

DIAGNOSI DELLE INFEZIONI VIRALI

- **INDAGINE SIEROLOGICA**
- **INDAGINE VIROLOGICA**

Relation of stage of illness to presence of virus in test materials and to appearance of specific antibody

Stage or period of illness	Virus detectable in test materials	Specific antibody demonstrable*
Incubation	Rarely	No
Prodrome	Occasionally	No
Onset	Frequently	Occasionally
Acute phase	Frequently	Frequently
Recovery	Rarely	Usually
Convalescence	Very rarely	Usually

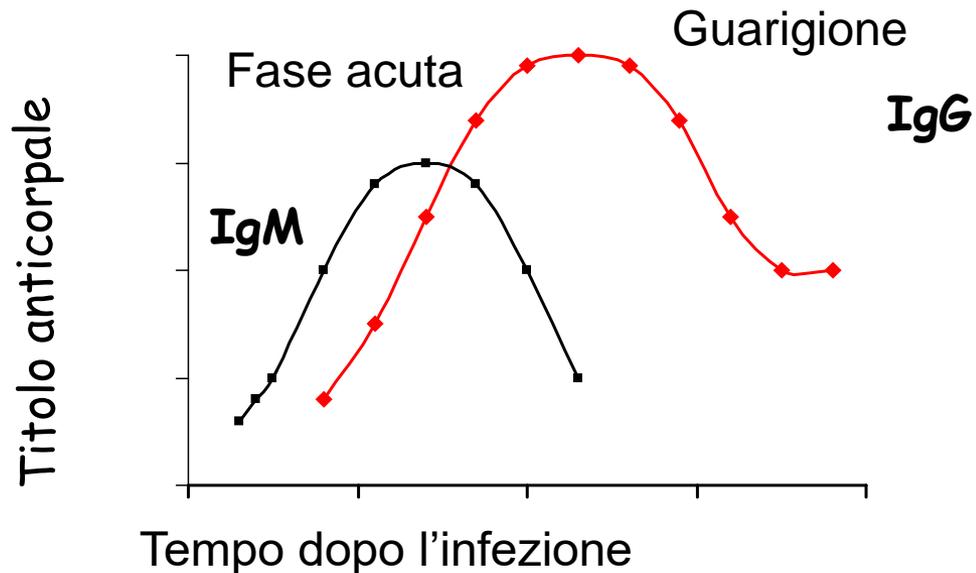
*Antibody may be detected very early in previously vaccinated persons

DIAGNOSI SIEROLOGICA

Ricerca di ANTICORPI

IgM: indicano, solitamente, un'infezione recente o in atto

IgG: indicano una infezione pregressa



INDAGINE SIEROLOGICA

- Tecniche classiche

- IEA
- FC
- NA
- IF

- Tecniche "più recenti"

- ELISA
- RIA
- WB
- RIBA

ELISA (indiretto)

Step 1: aggiunta del siero

Step 2: aggiunta Ac anti-Ig marcato con enzima

Step 3: aggiunta substrato

Step 4: aggiunta acido

Legenda:

 Antigene (Ag)

 Anticorpo (Ac) sierico specifico

 Ac anti-Ig marcato con enzima

 Substrato

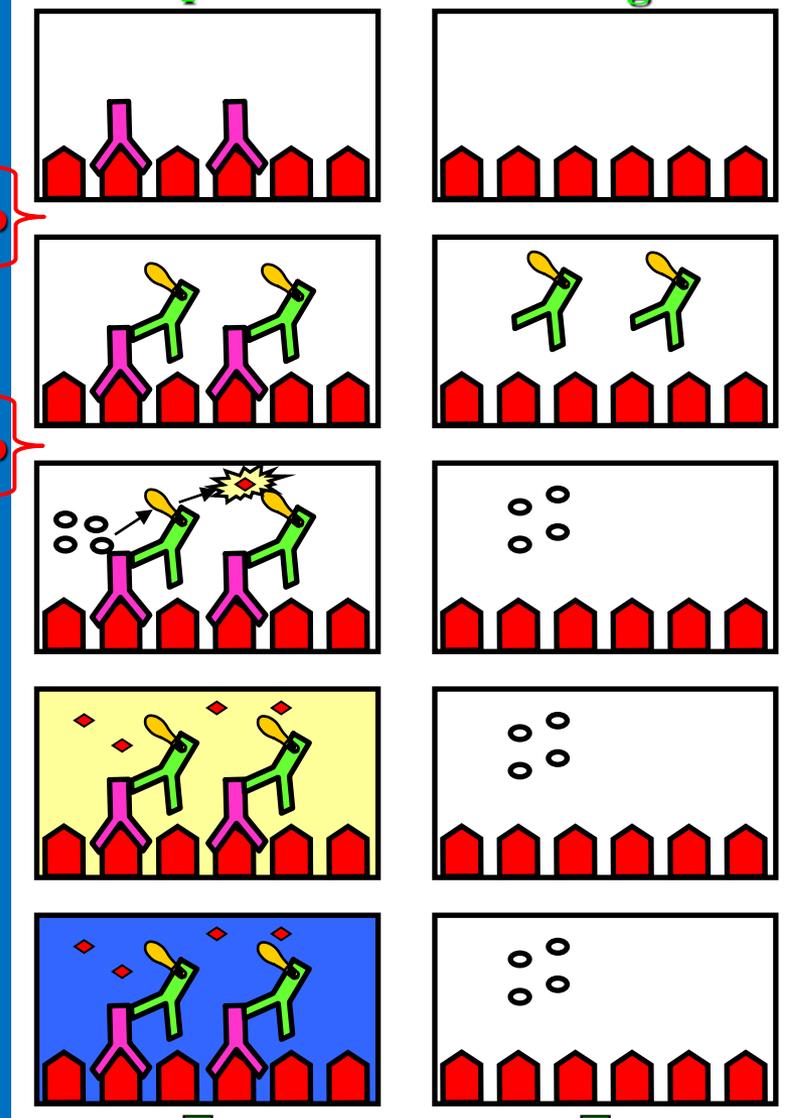
 Substrato ridotto (colorato)

Prova positiva

Prova negativa

Lavaggio

Lavaggio



Lettura spettrofotometrica

SAGGI DI SCREENING

Saggi immunoenzimatici: ELISA (INDIRETTO, A SANDWICH DI ANTIGENE, COMPETITIVO)

Altri saggi: immunoradiometrici, di neutralizzazione, di fissazione del complemento, di emagglutinazione

VIENE PRIVILEGIATA LA SENSIBILITÀ ALLA SPECIFICITÀ

I campioni non reattivi solitamente non richiedono ulteriori analisi

In alcuni casi (HIV, HCV etc.) i campioni reattivi **DEVONO** essere confermati con saggi differenti di conferma

SAGGI DI CONFERMA

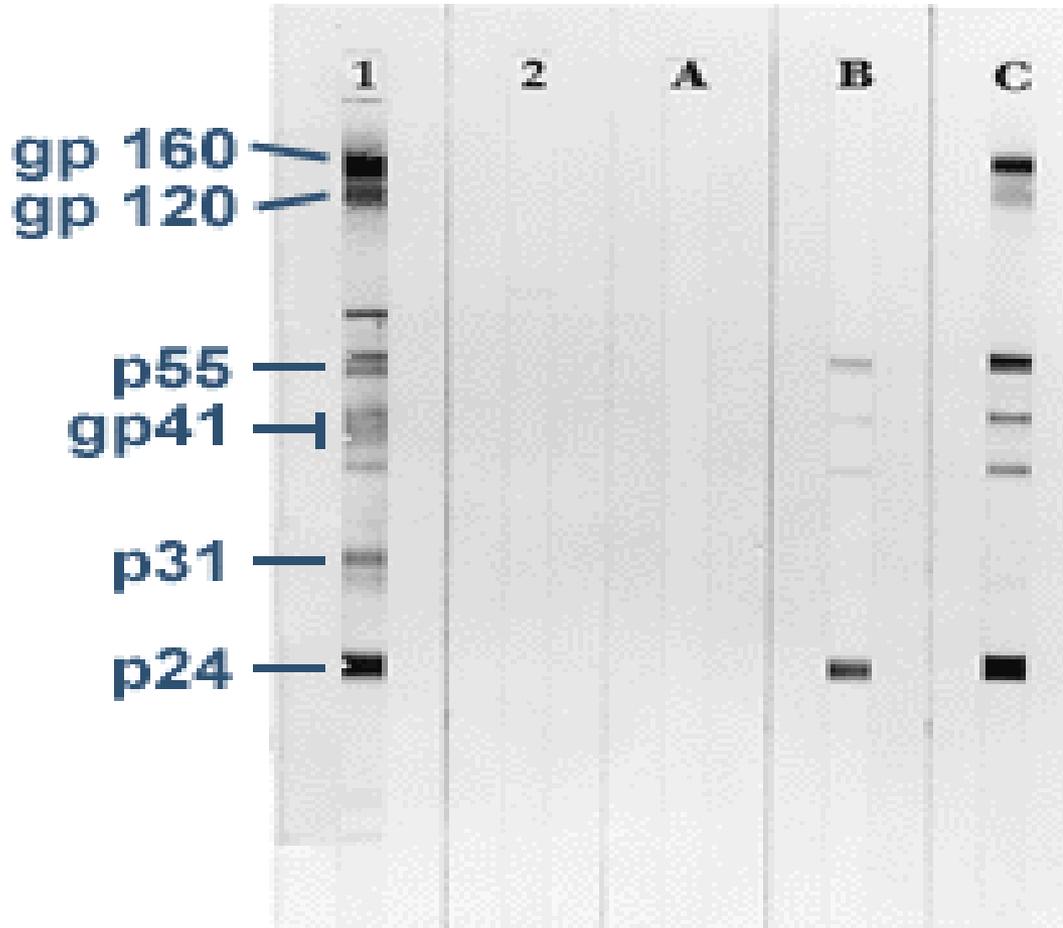
Vengono utilizzati per confermare una reattività ottenuta con i saggi di screening

- ELEVATA SPECIFICITA'

WESTERN BLOT

Proteine ottenute da lisati virali, separate su gel di acrilammide e trasferite su strisce di nitrocellulosa

Permette di determinare la presenza di anticorpi contro diverse proteine del virus in esame

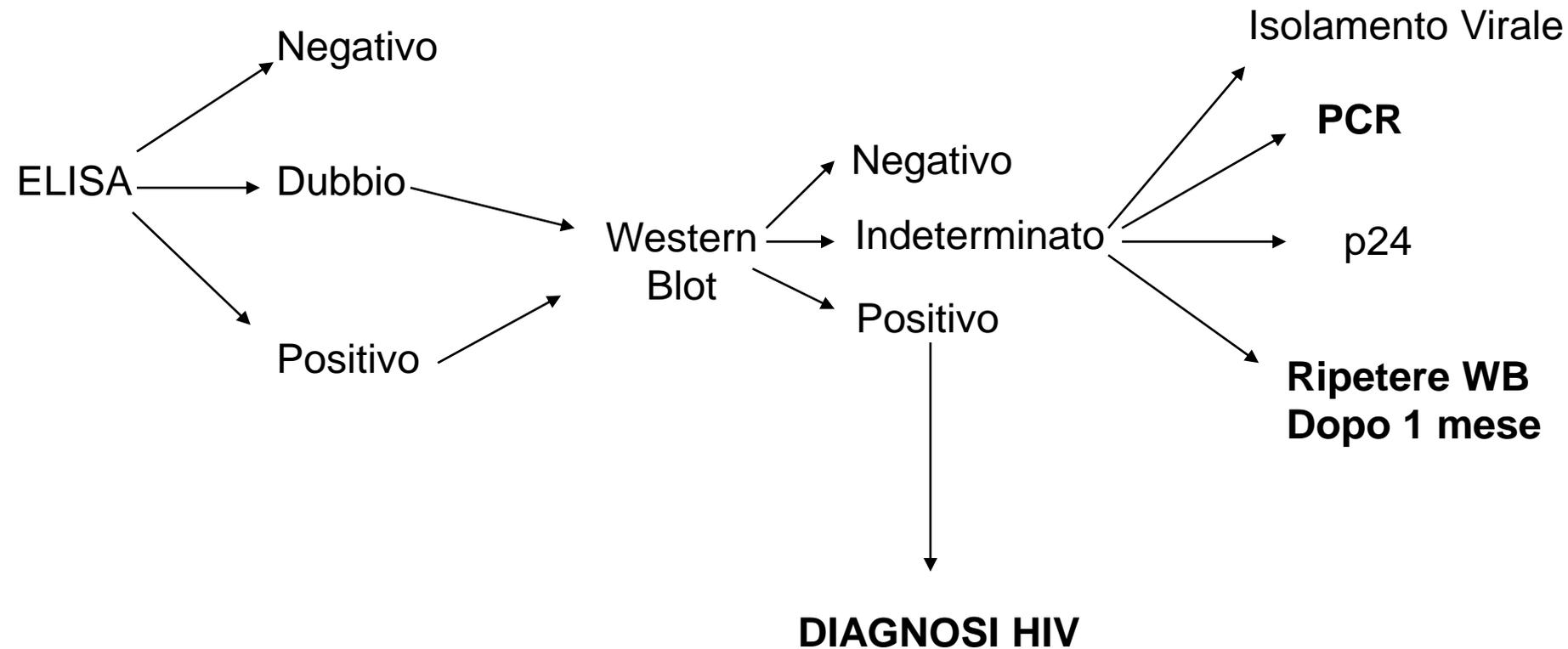


Lane 1, HIV+ serum (control)
 Lane 2, HIV- serum (control)
 Lane A, Patient A
 Lane B, Patient B
 Lane C, Patient C

CRITERI DI INTERPRETAZIONE STABILITI DALLA DIVERSE AUTORITA' COMPETENTI

AUTORITA' COMPETENTE	CRITERI DI INTERPRETAZIONE
Centro Controllo Malattie (CDC)	Almeno 1 di ENV e p24
American Food and Drug Administration (FDA)	P24 e p31 e gp41 o gp120/gp160
Organizzazione Mondiale della Sanita' (OMS)	Due bande ENV con o senza GAG o POL
Centre National de Transfusion Sanguigne (Francia)	Due bande ENV con GAG o POL

Algoritmo diagnostico nell'adulto



Indirect methods (serological methods)

- Etiological diagnosis
- Blood donors screening (HBV, HCV, HIV, HCMV)
- Solid organ/bone marrow donors screening
- Vaccine programs evaluation
- Prevalence and distribution of infectious diseases in the population

Relation of stage of illness to presence of virus in test materials and to appearance of specific antibody

Stage or period of illness	Virus detectable in test materials	Specific antibody demonstrable*
Incubation	Rarely	No
Prodrome	Occasionally	No
Onset	Frequently	Occasionally
Acute phase	Frequently	Frequently
Recovery	Rarely	Usually
Convalescence	Very rarely	Usually

*Antibody may be detected very early in previously vaccinated persons

INDAGINI VIROLOGICHE DIRETTE

- Isolamento virale
- Ricerca di antigeni
- Ricerca degli acidi nucleici
- Microscopia elettronica
- Dimostrazione di presenza di virus nei campioni biologici

INDAGINI VIROLOGICHE DIRETTE

- Isolamento virale
 - Ricerca di antigeni
 - Ricerca degli acidi nucleici
 - Microscopia elettronica
 - Dimostrazione di presenza di virus nei campioni biologici
- 

Tabella 40.4 Isolamento virale e materiali biologici da saggiare.

Virus	Campione
Influenza A e B	Secrezioni respiratorie*
RSV	Secrezioni respiratorie*
Rinovirus	Secrezioni respiratorie*
Parainfluenza	Secrezioni respiratorie*
Morbillo	Secrezioni respiratorie*, lavaggi o tamponi congiuntivali, linfociti
Rosolia	Secrezioni respiratorie*, urina, lavaggi o tamponi congiuntivali
Parotite	Liquor, saliva
HIV	Linfociti, plasma
HSV	Liquor, raschiati o fluidi oculari
CMV	Urine, leucociti, liquor, liquido amniotico
EBV	Saliva, linfociti B
Rotavirus	Feci o tamponi rettali
Enterovirus, poliovirus, echovirus, adenovirus enterici, coxsackievirus A e B, epatite A	Liquor, feci o tamponi rettali, tamponi faringei

* Per "secrezioni respiratorie" si intendono quelle prelevate direttamente in sede o tramite tamponi, aspirati e lavaggi.

Tabella 40.3 Patogenesi responsabili di infezioni del tratto respiratorio e del sistema nervoso centrale.

Tratto respiratorio	Sistema nervoso centrale
<p>Famiglia <i>Paramyxoviridae</i> Virus respiratorio sinciziale A e B Metapneumovirus Virus della parainfluenza 1, 2, 3</p>	<p>Famiglia <i>Herpesviridae</i> Virus dell'herpes simplex 1, 2 Virus della varicella-zoster Citomegalovirus Virus di Epstein-Barr Herpesvirus umano tipo 6</p>
<p>Famiglia <i>Orthomyxoviridae</i> Virus dell'influenza A Virus dell'influenza B Virus dell'influenza H1N1/2009</p>	<p>Famiglia <i>Picornaviridae</i> Enterovirus</p>
<p>Famiglia <i>Picornaviridae</i> Rinovirus, enterovirus</p>	<p>Famiglia <i>Arenaviridae</i> Virus della coriomeningite linfocitaria</p>
<p>Famiglia <i>Parvoviridae</i> Bocavirus</p>	<p>Famiglia <i>Paramyxoviridae</i> Virus della parotite Virus del morbillo</p>
<p>Famiglia <i>Coronaviridae</i> Coronavirus (ceppi 229/NL63, OC43/HKU1)</p>	<p>Famiglia <i>Togaviridae</i> Virus di West Nile Virus dell'encefalite giapponese Virus di St. Louis Virus della rosolia</p>
<p>Famiglia <i>Adenoviridae</i> Adenovirus (B, C, D, E)</p>	<p>Famiglia <i>Bunyaviridae</i> Virus toscana</p>
	<p>Famiglia <i>Adenoviridae</i> Adenovirus</p>
	<p>Famiglia <i>Polyomaviridae</i> Virus JC</p>

PRINCIPALI TIPI DI COLTURE CELLULARI

Tipo

Caratteristiche

Coltura primaria

Corredo diploide
primo espianto
durata 1-2 replicazioni cellulari

Coltura diploide

Corredo diploide
derivata da colture primarie
Durata massima 50 replicazioni cellulari

*Linea cellulare
continua*

Corredo aneuploide
durata indefinita

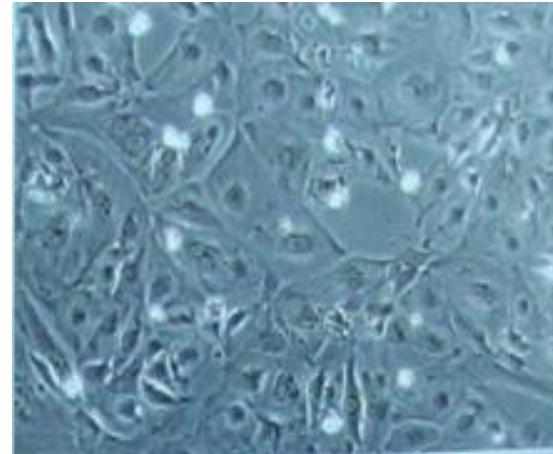
VIRUS ISOLATION

IMMORTALIZED CELL LINES

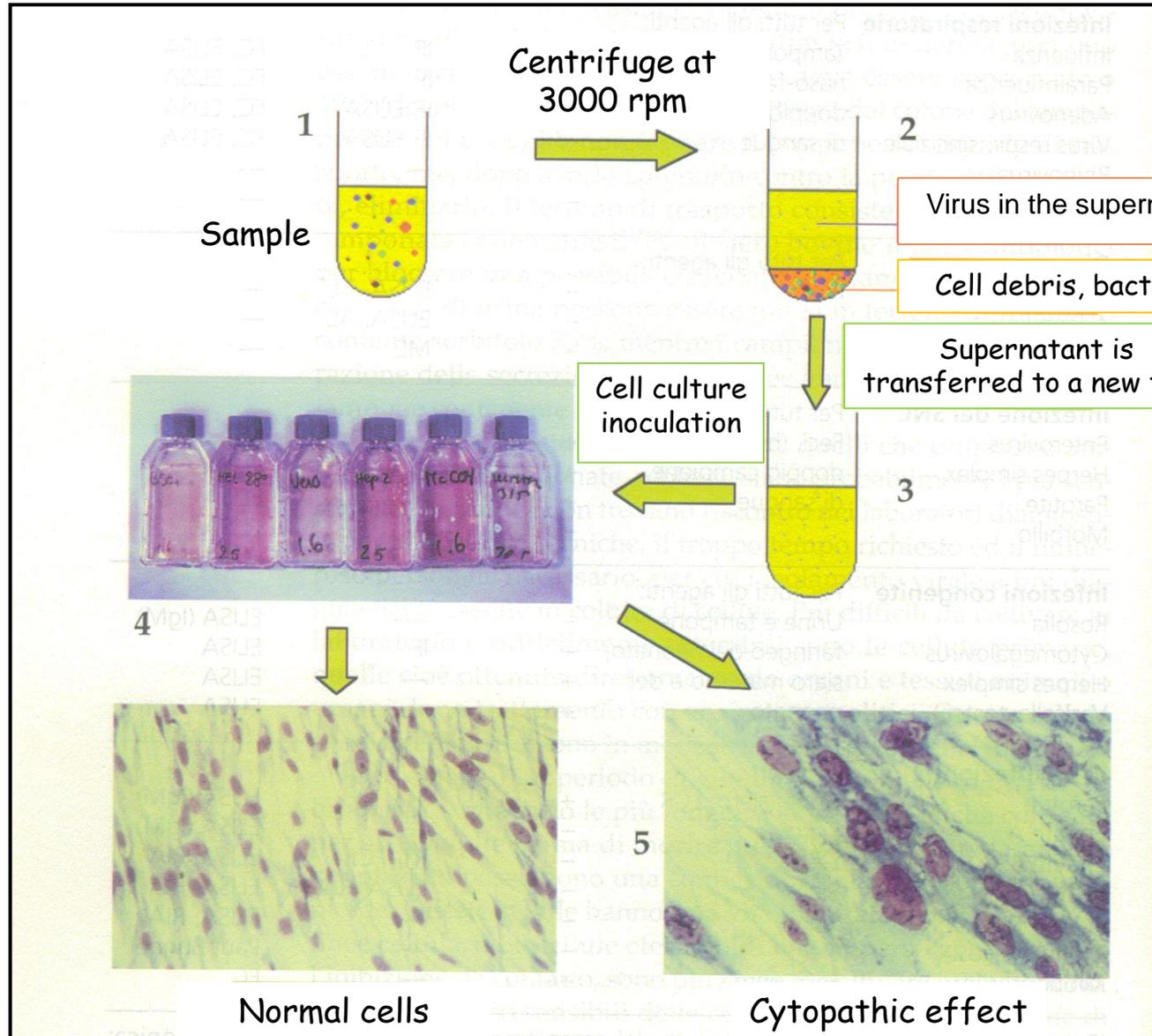
Derived from the propagation of primary and secondary cell lines. Immortalized cells acquired the ability to proliferate indefinitely, and can be obtained from cancer cells or artificially through *in vitro* mutation using mutagen agents

DIPLOID CELL LINES

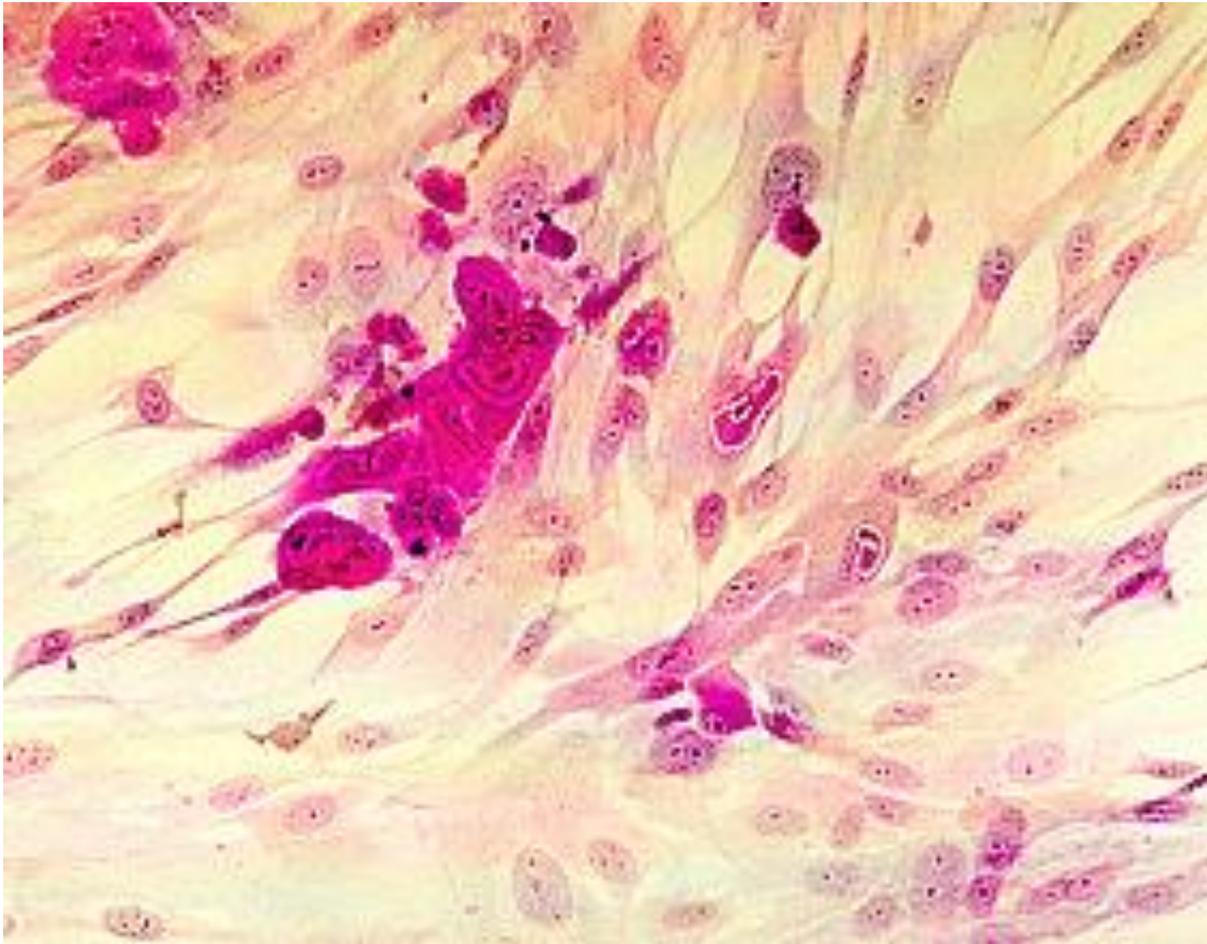
Able to undergo a limited number of subcultures (ex. 30-40 passages for fibroblasts) prior to their death or spontaneous transformation in immortalized cells



CYTOPATHIC EFFECT (CPE)



CPE caused by CMV in human fibroblasts



IMMUNOFLUORESCENCE

One of the most sensitive methods

Used:

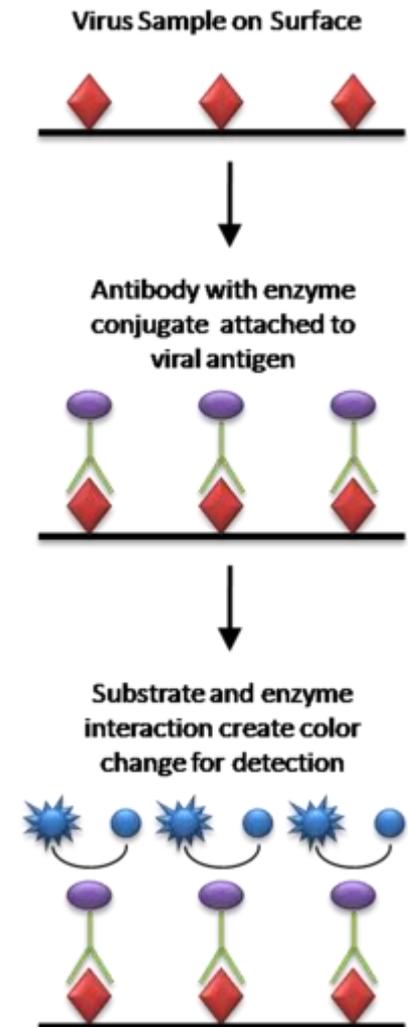
- to detect serum antibodies (using known antigens)
- to detect antigens (using commercially available antibodies)

- for the direct analysis of the specimens
- for cell analysis after viral isolation

Allow to:

- observe the cell localization of an antigen (cytoplasm, membrane, nucleus)

- determine the presence of multiple antigens or markers in the same cell using different fluorescent dyes

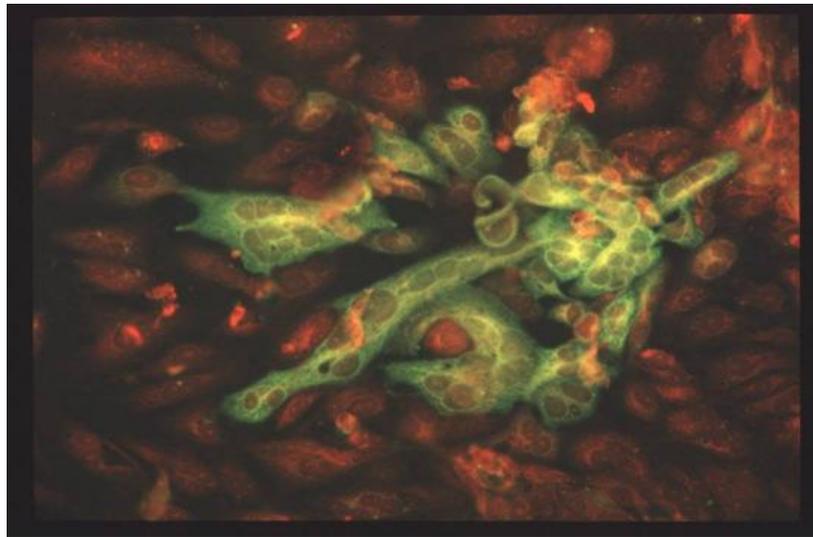


ANTIBODIES AND DIRECT DIAGNOSIS

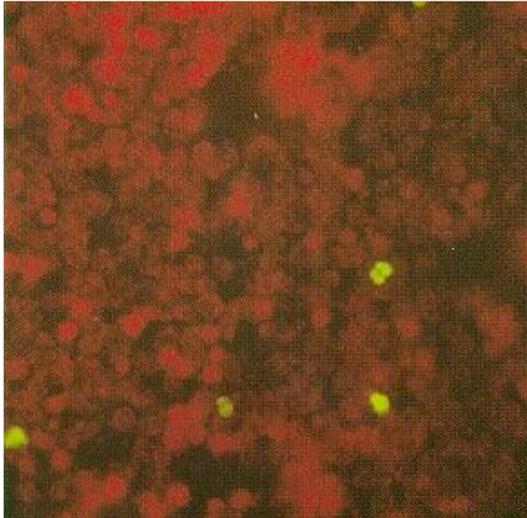
In the direct diagnosis, Ab are used for the detection of specific viral antigens

Many labeled animal Ab can be purchased

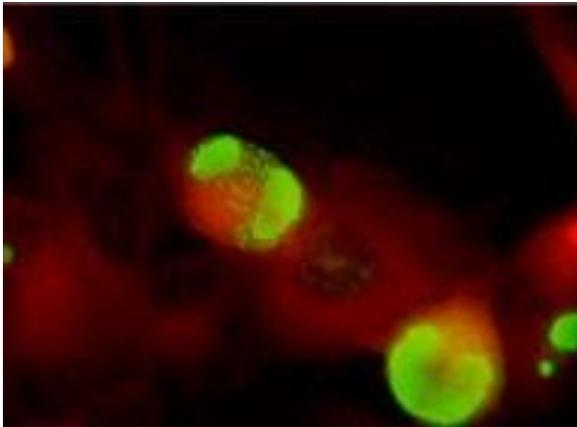
MONOCLONAL ANTIBODIES are widely used



Viral antigen detection in clinical specimens

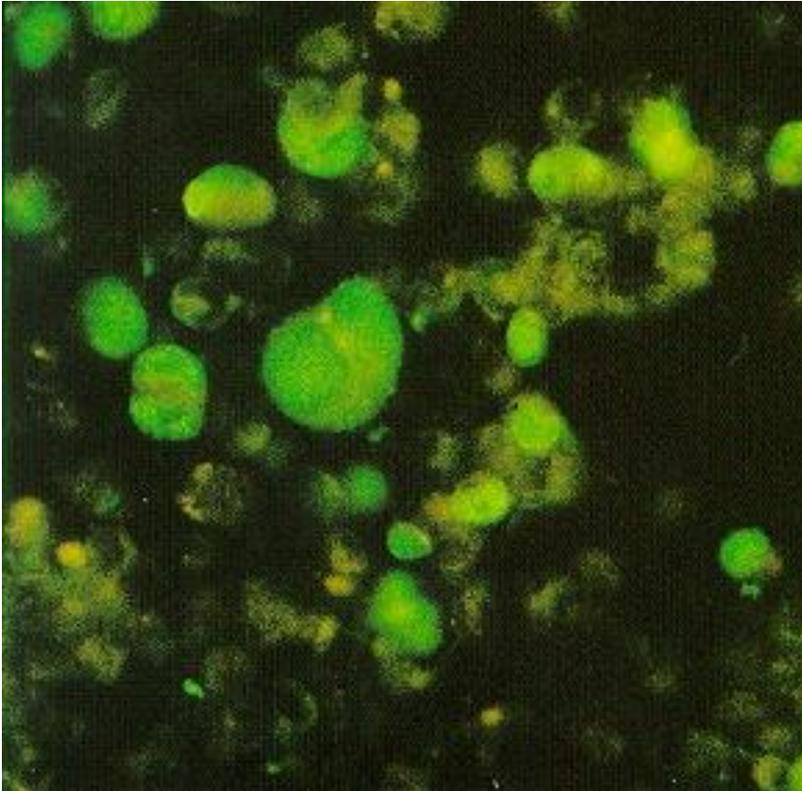


CMV Antigenemia (pp65)
(after staining with Evans Blue)



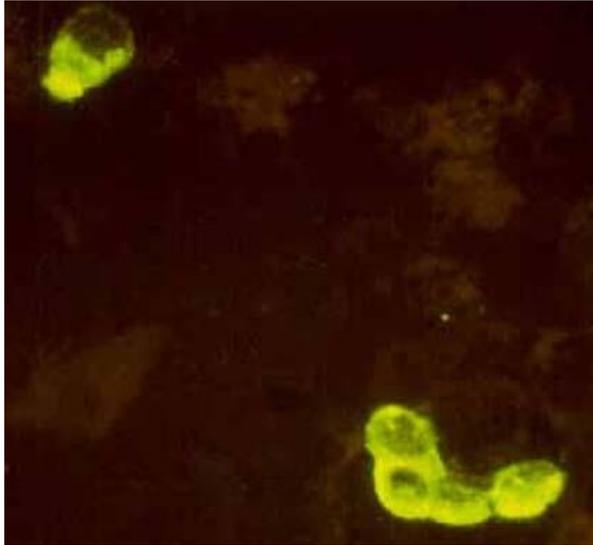
- for PBL samples
- semiquantitative

Viral antigen detection in clinical specimens

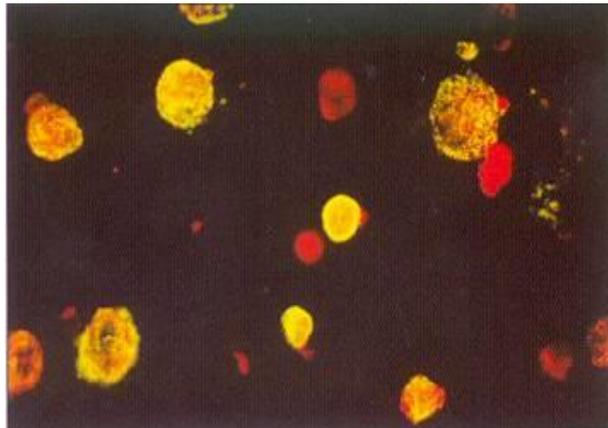


**IF HCMV
amniotic fluid**

Viral antigen detection in clinical specimens



RSV in smear from
nasopharyngeal swab
(without contrast staining)



HSV1 in epithelial cells

Viral antigen detection after virus isolation

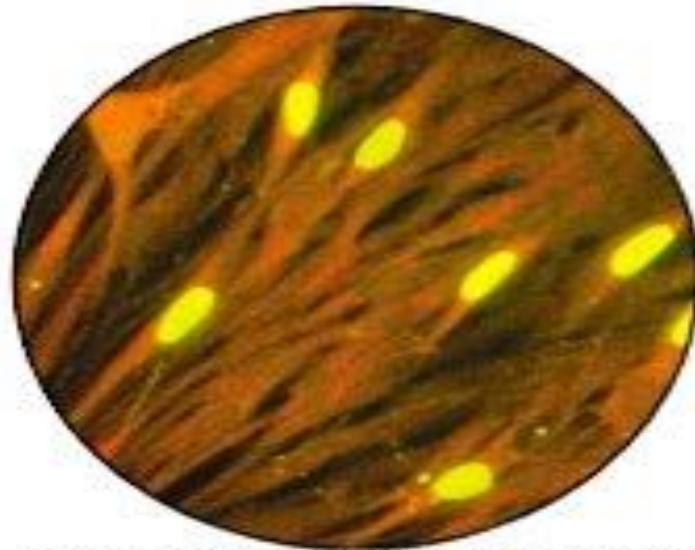
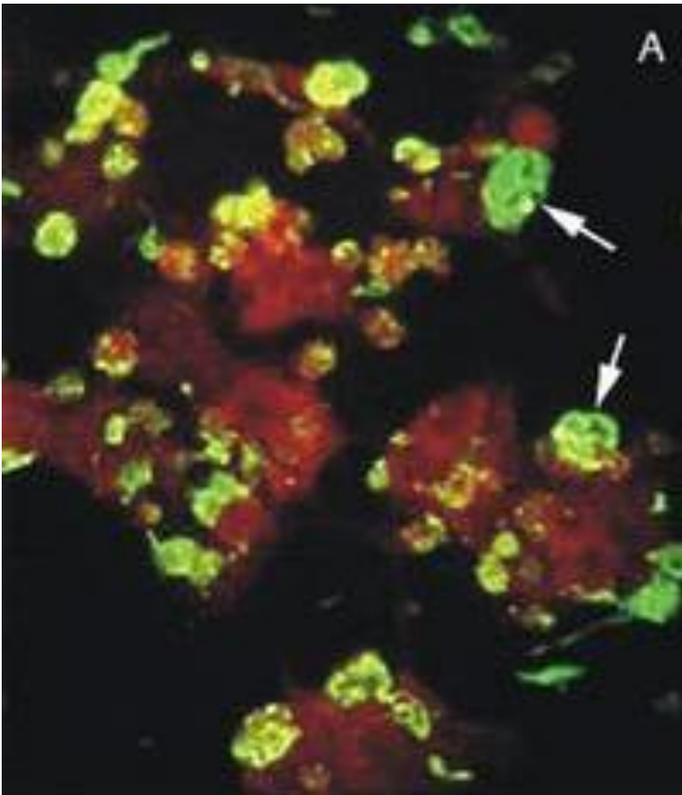


Fig. 2, CMV centrifugation culture fixed and stained 16 hrs after inoculation showing viral proteins in nuclei of infected human fibroblast cells

MATERIALI BIOLOGICI DA SAGGIARE PER ESEGUIRE L'ISOLAMENTO DEI PRINCIPALI VIRUS

VIRUS

Adenovirus

Citomegalovirus

Enterovirus, poliovirus

Echovirus, coxsackievirus A

e B, virus epatite A

Virus di Epstein Barr

Herpes simplex

HIV

Influenza A e B

Morbillo

Parainfluenza

Parvovirus

Respiratorio sinciziale

Rosolia

Rotavirus

Varicella-zoster

CAMPIONI DA PRELEVARE

Secrezioni respiratorie, leucociti, urina
tamponi congiuntivali

Urina, saliva, secrezioni respiratorie,
leucociti

Feci o tamponi rettali, tamponi faringei
liquor

Linfociti, saliva
liquido delle vescicole,
tamponi congiuntivali

Plasma, linfociti

Secrezioni respiratorie

Secrezioni respiratorie, saliva,
lavaggi congiuntivali, linfociti

Secrezioni respiratorie

Sangue, secrezioni respiratorie

Secrezioni respiratorie

Secrezioni respiratorie, urina,
Tamponi congiuntivali

Feci o tamponi rettali

Liquido delle vescicole o materiale
di scarificazione

INDAGINI VIROLOGICHE DIRETTE

- Isolamento virale
- Ricerca di antigeni
- Ricerca degli acidi nucleici
- Microscopia elettronica
- Dimostrazione di presenza di virus nei campioni biologici



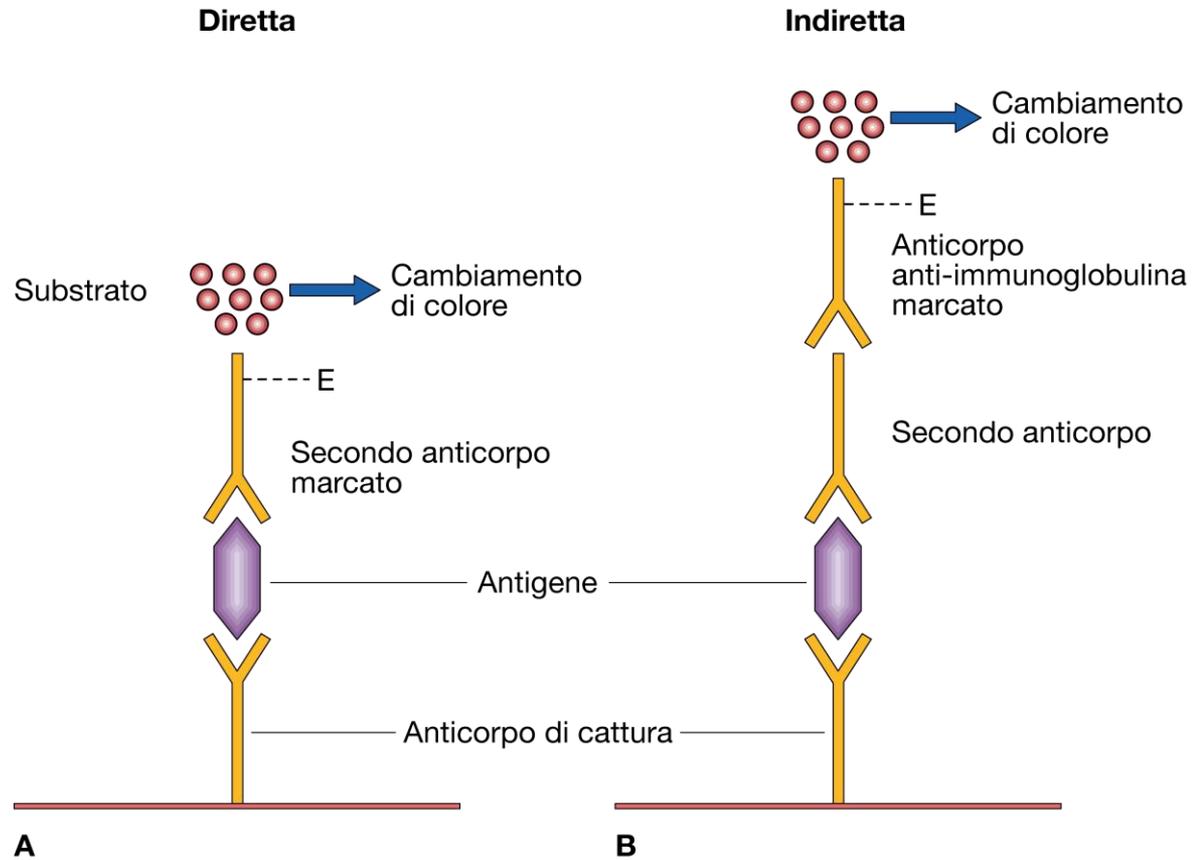


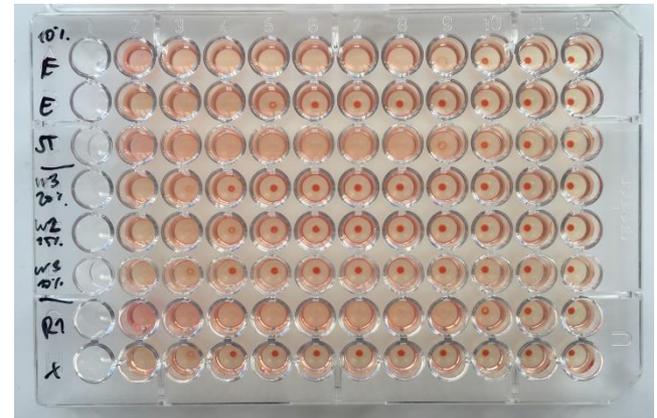
Figura 40.1 Schema di saggio immunometrico (ELISA) per la rilevazione di antigeni. **A.** Metodo diretto: l'antigene viene riconosciuto utilizzando direttamente un anticorpo marcato. **B.** Metodo indiretto: l'antigene viene riconosciuto utilizzando un primo anticorpo virus-specifico seguito dall'aggiunta di un secondo anticorpo marcato in grado di riconoscere una regione costante del primo anticorpo utilizzato.

Many types of assays can be used for the serological diagnosis

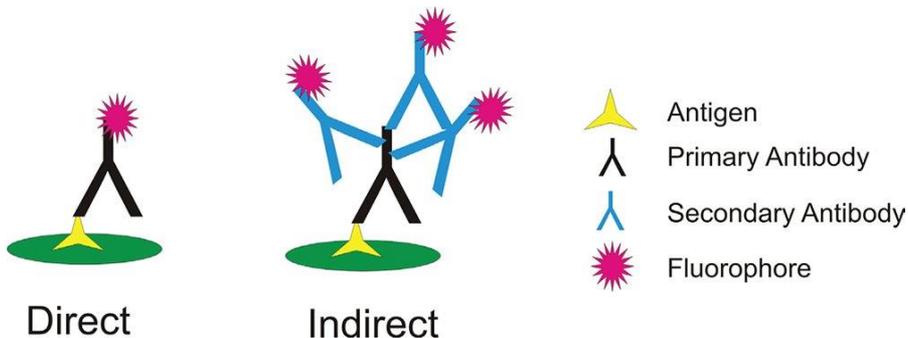
ELISA



Hemagglutination assay



Immunofluorescence assay



Complement fixation assay

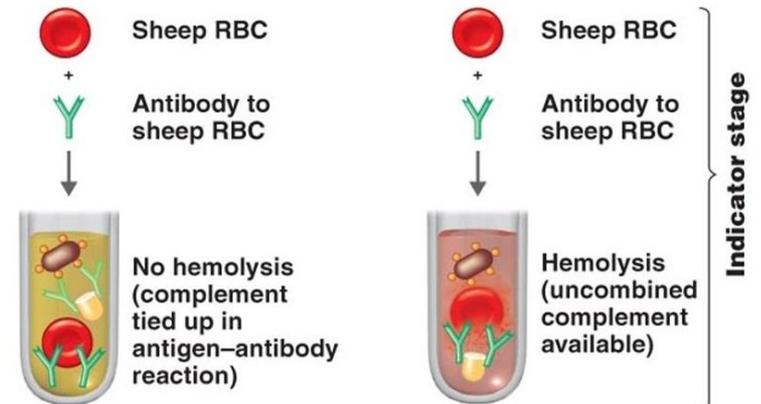


Tabella 40.1 Rilevazione di antigeni virali: campioni utilizzati e virus rilevati.

Campione	Virus rilevato
Tamponi o aspirati nasofaringei, lavaggi nasofaringei, aspirati broncoalveolari	RSV, influenza A e B, parainfluenza sierotipi 1-3, adenovirus
Raschiati da cute o mucosa	Morbillo, HSV, VZV
Raschiati da congiuntiva	HSV, adenovirus
Feci	Rotavirus, adenovirus enterici
Sangue	CMV (antigene pp65), HBV (HBsAg), HIV (antigene p24), EBV (EA ed EBNA)

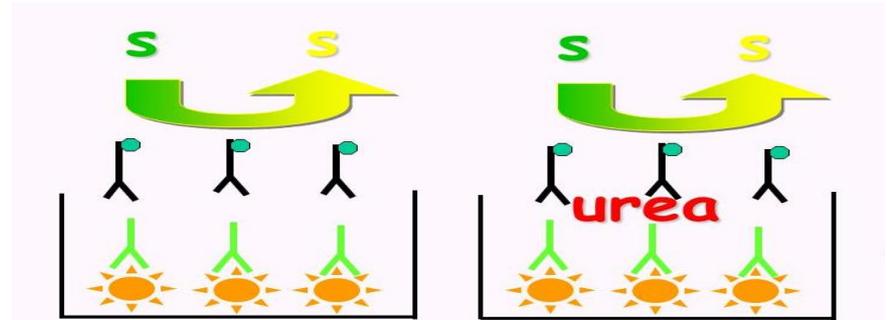
AVIDITY is the strength of the binding between the IgG antibody and its antigen. Following antigenic challenge the IgG antibodies produced initially bind weakly to the antigen (**low avidity**).

As the immune response develops there is maturation of IgG antibody response and the avidity increases progressively over weeks or months (**high avidity**).

→ The IgG avidity test helps in the discrimination between past and recently acquired infection.

AVIDITY EIA ASSAY

The optical density of the sample is compared before and after the treatment with urea (denaturing agent)



«Young» IgG, with low avidity, are dissociated after urea treatment and removed with washing
The % of residual IgG is lower when the amount of low-avidity IgG is higher

Automation



Figure 10.28 • Strumento automatizzato HTS per caratterizzazione di EUS

Site: univ...

Struttura: Struc...
Materie: 100%

2017 • 100% (see full text)



Figure 10.29 • Strumento automatizzato HTS per caratterizzazione di EUS

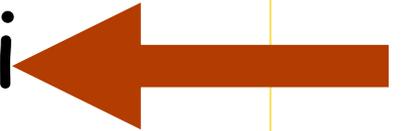
Site: univ...

Struttura: Struc...
Materie: 100%

2017 • 100% (see full text)

INDAGINI VIROLOGICHE DIRETTE

- Isolamento virale
- Ricerca di antigeni
- Ricerca degli acidi nucleici
- Microscopia elettronica
- Dimostrazione di presenza di virus nei campioni biologici



Tecniche classiche

- Dot-blot
- Southern-blot
- Northern-blot

Tecniche "piu recenti"

- PCR
- bDNA
- TMA
- Real-time PCR

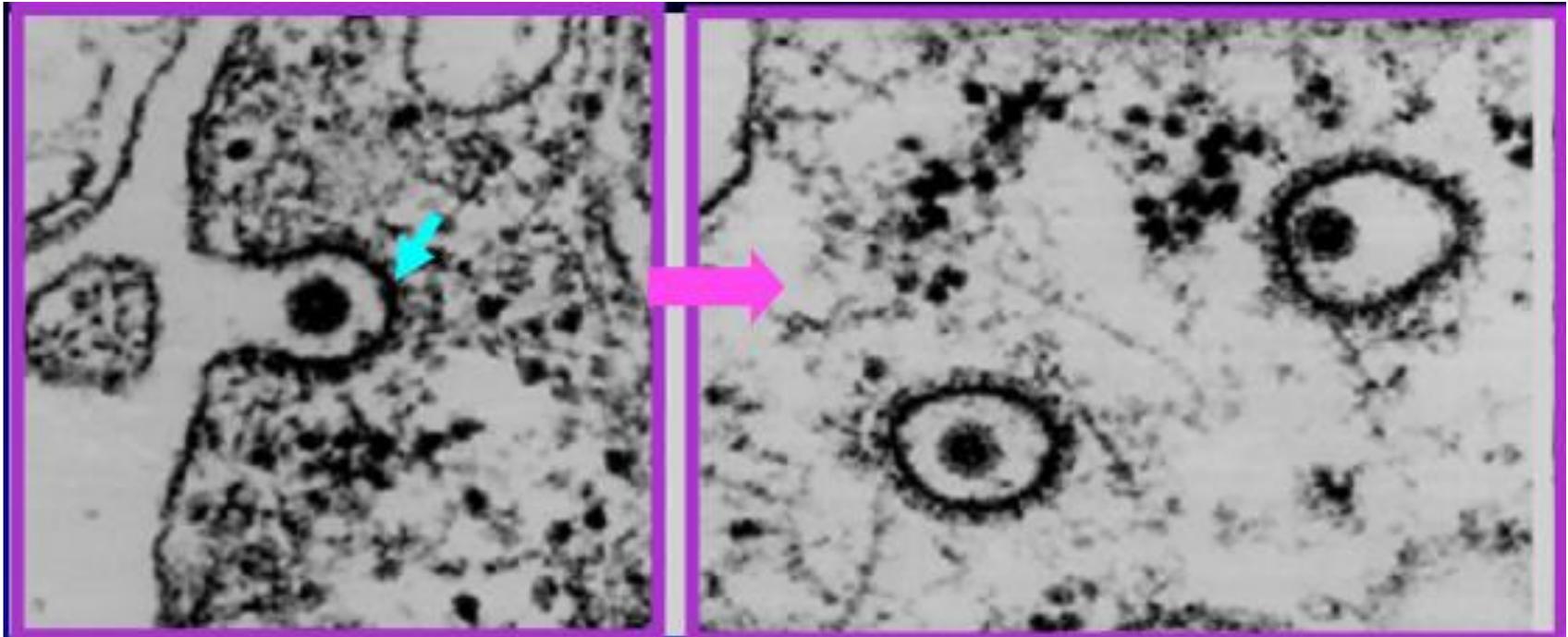
Tabella 40.2 Utilizzo di metodi molecolari nella diagnosi virologica.

Virus	Campione	Applicazione
HIV (qualitativo) (quantitativo)	Linfociti Plasma	Diagnosi precoce, diagnosi perinatale Monitoraggio dell'infezione e della terapia
HSV	Liquor, raschiati o fluidi oculari	Encefalite, retinite, meningite
VZV	Liquor, raschiati o fluidi oculari	Encefalite, retinite, meningite
CMV, EBV	Leucociti, plasma, sangue intero, liquor, raschiati o fluidi oculari, liquido amniotico, urine	Diagnosi di infezione sistemica nei trapianti, encefalite, mielite, retinite, infezione congenita
JC	Liquor	Leucoencefalopatia multifocale
BK	Urine	Cistite emorragica
HPV	Raschiati o tamponi cervicali, penieni o anali, biopsie genitali	Diagnosi di infezione e determinazione di tipi ad alto o basso rischio oncogeno
HCV (qualitativo) (quantitativo)	Plasma	Diagnosi dell'infezione Monitoraggio dell'infezione e della terapia
HBV (qualitativo) (quantitativo)	Plasma	Diagnosi dell'infezione Monitoraggio dell'infezione e della terapia

INDAGINI VIROLOGICHE DIRETTE

- Isolamento virale
- Ricerca di antigeni
- Ricerca degli acidi nucleici
- Microscopia elettronica
- Dimostrazione di presenza di virus nei campioni biologici

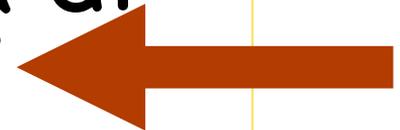


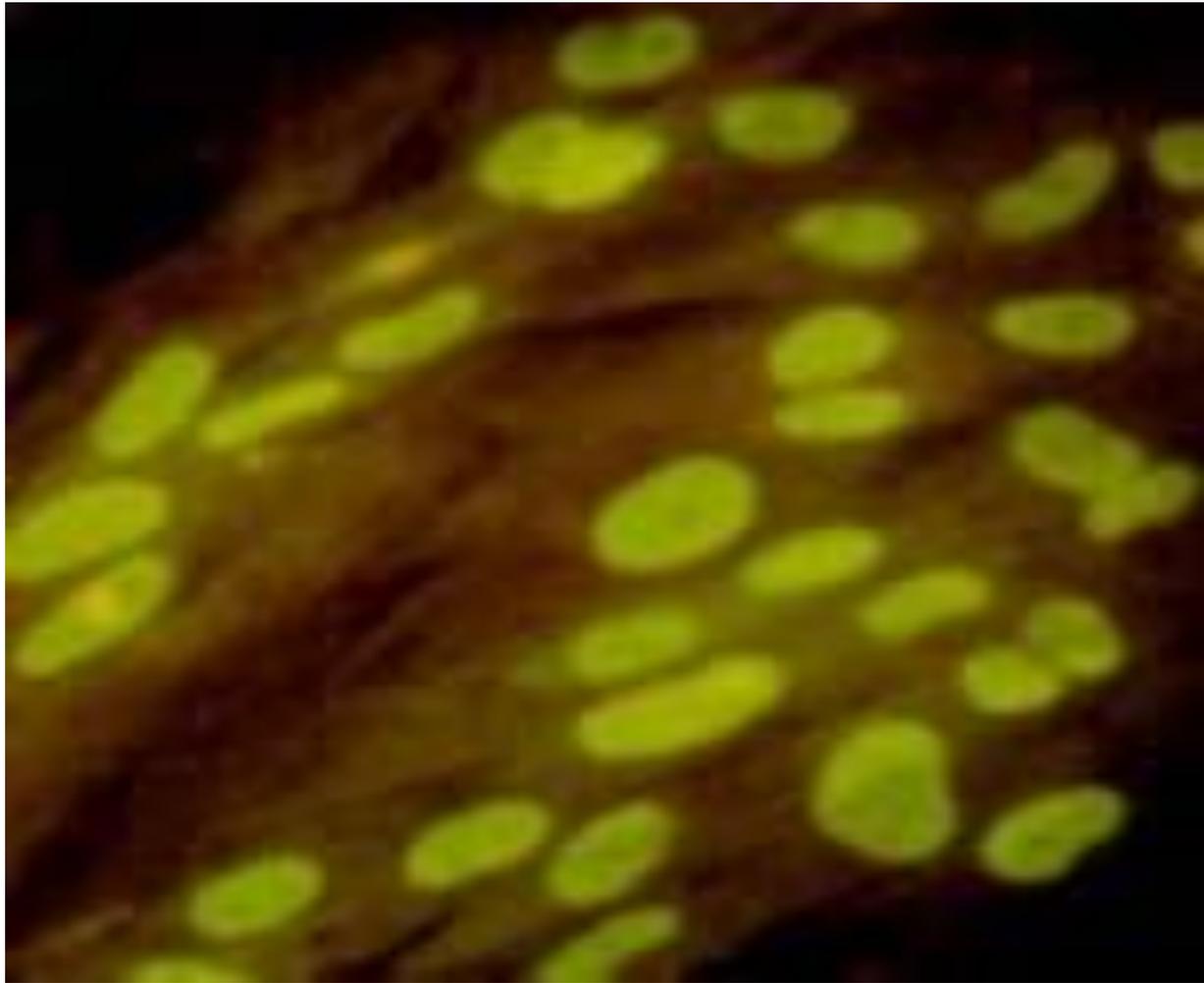


Primi stadi di infezione del virus Semliki Forest, un Togavirus. Le microfotografie al microscopio elettronico mostrano due diversi stadi di penetrazione.

INDAGINI VIROLOGICHE DIRETTE

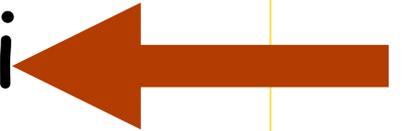
- Isolamento virale
- Ricerca di antigeni
- Ricerca degli acidi nucleici
- Microscopia elettronica
- Dimostrazione di presenza di virus nei campioni biologici





INDAGINI VIROLOGICHE DIRETTE

- Isolamento virale
- Ricerca di antigeni
- Ricerca degli acidi nucleici
- Microscopia elettronica
- Dimostrazione di presenza di virus nei campioni biologici



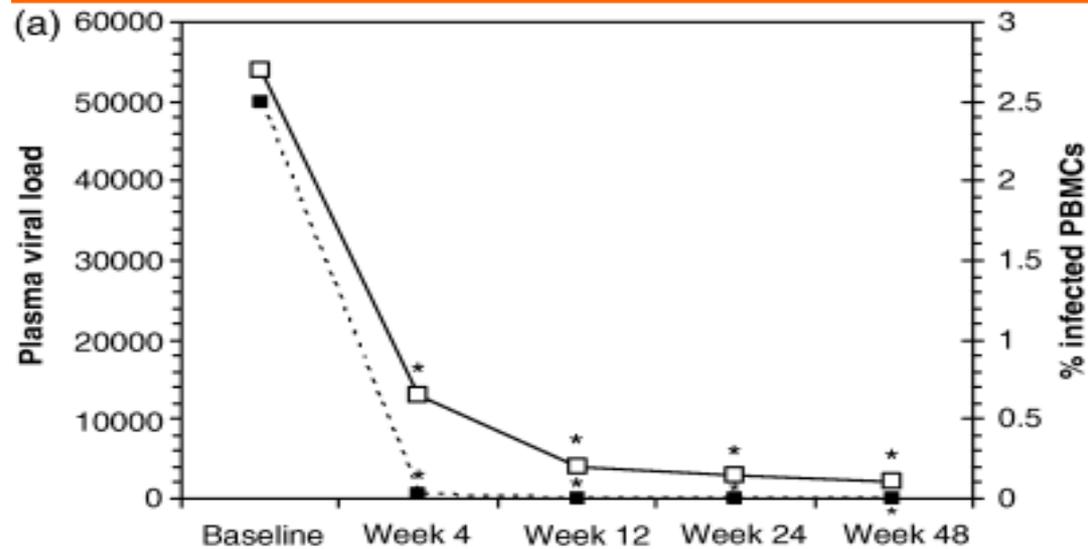
APPLICAZIONI DIAGNOSTICHE DELLA PCR qualitativa

- Diagnosi di infezioni perinatali
- Diagnosi di meningite, encefalite, retinite
- Diagnosi di infezione durante il "periodo finestra"

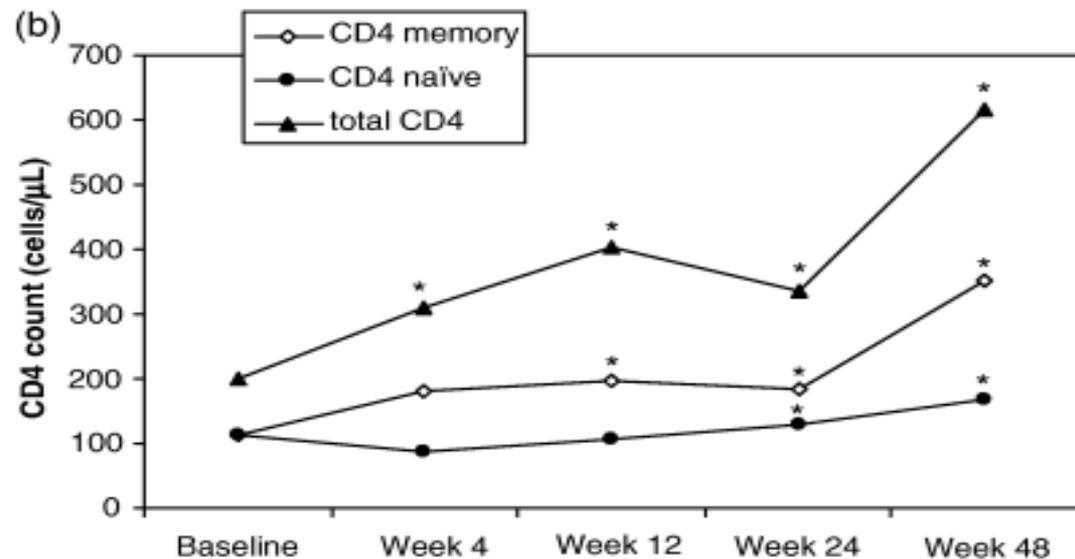
APPLICAZIONI DELLA PCR quantitativa

- Prognosi dell'infezione
- Monitoraggio della risposta alla terapia

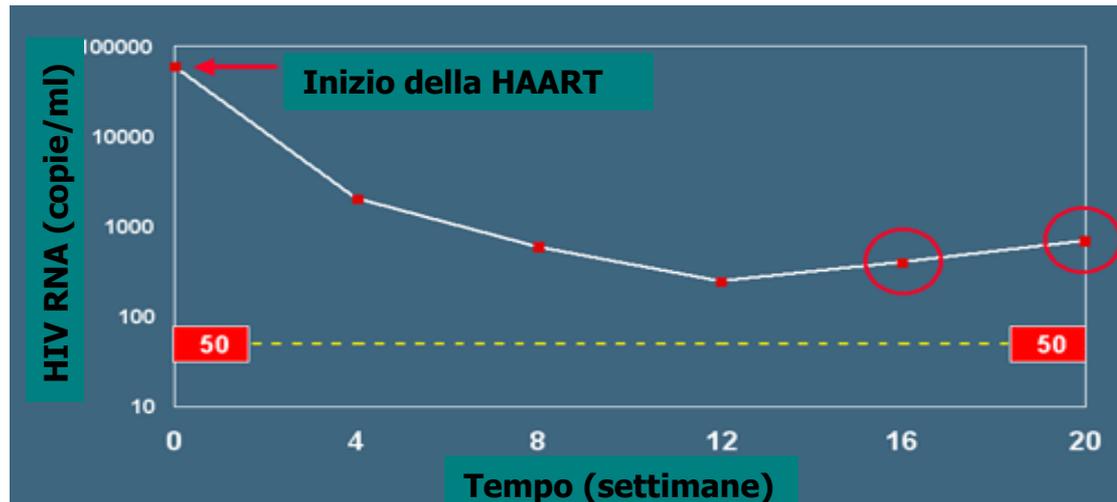
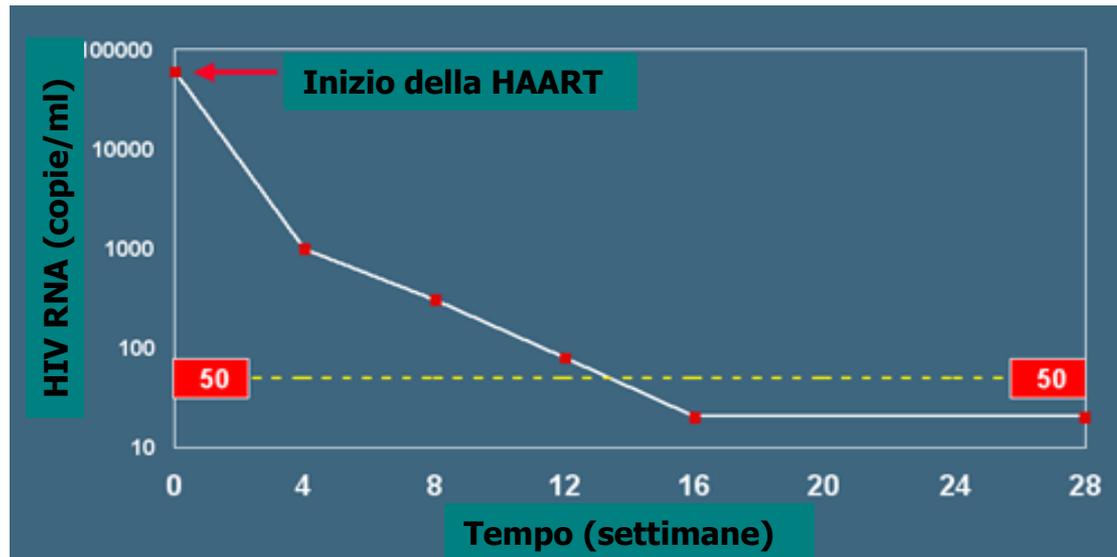
Decline of plasma viral load and percentage infected PBMCs following HAART



Kinetics of CD4 change



Effetto della terapia antiretrovirale sulla viremia

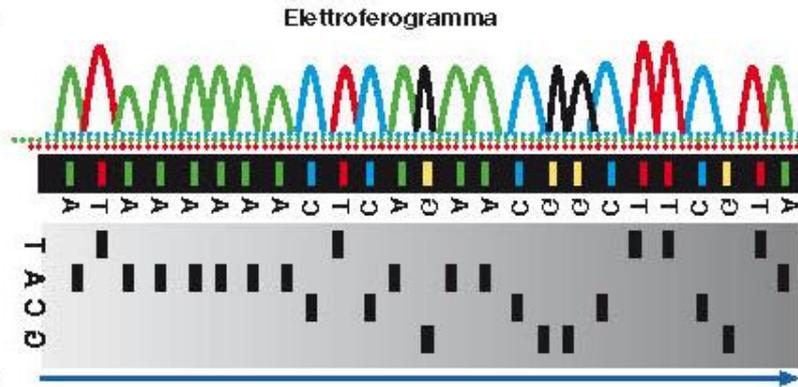
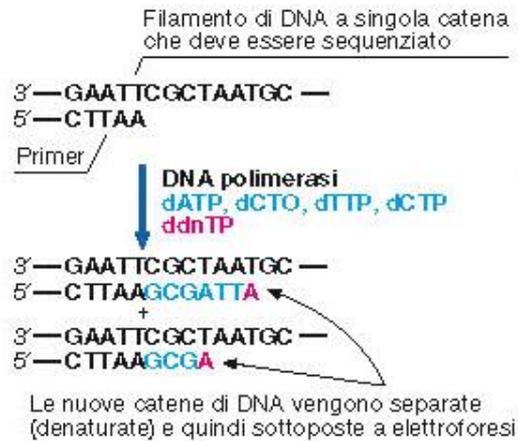


applicazioni

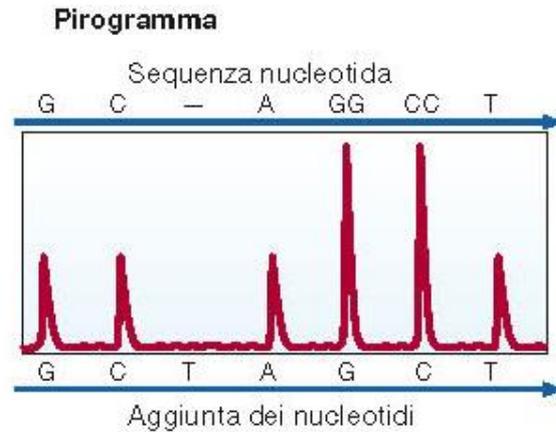
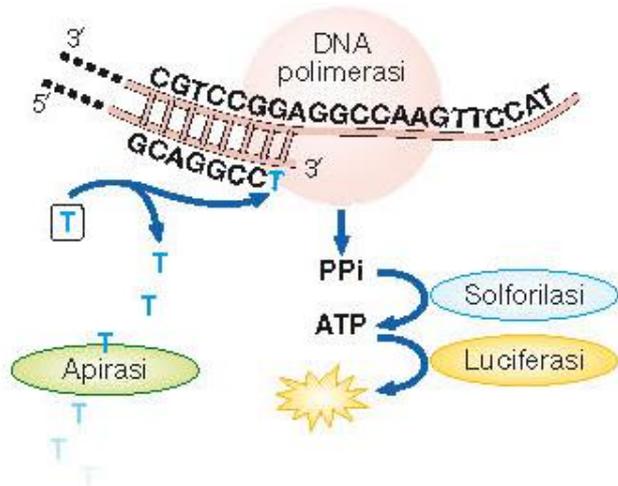
Analisi delle sequenze geniche del genoma virale del paziente per identificare le mutazioni e le interazioni tra mutazioni ritenute importanti per il conferimento di farmacoresistenza verso specifici agenti antiretrovirali

Scelta della terapia

Studio del fallimento terapeutico



A



B

Algoritmo diagnostico nell'adulto

Isolamento Virale

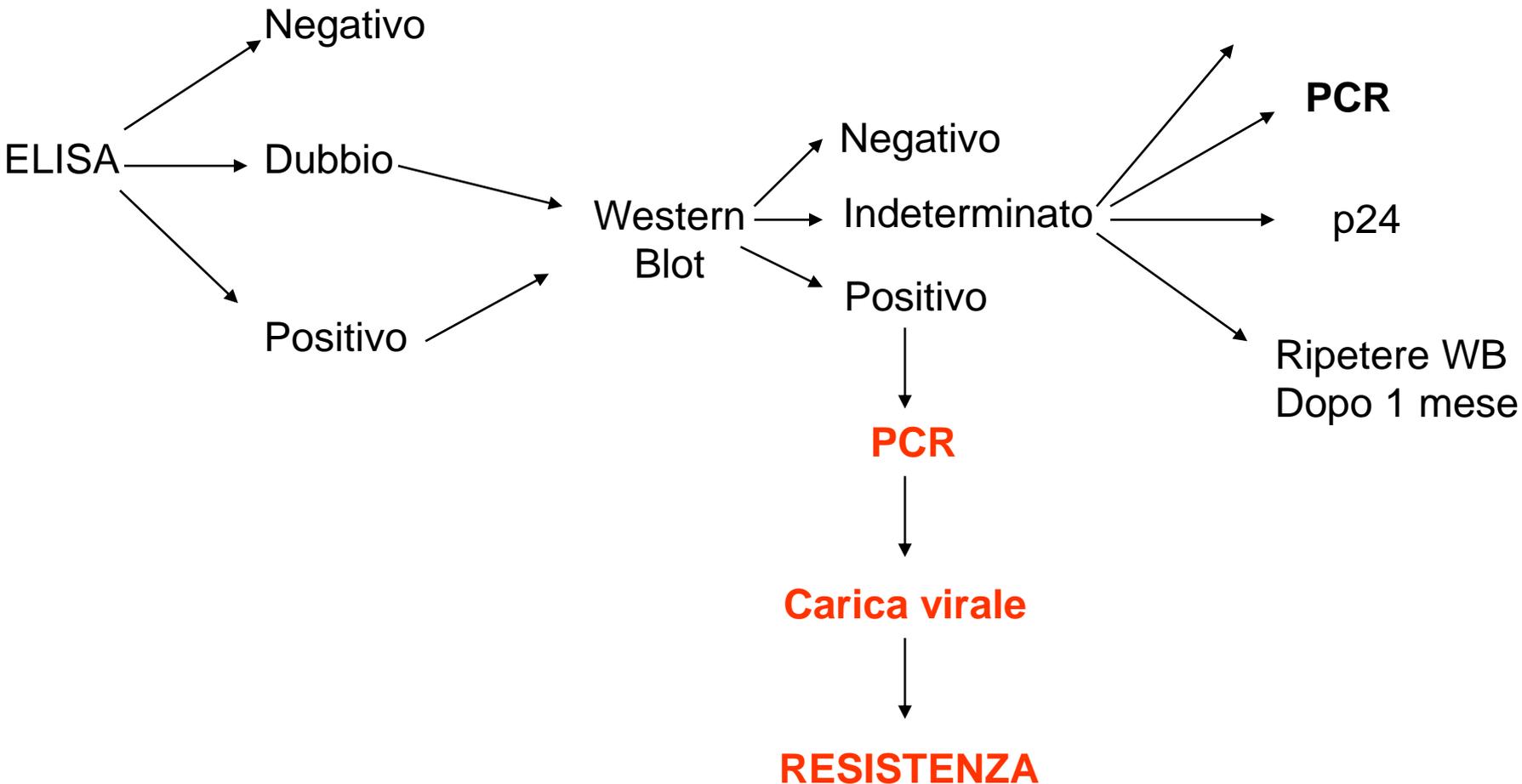


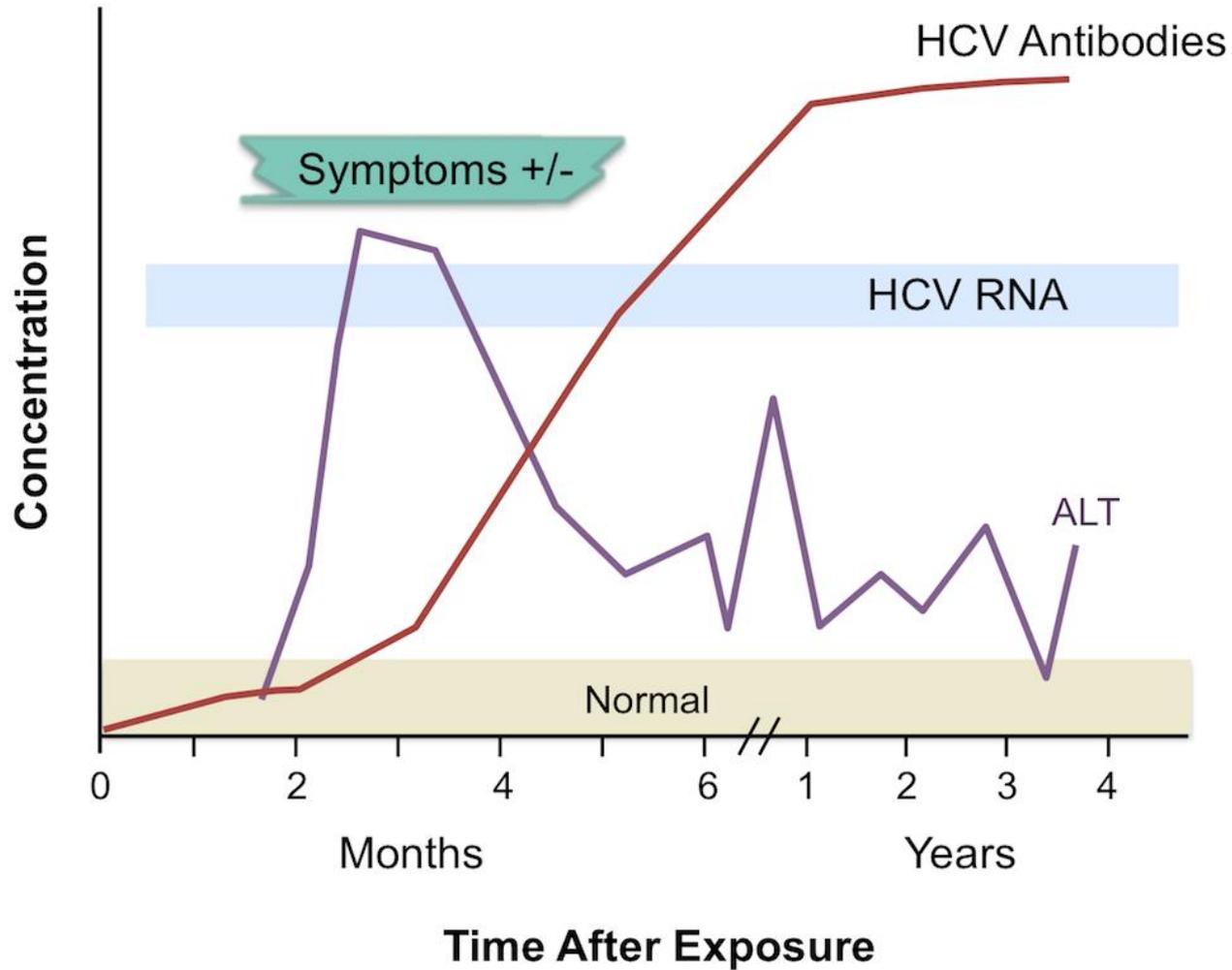
Tabella 40.5 Diagnosi virologica nel feto e nel neonato.

Virus	Feto	Neonato
CMV	Isolamento virale o PCR da liquido amniotico	Isolamento virale o PCR dalle urine nella prima settimana di vita*
VZV	PCR da liquido amniotico	Immunofluorescenza o isolamento virale dalle lesioni
HSV	NA	Isolamento virale o PCR dalle lesioni**
Parvovirus B19	PCR da liquido amniotico	IgM specifiche per parvovirus, PCR dal siero
HBV	NA	Ricerca di HBsAg nel siero
HIV	Controindicata	Isolamento virale o PCR nelle cellule o nel plasma
Rosolia	IgM specifiche nel sangue fetale, isolamento virale o RT-PCR nel liquido amniotico	IgM specifiche o aumento del titolo delle IgG specifiche nel siero, isolamento virale da urine, congiuntiva, sangue o liquor
Enterovirus	NA	Isolamento virale da feci, secrezioni nasofaringee, sangue o urine
HCV	NA	RT-PCR da siero o plasma
HPV	NA	PCR da materiale prelevato dalle mucose orali

* La coltura nella prima settimana di vita è importante per distinguere l'infezione congenita dall'infezione neonatale.

** La coltura può essere eseguita anche su altri materiali (liquor, urine ecc.); la PCR su liquor può aiutare nell'identificazione del coinvolgimento del sistema nervoso; la PCR nel sangue può aiutare a diagnosticare infezioni disseminate specialmente in assenza di lesioni cutanee.

HCV Markers



HBV Markers

