

Diagnosi di laboratorio

Diagnosi Indiretta

Determinazione della presenza di anticorpi specifici contro un agente eziologico.

anticorpi delle classi IgG; IgM o IgA

- **Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**
- **ImmunoFluorescenza Indiretta (IIF)**
- Neutralizzazione
- Western blot

Raccolta dei campioni

Fattori critici nella raccolta di un campione biologico per la diagnosi microbiologica:

- **Tempismo nell'effettuare il prelievo**
 - Fase acuta di infezione
- **Selezione il campione più adeguato**
 - Rischio di non poter effettuare la ricerca richiesta
- **Effettuare il prelievo in maniera accurata ed idonea**
 - Rischio di fornire un risultato falso negativo

- **Contenitore adeguato**
 - Contenitore sterile per ricerche colturali, presenza o meno di un liquido di trasporto...
- **Conservazione ed invio al laboratorio del campione**
 - Temperatura
 - Tempistica

Tipo di campione	Tipo di Indagine	Temperatura di conservazione
Tampone nasale	Virologica (Influenza, enterovirus)	2-8 °C; Indefinito: -80 °C
Tampone nasale	Batteriologico	R.T.: max. 48h
Liquor	Virologica (VZV; HSV; TOSV; PIC)	2-8 °C.: max. 48h Indefinito: -80 °C
Liquor	Batteriologico	R.T.: max. 30 min.
Tampone faringeo	Virus respiratori (ex. Virus respiratorio sinciziale, Influenza)	2-8 °C: Indefinito: -80 °C
Tampone faringeo	Batteriologico	R.T.: max. 48h
Siero	Sierologica	R.T.: poche ore 2-8 °C: fino a 7 gg Indefinito: -20 °C
Sangue citratato	Virologica (CMV; EBV; ADV)	2-8 °C: max 24-48h Indefinito: -80 °C
Urina	Batteriologico (urinocultura)	2-8 °C: max 12-24h
Urina	Virologica (RV; CMV)	2-8 °C Indefinito: -80 °C

METODI DIRETTI IN DIAGNOSTICA VIROLOGICA

Isolamento virale

I virus sono parassiti intracellulari obbligati: non possono moltiplicarsi all'esterno di una cellula vivente.

Isolamento virale: PRO

- Permette di isolare, tipizzare e conservare il virus
- Importante per CMV: diagnosi in bambini da madri con infezione in atto od immunodeficienti

Isolamento virale: CONTRO

- Richiede lunghi tempi di esecuzione
- Non è applicabile a tutti i virus (HPV, EBV, HBV, HCV, rotavirus)
- Poco sensibile (soprattutto in caso di infezioni paucivirali) e specifico

ANIMALI DA LABORATORIO

Si utilizzano cavie, topi, conogli... di poche settimane di vita.

Inoculo del campione per via intraperitoneale o intracranio.

Raccolta di organi o tessuti e indagini per l'identificazione del virus.

Attualmente utilizzati solo per ricerca.

UOVA EMBRIONATE

Ancora usate per l'isolamento e la crescita del virus influenzale.

COLTURE CELLULARI

Attualmente utilizzate al posto degli animali.

- Cellule di origine animale o umane isolate da:
 - Tessuti sani: cellule primarie
 - Tessuti patologici: cellule di linea
- Tecnica maggiormente usata per la coltivazione virale
- Formazione di placche: aree localizzate di lisi e distruzione cellulare
- Comparsa di caratteristici effetti citopatici (CPE)

Colture cellulari “primarie”

- Digestione enzimatica (tripsina, collagenasi) di organi/tessuti
- Crescono in monostrato (cellule epiteliali) od in sospensione (linfociti)
- Vita limitata (colture a termine)
- Esempi: rene di scimmia (paramyxovirus, enterovirus, adenovirus)

Linee cellulari “continue” (a vita illimitata)

- Cellule “trasformate” (cellule tumorali) isolate da tumori primari o immortalizzate in laboratorio
- Possono essere mantenute indefinitamente
- Esempi: cellule HeLa da cancro della cervice uterina (Henrietta Lax, 1951)

REQUISITI PER L' ISOLAMENTO VIRALE

- **Raccolta tempestiva del campione clinico:**

- Stabilire la tempistica dell' esordio dell' infezione: è troppo tardi?

PRELIEVO IN FASE ACUTA

- **Adeguatezza campione clinico**

- Stabilire quale/i virus si vogliono ricercare in base all' anamnesi.
- Effettuare il prelievo nel sito in cui il virus si replica o viene eliminato
- Esecuzione corretta/accurata del prelievo.

- **Trasporto e conservazione adeguata**

- Campioni mantenuti a temperatura appropriata (in base al tipo di campione).
- Processati tempestivamente.

- **Disponibilità di colture cellulari**

- Cellule suscettibili e sensibili: la cellula deve esprimere i recettori adeguati per consentire al virus di infettarle.
- Permissive: la cellula permette la replicazione del virus (CPE).

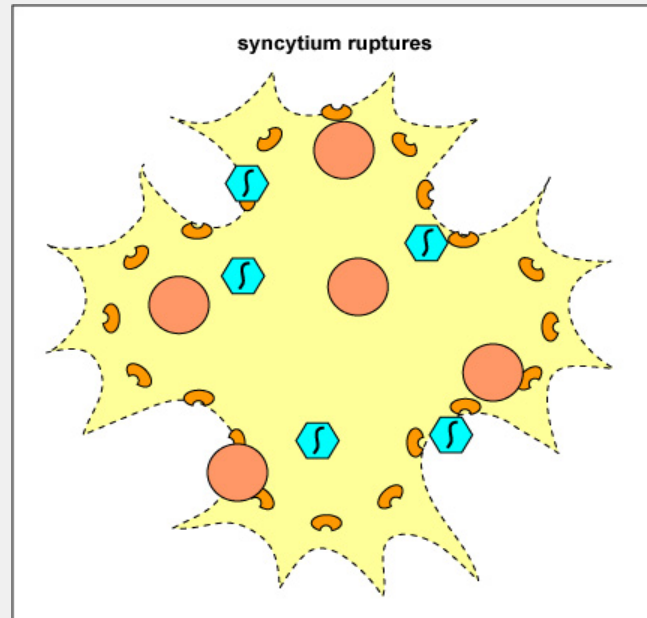
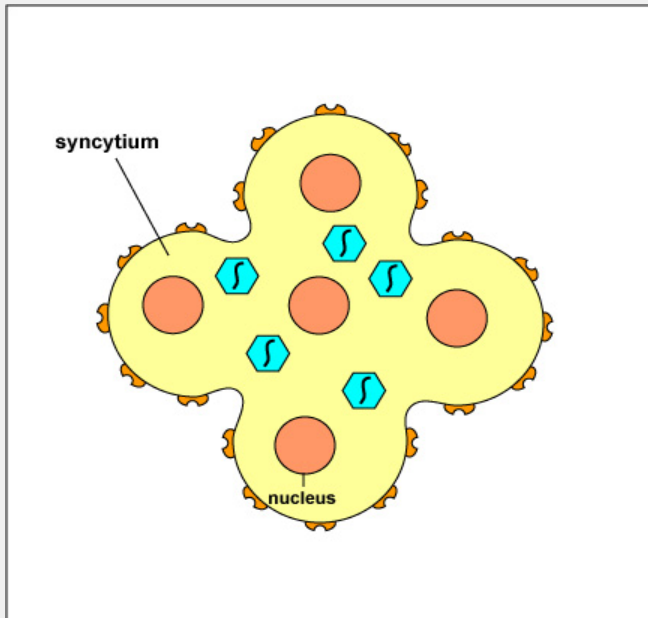
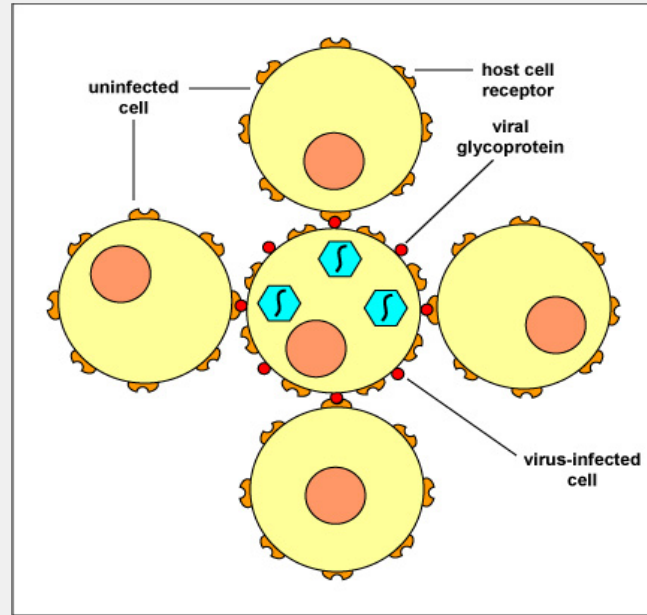
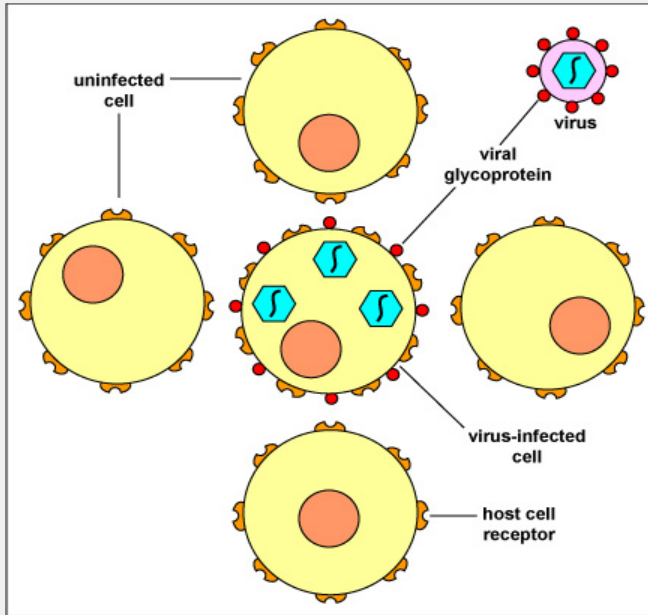
EFFETTO CITOPATICO (CPE)

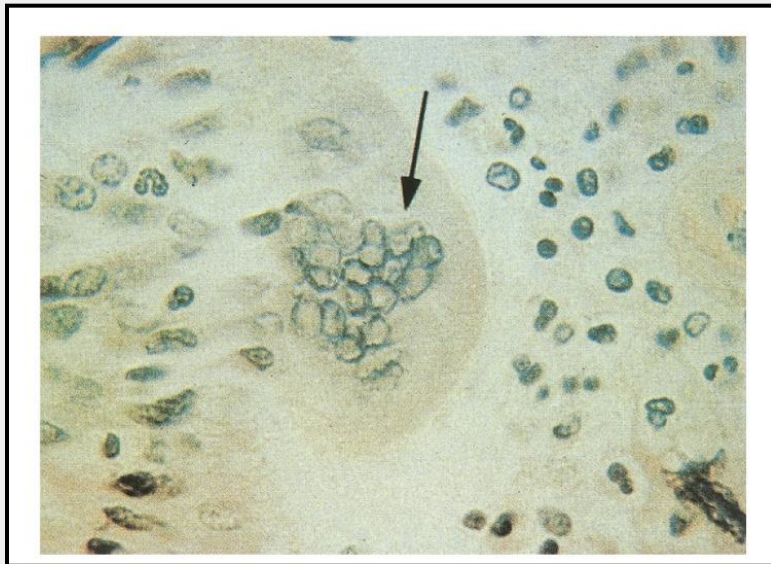
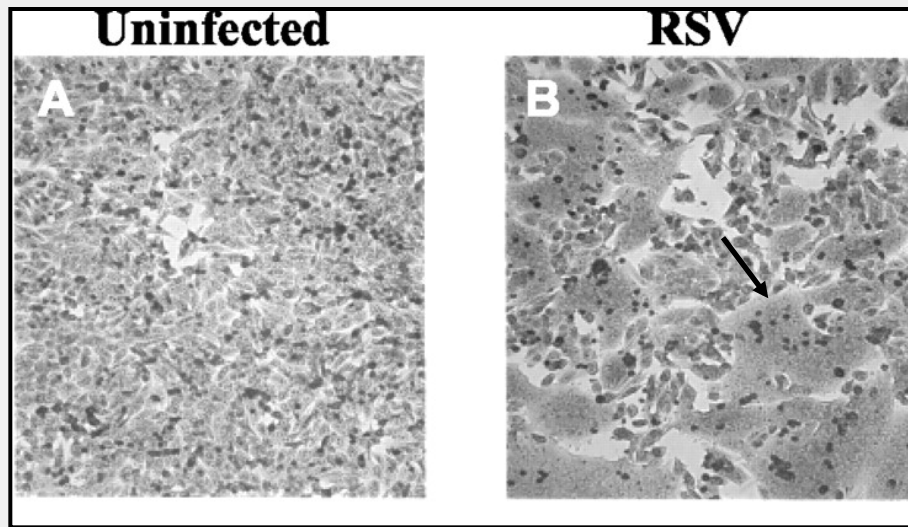
L'insieme di **ALTERAZIONI MORFOLOGICHE** e **BIOCHIMICHE** indotte nella cellula infettata.

Sono caratteristiche per i diversi virus e sono utili nel laboratorio diagnostico.

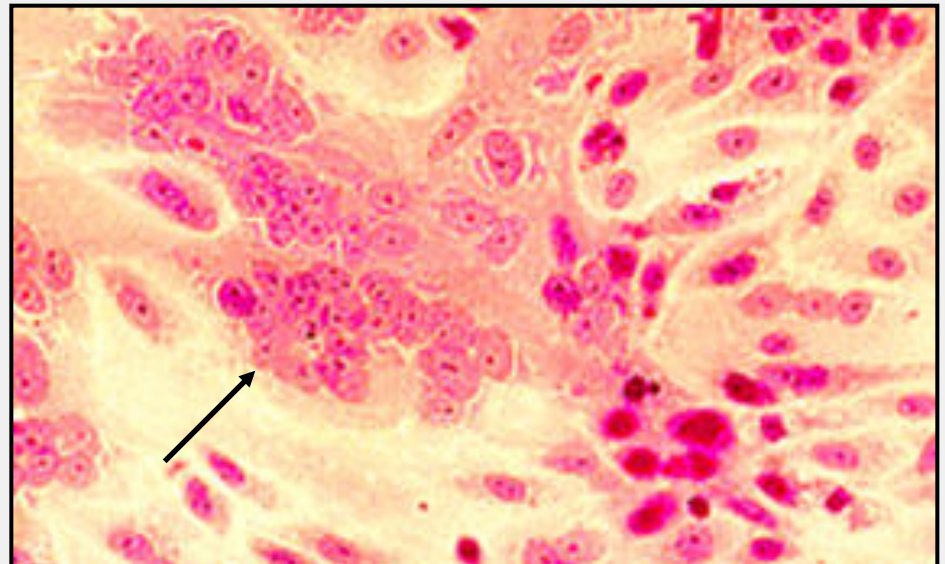
- Formazione di cellule giganti multi-nucleate (**SINCIZI**)
- **ARROTONDAMENTO** delle cellule con successiva lisi
- Formazione di **INCLUSIONI** nucleari e/o citoplasmatiche
- **BLOCCO** dei processi cellulari (shut off)
- **APOPTOSI** o morte cellulare programmata

SINCIZI





Morbillo

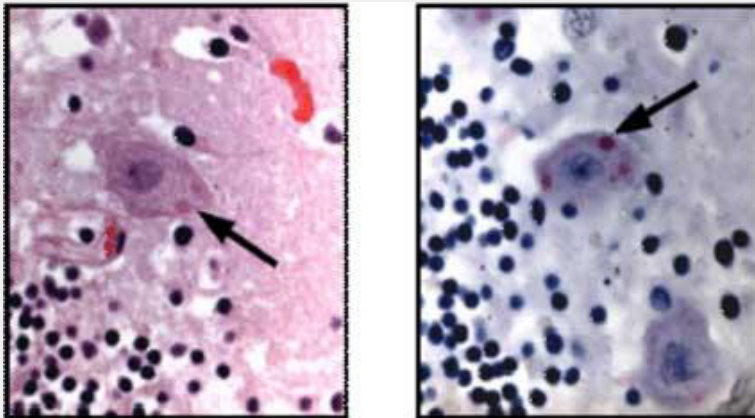


Herpes simplex tipo 1

CORPI DI INCLUSIONE

Cambiamenti istopatologici delle cellule causati direttamente dall'azione di componenti virali o modificazioni delle strutture cellulari in seguito all'infezione.

Virus della rabbia



Corpi del negri

CMV

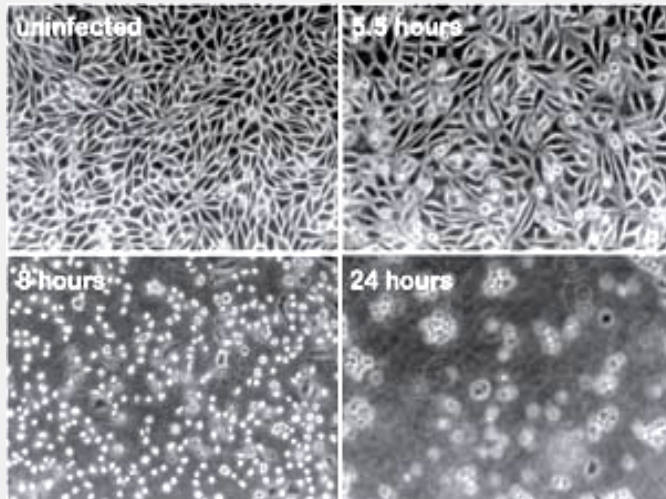


Corpi di inclusione ad
"occhio di gufo"

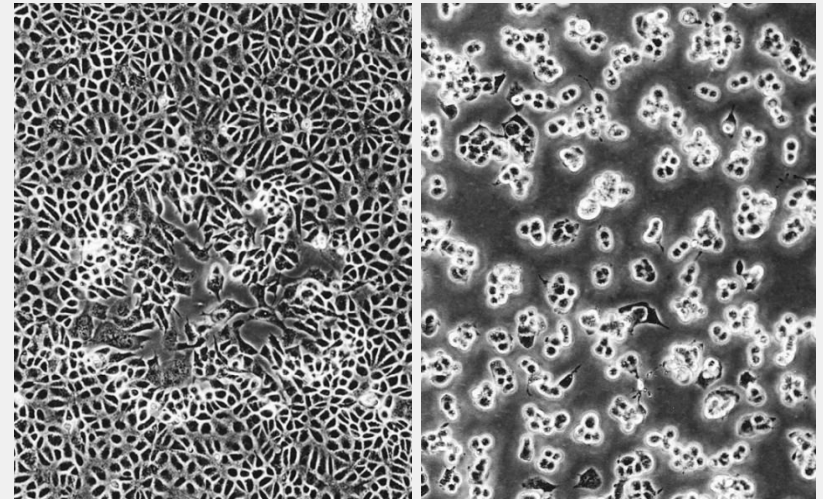
Effetto citolitico

Lisi delle cellule causati direttamente dalla replicazione del virus e dalla sua fuoriuscita dalla cellula ospite.

Poliovirus

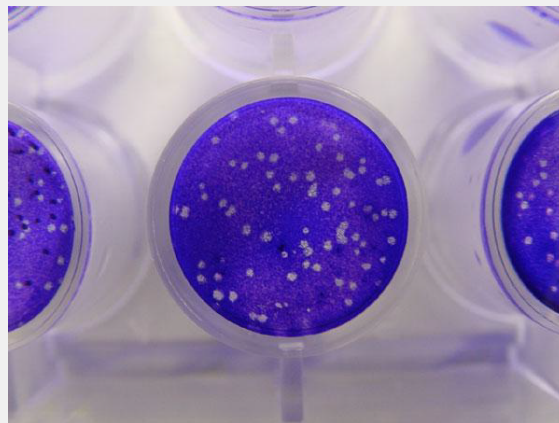


Vaiolo



CPE precoce

CPE tardivo



CARATTERIZZAZIONE DELL' ISOLATO

Identificazione molecolare dell' isolato virale:

- Estrazione dell' acido nucleico dal raccolto di coltura
- PCR/RT-PCR con primers specifici
- Sequenziamento

Identificazione sierologica dell' isolato virale :

- Neutralizzazione (NT)
- Raccolta di cellule infettate →
Immunofluorescenza (IFA) con sieri specifici

- Tempi lunghi: settimane per crescita del virus e caratterizzazione. Non conforme ai requisiti di diagnosi tempestiva.
- Bassa sensibilità: carica virale nel campione, modalità e sito di prelievo, condizioni di trasporto/conservazione del campione.
- Contaminazione batterica: prelievo non è perfettamente sterile o presenza di batteri commensali.
- Tossicità: sostanze presenti nel campione possono provocare effetto tossico sulle colture cellulari (emoglobina).

ISOLAMENTO

Poco usato per la diagnosi di routine.

Molto usato per la ricerca.

METODI INDIRECTI IN DIAGNOSTICA VIROLOGICA

Diagnosi sierologica

Risposta dell' organismo all' esposizione di proteine virali.

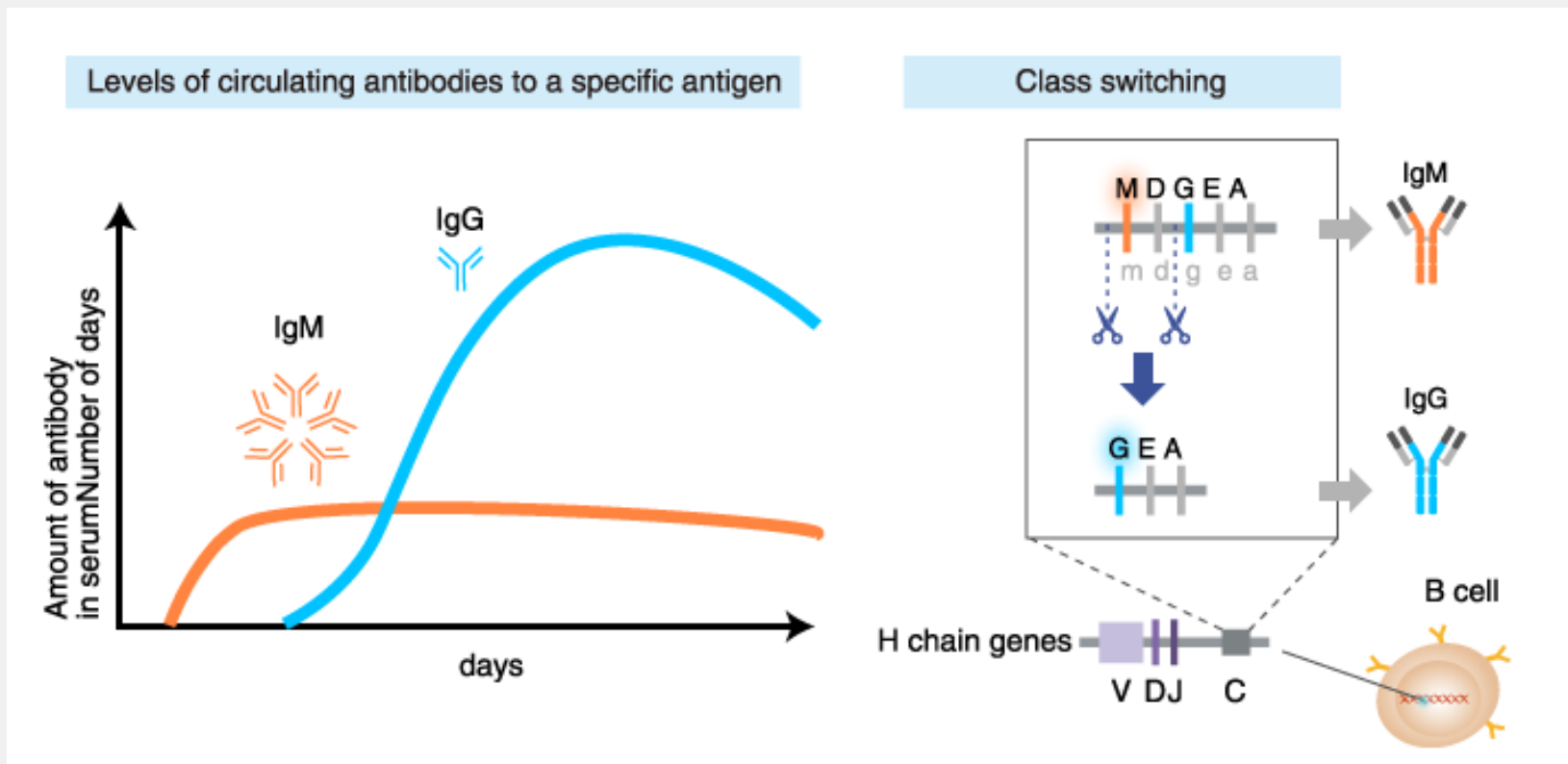
Nel corso dell' infezione virale vengono prodotte diverse tipologie di anticorpi:

- **IgM** : FASE ACUTA indice di infezione in atto o molto recente. Si manifestano QUASI sempre nella “prima infezione” di soggetto non immune. Scompaiono dopo alcune settimane.
 - NB: virus che danno latenza (ex. Herpetici) posso dare nuovamente comparsa di IgM in caso di **RI-ATTIVAZIONE**
- **IgG**: prodotte più tardivamente (FASE CONVALESCENTE) ma persistono per anni. Sono prontamente secrete a seguito di possibili successivi contatti con il virus specifico.
- **IgA**: secretorie mucosali. Svolgono un importante ruolo di “barriera” alla penetrazione virale delle mucose (ex. Virus respiratori).

La diagnosi sierologica si basa essenzialmente sulla ricerca di IgM o alternativamente **Siero-conversione**: “switch” da IgM a IgG e aumento (≥ 4 -fold) del titolo anticorpale indice di infezione primaria in atto.

Necessità di due campioni prelevati a tempi diversi:

1. Siero in fase acuta (1° prelievo): solo IgM; IgM e IgG
2. siero in fase convalescente (2° siero): IgG; IgG e IgM (bassissimi valori)



La diagnosi sierologica si basa essenzialmente sulla ricerca di IgM/IgA e IgG.

- Infezioni subcliniche o lievi non sempre danno risposte umorali **rilevabili**.
- Virus fra loro correlati (stesso genere) possono dare **reazioni crociate** (es Dengue virus, Zika virus), dando risultati dubbi.
- Pazienti **immuno-compromessi** spesso hanno risposta immunitaria alle infezioni assente o ridotta.
- Pazienti con **malattie autoimmuni** possono dare falsi positivi.

SAGGI FUNZIONALI

Evidenziazione di specifiche attività derivanti dalla formazione dell' immunocomplesso:

- Saggio di neutralizzazione: Abs specifici neutralizzano un caratteristico effetto citopatico (CPE).
- Reazione di inibizione dell' emoagglutinazione: Abs specifici in grado di inibire l' attività emoagglutinante di alcuni virus (influenza, parainfluenza, morbillo).
- Reazione di fissazione del Complemento: in presenza di Abs specifici si forma un immunocomplesso che lega il Complemento. In queste condizioni, il Complemento non può lisare gli eritrociti (sistema di rilevazione della formazione dell' immunocomplesso: Ag + eritrociti).

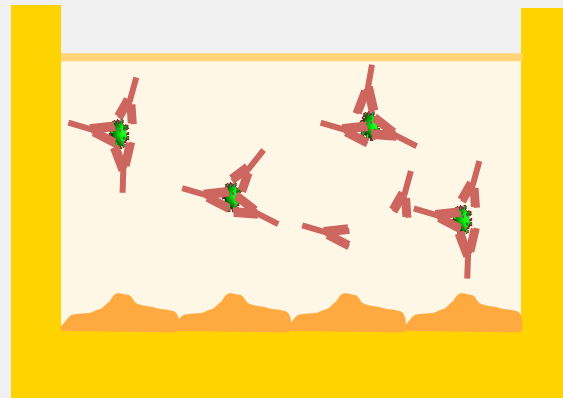
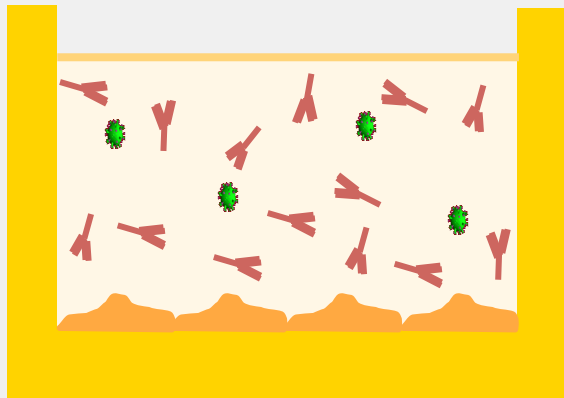
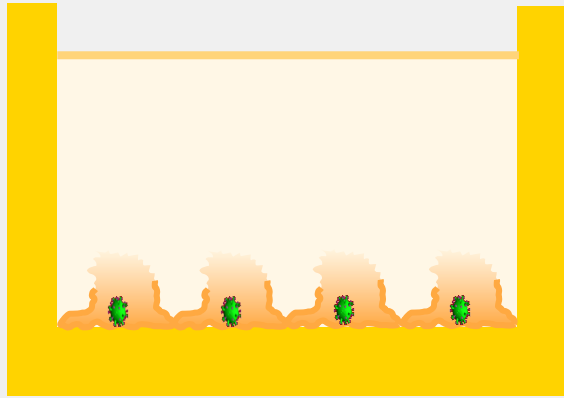
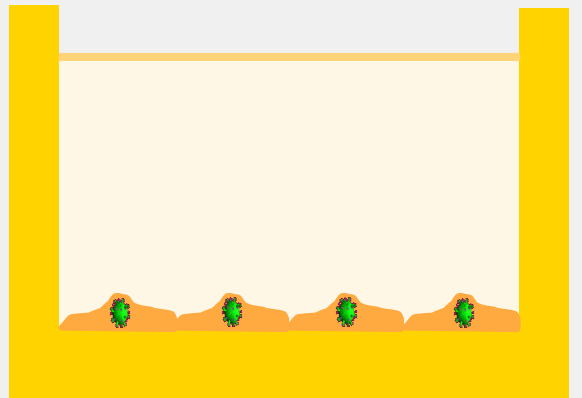
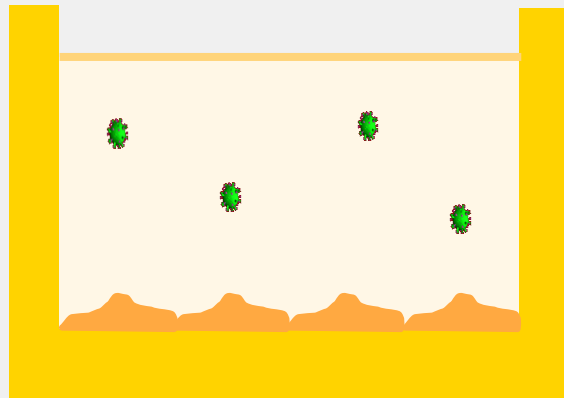
1. NEUTRALIZZAZIONE

Basato sulla presenza o meno di IgG specifiche

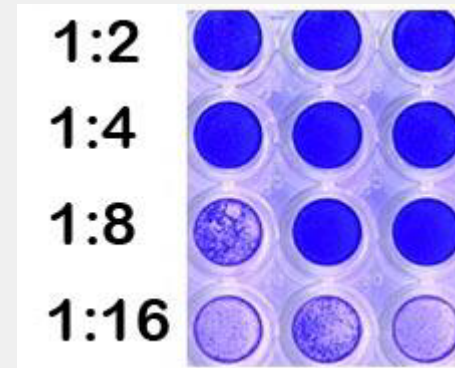
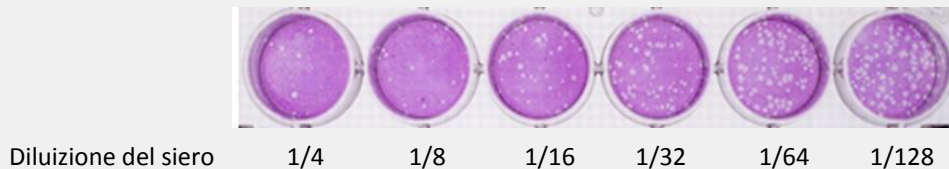
Totali: determinazione dell'esposizione ad un agente infettivo

Neutralizzanti: il virus, **neutralizzato dagli anticorpi**, perde la capacità di infettare colture cellulari. **NO CPE!**

- Valutazione dello sviluppo di una risposta anticorpale efficace in seguito a vaccinazione (es. anti-polio).
- Valutare la necessità di attuare un trial vaccinale (es. adozioni).



1. Virus pre-trattato con diluizioni seriali del campione.
2. Contatto con colture cellulari (in quadruplicato).
3. Osservazione della comparsa di CPE.
4. Determinazione del titolo neutralizzante: diluizione più alta del campione alla quale si osserva l' inibizione di CPE in 50% delle colture cellulari.



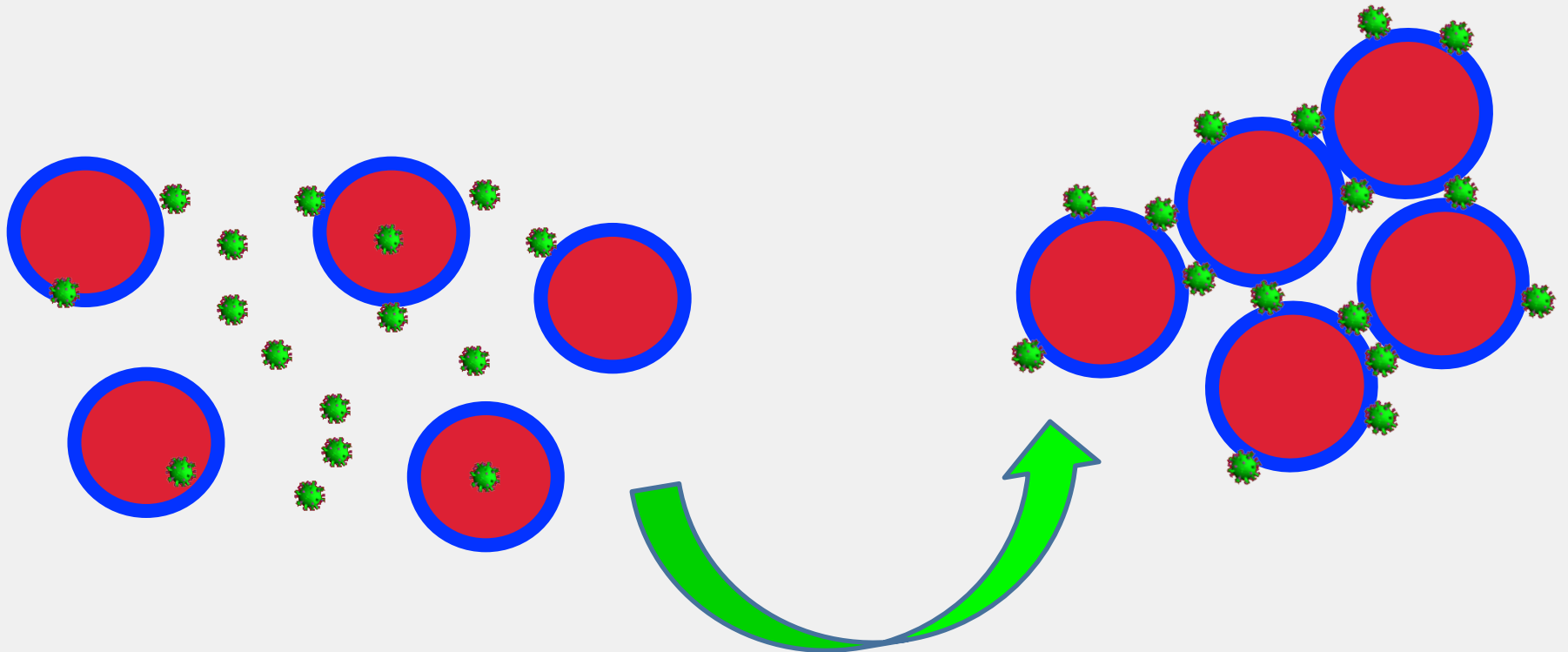
TITOLO PROTETTIVO $\geq 1/4$

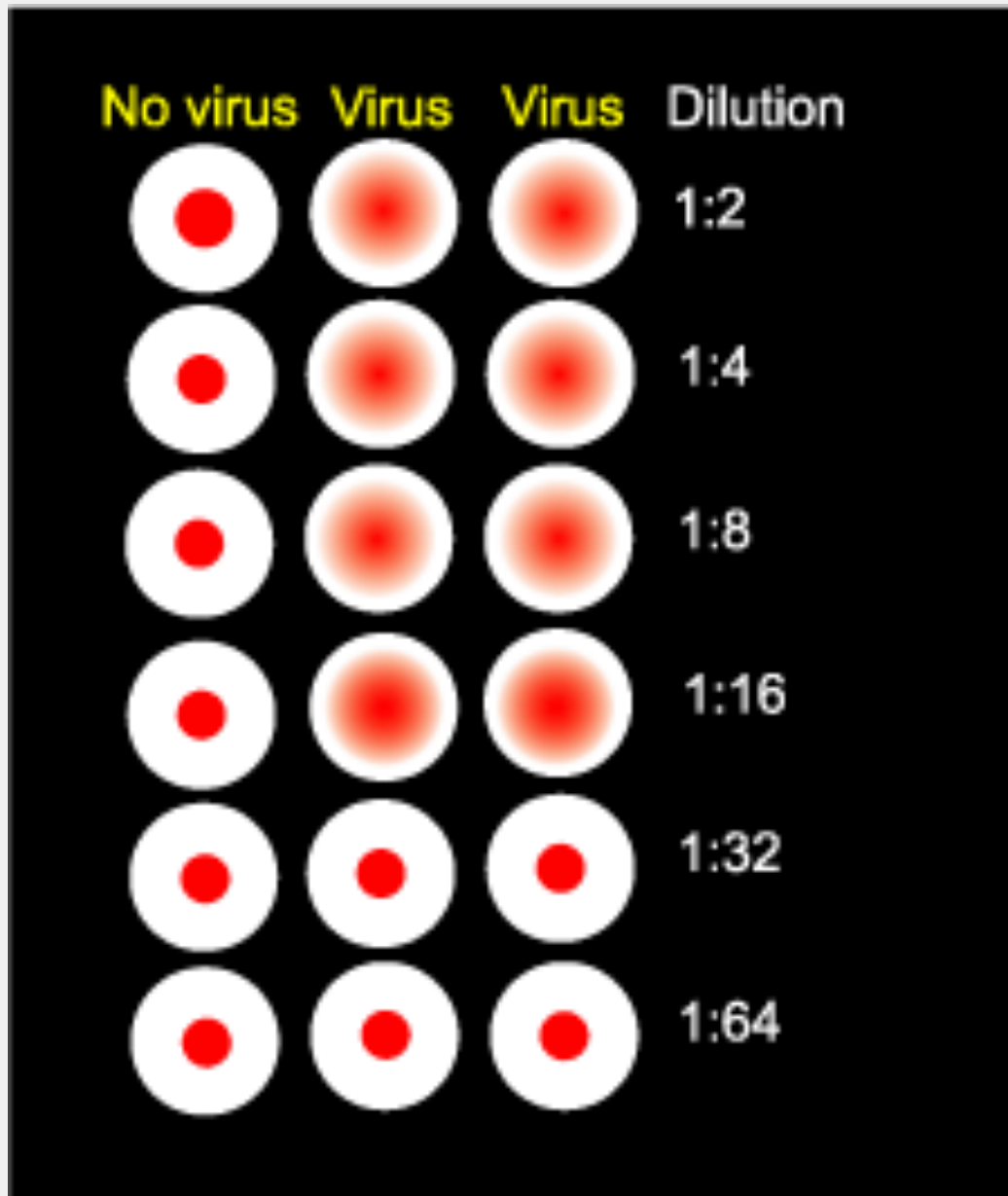
EMOAGGLUTINAZIONE

Identificazione di un virus in un campione

Sfrutta eritrociti come sistema di rilevazione

Il virus lega le emazie e le mantiene in sospensione (agglutinazione)

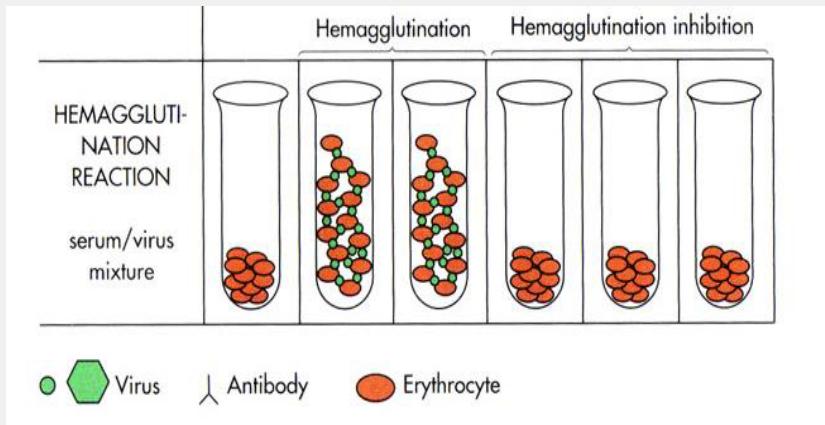
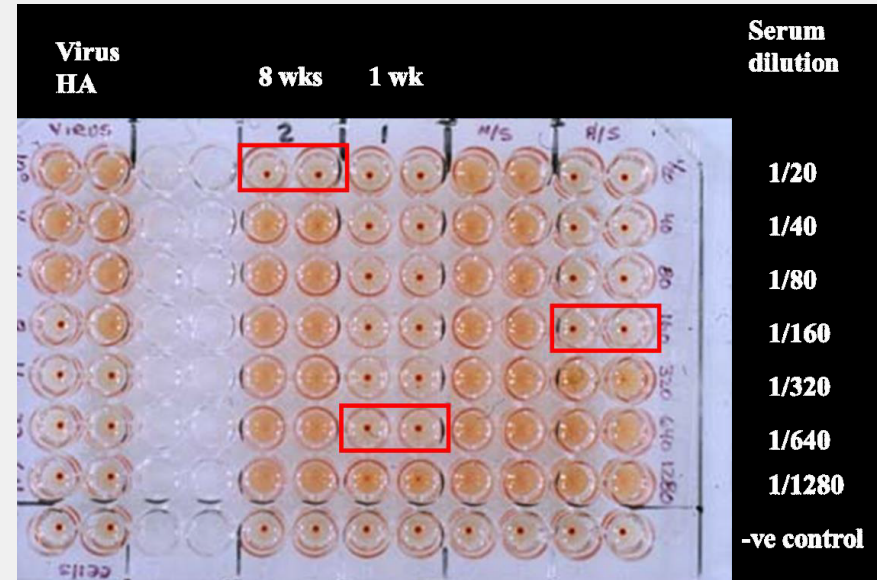
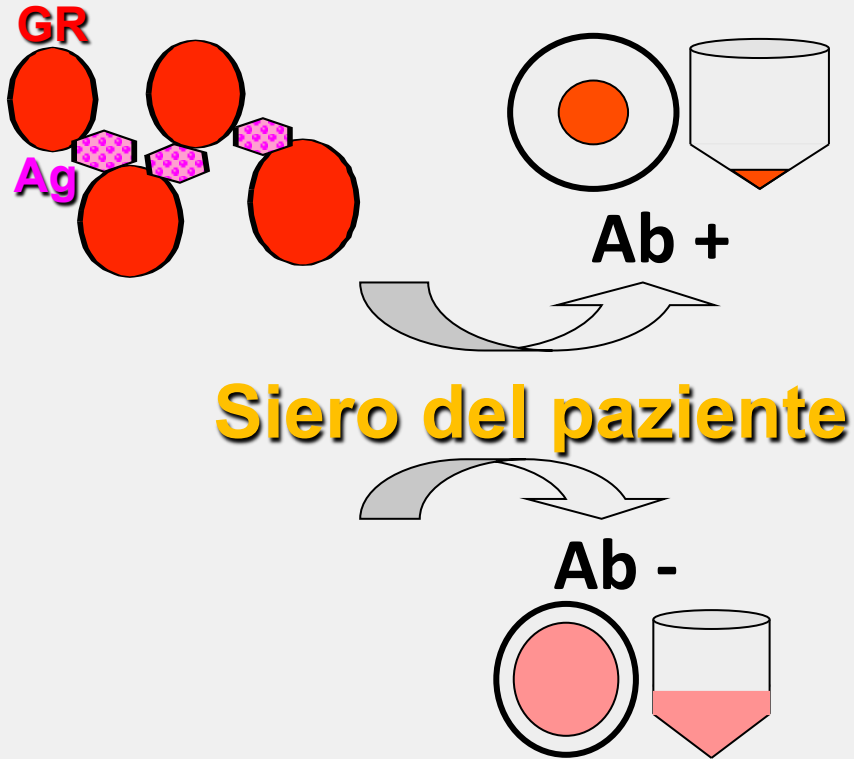




Determinazione del titolo virale

Diluizione più alta alla quale si osserva ancora attività emoagglutinante.

INIBIZIONE DELL' EMOAGGLUTININAZIONE



Diagnosi di laboratorio

Diagnosi Diretta

Ricerca diretta nel campione clinico di:

1. Agente virale

Isolamento virale su substrato cellulare

2. Agente batterico

Crescita di batteri su terreni di arricchimento e/o selettivi

3. Componenti dell' agente infettivo

Componenti proteiche

Acidi nucleici