

# COLTURE DI TESSUTI IN VIROLOGIA

Rappresentano il migliore substrato per la **coltivazione dei virus** ma....

- Quali cellule impiegare?
- Come preparare e inoculare il virus?
- Buona conoscenza dei fenomeni connessi alla replicazione virale

# SCelta DELLE COLTURE

- Occorre scegliere colture di **cellule sensibili** al virus che si vuole studiare:
  - Alcune cellule si dimostrano sensibili agli stessi virus verso i quali sono sensibili *in vivo* (es. **Virus del Sarcoma di Rous**);
  - Diversi virus sono in grado di infettare più linee cellulari;
  - Altri virus non sviluppano affatto su linee cellulari della stessa specie per la quale sono patogeni *in vivo*.

# PERCHÉ 'COLTIVARE' UN VIRUS?

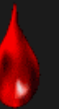
- ❖ Conservare un ceppo;
- ❖ Accertarsi circa la sua patogenicità *in vivo*;
- ❖ Per le siero-diagnosi;
- ❖ Allestire vaccini;
- ❖ Studiarne le caratteristiche ed il potere citopatogenetico;
- ❖ Valutare la presenza di inclusioni cellulari.

# PREPARAZIONE ED INOCULAZIONE DEL VIRUS

- Il virus può provenire da:

- Materiale patologico:

1. Organi o Tessuti;
2. Liquidi fisiologico;
3. Escreti;
4. Secreti;
5. Liquidi di lavaggio di un organo.



# PREPARAZIONE ED INOCULAZIONE DEL VIRUS

- Il virus può provenire da:
  - Altre colture:
    1. Infezione di una fiasca;
    2. *Freezing-Thawing Cycles*;
    3. Centrifugazione;
    4. Raccolta del **surnatante**.



# INOCULAZIONE DELLE COLTURE

- Infezione di monostrati cellulari sensibili con caratteristiche idonee agli esperimenti;
- Sostituire il terreno di crescita con un terreno di mantenimento;
- Qualora si adoperi materiale patologico 'sporco' (es. feci) è opportuno, dopo un'ora dall'infezione, cambiare nuovamente il terreno.

# TERRENI BASE PER COLTURA CELLULARI (*BASIC MEDIA*)



DMEM



F12



IMDM

# TERRENI **ARRICCHITI** CON...



Siero Fetale Bovino



Na Piruvato




Antibiotici

# FIASCHE E PIASTRE PER COLTURE CELLULARI

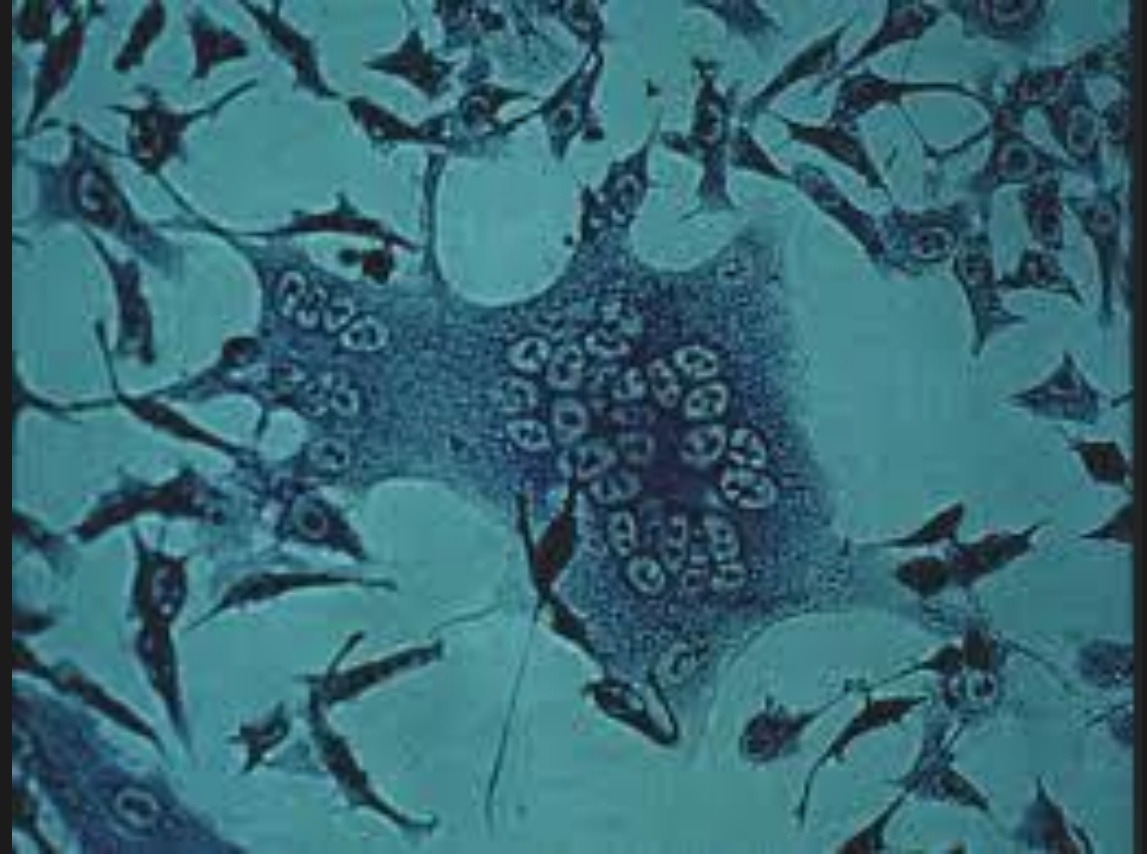
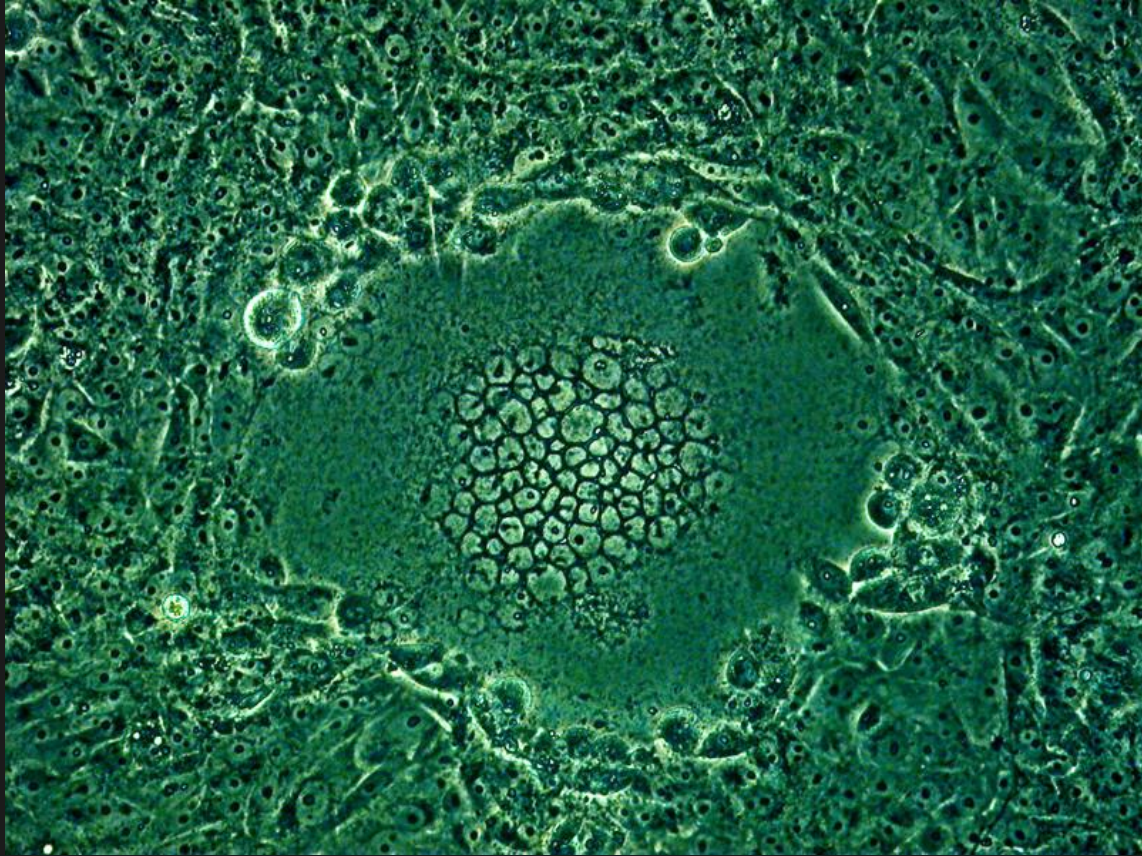


# FENOMENI CONNESSI ALLA MOLTIPLICAZIONE VIRALE

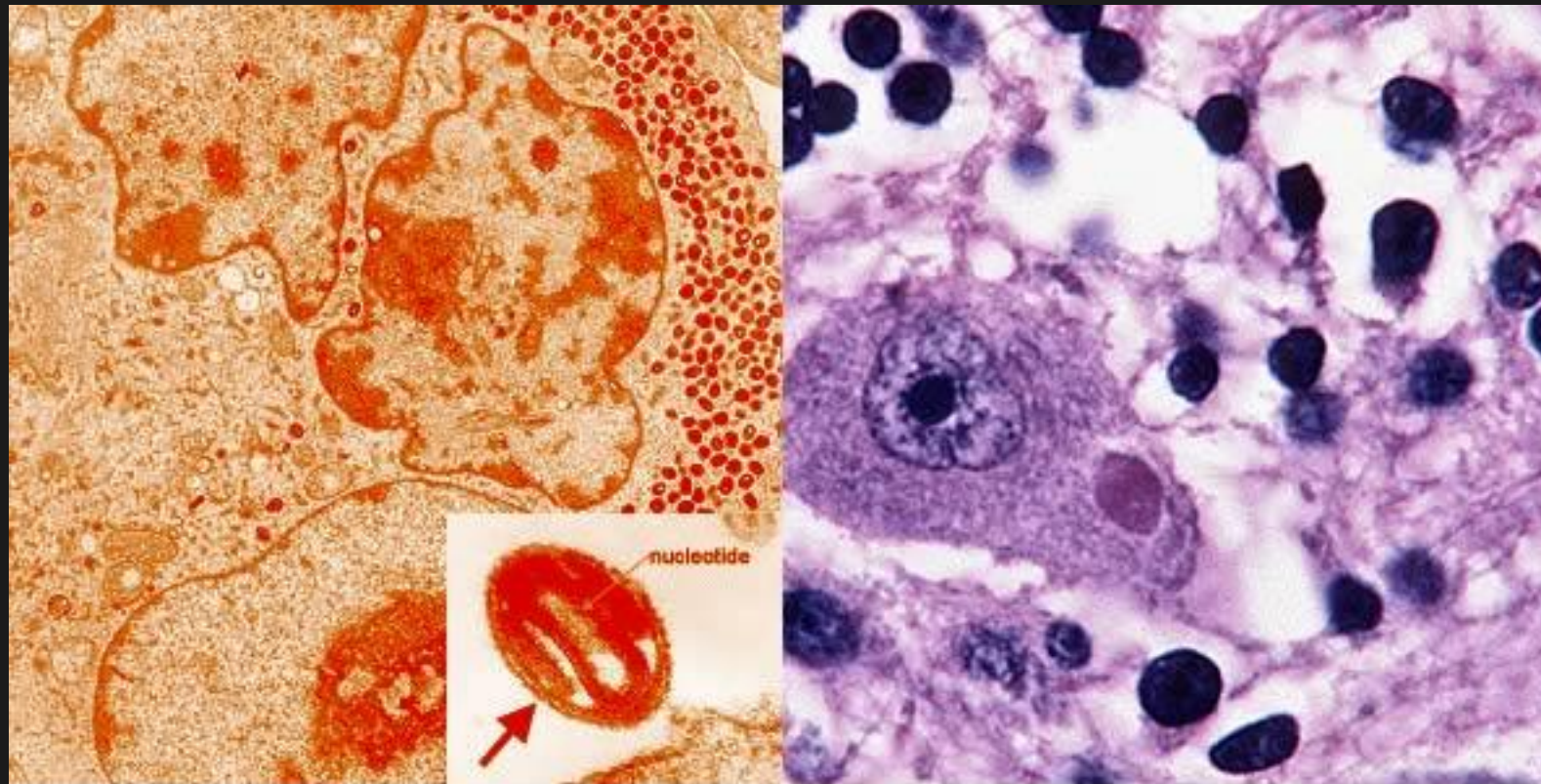
---

- Moltiplicazione virale  Reazione cellulare
- Effetti Citopatici (CPE):
  - Lisi cellulare;
  - Vacuolizzazione;
  - Formazione di sincizi;
  - Corpi inclusi (visibili dopo colorazione) all'interno del nucleo e/o del citoplasma.

# SINCIZI



# CORPI INCLUSI



Corpi inclusi prodotti durante la replicazione del virus. A sinistra corpi del Guarnieri causati dal vaiolo; a destra corpi del Negri prodotti dal virus della rabbia.

# TITOLAZIONE VIRALE

---

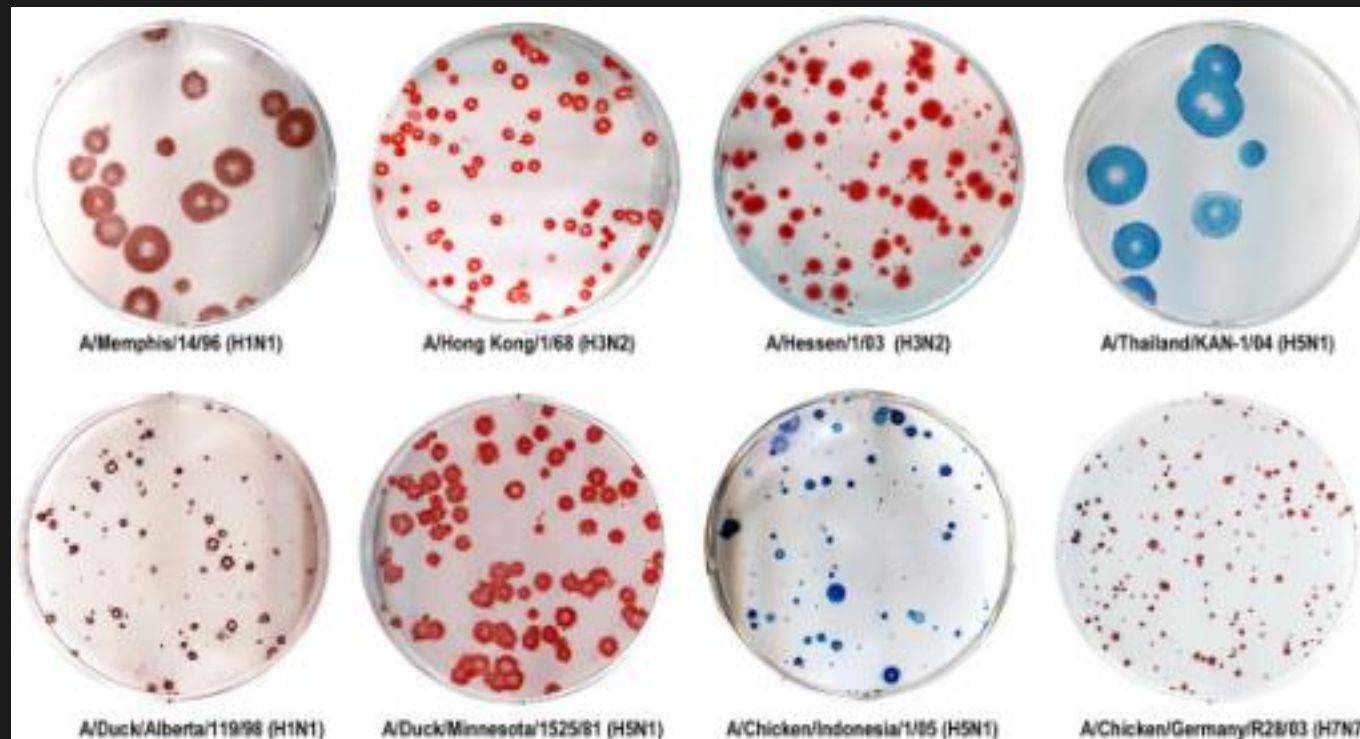
- È necessario eseguirla quando:
  - Si eseguono **esperimenti**;
  - Si devono allestire **vaccini**

**Consiste nella conta delle particelle virali presenti in una determinata preparazione di virus**

# METODO DELLE PLACCHE SECONDO DULBECCO

- Metodo estremamente preciso ma molto dispendioso a livello di tempo!
- Conta delle lesioni visibili (*pocks*) prodotte da determinati virus su monostrati cellulari, uova embrionate di pollo, membrane corion-allantoidee.
- Le placche sono in numero direttamente proporzionale alle unità infettanti presenti nell'*inoculum*.
- Se il virus uccide e lisa le cellule, le placche vengono visualizzate con Trypan Blue; se le cellule non vengono lisate sono evidenziabili mediante l'uso di coloranti vitali come il Rosso Neutro, ecc.
- Si può ricorrere alla Immunofluorescenza quando non è possibile ricorrere ai coloranti.

- Il titolo virale è espresso in **unità formanti placca (UFP/ml)**



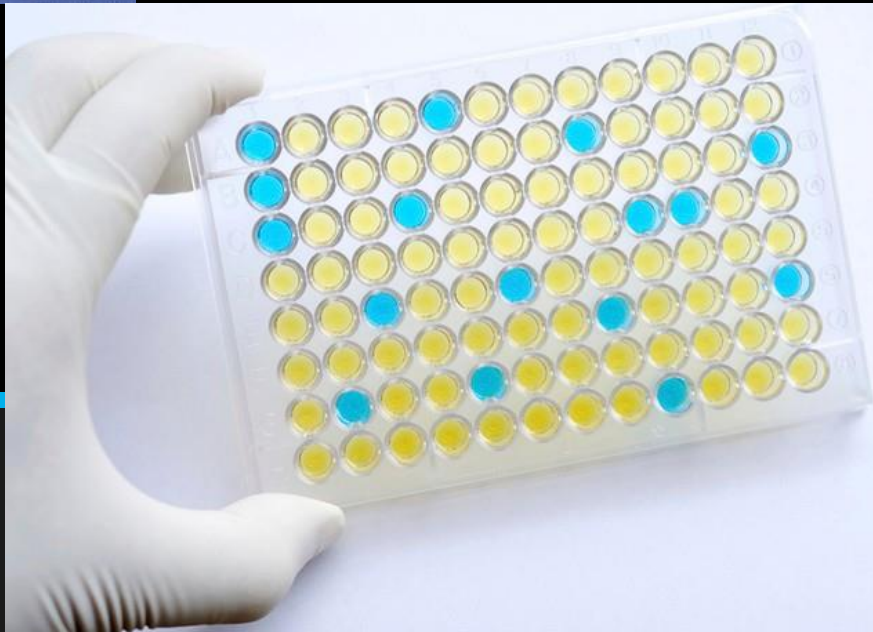
# METODO DELLA **DILUIZIONE LIMITE** (*ENDPOINT DILUTION ASSAY*)

- Non quantifica direttamente il numero delle particelle virali ma ne dà una stima in base alla valutazione della capacità infettante di una certa diluizione del virus
- Meno preciso del precedente ma più pratico e veloce
- Viene utilizzato nella comune *routine* di laboratorio
- Esiste una correlazione tra i due metodi:
  - **1 DTC<sub>50</sub> = 0,7 UFP**

- Il virus viene diluito serialmente, in base 10, ed inoculato in un numero definito di unità biologiche;
- Si conta il numero di unità che rispondono all'infezione (CPE, morte o malattia conclamata, degenerazioni);
- Punto finale della titolazione è considerata la diluizione del virus capace di determinare **EFFETTO CITOPATICO** nel 50% delle colture inoculate cioè la **TCID<sub>50</sub>** (se lavoriamo con colture cellulari);
- Punto finale della titolazione è considerata la diluizione capace di determinare **MORTE CELLULARE** nel 50% degli embrioni o degli animali inoculati, la **EID<sub>50</sub>** e **LD<sub>50</sub>** .

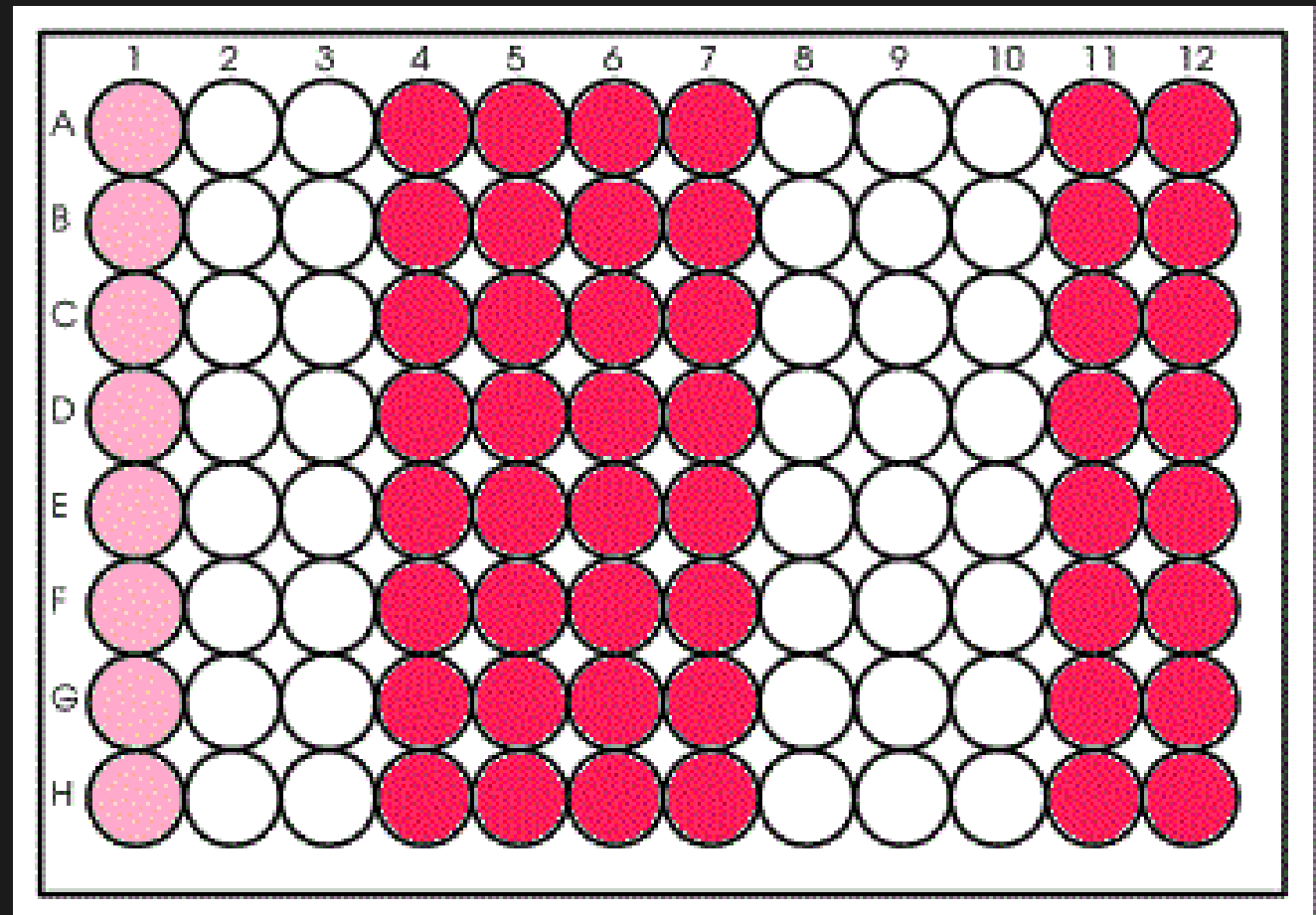
# PIASTRE MICROTITER A 96 POZZETTI

## *96-WELLS MICROTITER PLATES*



La piastra viene preparata il giorno prima dell'inoculazione del virus.

Trascorse 24 ore, si procede alla diluzione del virus e alla inoculazione delle unità stabilite.



Basic medium  
Virus

100  $\mu$ l cells  
50  $\mu$ l medium  
50  $\mu$ l virus

100  $\mu$ l cells  
100  $\mu$ l medium

# METODO DI REED E MUENCH

«Reed, L.J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints»

The Reed-Muench method for estimating TCID<sub>50</sub>

Virus dilution	Infections per number inoculated	Observed values		Cumulative values <sup>1</sup>		Infection ratio <sup>2</sup>	% infection <sup>3</sup>
		Positive	Negative	Positive	Negative		
10 <sup>-1</sup>	8/8	8	0	24	0	24/24	100
10 <sup>-2</sup>	7/8	7	1	16	1	16/17	94
10 <sup>-3</sup>	5/8	5	3	9	4	9/13	69
10 <sup>-4</sup>	3/8	3	5	4	9	4/13	31
10 <sup>-5</sup>	1/8	1	7	1	16	1/17	6
10 <sup>-6</sup>	0/8	0	8	0	24	0/24	0

<sup>1</sup>The cumulative values are derived by adding up the observed values in the direction of the arrows.

<sup>2</sup>The infection ratio is the number of positives for the cumulative value out of the total for the cumulative value.

<sup>3</sup>The % infection is the infection ratio converted to a percentage.

It had already been determined that the dilution of virus that contains one TCID<sub>50</sub> lies between 10<sup>-3</sup> and 10<sup>-4</sup>, so the end point can be expressed as 10<sup>-(3+x)</sup>, where x is the value to be estimated.

$$\begin{aligned}
 x &= \log_{10} \text{dilution factor} \left( \frac{\% \text{ infection at next dilution above } 50\% - 50}{\% \text{ infection at next dilution above } 50\% - \% \text{ infection at next dilution below } 50\%} \right) \\
 &= 1 \left( \frac{69 - 50}{69 - 31} \right) \\
 &= 0.5
 \end{aligned}$$

End point = 10<sup>-(3+0.5)</sup> = 10<sup>-3.5</sup>.

i.e. 1 ml of a 10<sup>-3.5</sup> dilution contains one TCID<sub>50</sub> of virus

i.e. 1 ml of a 1/3200 dilution contains one TCID<sub>50</sub> of virus.

(3.2 is the antilogarithm of 0.5)

The concentration of virus in the undiluted suspension is 3.2 × 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/ml.

# CRYSTAL VIOLET ASSAY

- Ci permette di identificare meglio le unità in cui si manifestano gli effetti citopatici mediante una serie di passaggi che prevedono la fissazione con metanolo assoluto, colorazione con violetto di genziana ed una serie di lavaggi con soluzione isotonica PBS;
- Osservazione

