DIAGNOSI DELLE INFEZIONI VIRALI

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

The past few decades have seen **a major revolution in the operation of virus diagnostic laboratories, and their role in the clinical management of patients has become vital.**
This has been driven by a number of factors:

1. The development of molecular technologies and ways to make these accessible for diagnostic laboratories;

2. The plethora of new antiviral agents and a more sophisticated understanding of how these should be used;

3. An increased awareness of the clinical value of, and demand for, prompt information about viral loads, viral sequence data, and antiviral resistance information

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

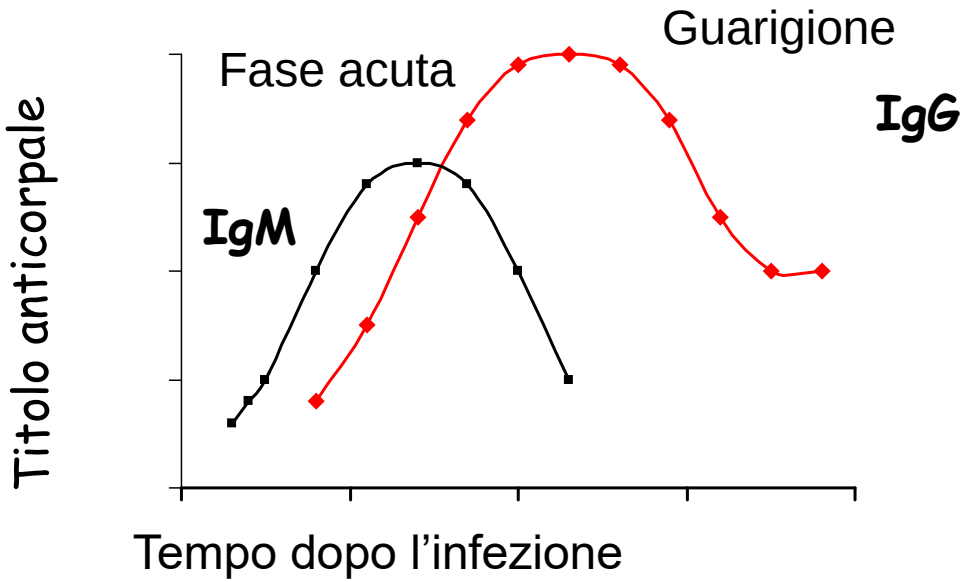
*Antibody may be detected very early in previously vaccinated persons

DIAGNOSI SIEROLOGICA

Ricerca di ANTICORPI

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

IgG: indicano una infezione pregressa



INDAGINE SIEROLOGICA

- **Tecniche classiche**

- Fissazione complemento
- Neutralizzazione
- Immunofluorescenza
- Inibizione dell'emagglutinazione
- Saggio radioimmunologico

- **Tecniche "in uso"**

- ELISA
- CLIA
- Western Blot

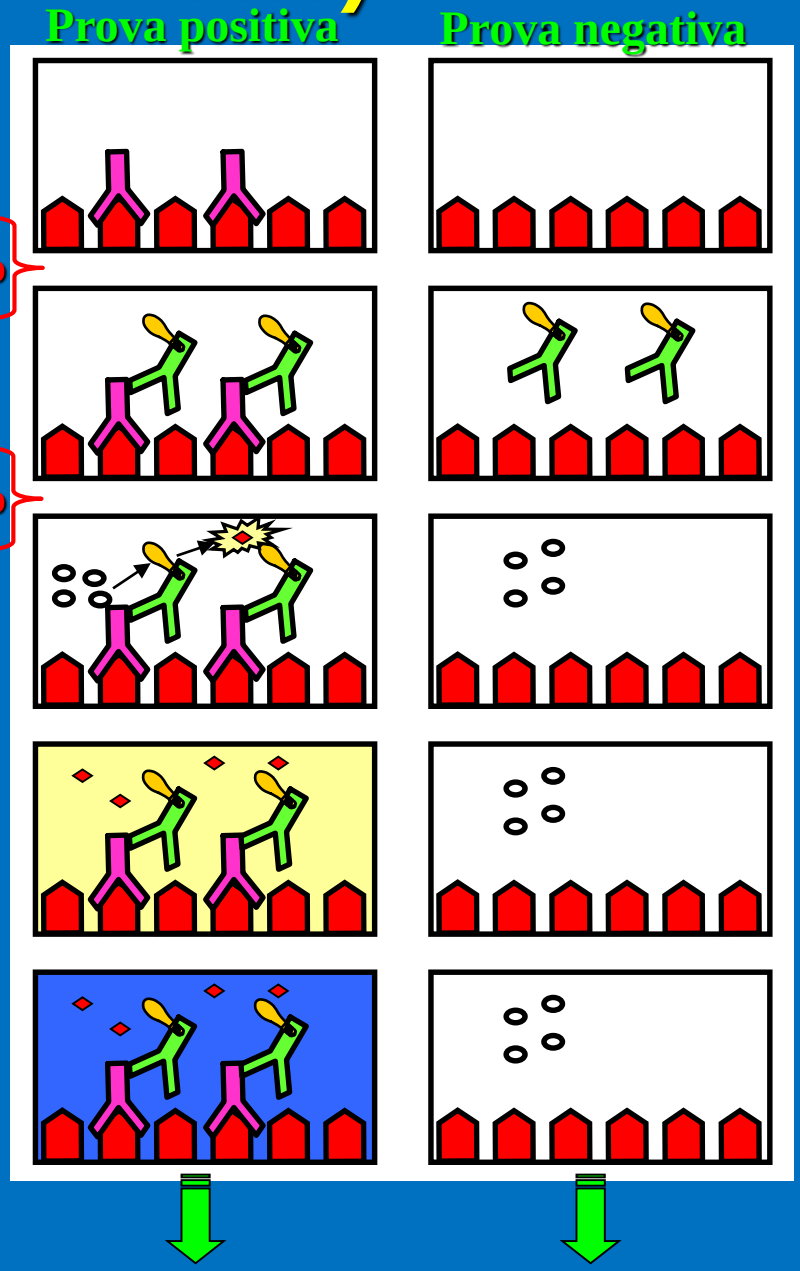
ELISA (indiretto)

Step 1: aggiunta del siero

Step 2: aggiunta Ac anti-Ig marcato con enzima

Step 3: aggiunta substrato

Step 4: aggiunta acido

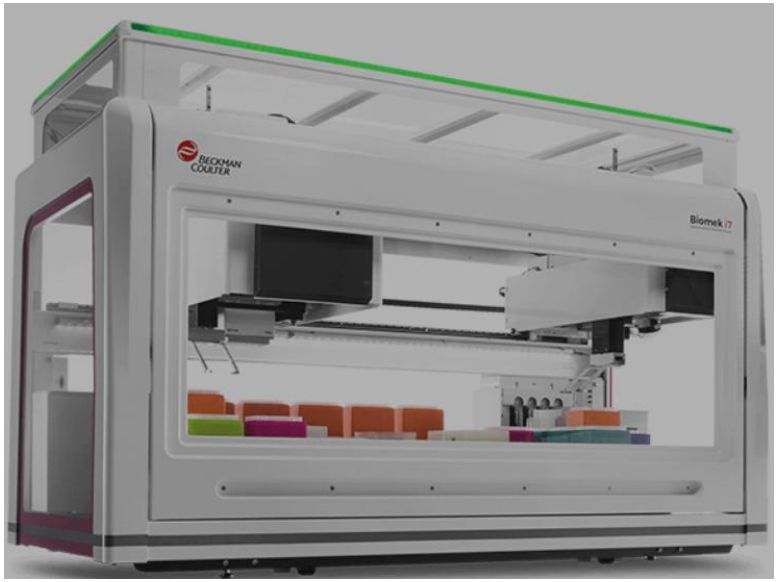


Legenda:

- Antigene (Ag)
- Anticorpo (Ac) sierico specifico
- Ac anti-Ig marcato con enzima
- Substrato
- Substrato ridotto (colorato)

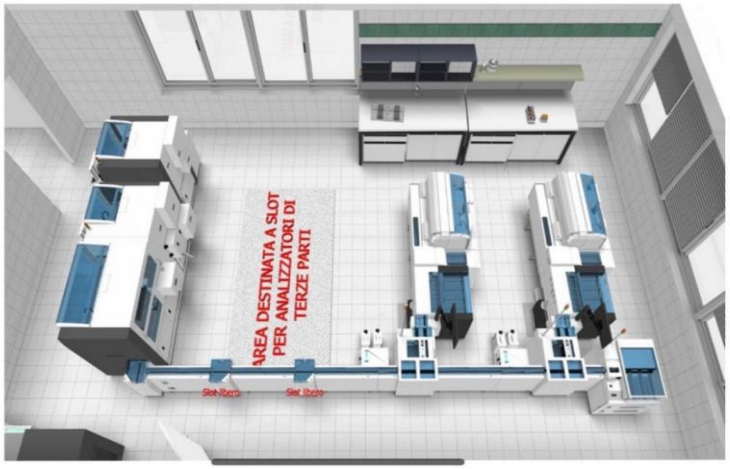
Evolution of TEST ELISA

- First generation
  - Ag : Purified lysates of virus
  - Poor sensitivity and specificity
- Second generation
  - Ag : viral-recombinant proteins and/ or peptides
  - Poor sensitivity, improved specificity
- Third generation
  - Ag : virus-recombinant proteins and/ or peptides
  - Detection of IgM and Ig G, improved sensitivity
  - Detection of HIV group O
- Fourth generation
  - Capacity to detect Ag and antibodies


BECKMAN COULTER
Biomek i7

Automation of Infectious Disease **Serology** at “Policlinico Umberto I”
Sapienza University of Rome
Building 29 / Basement Level - Unit of “Microbiology and Virology"

1 cobas P512 preanalytical system
1 cobas connection module (CCM)
2 cobas pro (1 module cobas e801 each)
2 free slot for third party instruments



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

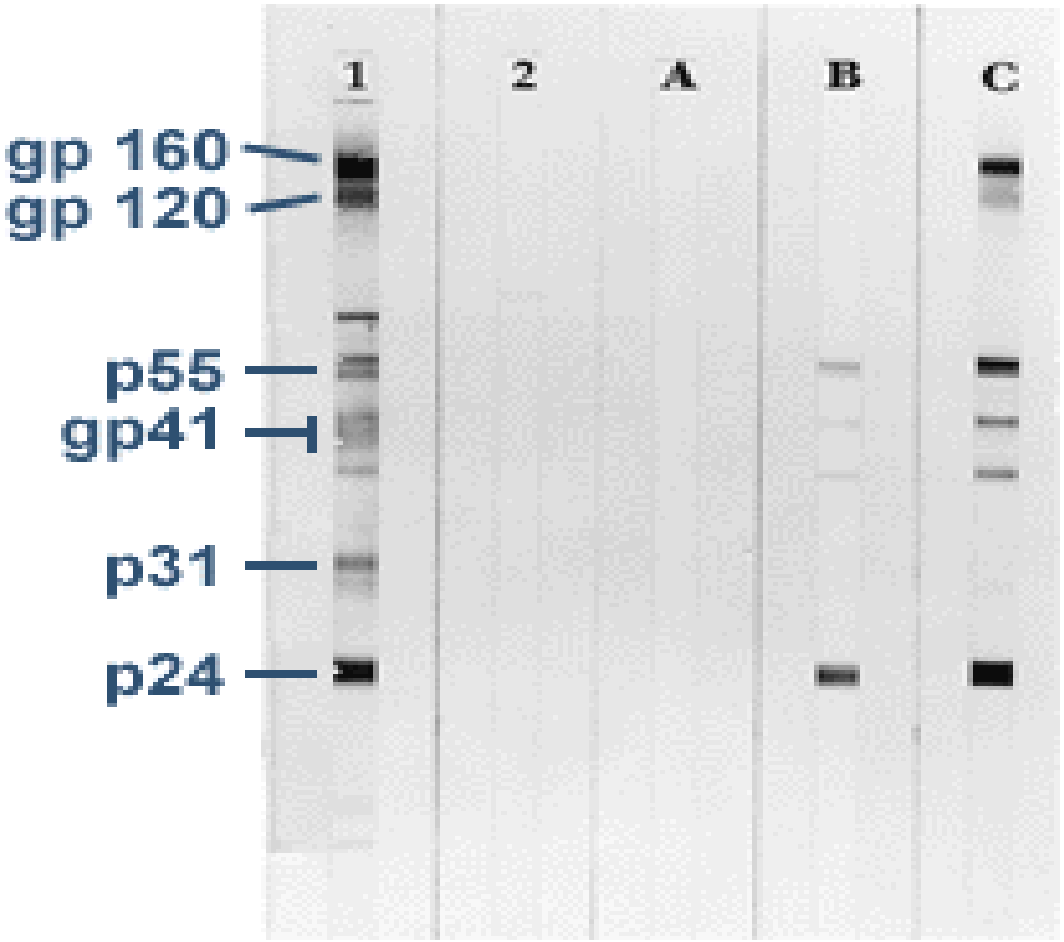
Vengono utilizzati per confermare una reattività ottenuta con i saggi si screening

- **ELEVATA SPECIFICITA'**

WESTERN BLOT

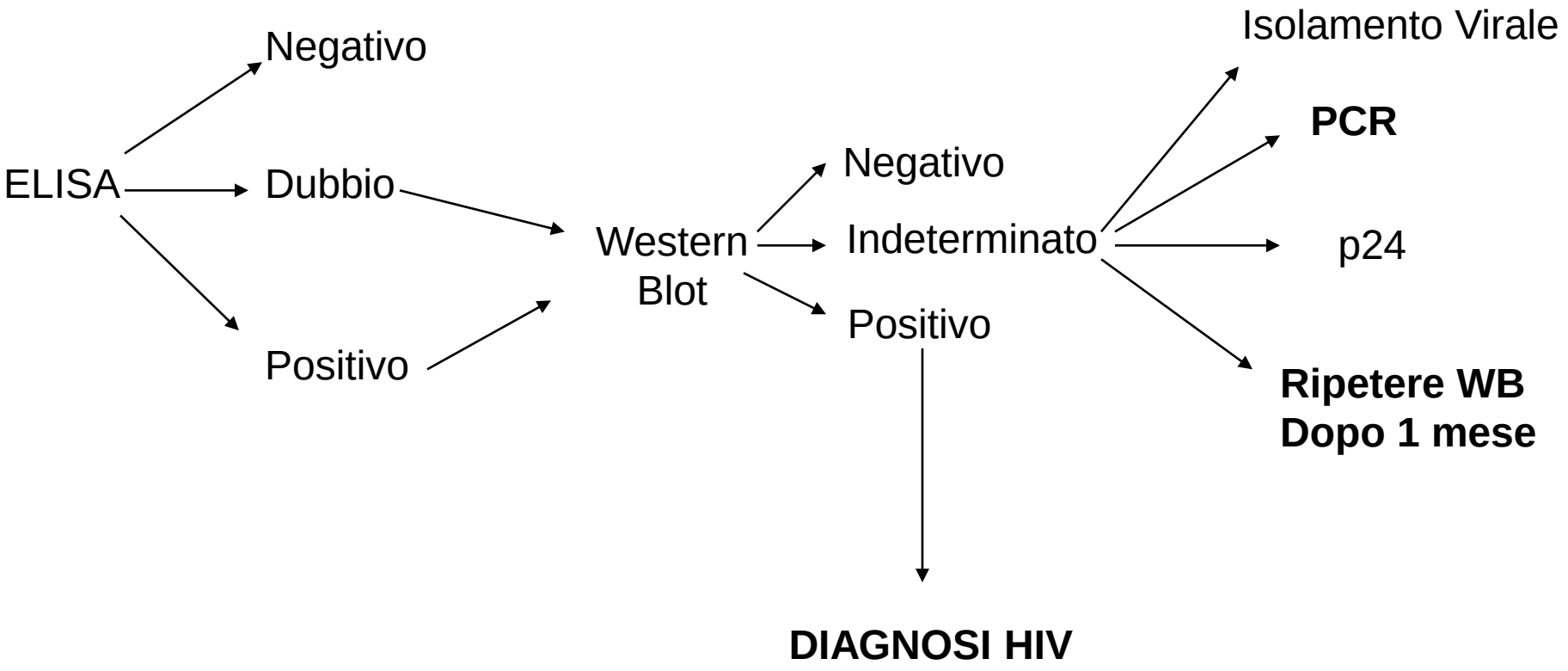
Proteine ottenute da lisati virali, separate su gel di acrilammide e trasferite su strisce di nitrocellulosa

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

Algoritmo diagnostico nell'adulto

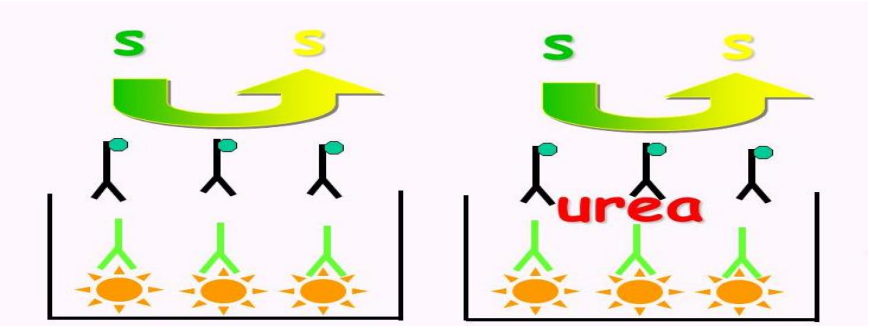


AVIDITY is the strength of the binding between the IgG antibody and its antigen.
Following antigenic challenge the IgG antibodies produced initially bind weakly to the antigen (**low avidity**).
As the immune response develops there is maturation of IgG antibody response and the avidity increases progressively 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 (denaturating 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

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

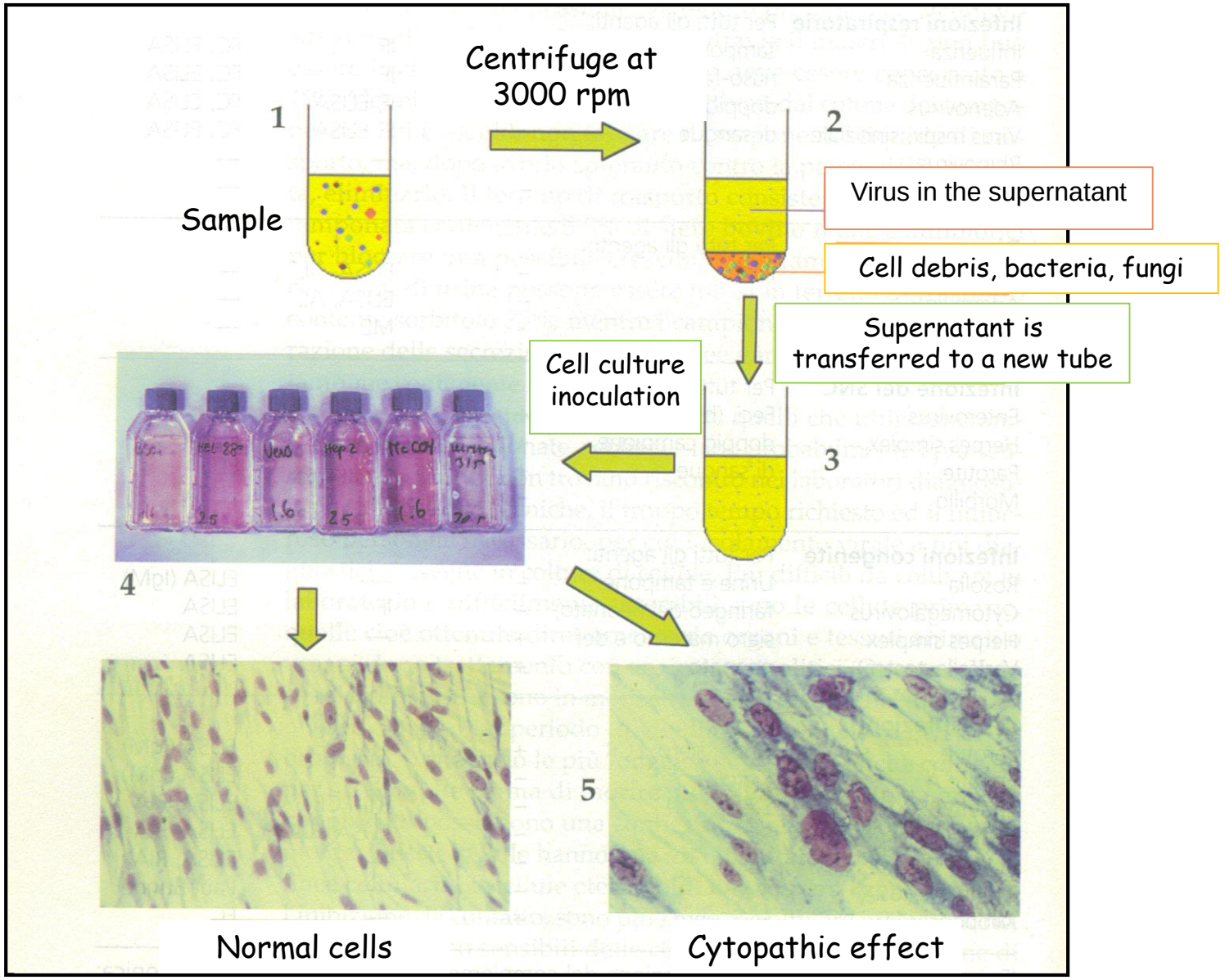
INDAGINI VIROLOGICHE DIRETTE

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

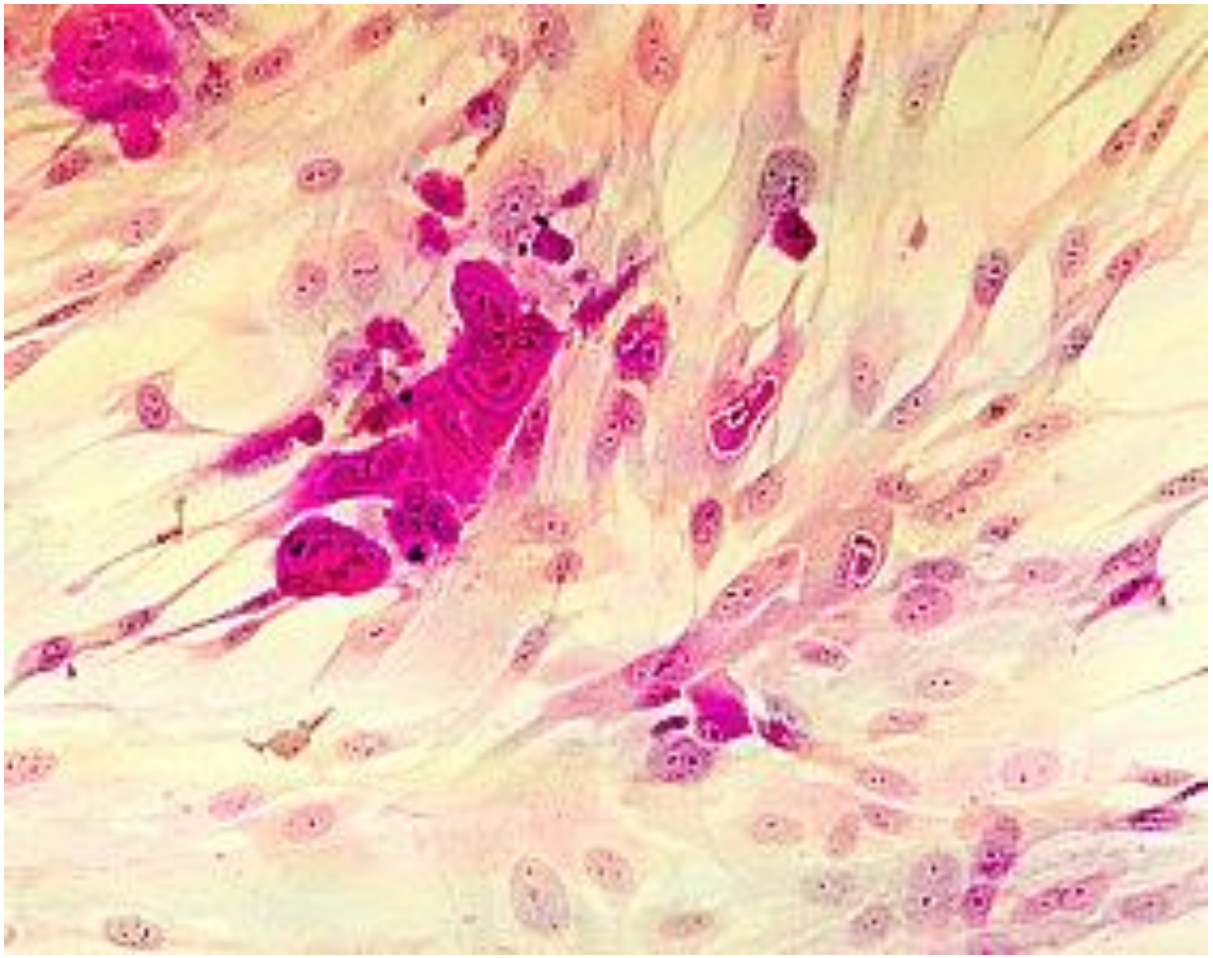
PRINCIPALI TIPI DI COLTURE CELLULARI

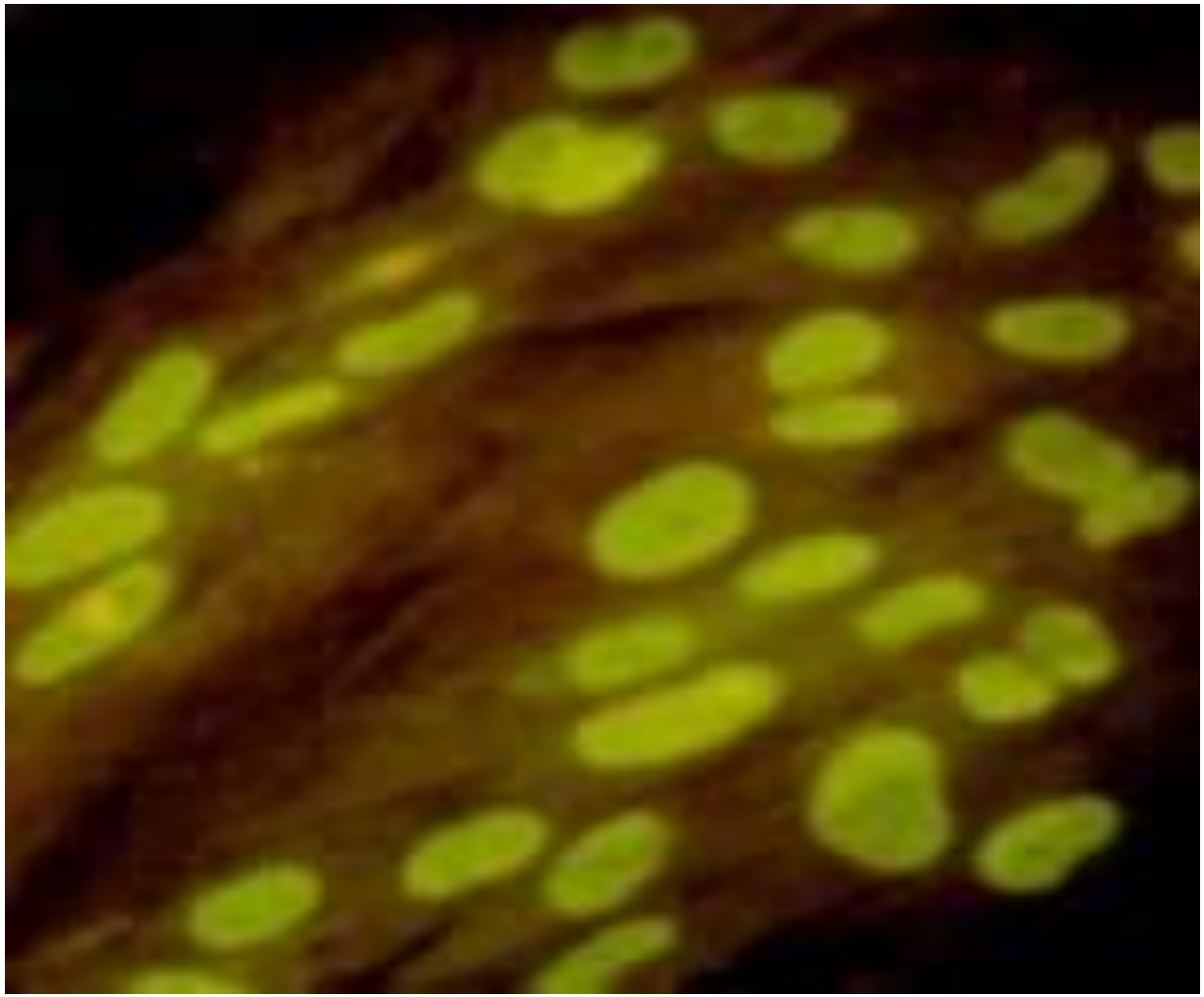
Tipo	Caratteristiche
Coltura primaria	Corredo diploide primo espianto durata 1-2 replicazioni cellulari
Coltura diploide	Corredo diploide derivata da colture primarie Durata massima 50 replicazioni cellulari
Linea cellulare continua	Corredo aneuploide durata indefinita

CYTOPATHIC EFFECT (CPE)



CPE caused by CMV in human fibroblasts





HCMV Immediate Early immunofluorescence detection on infected cell culture

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.

INDAGINI VIROLOGICHE DIRETTE

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

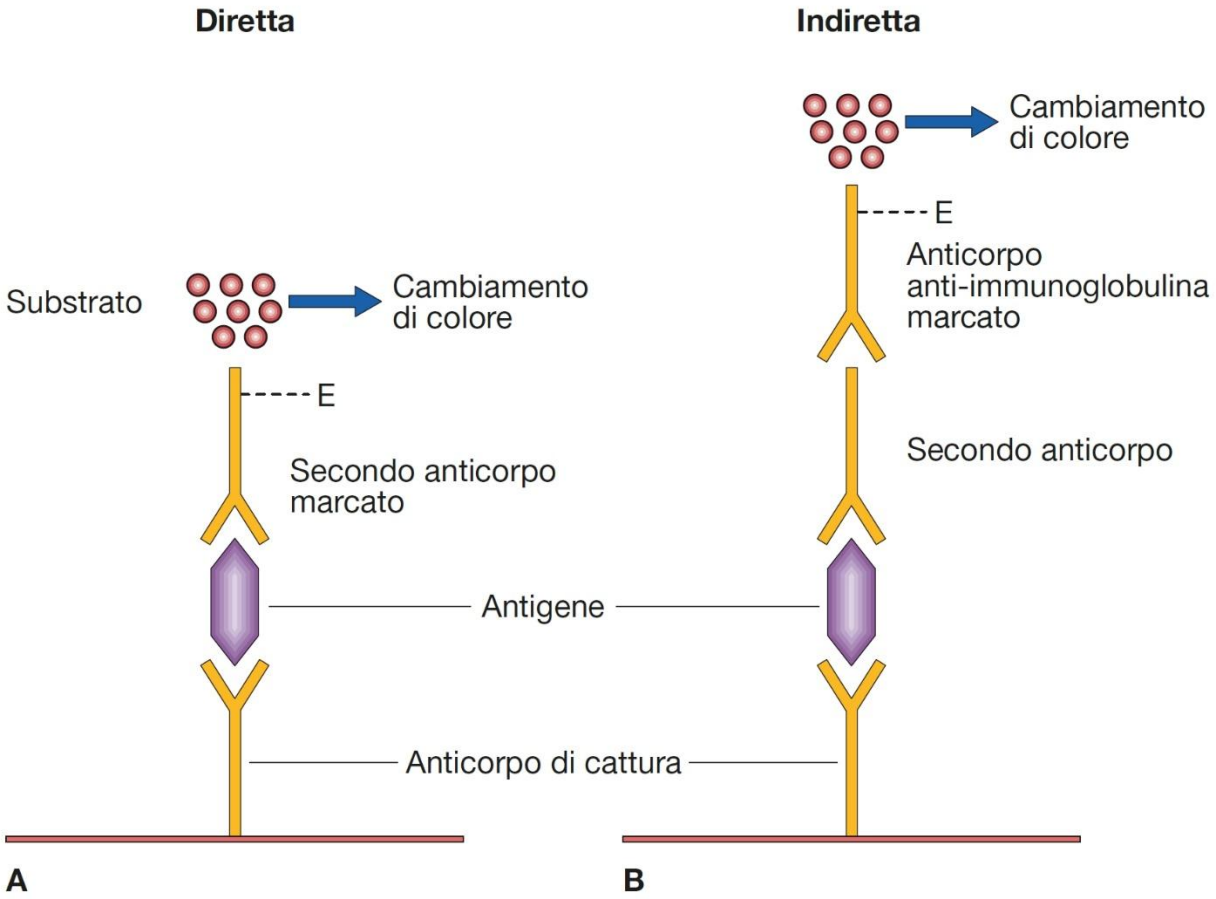


Figura 40.1 Schema di saggio immunometrico (ELISA) per la rilevazione di antigeni. **A.** Metodo diretto: l'antigene viene riconosciuto utilizzando direttamente un anticorpo marcato. **B.** Metodo indiretto: l'antigene viene riconosciuto utilizzando un primo anticorpo virus-specifico; segue poi l'aggiunta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

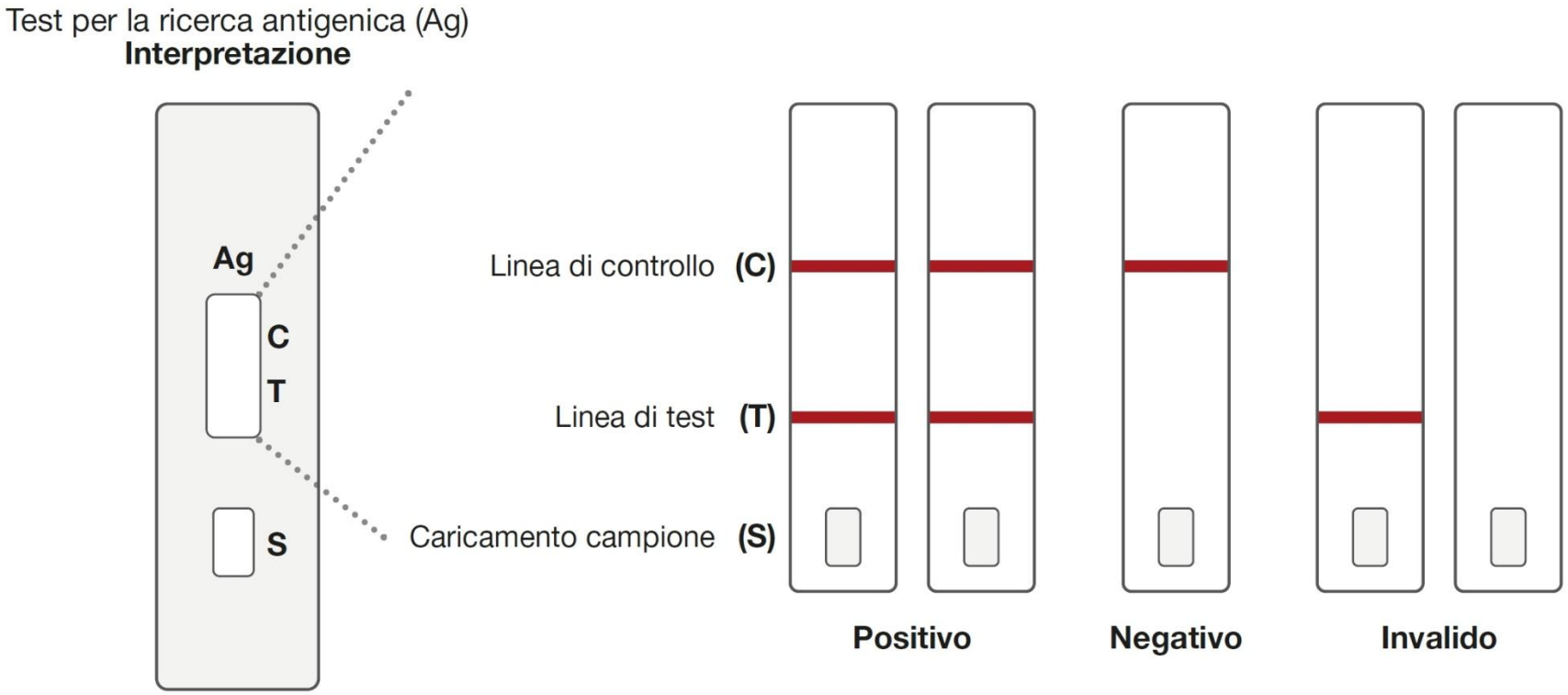
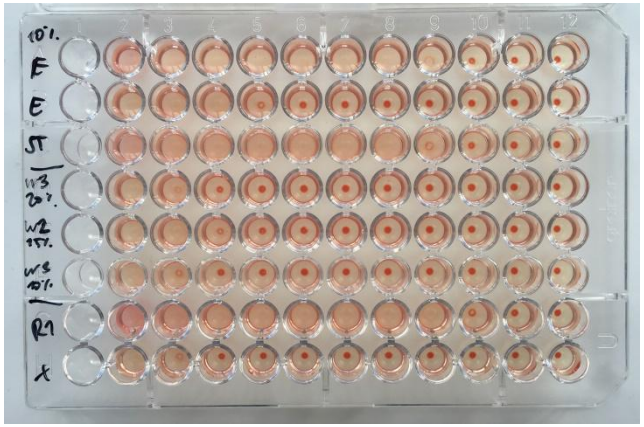


Figura 40.2 **Test rapidi per la rilevazione degli antigeni.**

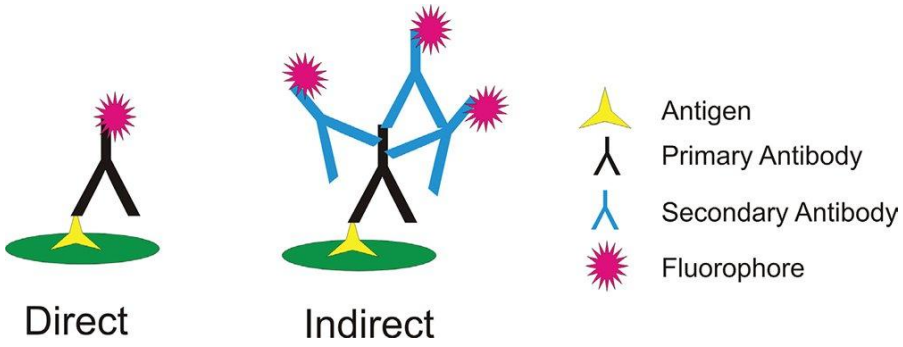
Many types of assays can be used for the serological diagnosis

ELISA

Hemagglutination assay



Immunofluorescence assay



Complement fixation assay

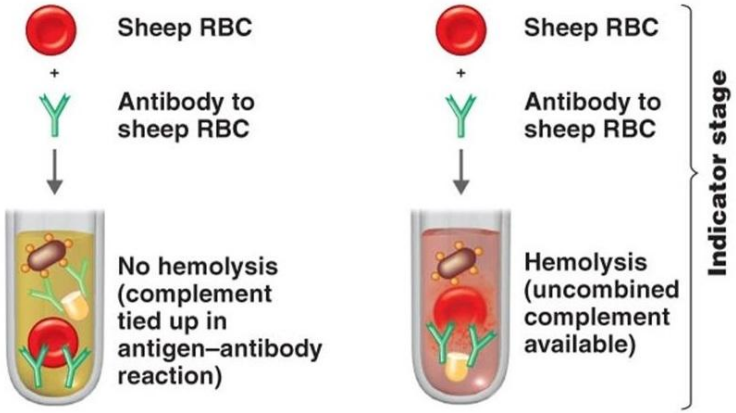


Tabella 40.1 Rilevazione di antigeni virali: campioni utilizzati e virus rilevati.

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)

In alcune condizioni la diagnosi sierologica è inefficace o difficile da interpretare

- Prelievo tardivo del primo campione.
- Infezione superficiali (es. respiratorie) che non inducono risposta umorale
- Infezione congenite e/o neonatali
- Soggetti immunocompromessi
- Reinfezioni
- Riattivazioni delle infezioni latenti

INDAGINI VIROLOGICHE DIRETTE

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

Metodi molecolari per la diagnosi delle infezioni virali

Tecniche classiche

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

Tecniche recenti ma non più utilizzate

- bDNA
- TMA

Tecniche "piu recenti"

- PCR
- Real-time PCR

Tabella 40.2 Utilizzo di metodi molecolari nella diagnosi virologica.

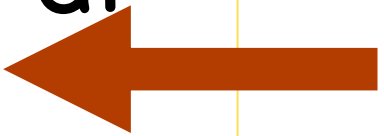
Virus	Campione	Applicazione
HIV (qualitativo) (quantitativo)	Linfociti Plasma	Diagnosi precoce, diagnosi perinatale Monitoraggio dell'infezione e della terapia
HSV	Liquor, raschiati o fluidi oculari	Encefalite, retinite, meningite
VZV	Liquor, raschiati o fluidi oculari	Encefalite, retinite, meningite
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

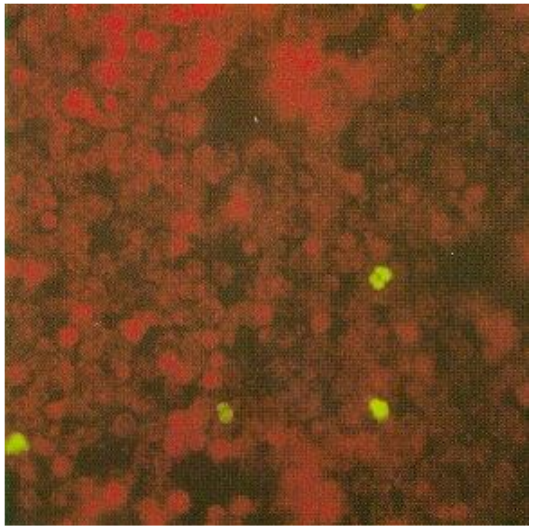
- Isolamento virale
- Ricerca di antigeni
- Ricerca degli acidi nucleici
- Microscopia elettronica
- Dimostrazione di presenza di virus nei campioni biologici

INDAGINI VIROLOGICHE DIRETTE

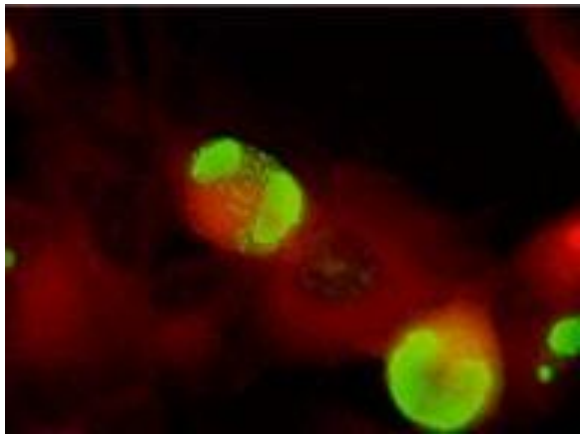
- Isolamento virale
- Ricerca di antigeni
- Ricerca degli acidi nucleici
- Microscopia elettronica
- Dimostrazione di presenza di virus nei campioni biologici



Viral antigen detection in clinical specimens



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



- for PBL samples
- semiquantitative

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

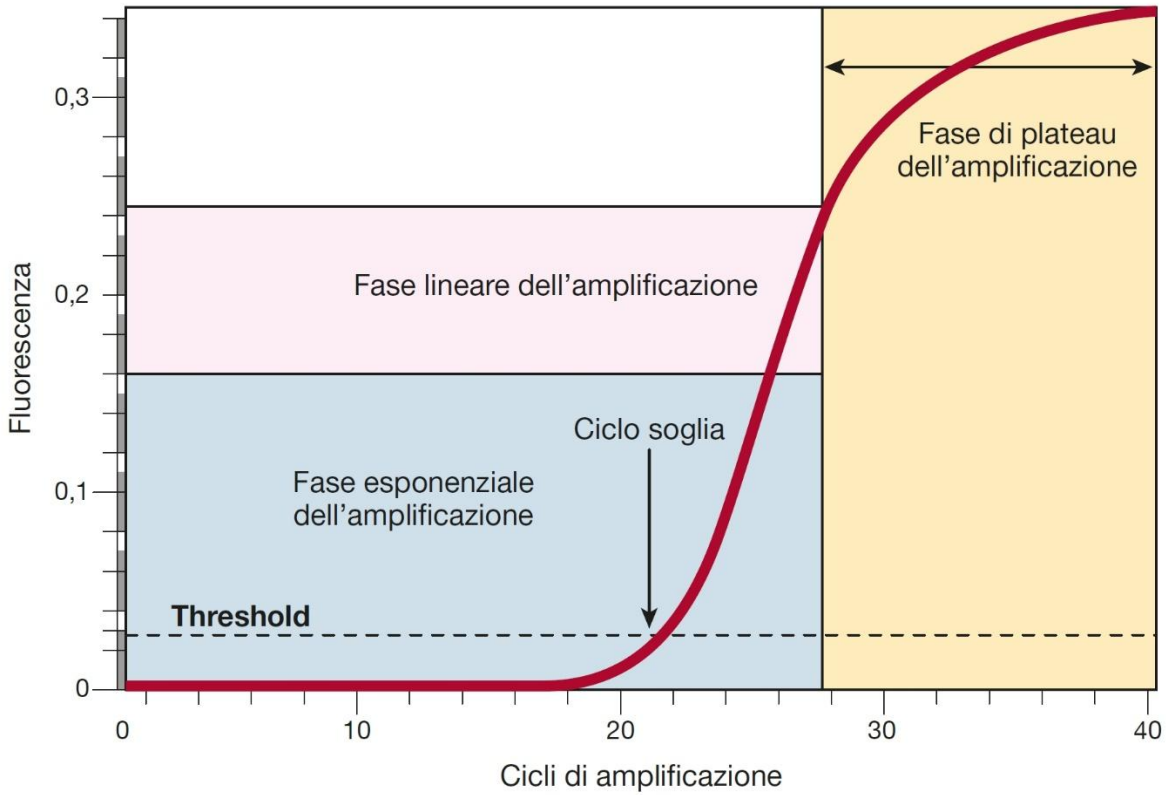
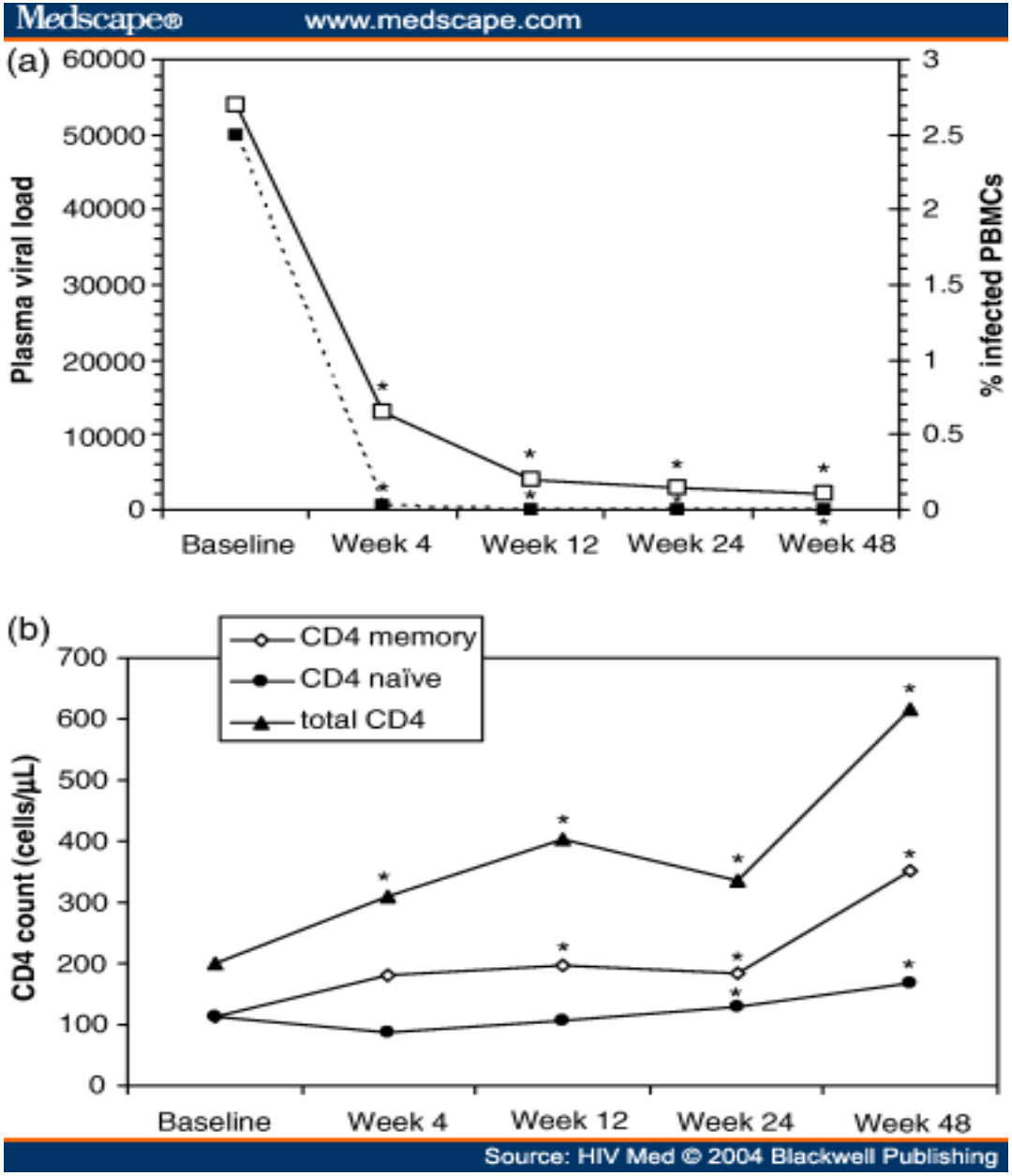


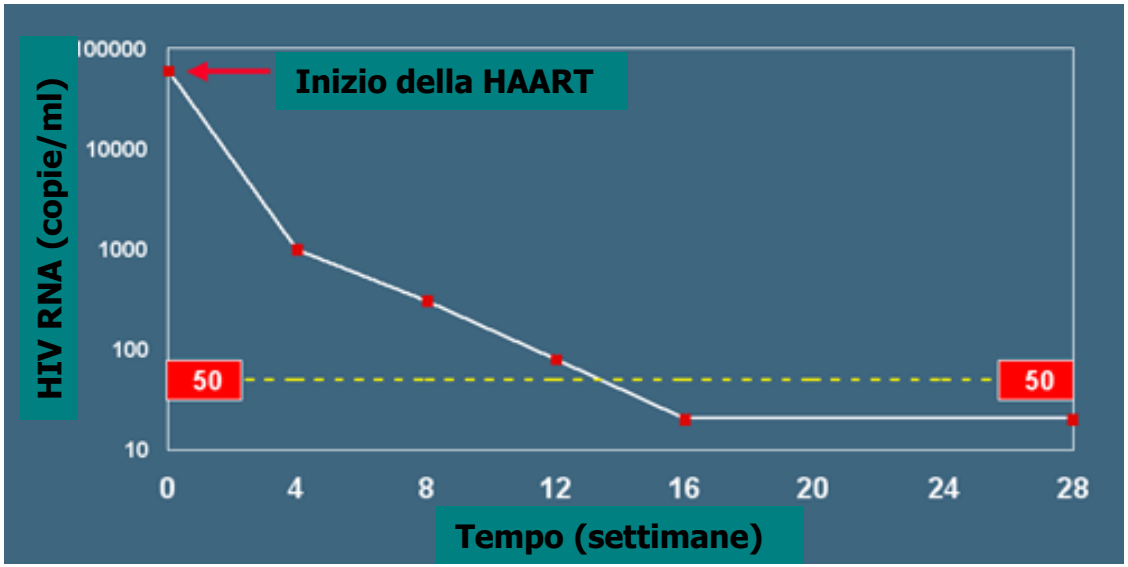
Figura 40.3 Analisi di una curva di amplificazione in Real-Time PCR. La quantificazione viene effettuata aggiungendo composti fluorescenti (intercalanti o sonde marcate) la cui fluorescenza emessa a ogni ciclo di reazione è proporzionale alla quantità di materiale di partenza. La resa teorica (ovvero il raddoppiamento degli ampliconi a ogni ciclo di reazione) equivale alla resa reale solo nella fase esponenziale della curva in cui l'efficienza di reazione è massima. Nella Real-Time PCR la quantificazione avviene pertanto in questa fase grazie alla raccolta del segnale di fluorescenza da parte di strumenti specifici e alla successiva elaborazione e visualizzazione da parte di un software. La **fase esponenziale** rappresenta la fase di massima efficienza della reazione ed è quella in cui viene rilevato il segnale per la quantificazione. La **fase lineare** è una fase di grande variabilità in cui la reazione comincia a perdere di efficienza per l'esaurimento dei reagenti. La **fase di plateau** è la fase in cui la reazione ha perso di efficienza (a causa dell'esaurimento dei reagenti), non si producono più ampliconi e di conseguenza anche il segnale di fluorescenza si esaurisce. La **threshold** è la linea scelta dall'operatore in modo da intersecare la fase esponenziale della curva in cui l'efficienza della reazione è massima e separa il rumore di fondo dalla fase di massima efficienza della reazione. Il **ciclo soglia** (Ct) è il ciclo di amplificazione della reazione in cui il segnale di fluorescenza è superiore alla threshold. Il Ct è inversamente proporzionale alla quantità di materiale di partenza. Più basso sarà il ciclo soglia, maggiore sarà la quantità di materiale di partenza presente nel campione.

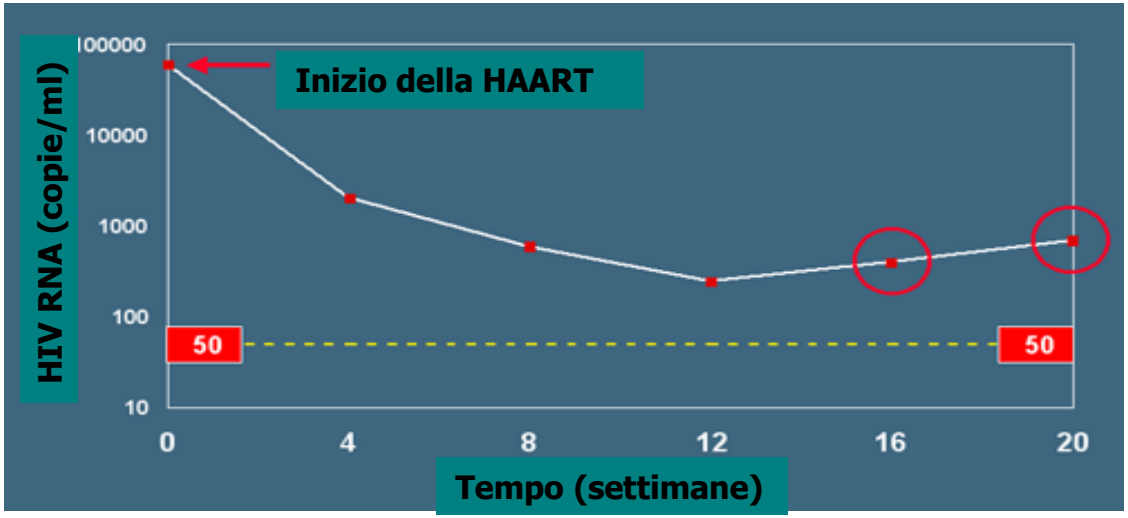
Decline of plasma viral load and percentage infected PBMCs following HAART

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

Algoritmo diagnostico nell'adulto

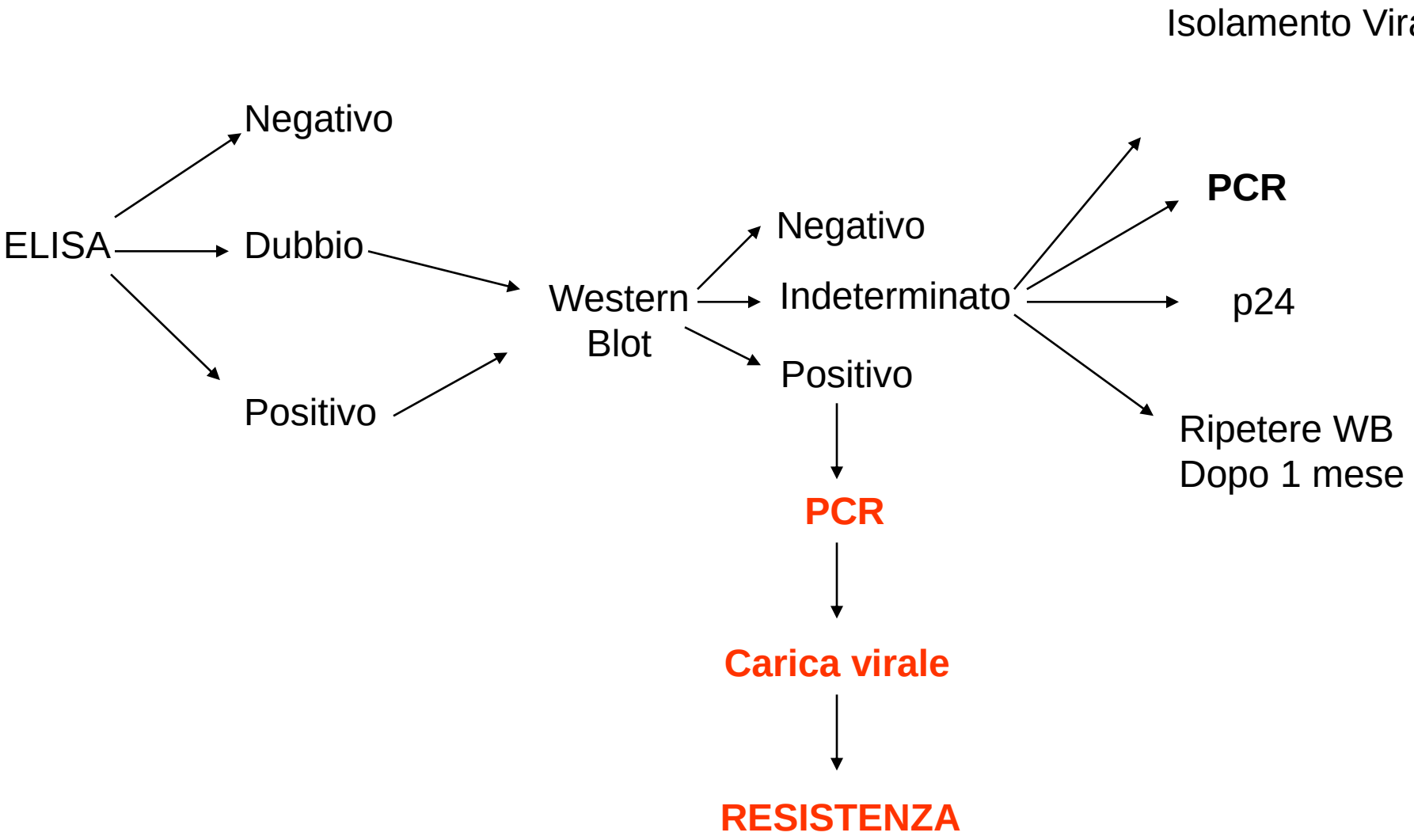


Tabella 40.5 Diagnosi virologica nel feto e nel neonato.

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

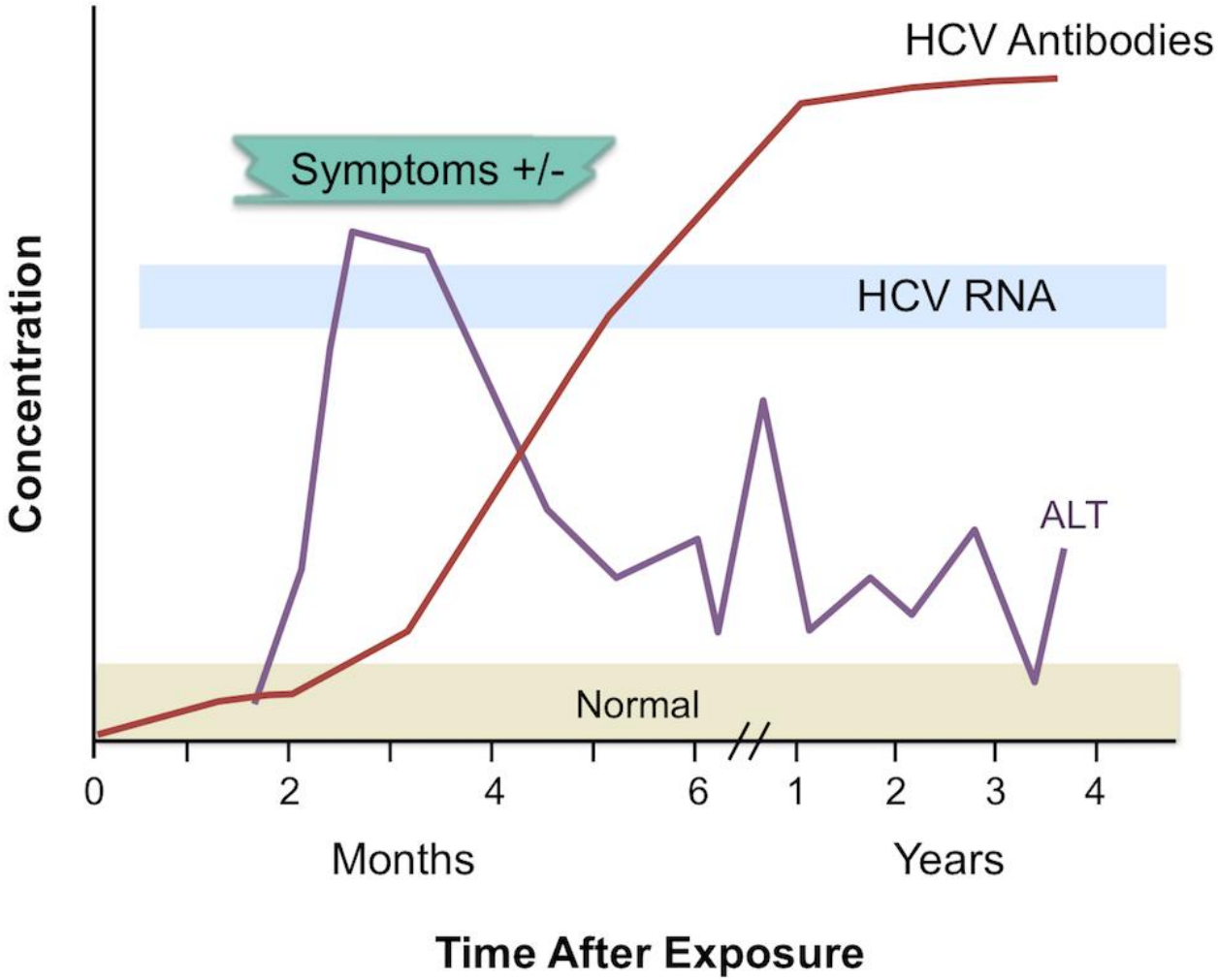
* La coltura nella prima settimana di vita è importante per distinguere l'infezione congenita dall'infezione neonatale.
** La coltura può essere eseguita anche su altri materiali (liquor, urine ecc.); la PCR su liquor può aiutare nell'identificazione del coinvolgimento del sistema nervoso; la PCR nel sangue può aiutare a diagnosticare infezioni disseminate specialmente in assenza di lesioni cutanee.

978-88-08-18705-5

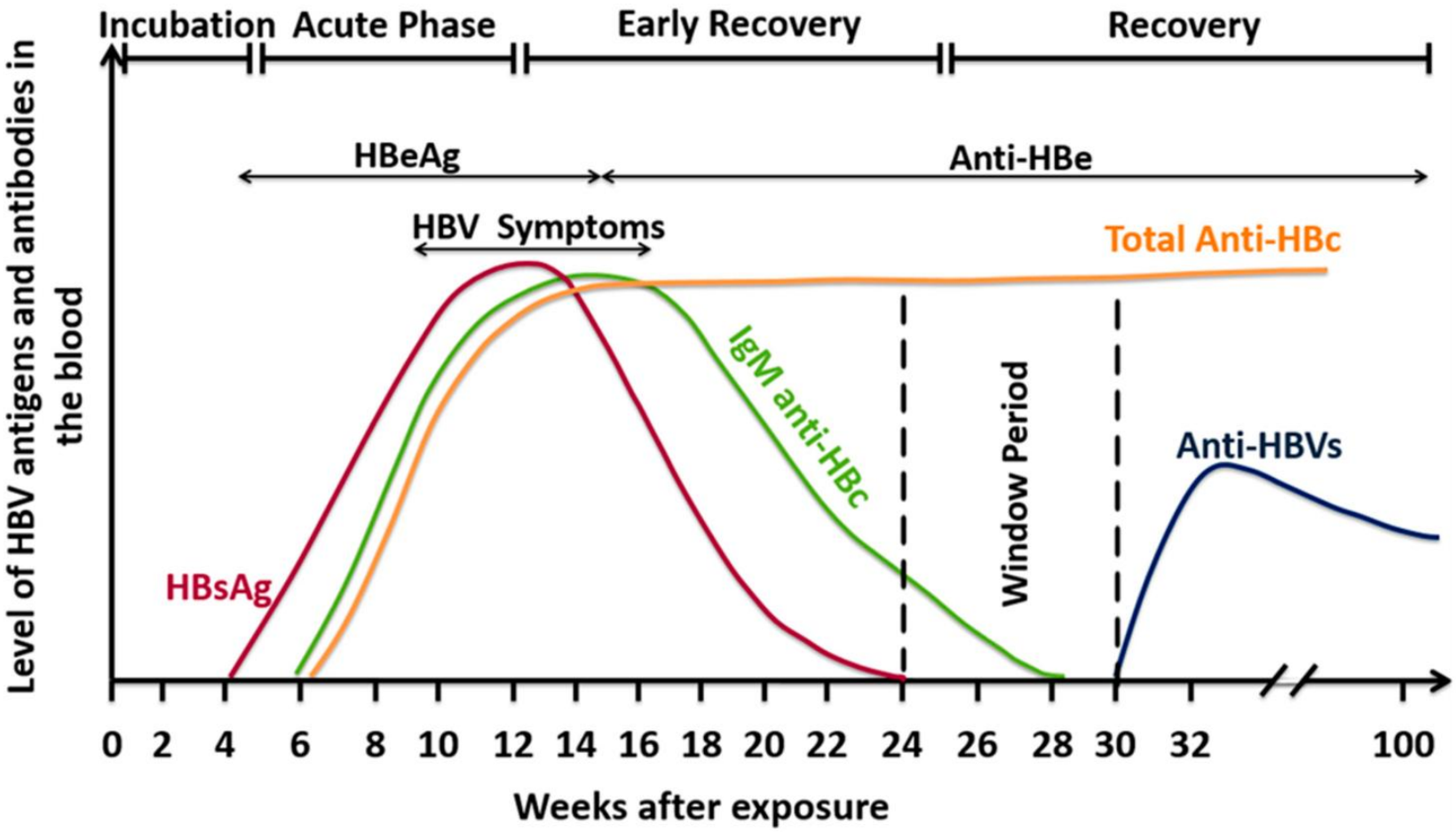
DIAGNOSI DELLE INFEZIONI VIRALI

- INDAGINE SIEROLOGICA
- INDAGINE VIROLOGICA

HCV Markers


HCV Antibodies
Symptoms +/-
HCV RNA
ALT
Normal
Concentration
0
2
4
6
1
2
3
4
Months
Years
Time After Exposure

HBV Markers


Incubation
Acute Phase
Early Recovery
Recovery
HBeAg
Anti-HBe
HBV Symptoms
Total Anti-HBc
IgM anti-HBc
Window Period
Anti-HBVs
HBsAg
Level of HBV antigens and antibodies in the blood
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 100
Weeks after exposure