diversi punti possono essere analizzati come la moltiplicazione delle cellule dopo stimolazione antigenica; la distruzione delle cellule infette, da un test che valuta la capacità di citotossicità dei linfociti Tc; o la secrezione di citochine, ad esempio utilizzando il test ELISA che abbiamo visto nel video precedente. In questo video vedremo come determinare la moltiplicazione dei linfociti, o malattia linfoproliferativa.

Malattia linfoproliferativa è una tecnica che misura la proliferazione dei linfociti T-helper in risposta agli antigeni virali presentato da antigene-presentare le cellule. Questo accade solo se il paziente ha stati precedentemente esposti al virus, cioè, se ha recuperato da un'infezione o se egli è stato vaccinato, sempre con quel virus stesso.

La prima cosa è isolare i linfociti. Il modo più semplice ottenere sono quelli dal sangue periferico, raccolto con anticoagulante. Sangue è diluito con terreno di coltura e posizionati con cura sulla parte superiore del una sostanza densa chiamata Ficoll. Dopo la filatura, eritrociti e granulociti penetrano il Ficoll e si depositano sul fondo del tubo, ma i linfociti e alcuni monociti soggiornano presso l'interfaccia tra il Medio di Ficoll e plasma e cultura. Li raccogliamo con attenzione e contarli sotto il microscopio. Chiamiamo queste cellule PBMC.

Abbiamo messo 100.000 PBMCs in ciascuna bene di una piastra a 96 pozzetti e aggiungere una sospensione di virus o antigene virale in ciascun pozzetto, e ci permette di incubare a 37° C per 4-6 giorni. Durante questo tempo, cellule presentanti l'antigene del virus di processo e presentarlo ai linfociti T. Se il paziente è stato precedentemente esposto al virus stesso, Ci saranno T-linfociti che riconoscono il virus e proliferano.

Per determinare quanto si sono moltiplicate, aggiungiamo la timidina, che sai che è un nucleotide che fa parte del DNA, etichettato con trizio, che è l'idrogeno radioattivo, e noi Incubare 6 ore in più. Questa timidina contenente trizio è incorporata nel DNA delle cellule nuove, così, quando raccogliamo le cellule e misuriamo la quantità di radioattività in un contatore a scintillazione, indica il grado di moltiplicazione delle cellule. Come sempre, dobbiamo prendere precauzioni, come fare ogni campione in triplice copia e aggiungere PBMCs di un individuo normale non infetti, così come i PBMCs del paziente senza stimolare con il virus, per essere utilizzato come controllo.

I risultati possono essere espressi come indice di stimolazione, quale è il rapporto tra la radioattività misurata nelle colture stimolate e i controlli senza stimolare dallo stesso individuo.

La proliferazione dei linfociti possono essere valutati anche da kit che non richiedono nessuna radioattività. Misurano la quantità di ATP citoplasmatica in cellule metabolicamente attive. Di conseguenza, maggiore è la quantità di cellule, più alti i livelli di ATP. ATP è usato in una reazione di luminescenza che può essere misurata con un luminometro.

Come potete vedere ci sono diverse tecniche per rilevare il sistema immunitario cellulare risposta dopo l'infezione virale. Ho citato solo alcuni. Ci sono molte altre e molti altri sono in fase di sviluppo. Godetevi la loro scoperta.

Grazie per la vostra attenzione.