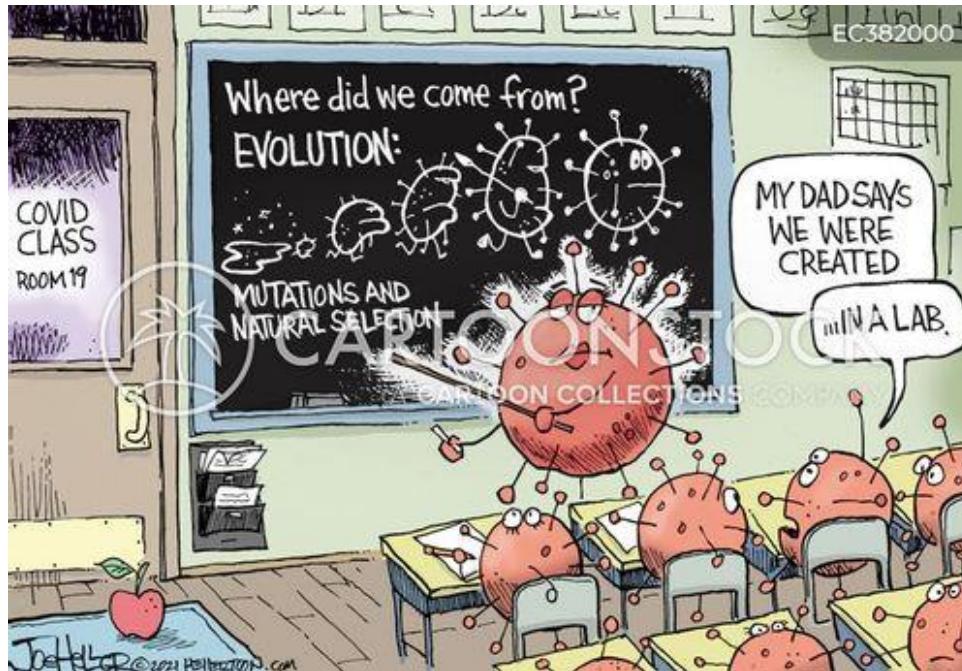


Parti del testo “Introduzione alla Virologia Moderna” da consultare per questa lezione

- **Capitolo 4 – Evoluzione dei virus**
- **Capitolo 5:5.1, 5.2, 5.3, 5.4 5.5,5.6– Metodi di rilevazione e studio dei virus**

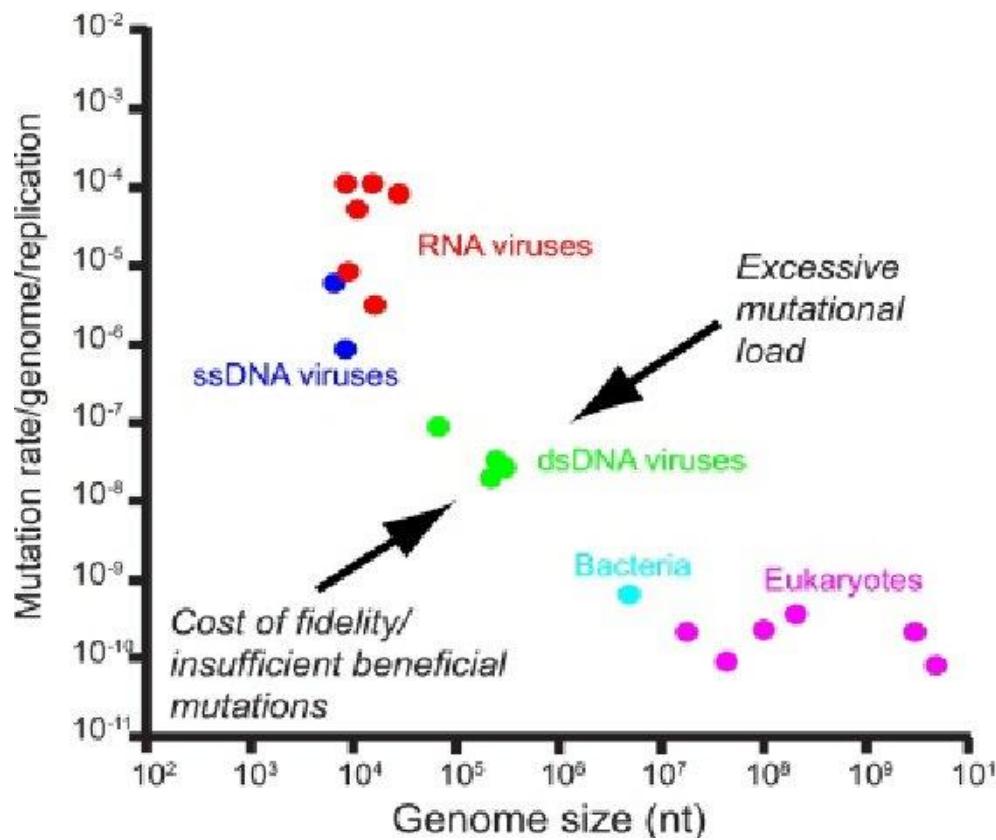
Meccanismi di Evoluzione virale



Indipendentemente dal sempre attuale dibattito sulla opportunità o meno di definire i virus come viventi, essi sono sicuramente soggetti alle stesse forze evolutive degli organismi cellulari:

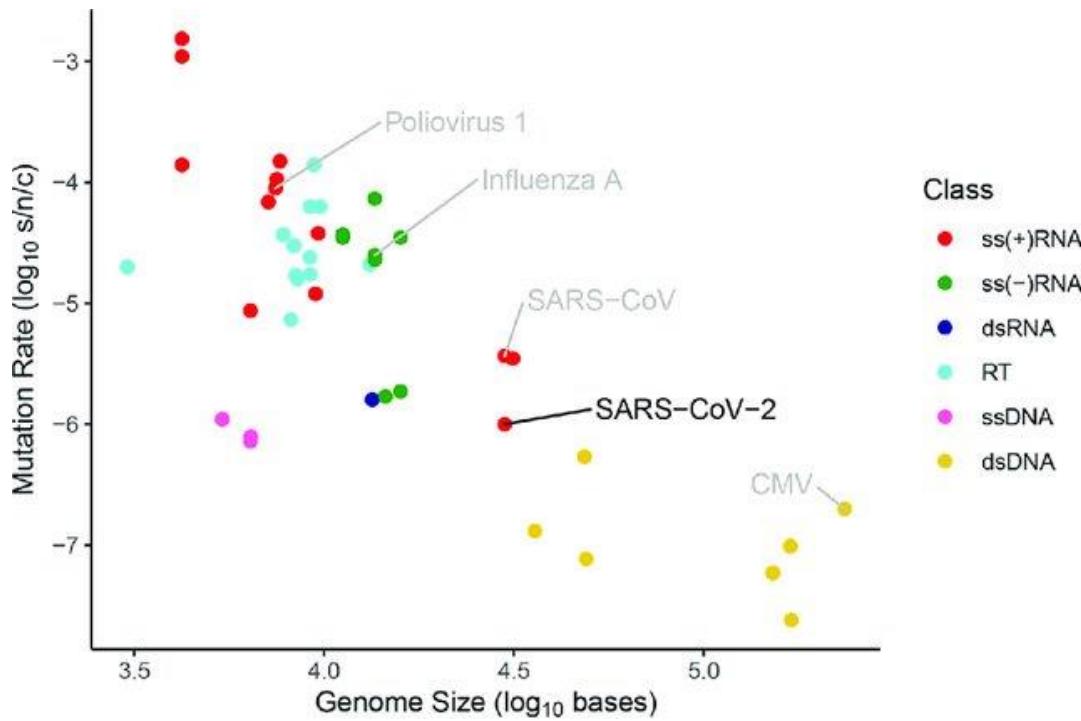
Mutazione, ricombinazione e riassortimento, deriva genetica, selezione naturale e migrazione.

Variabilità genetica: mutazioni



In alcuni virus la frequenza di mutazioni è molto elevata e può raggiungere 10^{-3} a 10^{-4} per nucleotide incorporato (es. virus con genoma ad RNA), mentre in altri i valori sono simili a quelli riscontrati per il DNA cellulare, da 10^{-8} a 10^{-11} (es. herpesvirus e altri virus con genoma a dsDNA)

Variabilità genetica: mutazioni



Queste differenze sono associate alle modalità di replicazione del genoma, infatti, la frequenza di errori della trascrittasi inversa e delle RNA polimerasi RNA-dipendenti è più alta di quella della DNA polimerasi DNA-dipendente

L'insieme delle varianti molecolari generate durante un ciclo replicativo sono note come **“quasispecie”** e sono caratteristiche di molte famiglie di virus a RNA e a DNA

Variabilità genetica: quasispecie

Il concetto di quasispecie ha origine in una formulazione teorica dell'evoluzione molecolare che enfatizzava la replicazione incline all'errore di semplici RNA o repliconi simili a RNA come caratteristica essenziale dell'autorganizzazione e dell'adattabilità delle forme di vita primitive (Eigen, 1971, 2013; Eigen e Schuster, 1979).

Le **quasispecie** virali sono le distribuzioni di mutanti che vengono generate durante la replicazione dei virus a RNA e di alcuni virus a DNA (es HBV) in cellule e organismi infetti.

La quasispecie viene anche definita come la distribuzione di virus presente all'interno dell'ospite in un determinato momento.

Sappiamo che i virus hanno una grande capacità replicativa e che molte specie, in particolare i virus a RNA, vanno incontro a frequenti mutazioni che possono alterarne il tropismo, li rendono resistenti ai farmaci, gli permettono in qualche caso, niente affatto raro, di passare da una specie all'altra

Variabilità genetica: quasispecie

La quasispecie generata dalla mutazione è influenzata da una complessa e potente pressione selettiva nell'ospite con alcuni virus che hanno un vantaggio di sopravvivenza o di fitness rispetto ad altri.

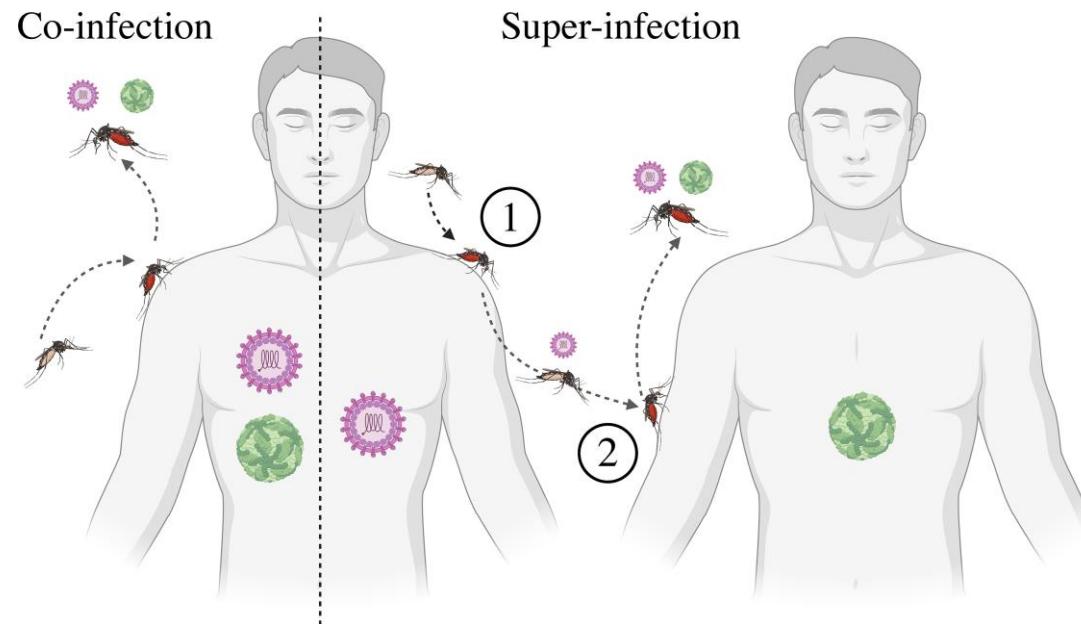
La pressione selettiva si osserva sia a livello di singolo ospite (intra-host) che a livello di distribuzione nella popolazione.

Fenomeno particolarmente descritto per infezioni croniche come **HIV** e **HCV** dove nel corso della vita dell'ospite si susseguono numerosissimi eventi mutazionali che generano quasispecie in grado di adattarsi alla risposta immunitaria dell'ospite e alle terapie.

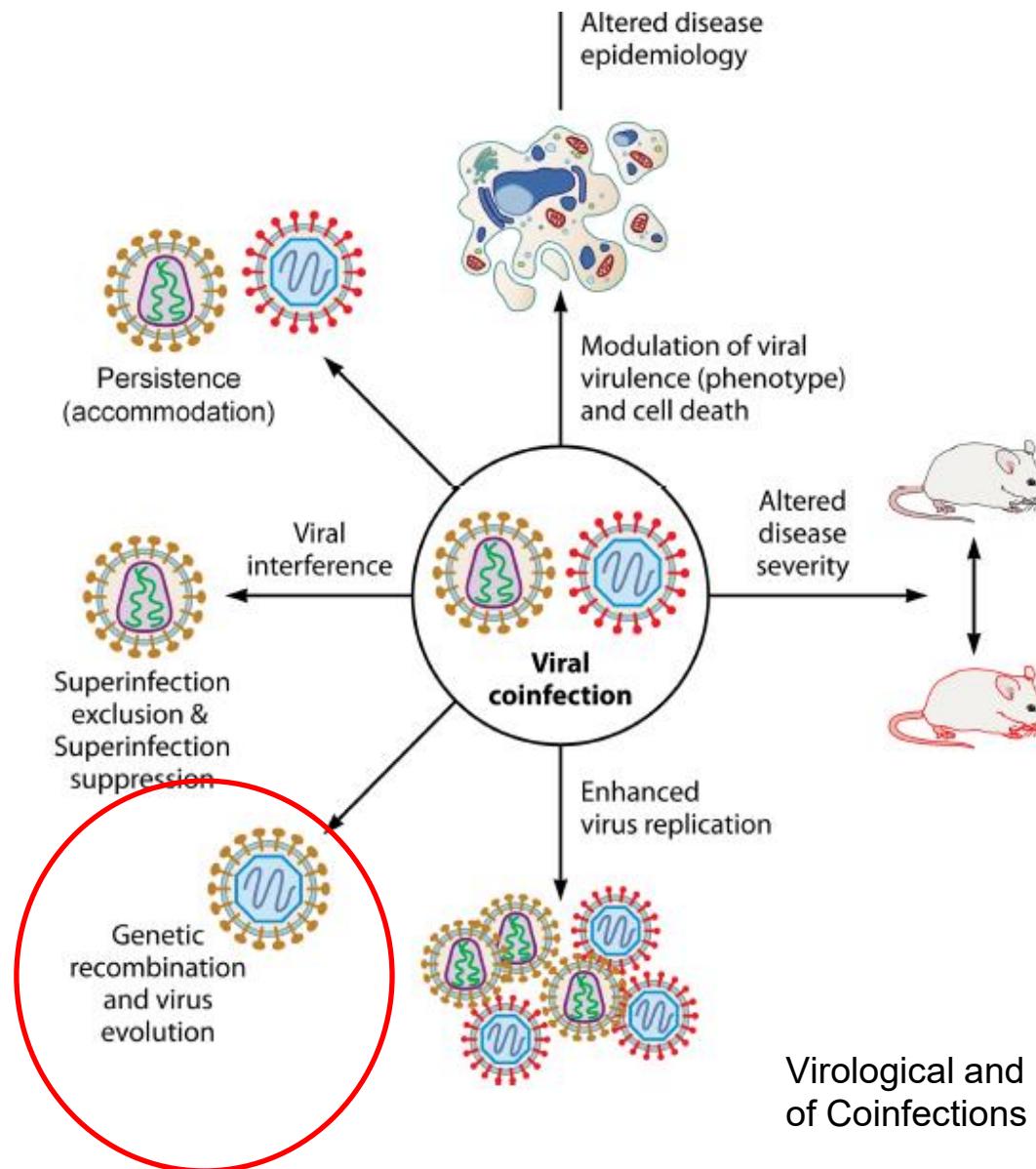
Lo studio delle varianti virali a livello di popolazione (genotipi e clades) può evidenziare delle distribuzioni preferenziali per area geografica che possono essere legate alla genetica dell'ospite.

Interazioni genetiche

Si verificano frequentemente in natura dal momento che un ospite può essere infettato da più di un virus



Conseguenze di co/super-infezioni



Virological and Immunological Outcomes
of Coinfections Naveen Kumar et al. 2018

Conseguenze di co/super-infezioni

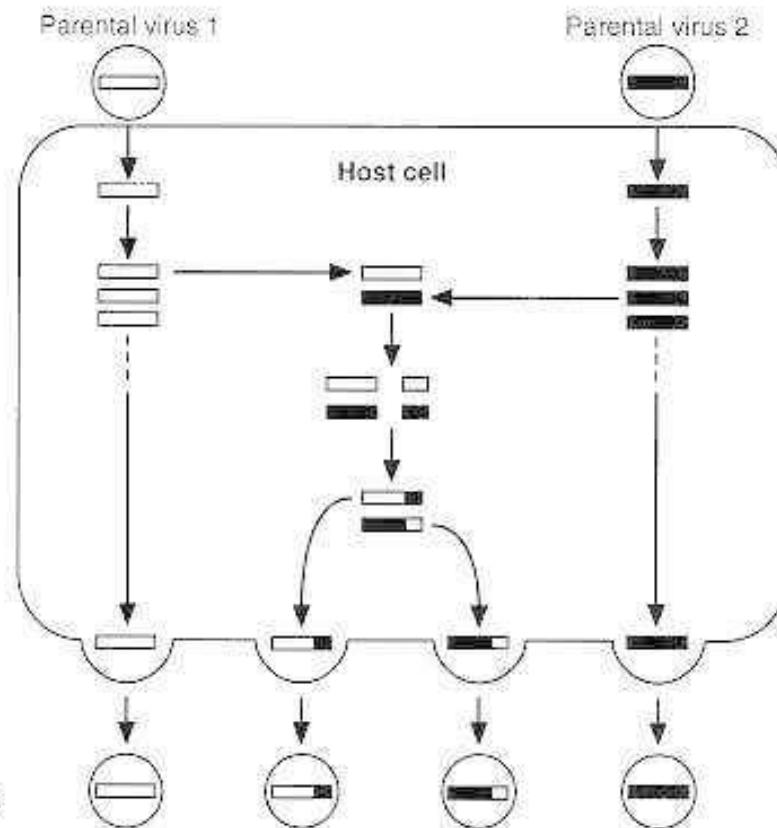
Data la presenza di due virus nell'ospite si può assistere ad interazioni tra i virus infettanti di tipo genetico e non genetico

Le interazioni genetiche più importanti sono rappresentate da **Ricombinazione e Riassortimento**

Ricombinazione genomi a DNA

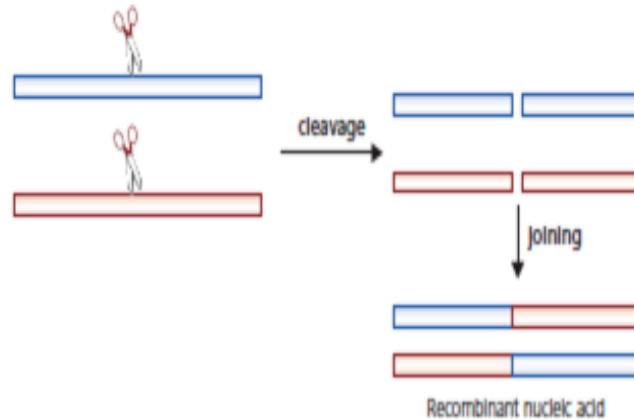
Steps

1. Dual infection
2. Uncoating of virus genomes
3. Interaction of some replicating genomes
4. Break in some replicating genomes
5. Crossover between broken genomes
6. Progeny virus with recombinated (break-rejoin) or parental genomes



The genetic interaction of DNA viruses can result in break-rejoin recombination, in which the two DNA molecules of different viruses break and then cross over. Break-rejoin recombination results in novel progeny viruses with some DNA sequences of both types of parental viruses.

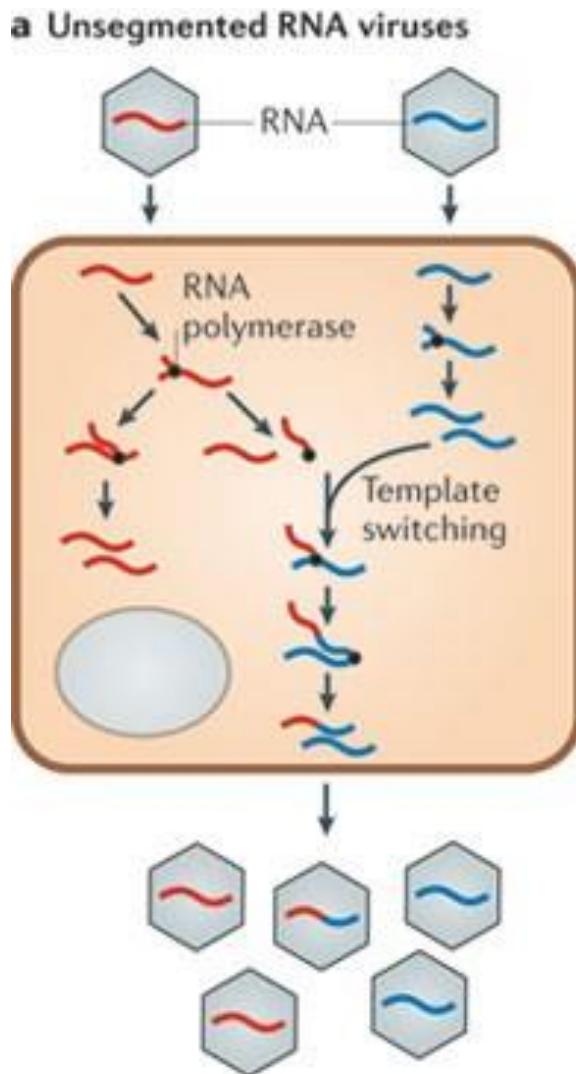
Ricombinazione genomi a DNA



La ricombinazione può avvenire anche più volte per un genoma, creando virus ricombinanti a mosaico. Tuttavia eventi multipli sono molto più rari rispetto a quelli singoli.

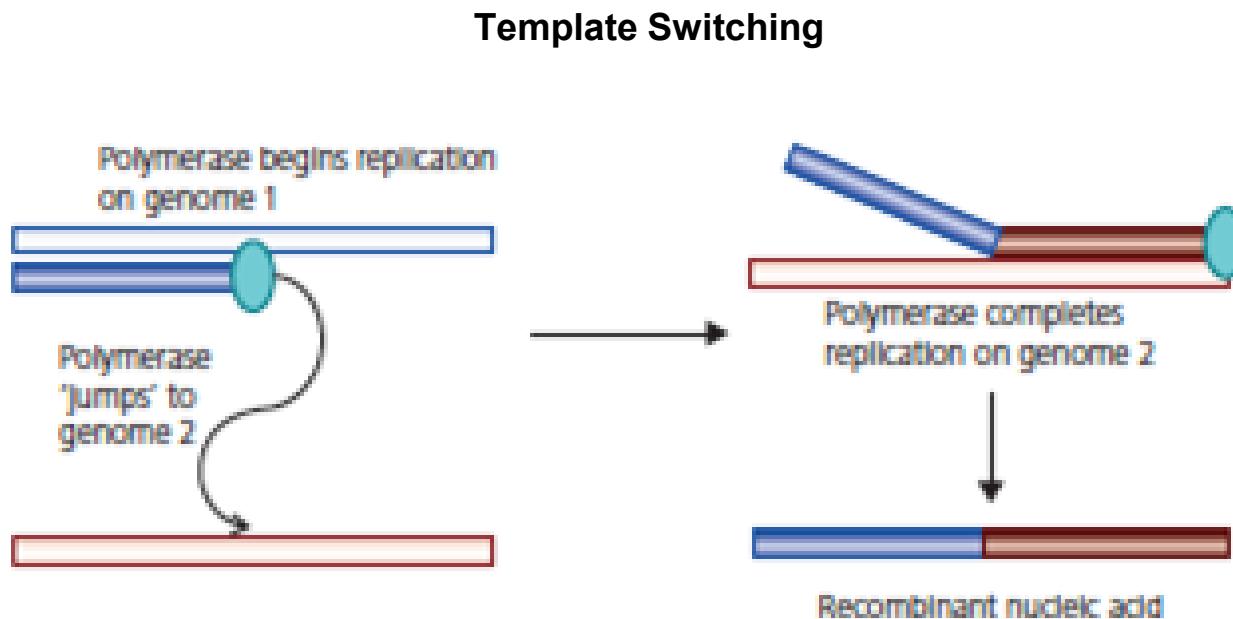
Gli eventi di ricombinazione hanno un ruolo importante nell'evoluzione degli adenovirus (genoma lineare a dsDNA) di cui si riconoscono molti sierotipi con sequenze ricombinanti.

Ricombinazione genomi ad RNA



a | Co-infection of a cell by genetically distinct viral strains can lead to the generation of recombinant viruses. This process can occur in both non-segmented viruses (as shown here) or within a segment of a segmented virus.

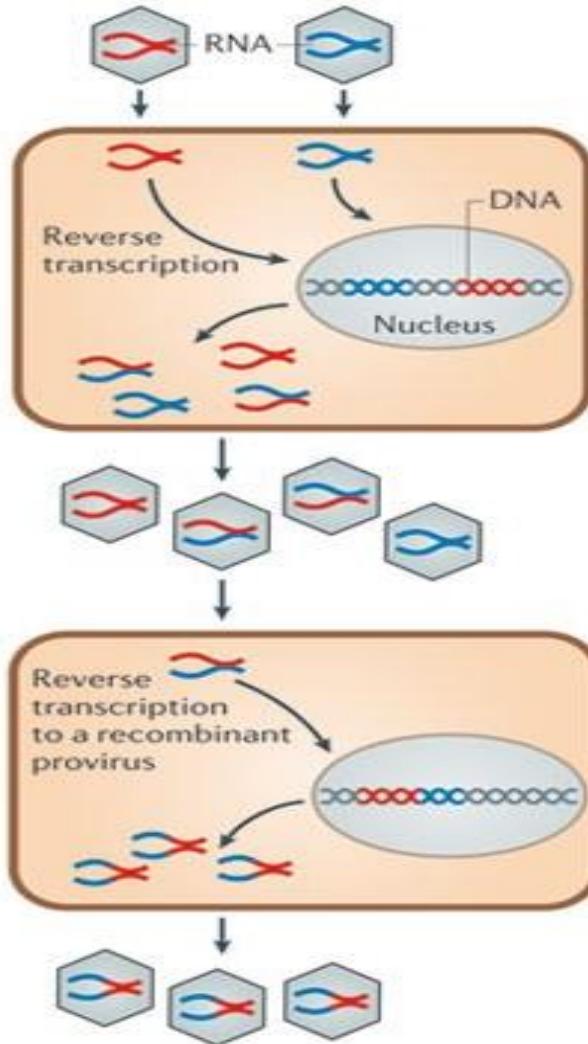
Ricombinazione genomi ad RNA



Eventi di ricombinazione possono portare a delezione o duplicazione di sequenze e ad acquisizione di nuovi geni

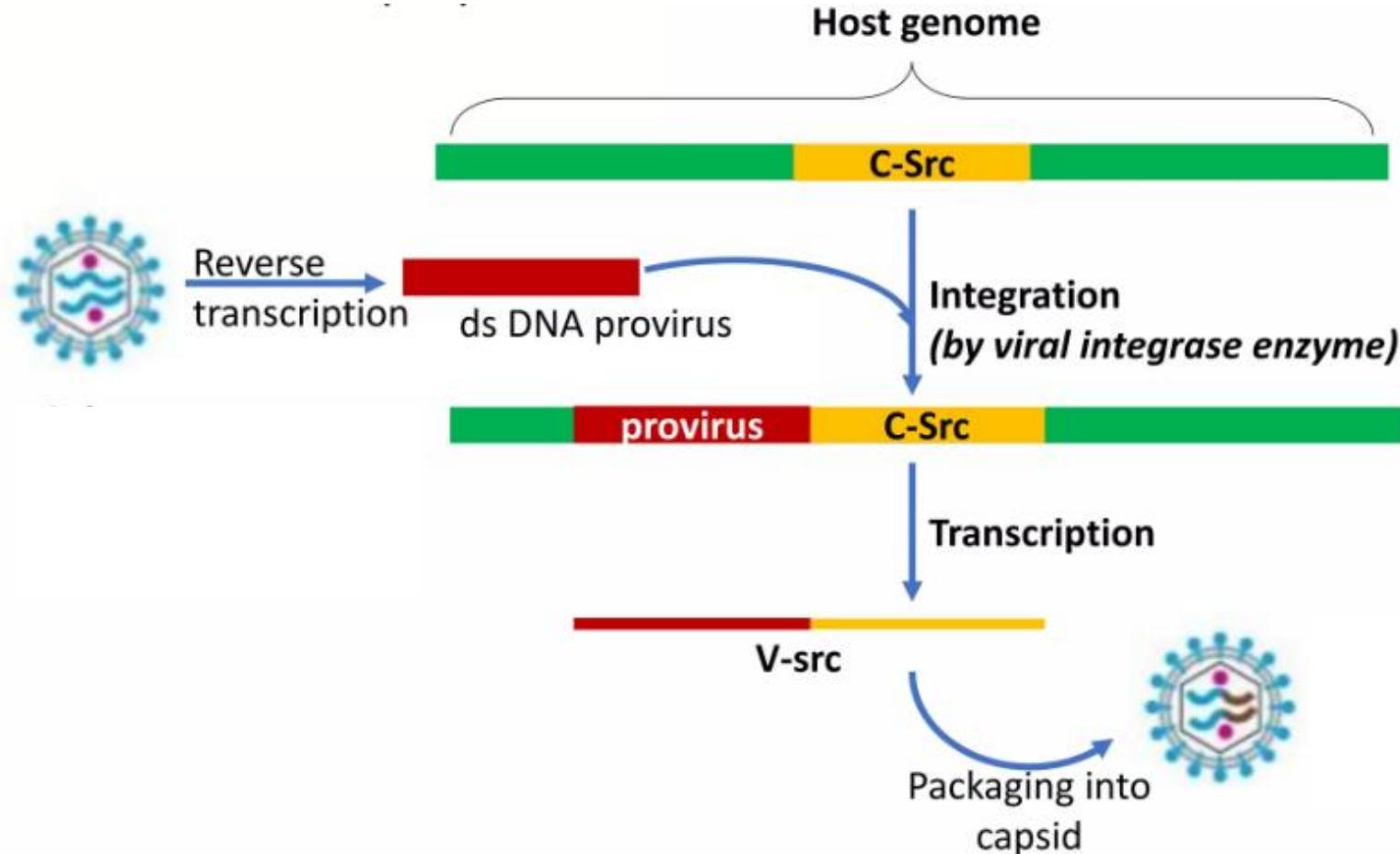
Ricombinazione genomi ad RNA

b Retroviruses



b | Co-infection of a cell by genetically distinct strains of a retrovirus can lead to the generation of 'heterozygous' virus particles, after which a template-switching event can lead to a recombinant provirus

Inserzione di un oncogene nel genoma retrovirale



Retrovirus trasformanti acuti: Hanno acquisito nel loro genoma sequenze cellulari
La polimerasi non riconosce il segnale di poliadenilazione e continua a trascrivere

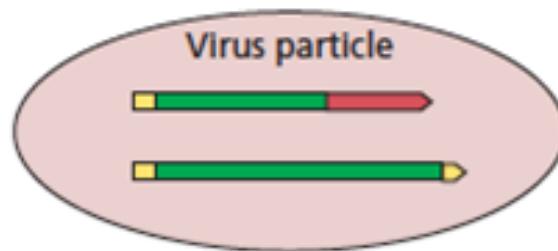
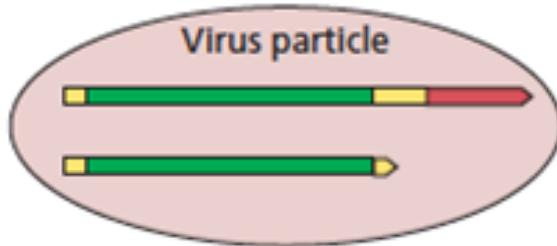
Possible mechanisms for oncogene capture by retroviruses



Trascrizione provirus e gene cellulare

Trascrizione dall'LTR di destra include LTR e geni cellulari

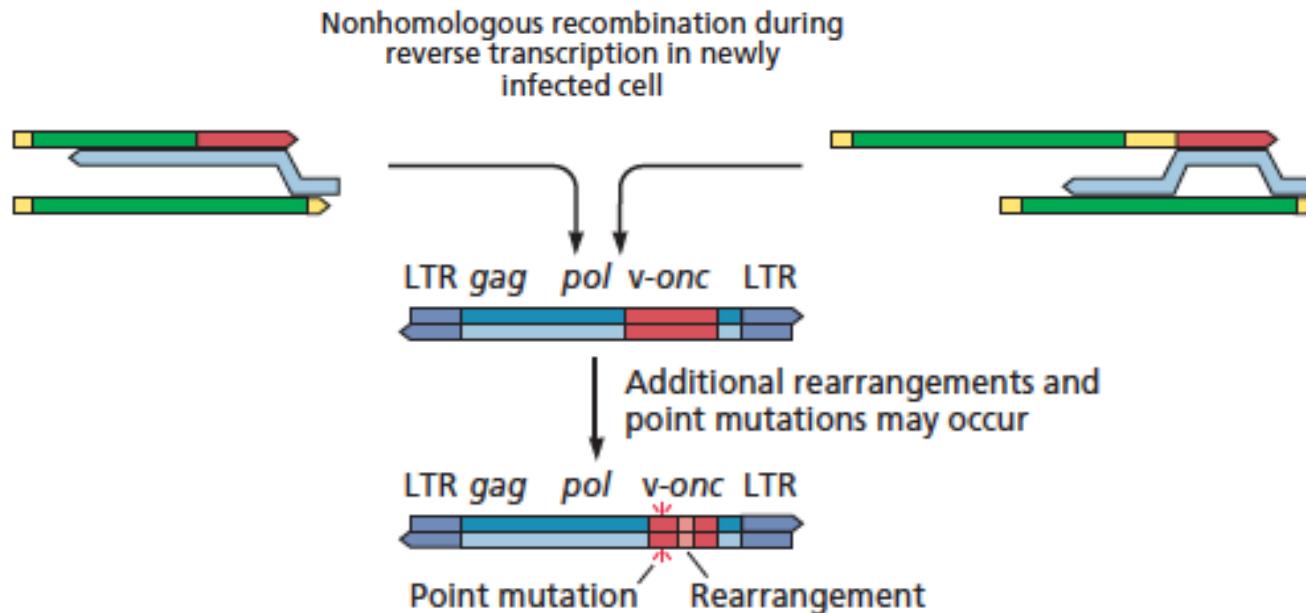
La particella virale contiene due molecole non identiche



Porzione cellulare in rosso, LTR in giallo, geni virali in verde

Chimeric RNA molecules that include the viral packaging signal can be incorporated efficiently into viral particles with a wild-type genome produced from another provirus in the same cell.

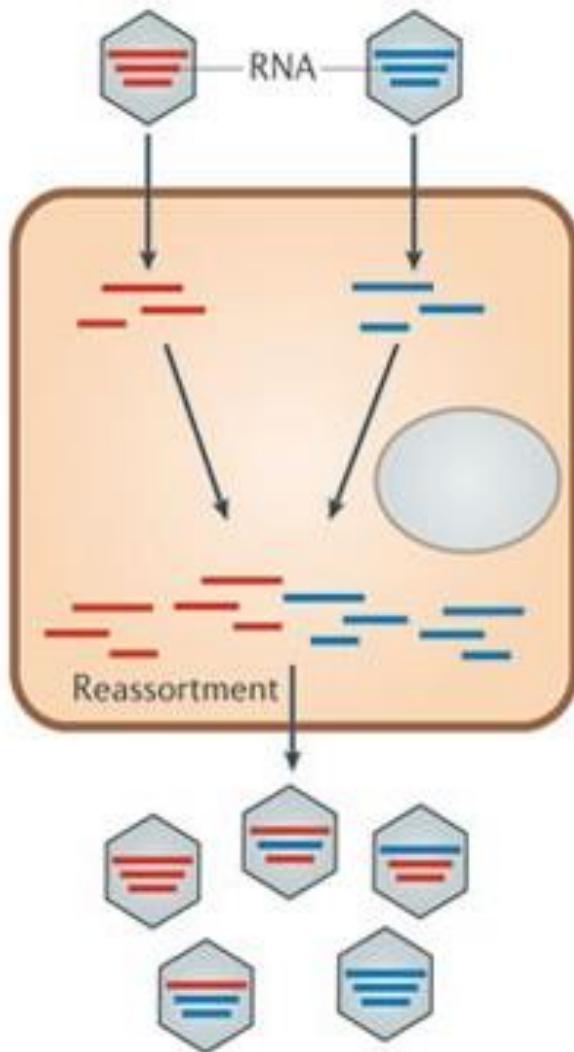
Possible mechanisms for oncogene capture by retroviruses



A second recombination reaction, during reverse transcription is then required to add right-end viral sequences to the recombinant. At a minimum, these right-end sequences must include signals for subsequent integration of the recombinant viral DNA into the genome of the newly infected host cell, from which the transduced gene is then expressed. Important additional mutations and rearrangements probably occur during subsequent virus replication.

Riassortimento genico

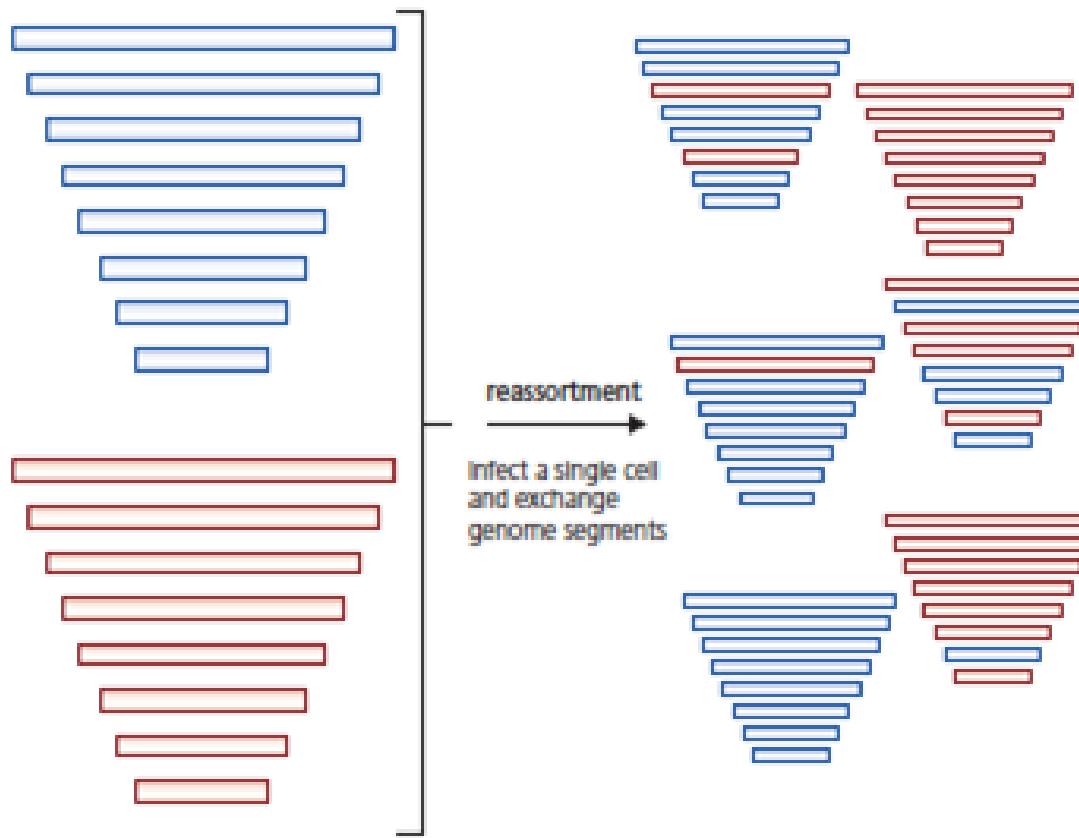
c Segmented RNA viruses



Nei virus con genomi segmentati, durante la superinfezione, i vari segmenti genomici possono mischiarsi a caso durante la fase di assemblaggio dei nuovi virioni.

La progenie virale riceverà almeno una copia di ogni segmento genetico, ma non necessariamente proveniente dallo stesso virus.

Riassortimento genico



Il virus dell'influenza ha 8 segmenti genomici quindi, durante una superinfezione da parte di due sottotipi diversi, potrebbero generarsi virioni con $2^8 = 256$ possibili corredi genetici diversi.

Variabilità antigenica

Virus dell'Influenza

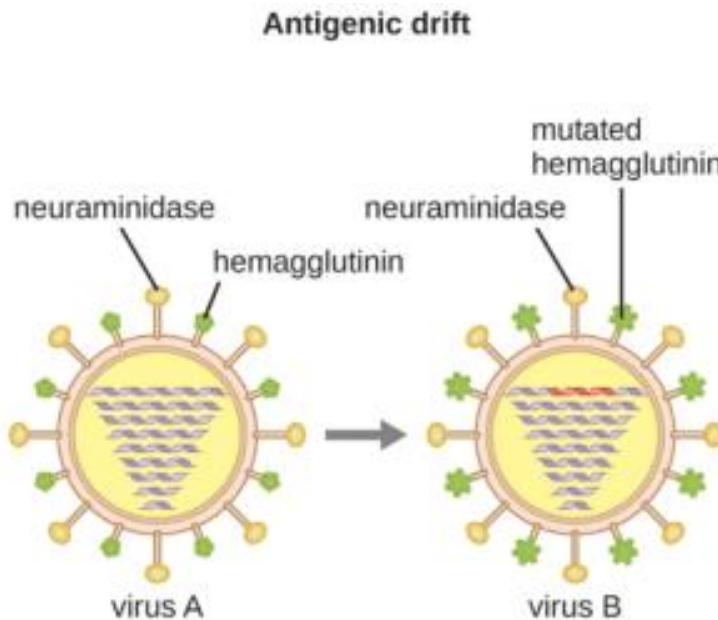
Varianti antigeniche sono il risultato di due processi distinti:

Antigenic drift: o deriva antigenica. Comparsa di ceppi con proteine di superficie (antigeni) lievemente, ma spesso sufficientemente alterate da evadere la risposta dell'ospite e permetterne la diffusione nella popolazione

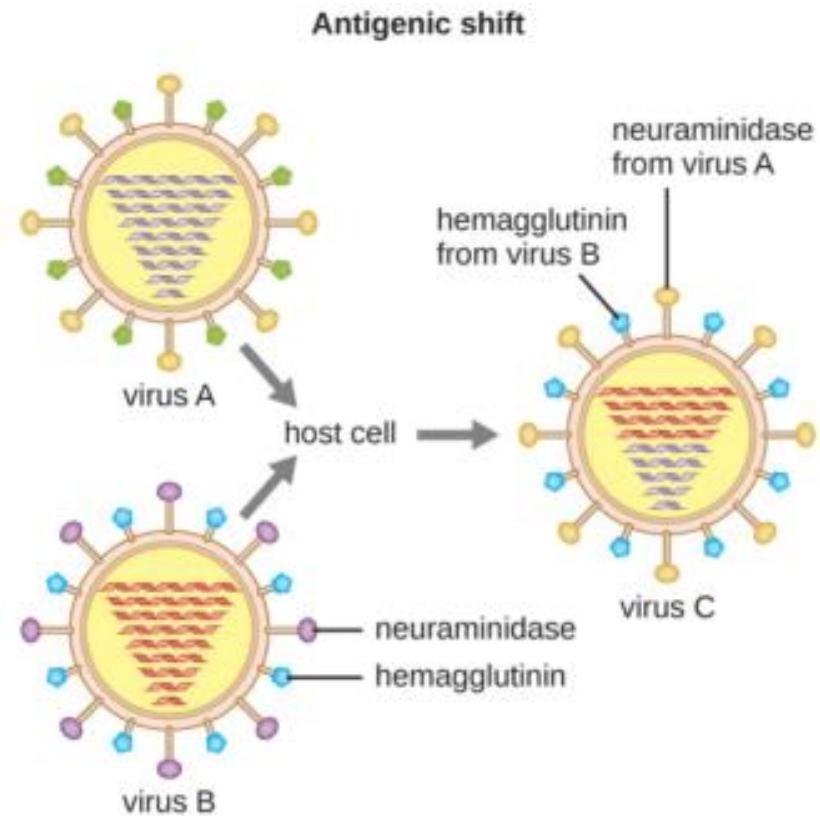
Antigenic shift: o “spostamento” antigenico. Acquisizione di proteine di superficie completamente nuove attraverso il riassortimento genico. In presenza di un antigenic shift, la maggior parte degli individui presenta una bassa o assente protezione verso il nuovo virus riassortante.

Variabilità antigenica

Virus dell'Influenza



(a)



(b)

Figura: sottotipi antigenici dell'emagglutinina (H) e della neuraminidasi (N)

H1						N1					
H2						N2					
H3						N3					
H4						N4					
H5						N5					
H6						N6					
H7						N7					
H8						N8					
H9						N9					
H10											
H11											
H12											
H13											
H14											
H15											
H16											

Alla base della epidemiologia dell'influenza vi è la marcata tendenza di tutti i virus influenzali a variare, cioè ad acquisire cambiamenti nelle proteine di superficie che permettono loro di aggirare la barriera costituita dalla immunità presente nella popolazione che in passato ha subito l'infezione influenzale.

Ad oggi sono stati identificati 16 sottotipi di emagglutinina e 9 di neuramminidasi di Influenza A.

Nell'uomo H1N1, H3N2 come responsabili di influenza nel corso degli ultimi decenni.

I **virus dell'influenza A** si classificano in sottotipi a seconda di due proteine di superficie: emagglutinina (HA) e neuramminidasi (NA).



H5 Bird Flu: Current Situation

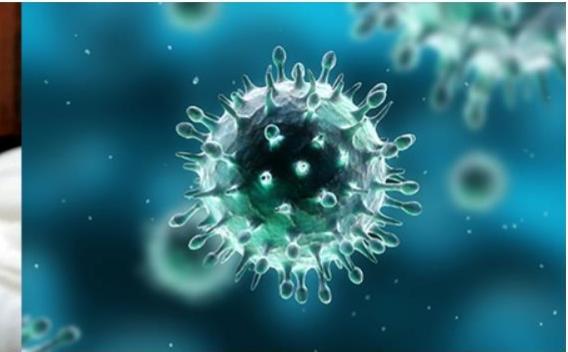
WHAT TO KNOW

- H5 bird flu is widespread in wild birds worldwide and is causing outbreaks in poultry and U.S. dairy cows with several recent human cases in U.S. dairy and poultry workers.
- While the current public health risk is low, CDC is watching the situation carefully and working with states to monitor people with animal exposures.
- CDC is using its flu surveillance systems to monitor for H5 bird flu activity in people.



Influenza aviaria

<https://www.cdc.gov/bird-flu/situation-summary/index.html>



L'influenza aviaria è una malattia virale che colpisce prevalentemente gli **uccelli selvatici**, che fungono da serbatoio e possono eliminare il virus attraverso le feci. Solitamente tali uccelli non si ammalano, ma possono essere molto contagiosi per gli **uccelli domestici** come polli, anatre, tacchini e altri animali da cortile.

L'influenza nel pollame si presenta regolarmente nel territorio nazionale, sia nella forma causata da virus a **bassa patogenicità (LPAI)** sia da virus ad **alta patogenicità (HPAI)**. Questa malattia, soprattutto quando sostenuta da ceppi altamente patogeni, ha **conseguenze devastanti**: non solo per l'elevato tasso di mortalità che può essere raggiunto, ma anche per il forte impatto economico che ne consegue, dovuto all'adozione di politiche di eradicazione e alle restrizioni al commercio imposte nelle zone in cui sorgono i focolai.

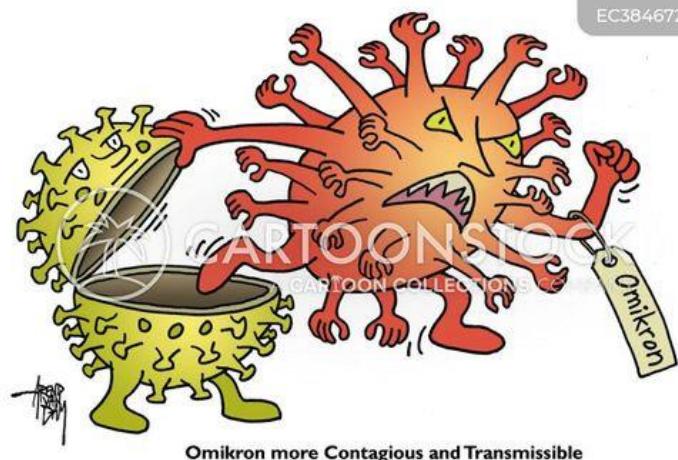
L'importanza del controllo sanitario per questa malattia non è legato solo a un problema di sanità animale ma anche di salute pubblica. Infatti i virus influenzali appartenenti al tipo A possono infettare anche altri animali (maiali, cavalli, cani, balene) nonché l'uomo. Data l'elevata frequenza con cui questi virus vanno incontro a fenomeni di mutazione, c'è la possibilità che da un serbatoio animale possa originare un nuovo virus per il quale la popolazione umana risulta suscettibile, dando modo alla malattia di estendersi a livello globale e provocando quindi una pandemia.

<https://www.izsvenezie.it/temi/malattie-patogeni/influenza-aviaria/>

Variabilità genetica: selezione naturale

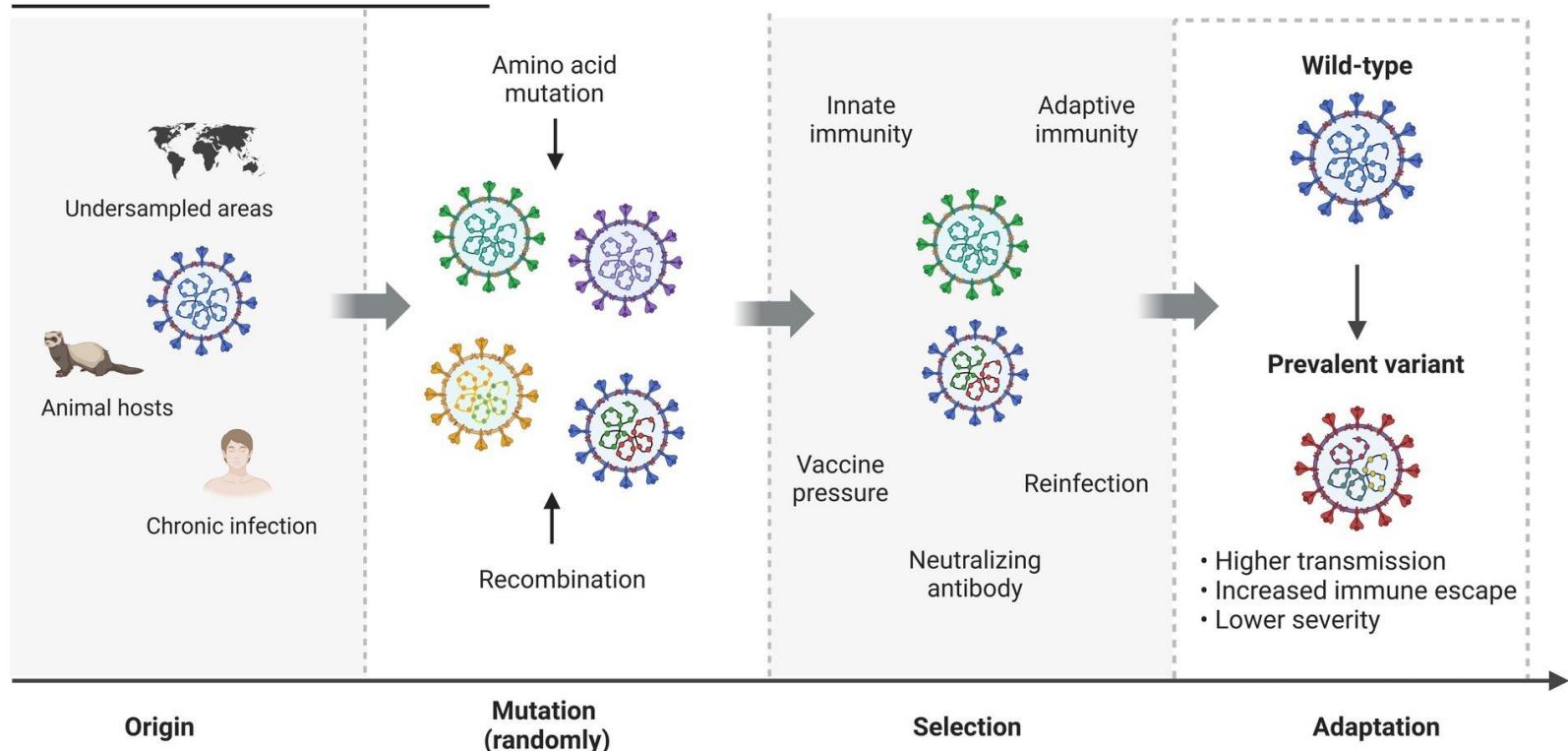
Studi di mutagenesi in vitro sul VSV hanno misurato la seguente proporzione di mutazioni: 40% letale, 29% deleteria, 27% neutra, 4% vantaggiosa (in vivo probabilmente ancora minore)

La selezione di una variante virale può essere guidata da meccanismi di *escape immunologico*, resistenza a farmaci antivirali, l'adattamento ad un nuovo ospite o ad un nuovo tipo cellulare (tropismo), o al background genetico dell'ospite.



SARS-CoV-2 Evolution

Process of Mutation-Selection-Adaptation



The evolutionary trend tends to lower the pathogenicity but increase the transmissibility of variants, resulting in long-term retention of virus in human hosts

Interazioni non-genetiche tra virus

Quando due virus infettano la stessa cellula, oltre che a livello di genoma, essi possono interagire anche a livello di funzioni geniche.

Queste interazioni non sono stabili poiché non alterano il genoma virale.

Questo tipo di interazioni comprendono:

L'interferenza virale

La complementazione

Il mescolamento fenotipico

Interazioni non-genetiche tra virus

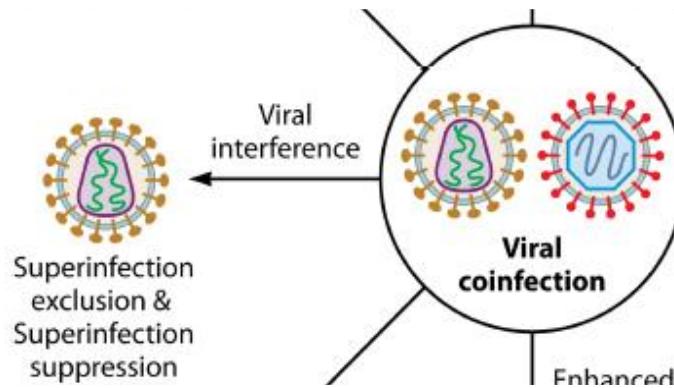
Interazioni competitive:

L'interferenza risulta nella resistenza di un ospite già infettato alla superinfezione con un altro virus quindi il risultato è che la presenza di un primo virus inibisce la replicazione di un secondo

I meccanismi di interferenza sono diversi e non sempre caratterizzati. Si può verificare: la competizione per lo stesso recettore, il blocco delle vie metaboliche indispensabili alla replicazione de secondo virus, lo stato antivirale indotto dagli interferoni



Interferenza virale intrinseca



The most common outcome of coinfection is viral interference, where one virus competitively suppresses replication of the other coinfecting viruses.

Interference between closely related viruses eventually results in elimination of the secondary coinfecting virus and is referred to as superinfection exclusion. Es. Env, Nef, Vpu from HIV-1 downmodulate CD4 on cell surface.

The instances where persistently infected cells withstand the challenge of a heterologous virus are termed superinfection suppression.

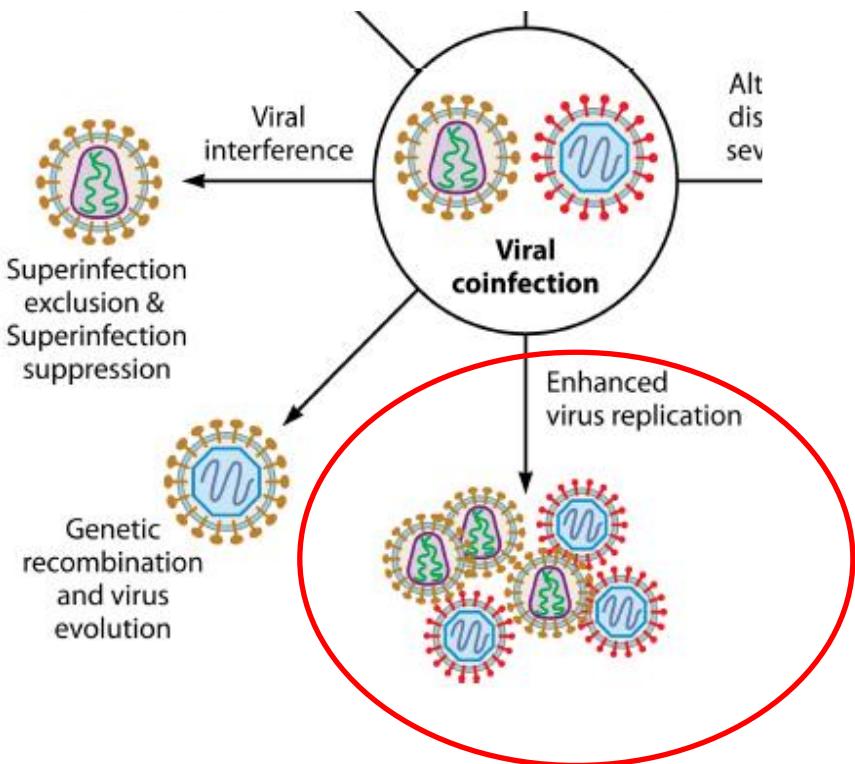
Interference due to vaccination with live-attenuated viruses es. the poliovirus vaccine strain is known to restrict the growth of standard (WT) virus (later, Immune system intervention)

Interazioni non-genetiche tra virus

L'inibizione competitiva non è l'unico risultato della coinfezione.

In esperimenti di coinfezione tra virus respiratori si osserva spesso l'aumento della replicazione di un virus in presenza di un altro virus rispetto alla singola infezione (es. RSV e Influenza)

La coinfezione da CMV/HSV determina una maggiore replicazione del virus e virulenza.



Complementazione

La complementazione risulta dall'interazione dei prodotti virali durante una superinfezione che ha come esito il rilascio di uno o entrambi i virus infettanti (la cui efficienza di replicazione sarà aumentata), che tuttavia possono rimanere inalterati dal punto di vista genetico

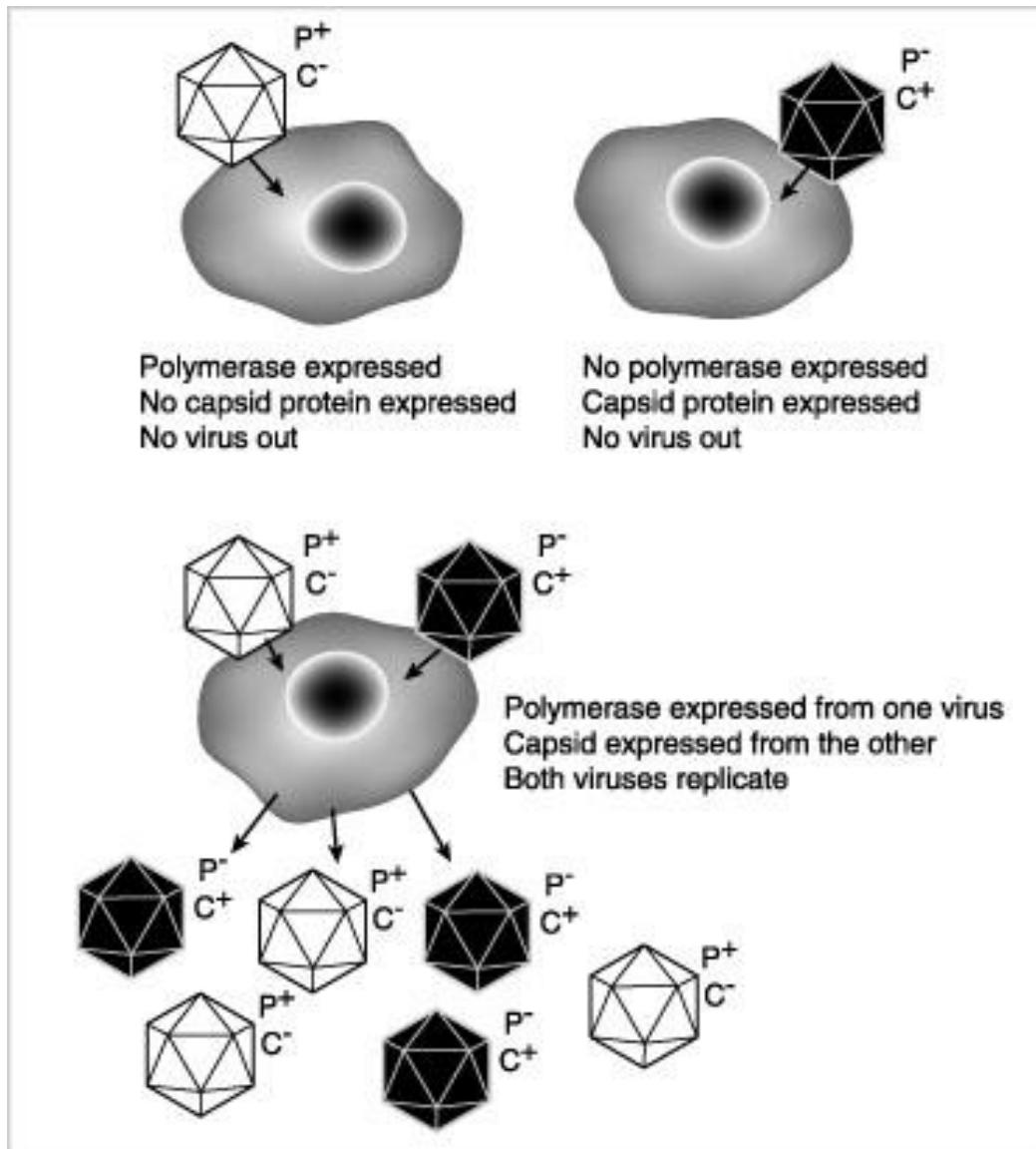
Nella superinfezione uno dei virus fornisce il prodotto funzionale ad un altro virus che è difettivo per quella stessa funzione

Complementazione

Complementazione allelica (intranigenica) si verifica quando differenti mutanti hanno difetti complementanti nella stessa proteina, in diversi domini funzionali, o in diverse subunità di una proteina multimerica (rara)

Complementazione non allelica (intergenica) risulta da mutanti con difetti in geni diversi (la più comune)

Complementazione



Complementazione

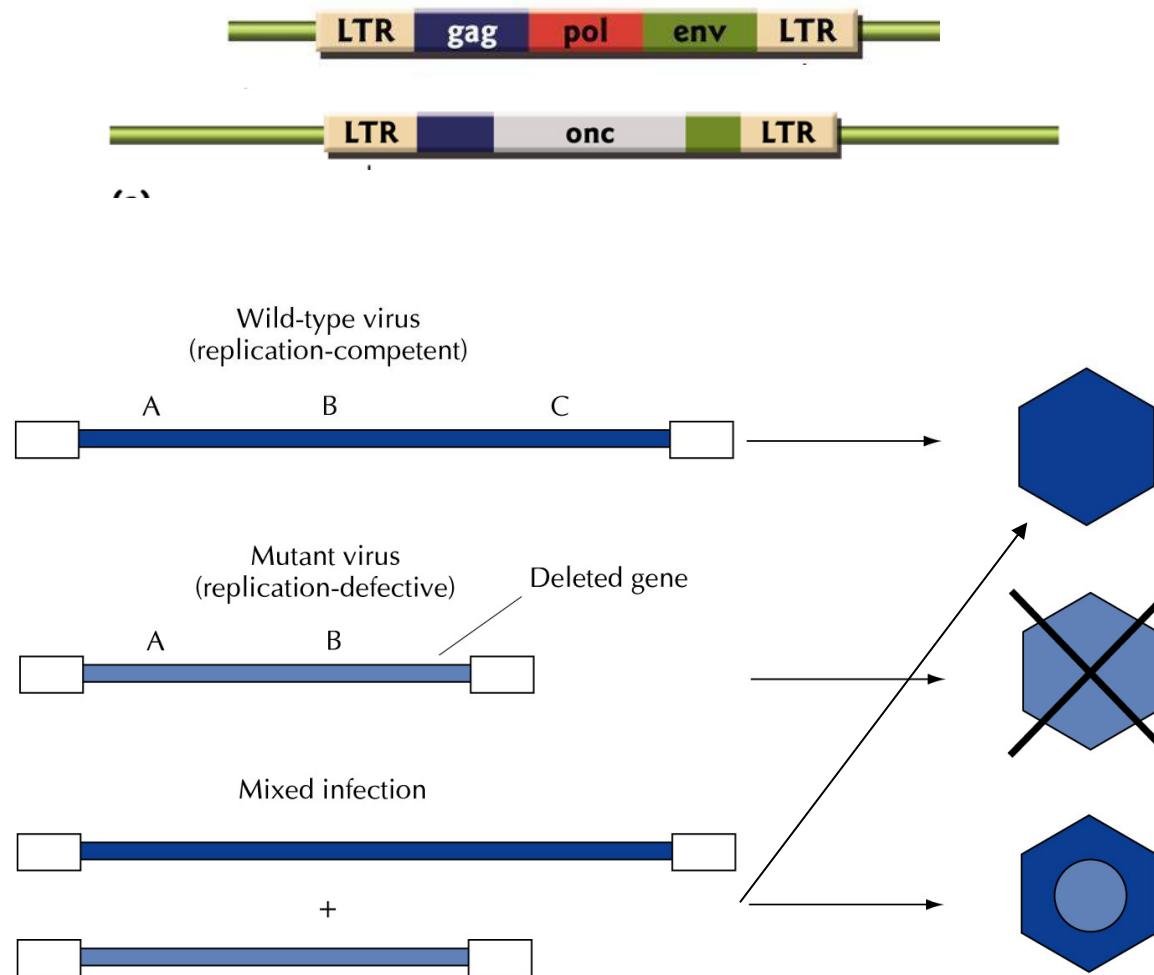
La complementazione può essere **asimmetrica** quando soltanto uno dei virus infettanti trarrà vantaggio.

Un esempio di complementazione asimmetrica presente in natura è rappresentato dalla funzione **helper** esplidata da un virus wt replicazione-competente verso un mutante replicazione-difettivo. In questi casi il wt è definito **virus “helper”**

Alcuni virus stabiliscono un rapporto di parassitismo stabile con altri virus, non necessariamente affini, derivando da questi alcune funzioni di cui mancano.

Un classico esempio è dato dai retrovirus trasformanti contenenti oncogeni (detti trasformanti acuti), generalmente difettivi per la replicazione. Un altro è quello dell'HDV che ha bisogno delle glicoproteine di HBV

Complementazione



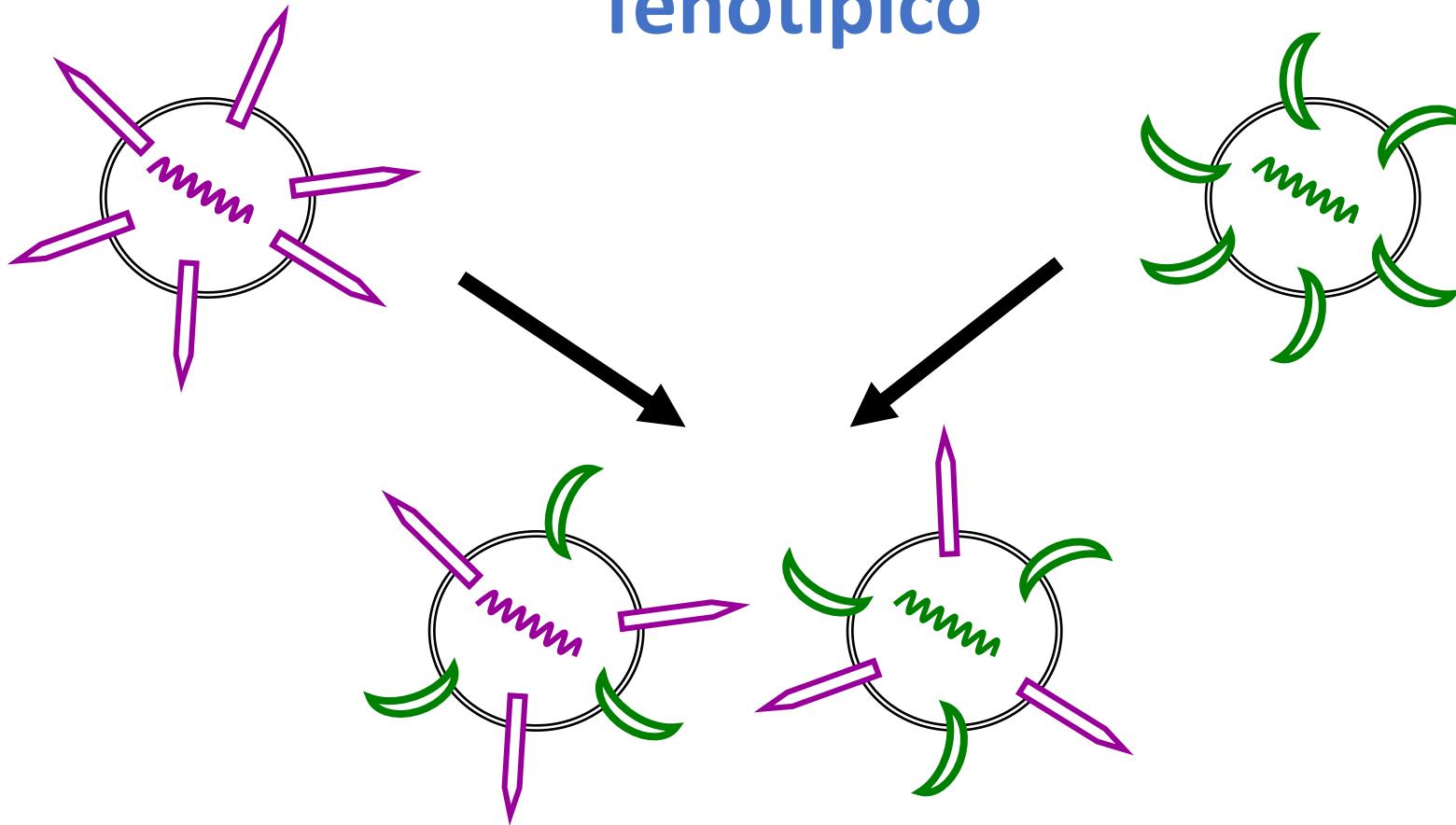
Interazioni non-genetiche tra virus

Il mescolamento fenotipico

Phenotypic mixing: il capsid/envelope della progenie contiene proteine derivanti da entrambi i virus, oppure il genoma di un virus può essere incapsidato nell'involucro di un altro virus (**pseudotyping**).

Il risultato sono virioni fenotipicamente diversi ma privi di qualsiasi modificazione genetica. Nella infezione successiva verranno nuovamente generati i virioni parentali

Il mescolamento fenotipico

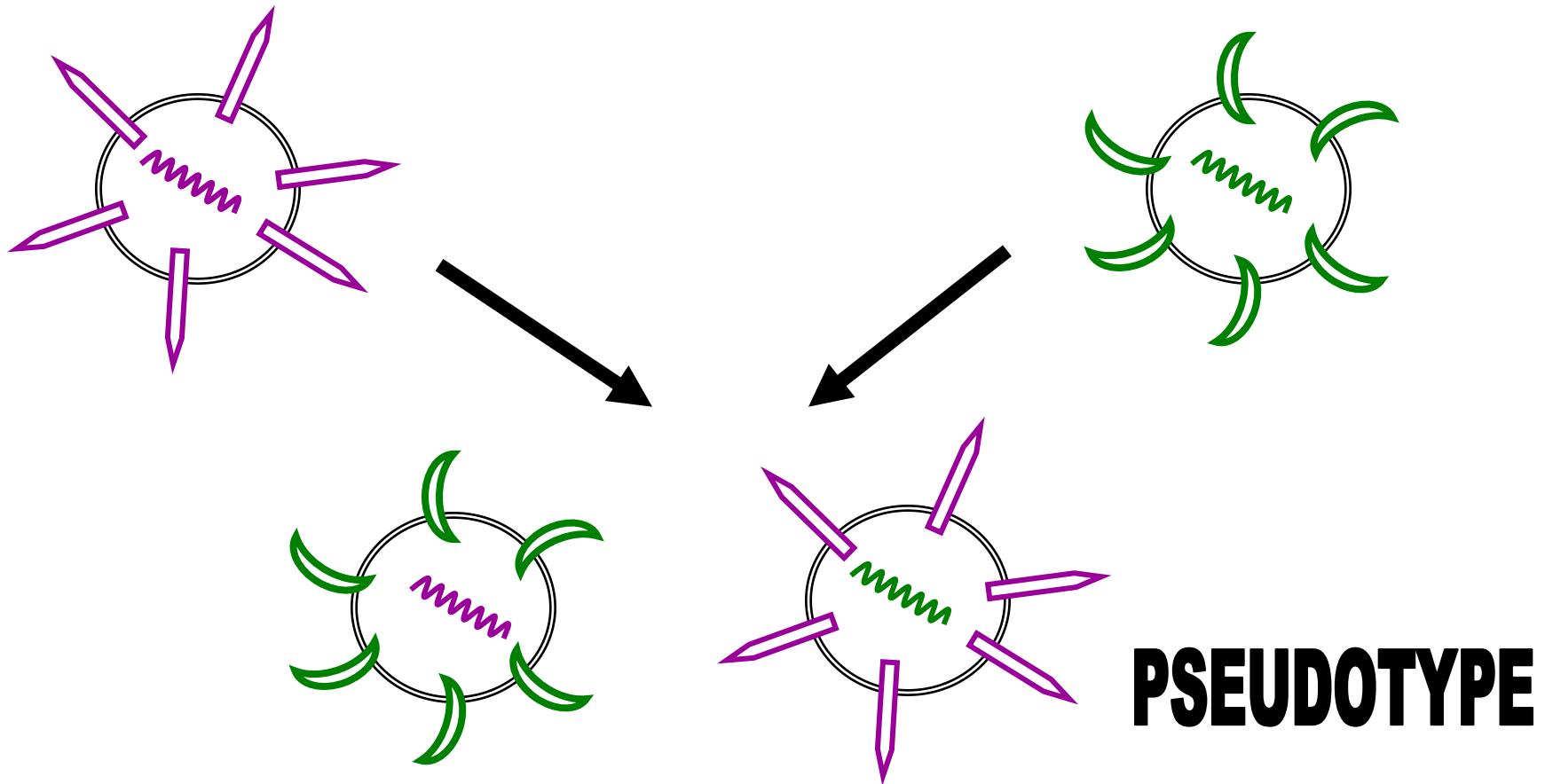


no changes in genome

possibly altered host range

possibly resistant to antibody neutralization

Il mescolamento fenotipico



La creazione degli pseudotipi virali ha molteplici applicazioni nella virologia di base ed applicata

Cell culture and virology: the history

Viruses are obligate intracellular parasites



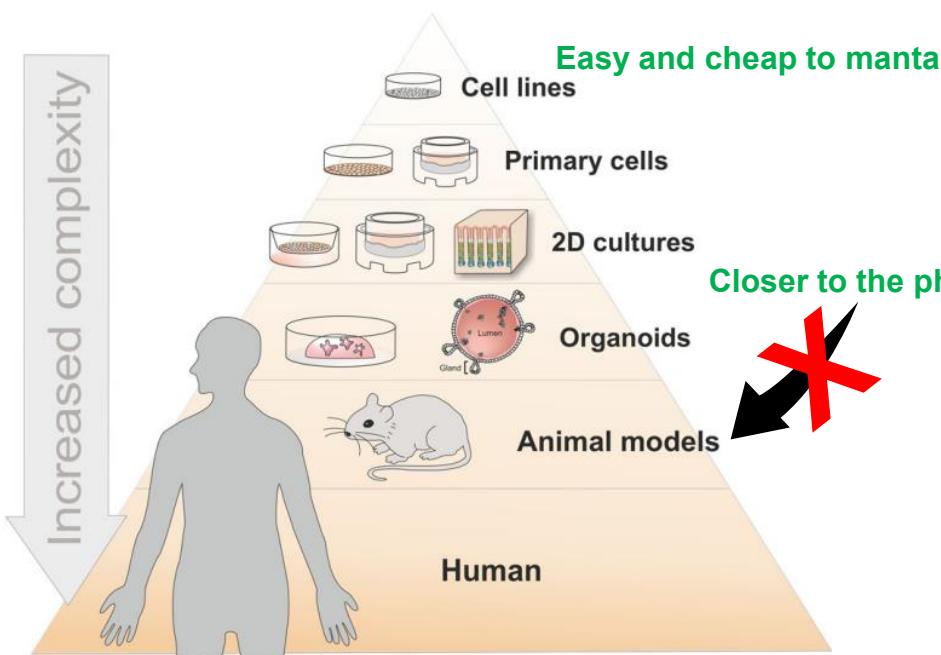
- 1665 – Hooke's *Micrographia* is published and the term „cell“ is used for the first time
- 1676 – A. van Leeuwenhoek presents results of his microscopic observations in a letter to the Royal Society
- 1838-1839 – Schleiden and Schwann formulated the „cell theory“
- 1885 – Roux's first method of cell culture
- 1910 – Carrel, Burrows and Montrose explants of tissue fragments for 2-3 months
- 1916 – Rous and Jones work out trypsinization and subculture methods
- 1925 – The ATCC is established for cell culture technique evaluation
- 1930's – Carrel & Lindbergh's new cell cultures devices
- 1940s – Keilova, Cruikshank & Lowbury introduce antibiotics in tissue culture
- 1943 – Establishment of the first continuous mouse fibroblast cell line (L-cells)
- 1949 – Enders uses cell cultures for growth of virus
- 1955 – Eagle develops defined cell culture media
- 1970s – Kruse develops of laminar-flow cabinets
- 1983 – Genentech produces the first therapeutic protein in cell culture and conducts the human clinical trial
- 1998 – Thomson & Gearhart isolate and culture human embryonic stem cells
- 2006 – Yamanaka obtains induced pluripotent stem cells (iPS)
- 1676 – A. van Leeuwenhoek presents results of his microscopic observations in a letter to the Royal Society
- 1855 – Virchow's theory of tissue formation – 'omnis cellula e cellula'
- 1907 – Harrison establishes method of cell culture in hanging drop and maintains frog embryo nerve fibers *in vitro*
- 1912 – Carrel establishes aseptic techniques for cell cultures
- 1920 – The ECACC is established for cell culture preservation
- 1925 – 1926 – Strangeways & Fell describe differmentation *in vitro* in organ culture
- 1920 – 1930 – Carrel and Ebeling subculture of fibroblastic cell line
- 1940 – 1950 – Development of techniques for cell culture, cultures of antibodies and vaccines
- 1948 – Sanford derives clone 929 from the L cell line
- 1952 – 1955 – Gey establishes the first human cell line
- 1965 – Hayflick defined finite life span of human cells
- 1975 – Kohler & Milstein develop first hybridoma cell lines
- 1992 – SkinEthic produces human tissue and neural stem cells cultured *in vitro*
- 2002 – Atala & Lanza exploit tissue engineering
- 2010+ – Atala demonstrates 3D tissues and organs bioprinting techniques

- **1913:** VACV grown in cell culture
- **1930s:** YFV and Poxvirus grown for vaccine production
- **1950:** First virus (poliovirus) grown in cultures of various human embryonic tissues

1949 John Franklin Enders, Thomas Huckle Weller, and Frederick Chapman Robbins reported successful *in vitro* culture of poliovirus aiding polio vaccine research and basic virology.

1952 Renato Dulbecco developed plaque assays for animal viruses and quantitative methods for measuring viral growth

Cell culture models



Primary cells: freshly isolated from organ tissue and maintained for growth in vitro

- ✓ most closely represent the tissue of origin;
- ✓ have a limited lifespan and will stop dividing (or senesce) after a certain number of cell divisions;
- ✓ can be more difficult to culture and maintain than a continuous cell line.

Continuous cell lines: cells that have acquired the ability to proliferate indefinitely (immortalized) either through random mutation as in transformed cancer cell lines, or by deliberate modification such as artificial expression of cancer genes.

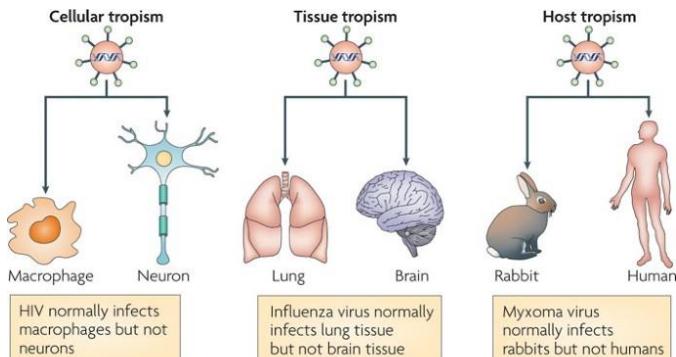
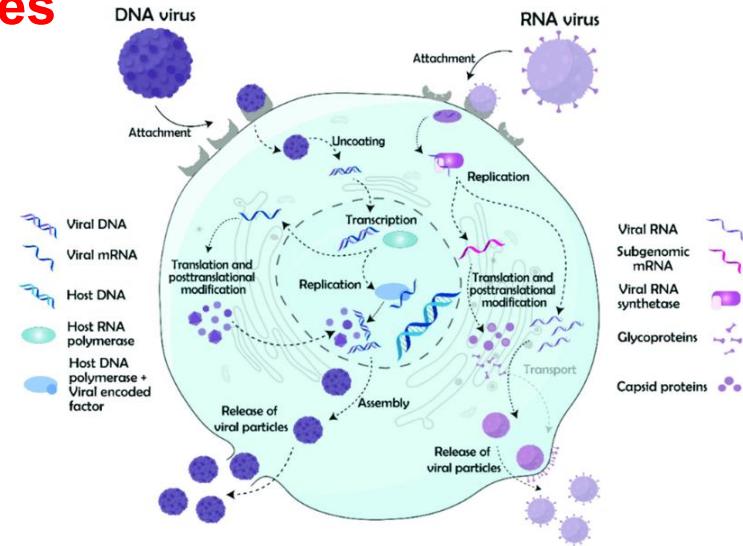
- ✓ more robust and easier to work with than primary cells.
- ✓ have unlimited growth potential and are a quick, easy way to get basic information.
- ✓ they are genetically modified/transformed, lack the authentic characteristics of the original tissue

Cell Cultures: A Laboratory Tool for Studying Viruses

Viruses are obligate intracellular parasites

They require a living cell to replicate using the machinery of the host cell

- **Susceptibility:** virus ability to enter in the cells
- **Permissivity:** virus ability to replicate in the cells giving rise to progeny viruses

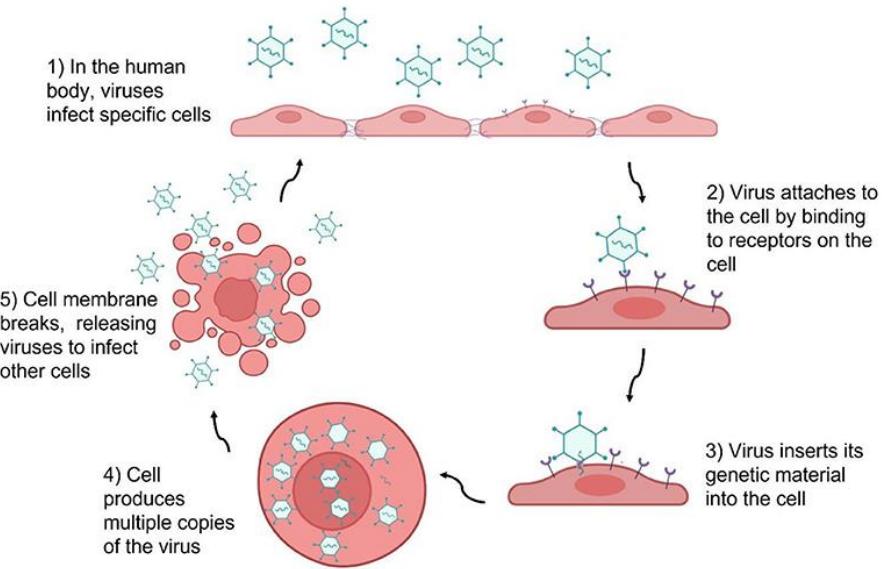
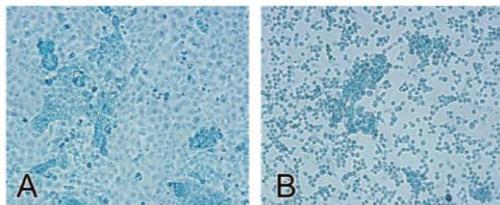


Tropism: ability of a given virus to productively infect a particular cell, tissue, or host species
[receptors and anti-viral immunity]

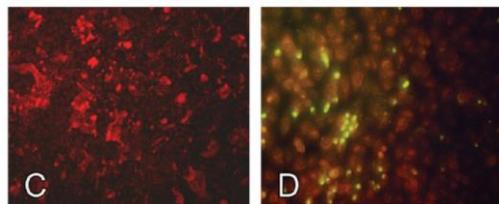
Viral infection on cell culture

How do we assess the viral infection?

1) **cytopathic effect (CPE) of the virus** = microscopic examination for the degenerative changes in monolayer cells that provide evidence of viral presence



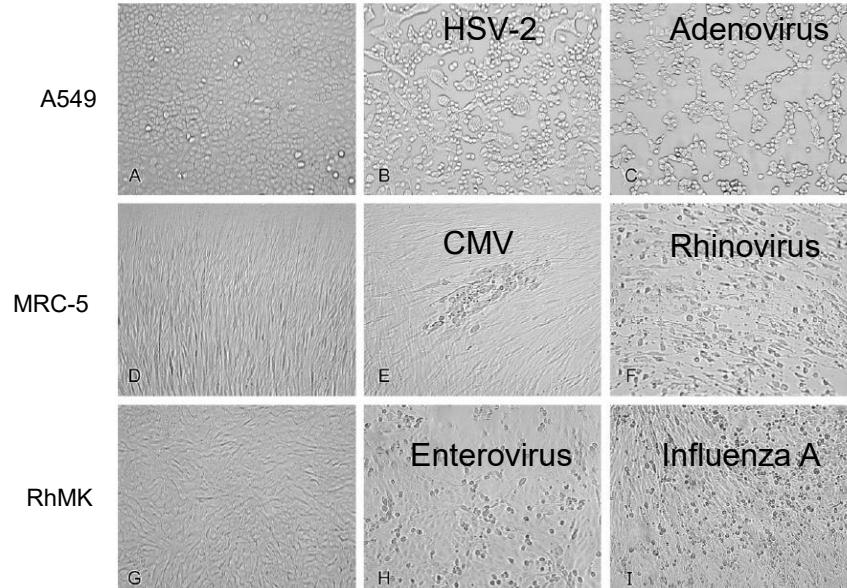
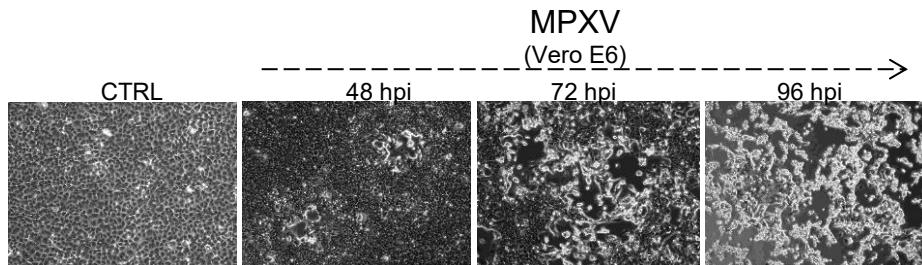
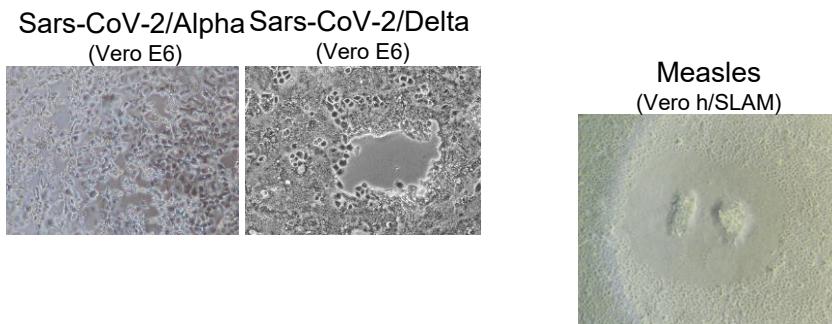
2) Presence of the viral **nucleic acid** (PCR, RT-PCR, ISH)



4) Visualization through Electron Microscopy

The Cytopathic effect

- The degree of visible cell damage **varies between viral species and host cell lines**
- Some viruses cause little to no CPE in host cells, while others can destroy the host cell population
- CPE include focal degeneration, vacuolization, cellular fusion (syncytia), or host cell death



Leland et al., 2007

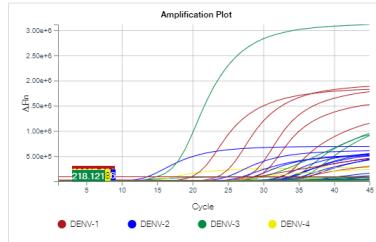
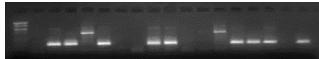
- Daily observation of the cultures to monitor the CPE!

Rilevamento dell'acido nucleico virale

Metodi molecolari: ricerca diretta del genoma e dei trascritti virali in campioni biologici, surnatanti di coltura, cellule/tessuti infettati in vitro...

Amplificazione dell'acido nucleico

Polymerase Chain Reaction (PCR) e Reverse Transcription PCR (RT-PCR)



Test di screening dei donatori basato su real-time PCR per chikungunya e virus dengue



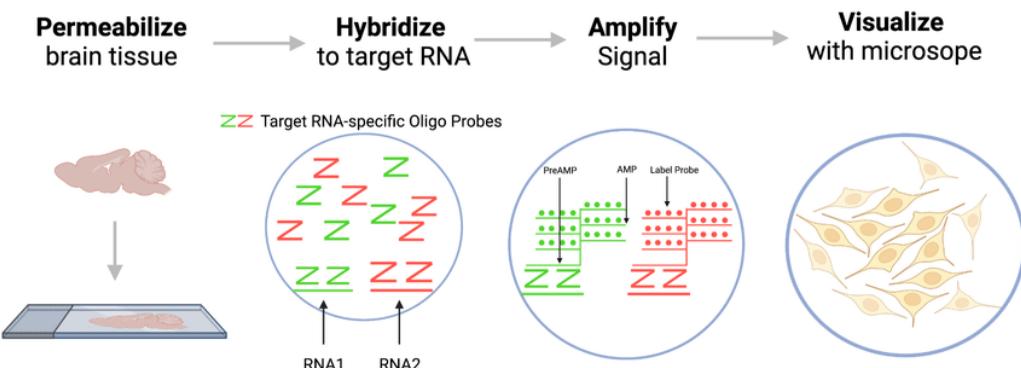
Sviluppati metodi basati su amplificazione isoterma, di quantificazione diretta ecc (TMA, LAMP, ddPCR)

Rilevamento dell'acido nucleico virale

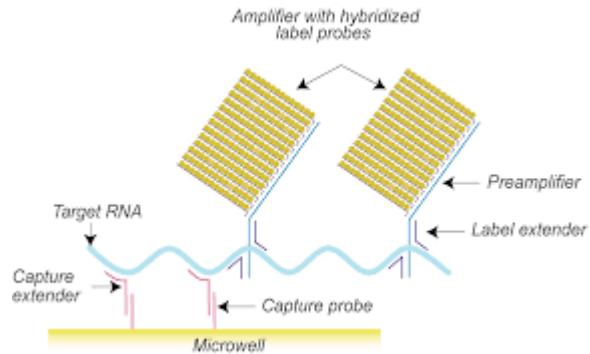
Metodi molecolari: ricerca diretta del genoma e dei trascritti virali in campioni biologici, surnatanti di coltura, cellule/tessuti infettati in vitro...

Ibridazione ed Amplificazione del segnale

Ibridazione in situ (ISH, FISH)



Branched DNA (bDNA)





Sequenziamento virale



≈ 4-5 giorni

- Approccio ad ampliconi (targeted)

Sequenziamento di una specifica regione genica (o più regioni per l'intero genoma) mediante metodica Sanger o NGS (maggiore profondità di sequenziamento)

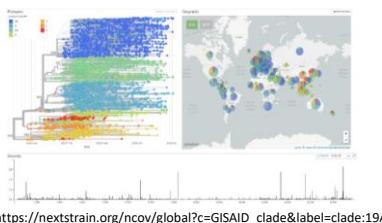


≈ 6-10 giorni

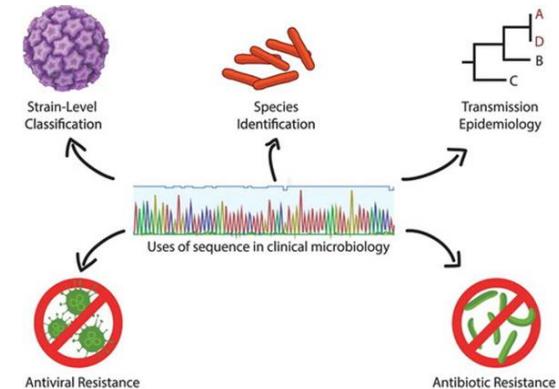
- Approccio shot-gun (unbiased)

Sequenziamento di tutto il materiale genomico del campione

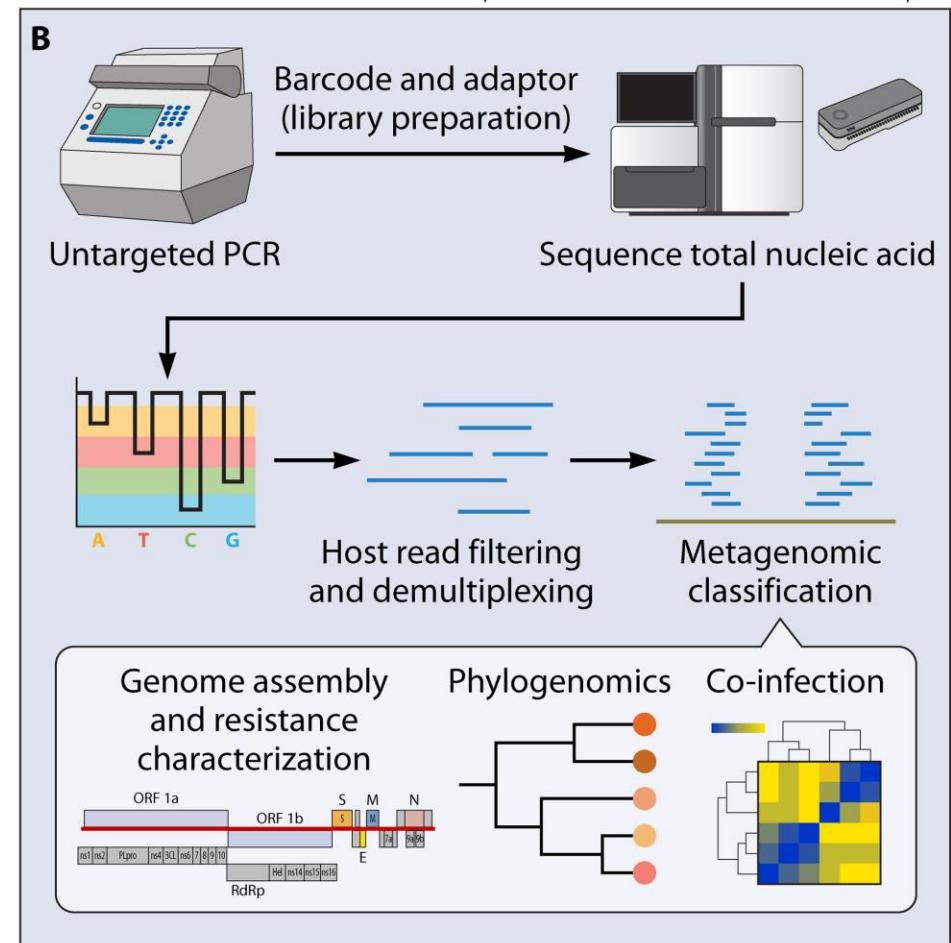
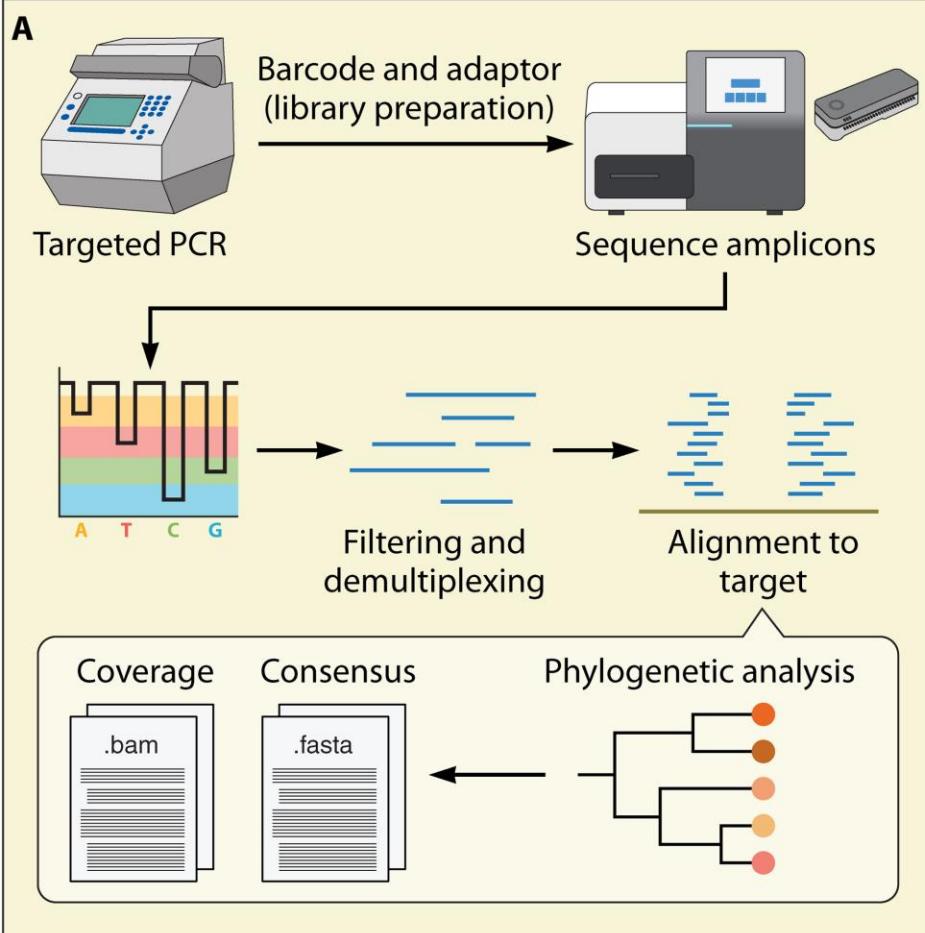
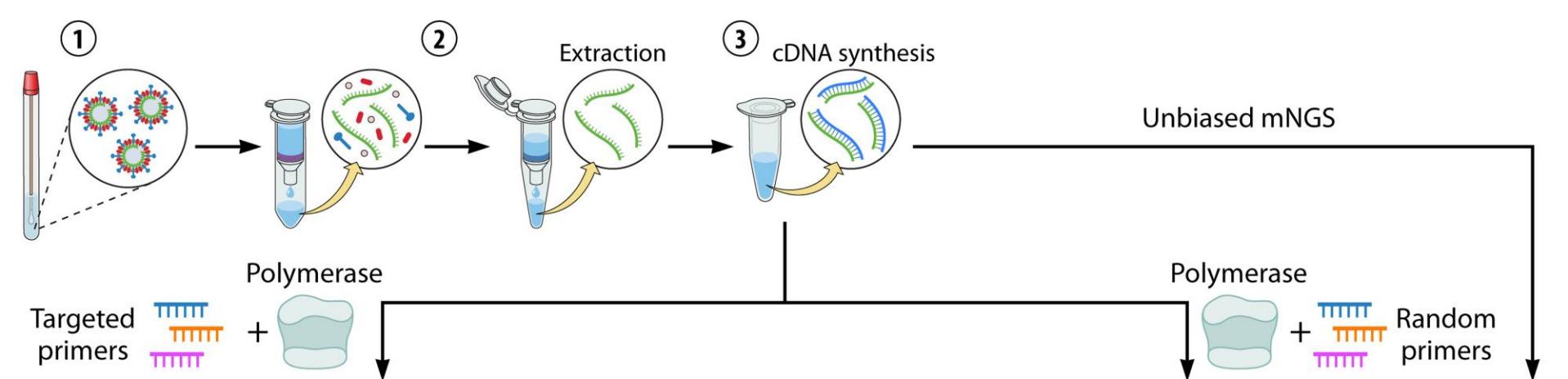
- Caratterizzazione genetica del virus
- Conferma diagnostica
- Filogenesi e epidemiologia molecolare (es., cluster, fonte)



https://nextstrain.org/ncov/global?c=GISaid_clade&label=clade:19A



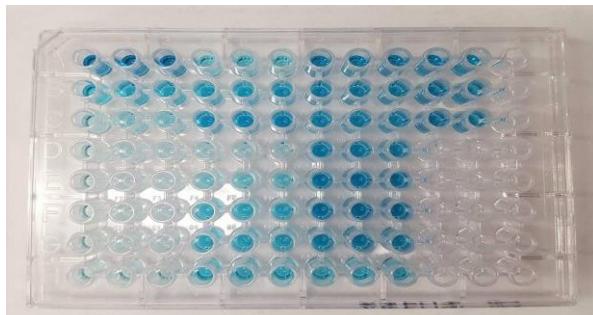
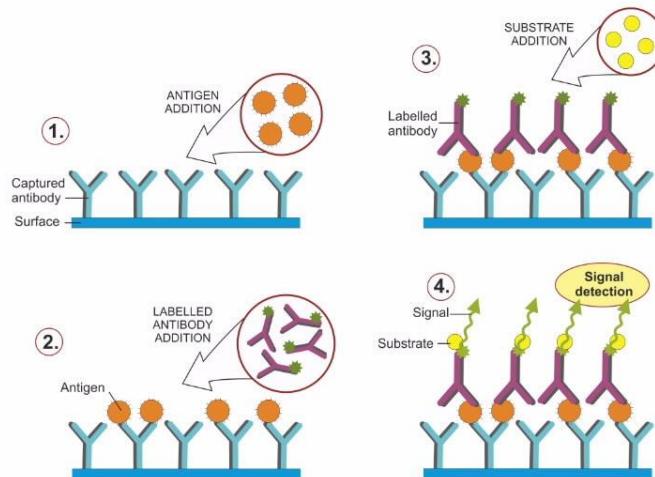
Le sequenze ottenute vengono rese disponibili alla comunità scientifica tramite le banche dati



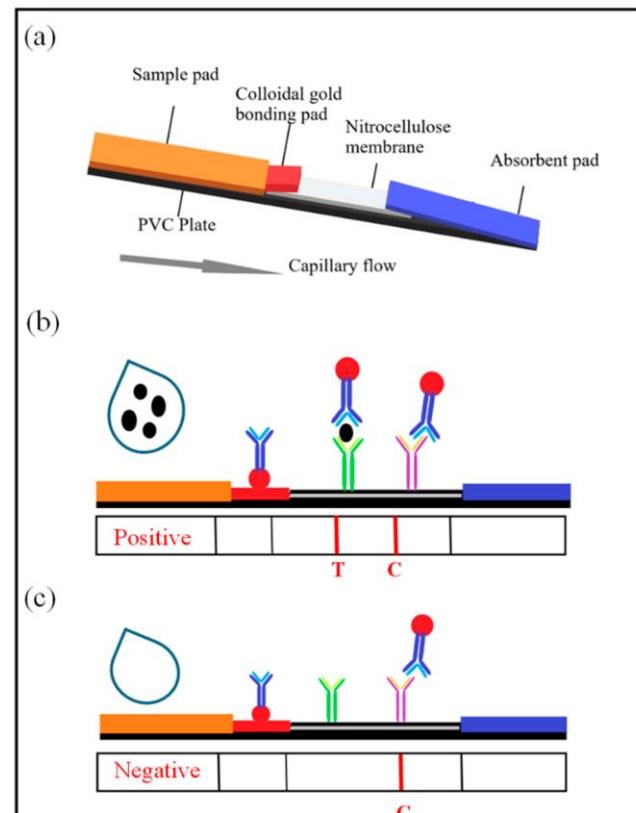
Rilevamento dell'antigene virale

Metodi immunoenzimatici ed immunocromatografici: ricerca diretta delle proteine virali in campioni biologici, surnatanti di coltura, cellule/tessuti infettati in vitro...

ELISA (Enzyme linked Immunosorbent assay)



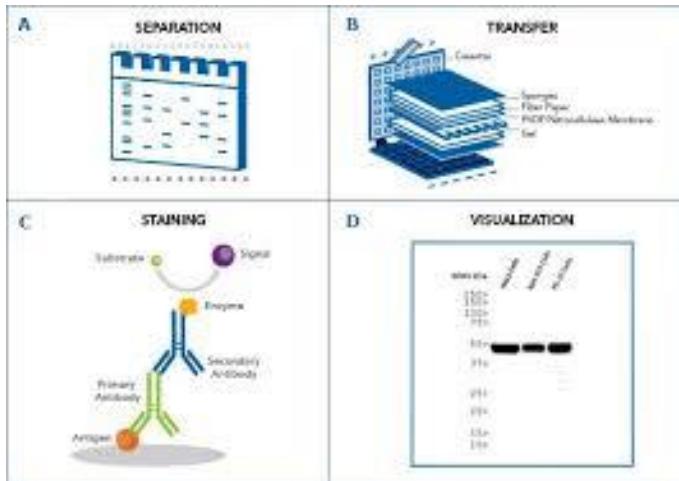
Test Immunocromatografico



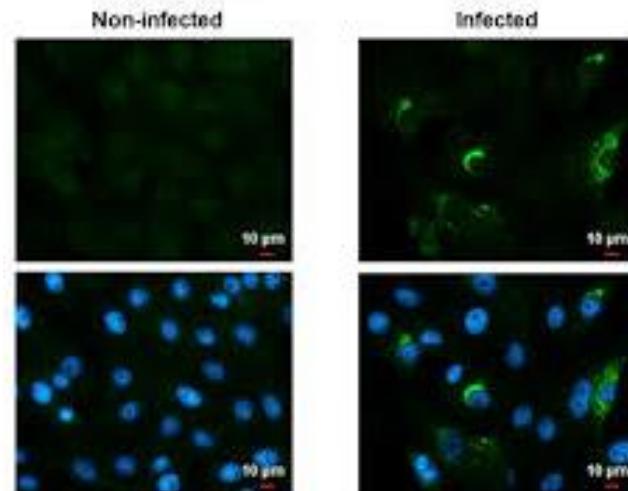
Rilevamento dell'antigene virale

Metodi immunoenzimatici ed immunocromatografici: ricerca diretta delle proteine virali in campioni biologici, surnatanti di coltura, cellule/tessuti infettati in vitro...

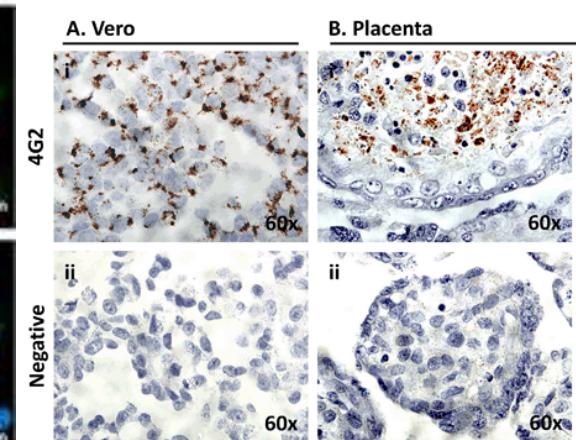
Western Blot



Immunofluorescenza diretta

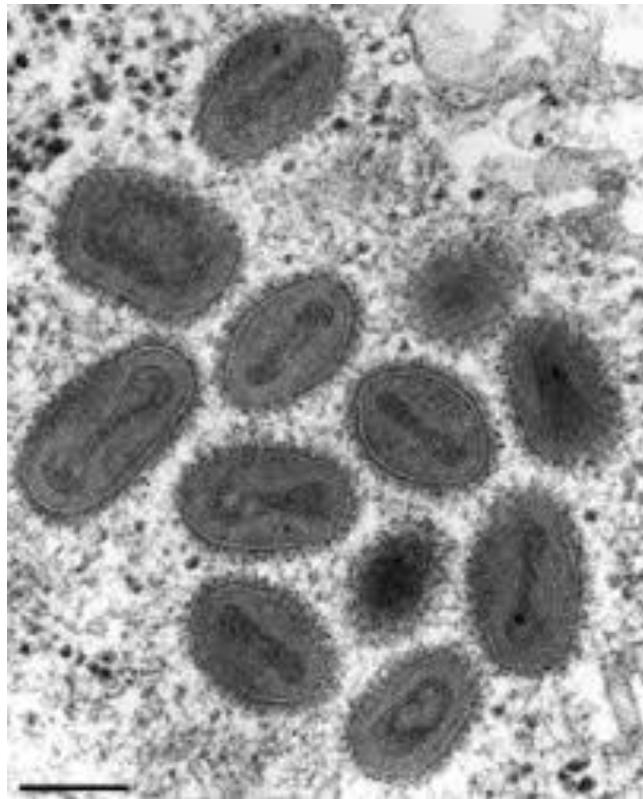


Immunoistochimica

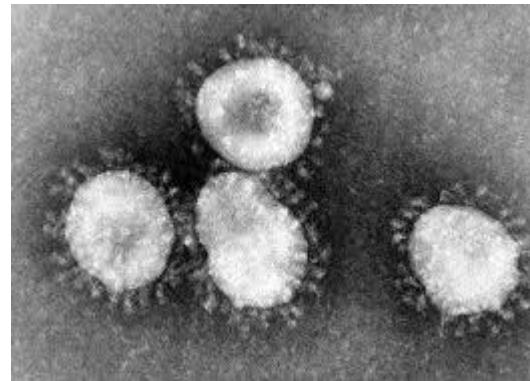


Visualizzazione del virus

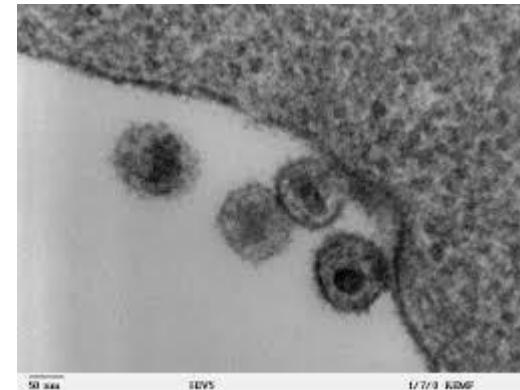
Microscopia elettronica



POXVIRUS

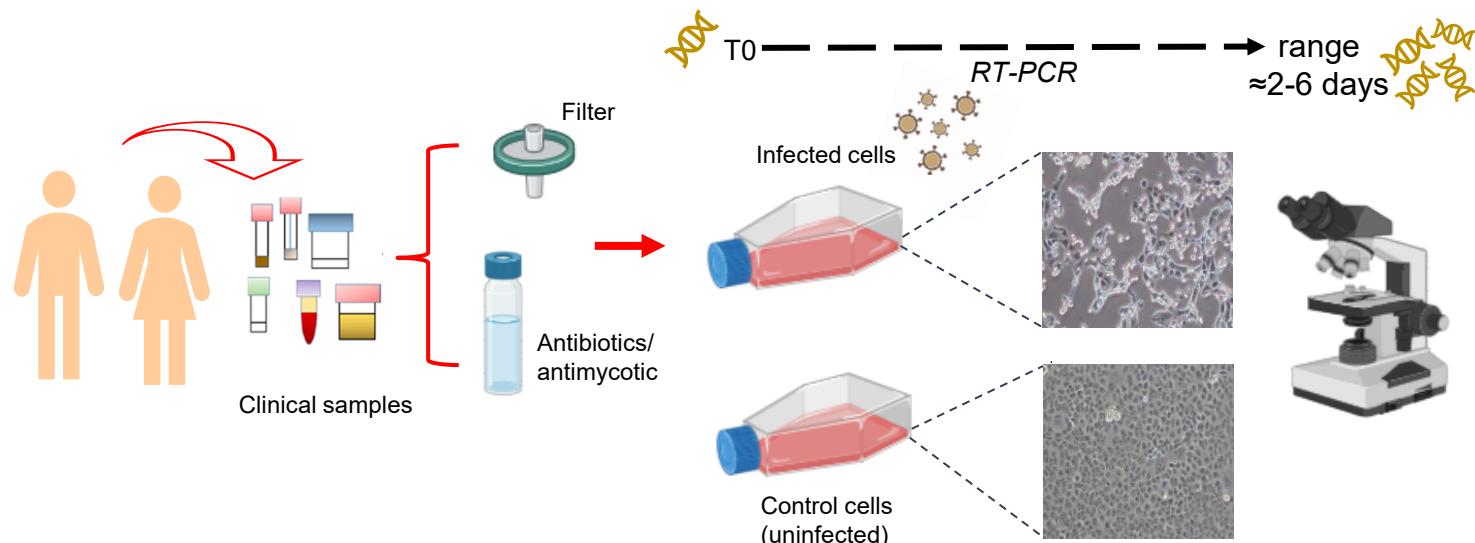


CORONAVIRUS



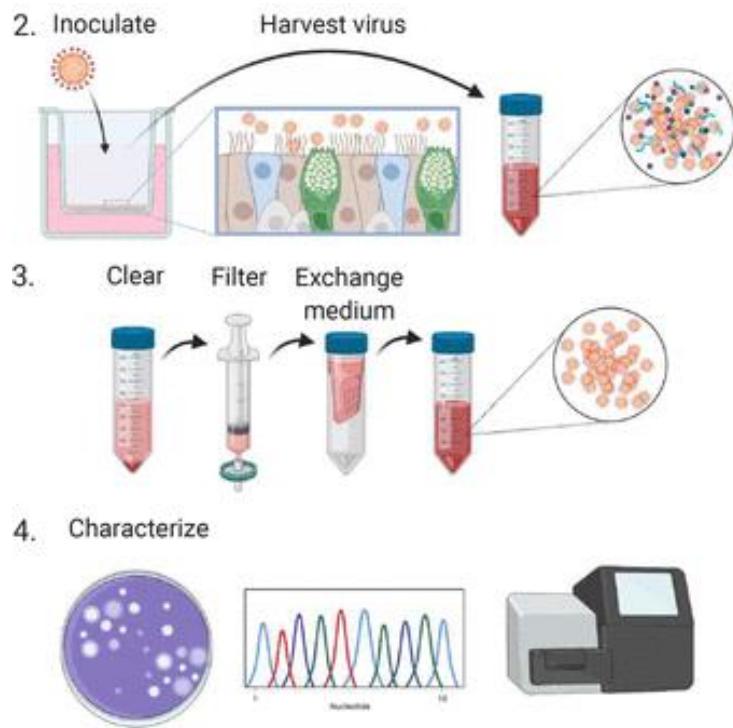
HIV

Viral isolation from biological samples



- The use of the most suitable cell types and the appropriate selection, collection, transport, storage and processing of the clinical samples are important for successful viral isolation.
- Several factors can affect the viral isolation, resulting in the inability to establish real viability and infectivity (suboptimal sensitivity of the protocol – correlation with the viral load, non adequate storage of the samples, contaminants and cytotoxicity of the specimen, or the presence of antibodies against the virus in the clinical samples)

Dall'isolato allo stock virale

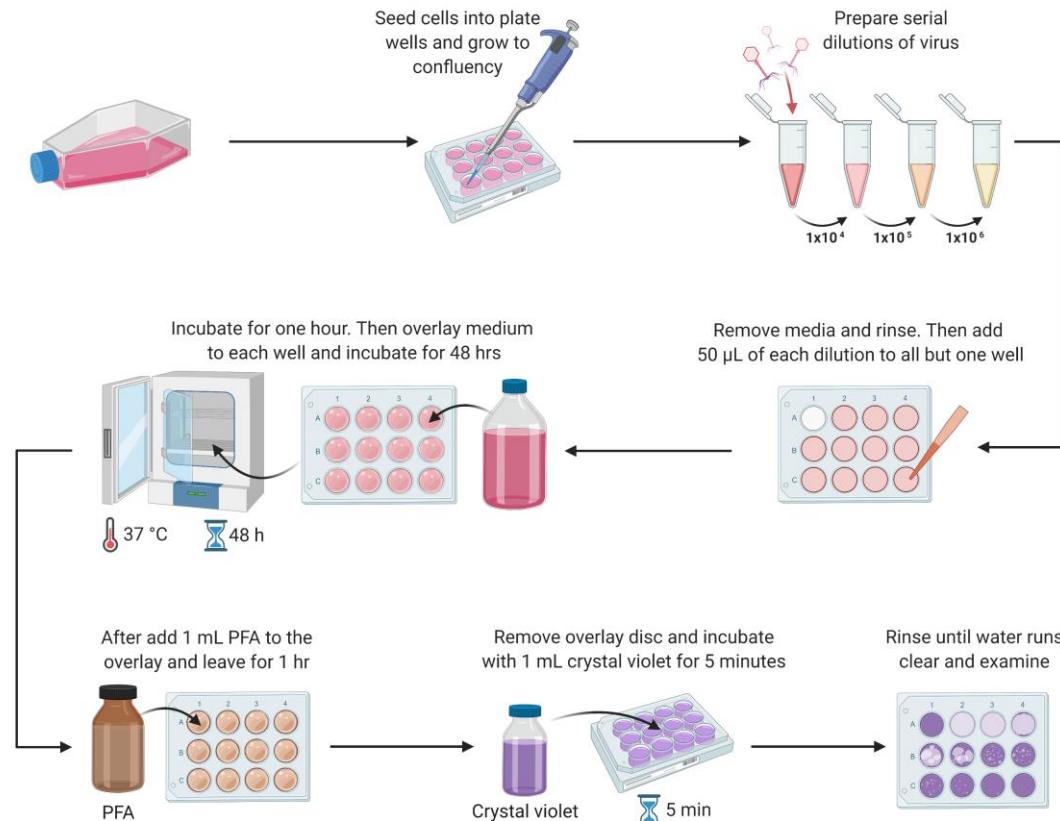


L'isolato virale viene amplificato tramite passaggio su coltura di cellule suscettibili e permissive

Il ceppo virale così ottenuto viene caratterizzato ed utilizzato per applicazioni di ricerca di base ed applicata e per applicazioni diagnostiche

Titolazione virale

La titolazione virale è un metodo per quantificare le particelle virali infettanti: metodo delle placche e metodo della diluizione limite



Pfu/ml=plaque forming unit/ml

TCID50/ml=Tissue culture infectious unit/ml

Titolazione virale

La titolazione virale è un metodo per quantificare le particelle virali infettanti: metodo delle placche

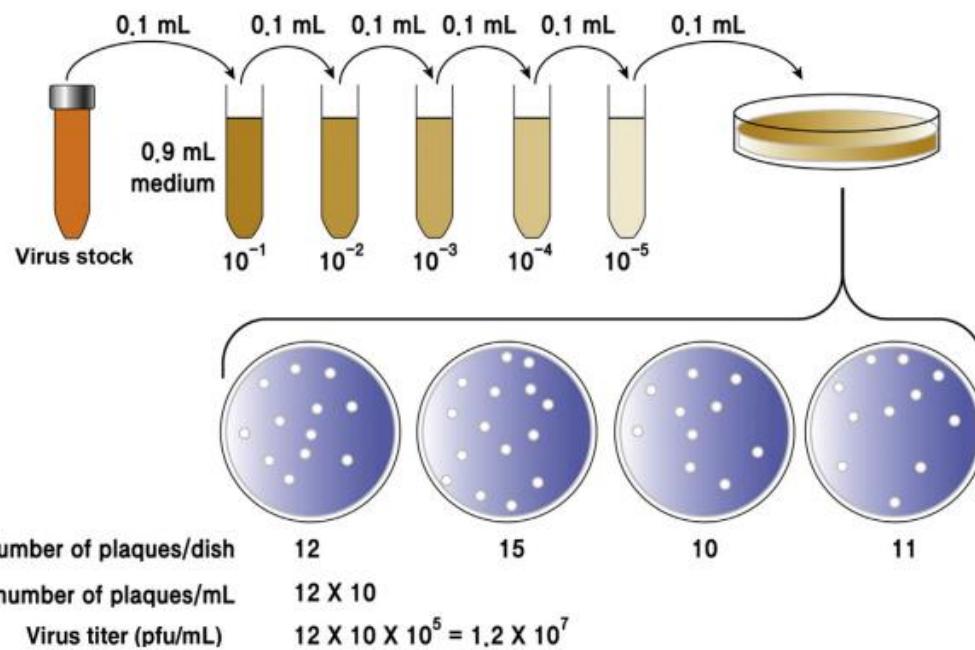


FIGURE 4.10 Virus quantification by plaque assay. This assay is based on a microbiological method conducted in a plate. Specifically, a confluent monolayer of host cells is infected with the virus at varying dilutions and covered with a semisolid medium, such as agar, to prevent the virus infection from spreading indiscriminately. Plaque formation can take about 10–14 days, depending on the virus being analyzed. Plaques are generally counted manually and the results, in combination with the dilution factor used to prepare the plate, can be used to calculate the number of pfu per sample unit volume (pfu/mL).

Pfu/ml=plaque forming unit/ml

TCID50/ml=Tissue culture infectious unit/ml

Titolazione virale

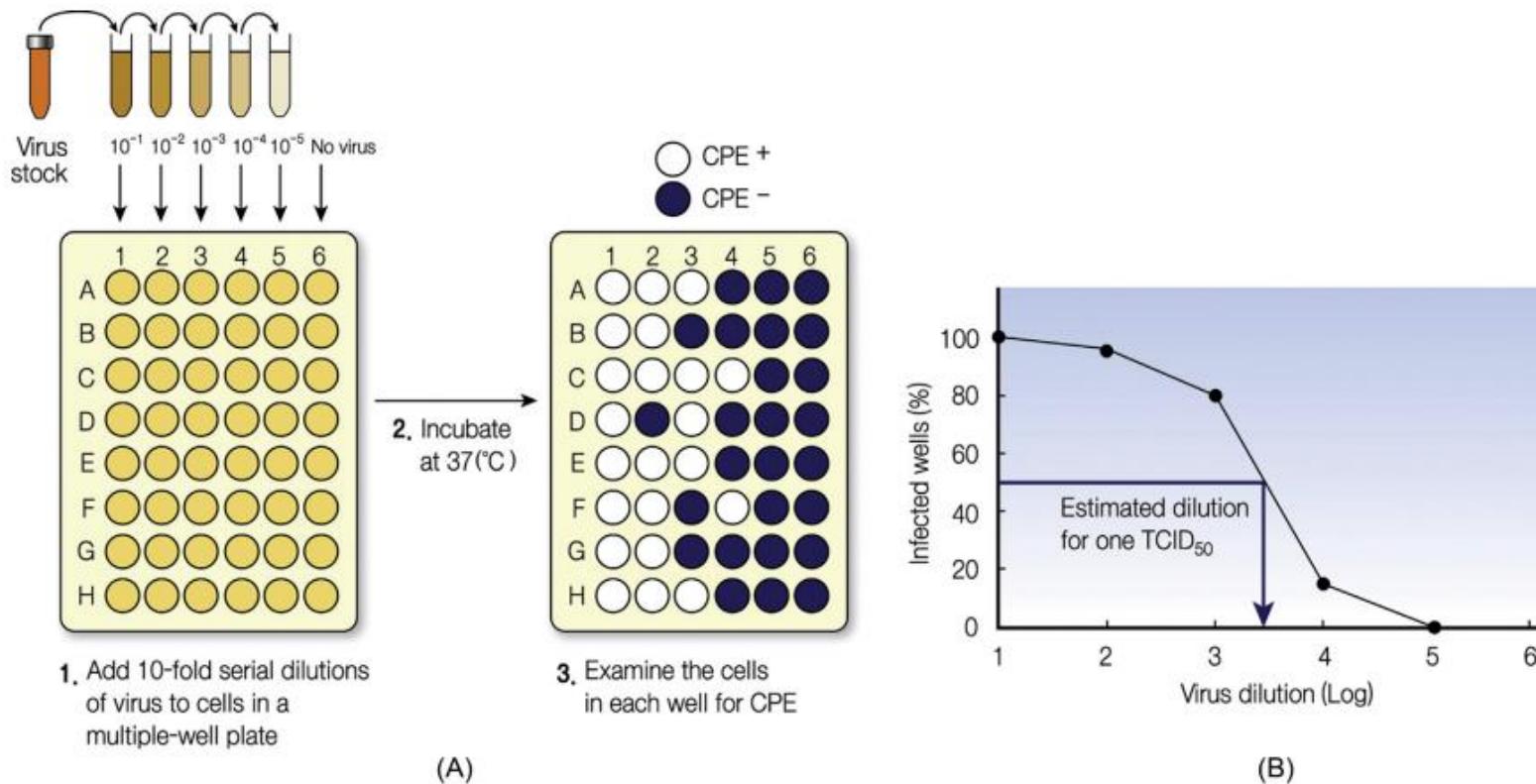


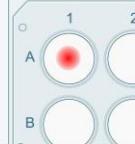
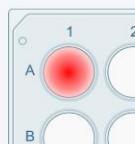
FIGURE 4.11 End-point dilution assay. (A) A diagram illustrating the steps involved in the end-point dilution assay. The virus inoculum in each dilution are seeded into multiple cells. The presence of CPE in each well is denoted in dark blue. (B) Estimation of TCID₅₀ value. The percentages of CPE in each dilution are plotted against the logarithmic value of the dilutions in X-axis. The arrowed line shows how TCID₅₀ can be obtained from the graph.

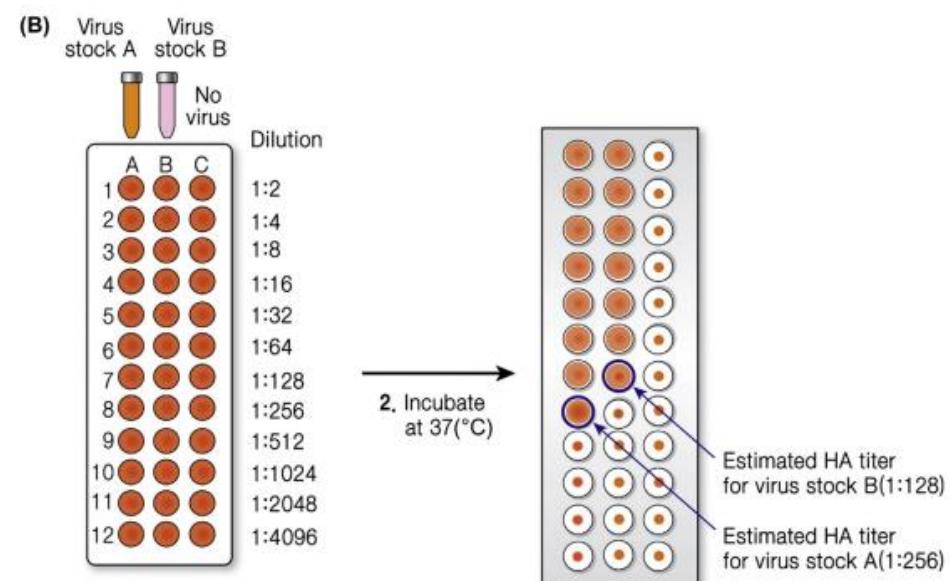
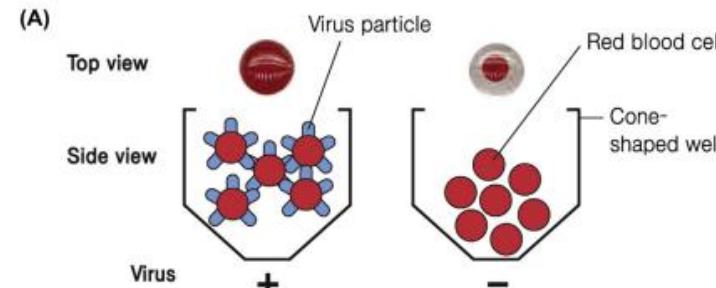
Pfu/ml=plaque forming unit/ml

TCID₅₀/ml=Tissue culture infectious unit/ml

Titolazione virale

Saggi di emoagglutinazione per il virus influenzale

	Components	Interaction	Microtiter test results
A	RBC		No reaction 
B	Virus RBC		Hemagglutination 

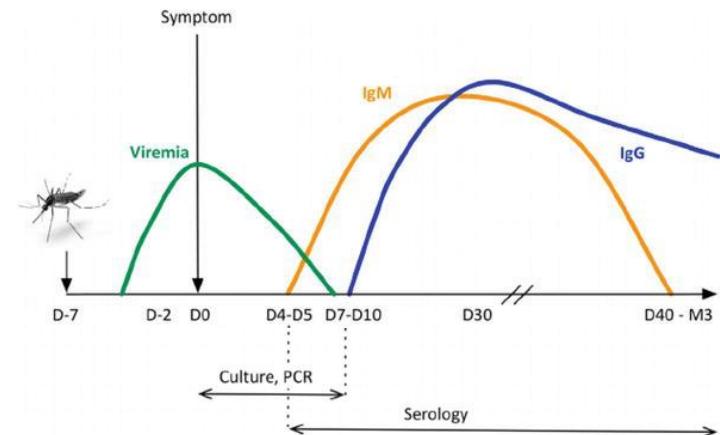
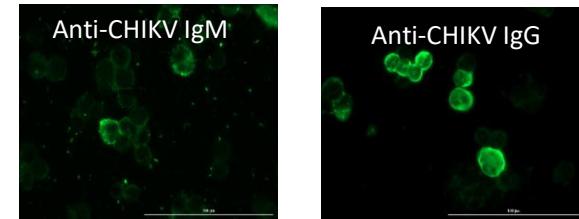
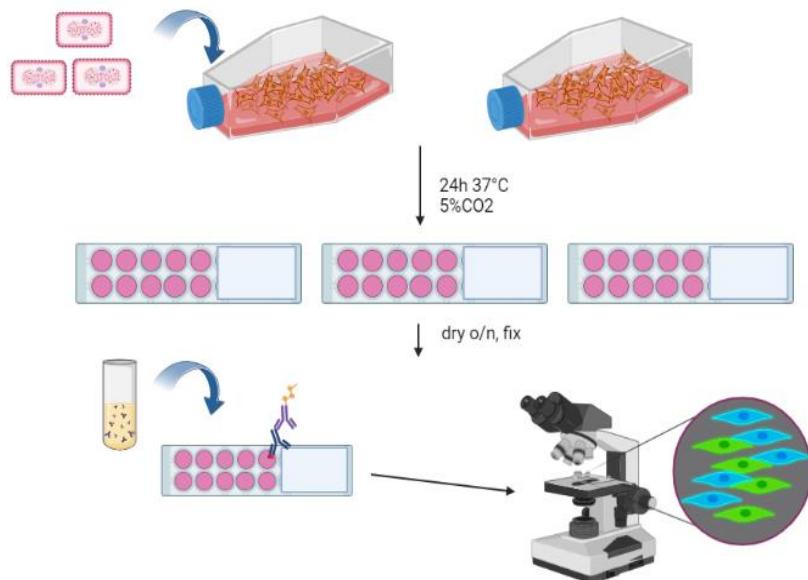


1. Add twofold serial dilutions of virus to red blood cells in a 96-well plate

3. Examine the cells in each well for hemagglutination

Rilevamento degli anticorpi diretti contro il virus

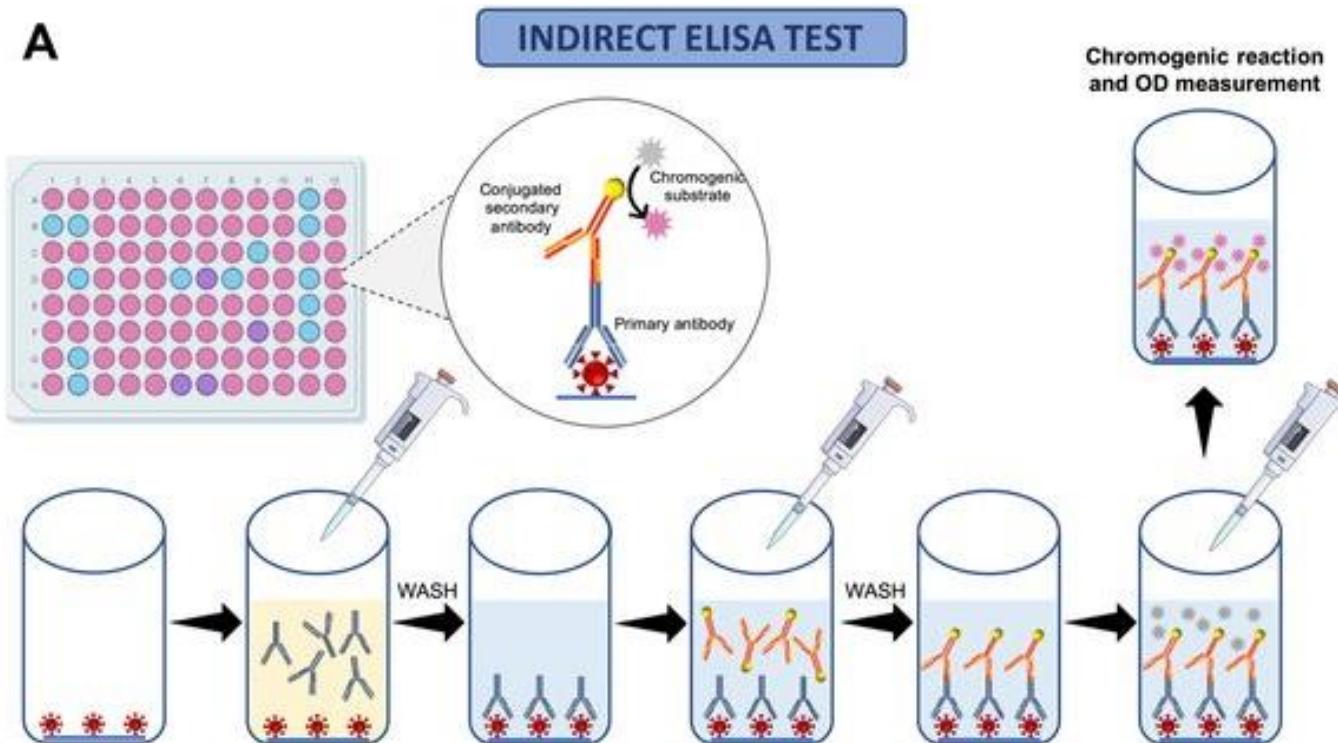
Immunofluorescenza indiretta



Rilevamento degli anticorpi diretti contro il virus

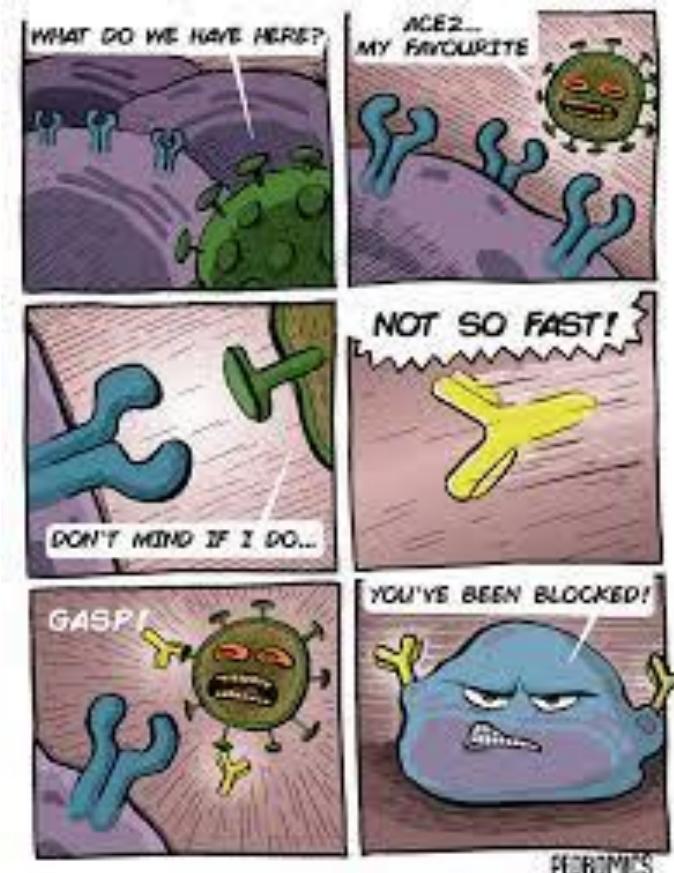
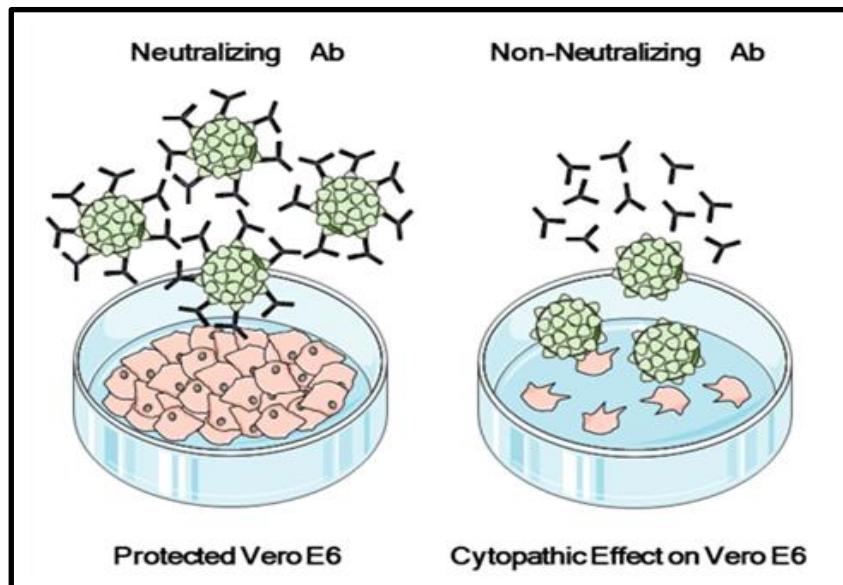
ELISA indiretto

Indirect ELISA protocol from antigen coating to antibody binding and detection



Rilevamento degli anticorpi neutralizzanti il virus

Neutralizing antibodies (nAbs) are able to bind free virus and prevent it from infecting the cells The nAbs response can be elicited by natural infection or vaccination



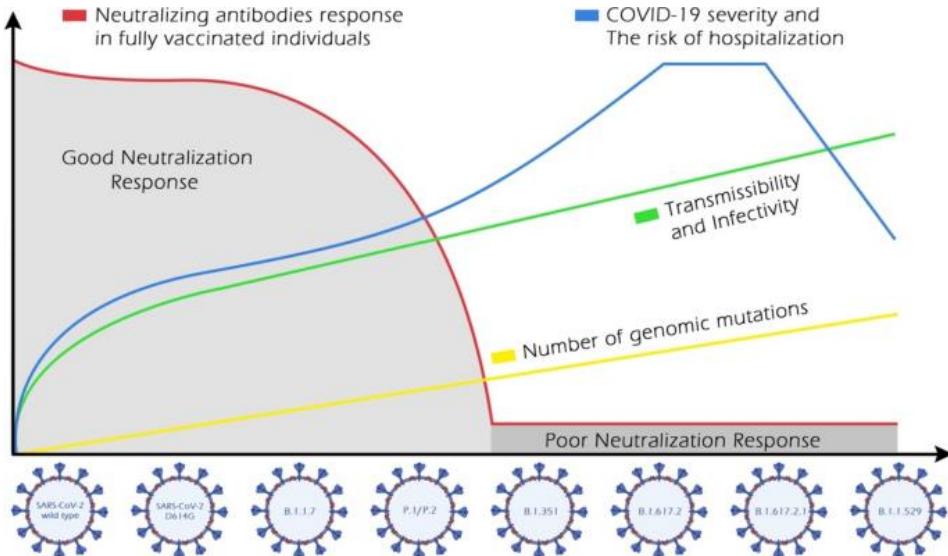
Rilevamento degli anticorpi neutralizzanti il virus

Ci sono differenti protocolli che si basano su virus vivo o su pseudotipi esprimenti le glicoproteine di superficie del virus di interesse.

Si utilizzano saggi di microneutralizzazione (MNT) e saggi di riduzione del numero delle placche (PRNT).

L'evasione dalla risposta immunitaria neutralizzante è un meccanismo alla base dell'evoluzione virale.

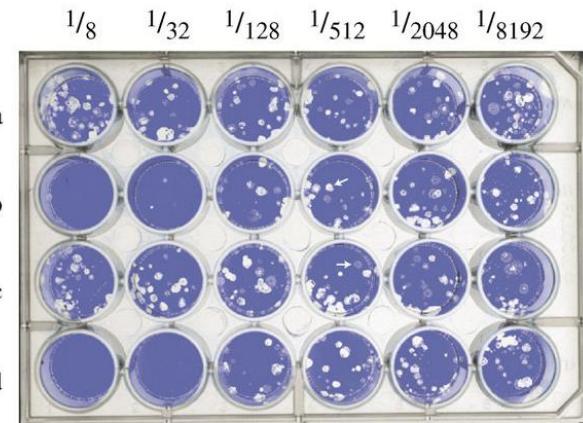
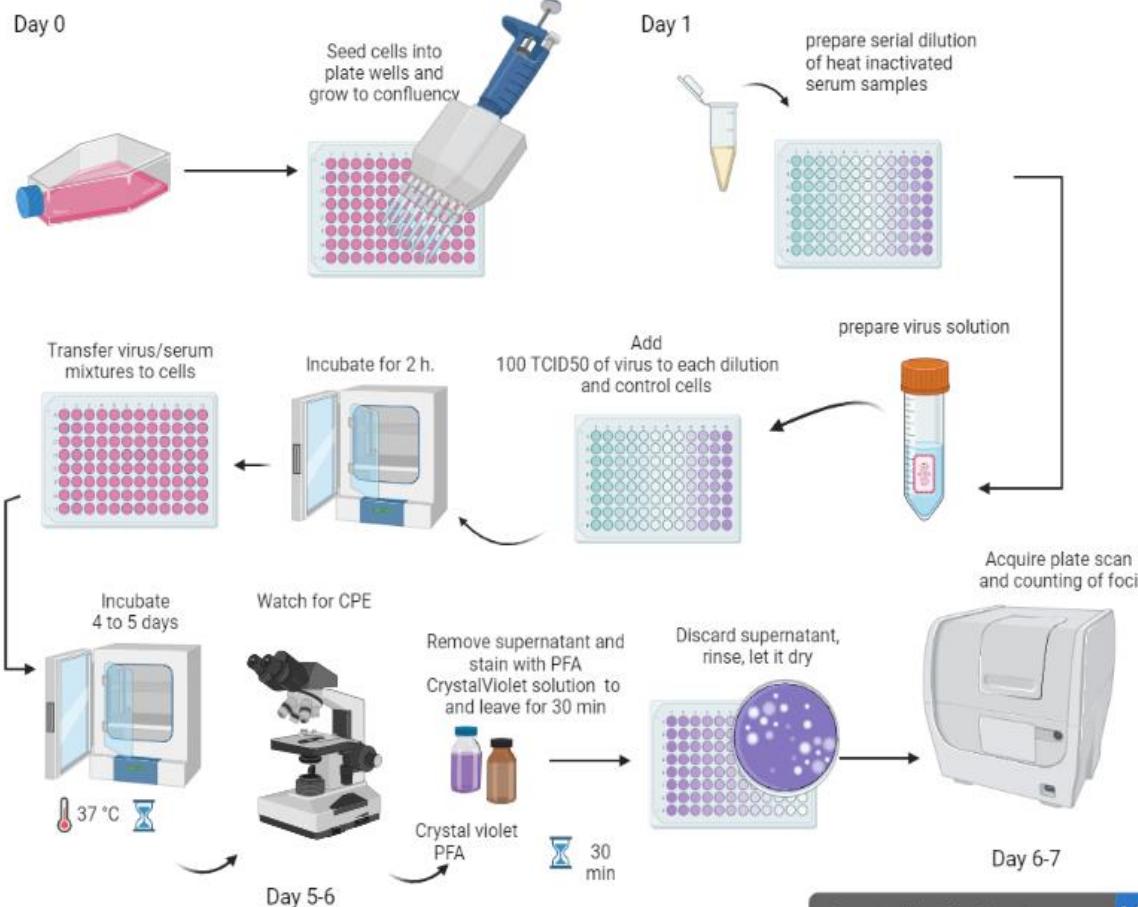
Il virus che sfugge all'azione degli anticorpi neutralizzanti ha un vantaggio evolutivo.



L'aggiornamento dei vaccini COVID-19 si è reso necessario con il proliferare di varianti in grado di evadere la risposta neutralizzante.

Rilevamento degli anticorpi neutralizzanti il virus

PRNT



Diluizioni seriali di siero in contatto con dose fissa di virus
Si guarda alle diluizioni inibenti il legame tra virus e anticorpi

Biosafety levels to be considered!

Risk Group 1

A microorganism that is unlikely to cause human or animal disease.



Risk Group 2

A pathogen that can cause human or animal disease but is unlikely to be a serious hazard to laboratory workers, the community, livestock or the environment. Laboratory exposures may cause serious infection, but effective treatment and preventive measures are available and the risk of spread of infection is limited.



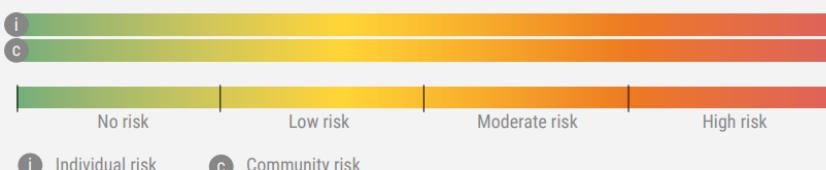
Risk Group 3

A pathogen that usually causes serious human or animal disease but does not ordinarily spread from one infected individual to another. Effective treatment and preventive measures are available.



Risk Group 4

A pathogen that usually causes serious human or animal disease and that can be readily transmitted from one individual to another, directly or indirectly. Effective treatment and preventive measures are not usually available.



- Biocontainment facilities**
- Biosafety procedures and adapted protocols**
- Trained staff**



BSL-3

- DENV
- CHIKV
- WNV
- TBE
- MPXV
- Hantaan



BSL-4

- EBOV
- MARV
- LASV
- CCHF
- OMSKV
- KSFV



