

M1.4 - UTILIZZO DELLA STRUMENTAZIONE ODYSSEY PER LA TITOLAZIONE DI VIRUS A DNA E A RNA [Anna Teresa PALAMARA]

Data di attivazione della borsa di studio (6 mesi): in corso di attivazione.

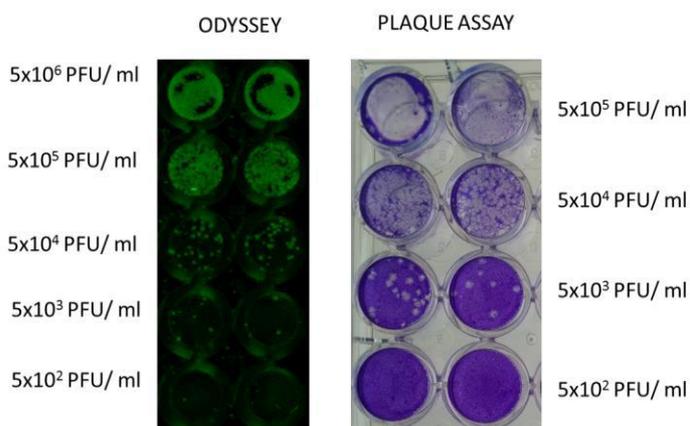
Introduzione ed obiettivi. L'obiettivo principale dell'Unità di Ricerca in questo I° anno di attività è consistito nella messa a punto di uno strumento innovativo per la titolazione e la caratterizzazione di virus a DNA e RNA. In particolare sono stati messi a confronto metodi classici di titolazione virale quali il metodo delle placche, il metodo della TCID50 (concentrazione di virus in grado di infettare il 50% del monostrato cellulare) e del test di emoagglutinazione, con nuovi test di titolazione virale utilizzando la strumentazione "Odyssey CLx imaging System" acquistata di recente dal nostro Dipartimento.

Le principali metodiche utilizzate in un laboratorio di virologia per quantificare il numero di particelle virali presenti in un campione comprendono la titolazione virale mediante il metodo delle placche o l'osservazione al microscopio dell'effetto citopatico indotto dal virus sulle cellule infettate. Sicuramente, il tipo di metodica utilizzata dipende dal tipo di virus preso in esame, alcuni virus infatti producono, *in vitro* su un monostrato cellulare, un effetto citopatico ben visibile e possono essere titolati anche senza l'ausilio della microscopia, introducendo però variabili dovute alla soggettività del giudizio dell'operatore. La metodica più spesso utilizzata per questi virus è la "plaque formation assay" ma è una tecnica che necessita di una quantità di campione iniziale che non sempre è disponibile e richiede decisamente molto tempo.

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di sviluppare una metodica di titolazione virale utilizzando la tecnica "in Cell Western" grazie alla strumentazione "Odyssey CLx imaging System" che utilizza un sistema di rilevazione di segnale emesso da anticorpi con fluorofori che emettono a lunghezza d'onda vicino all'infrarosso (680 e 800 nm) "Near-InfraRed" (NIR).

Risultati del I anno di ricerca. Cellule Vero permissive al virus Herpes Simplex di tipo I (HSV-1) sono state fatte crescere in multiwells da 96. Quando il monostrato cellulare ha raggiunto il 90% di confluenza (dopo circa 24 h), le cellule sono state infettate con i campioni contenenti il virus da titolare. Dopo 24 ore dall'infezione, le cellule sono state fissate con Paraformaldeide al 4% e successivamente sono state effettuate le incubazioni dell'anticorpo primario (che lega una delle proteine virali) e dell'anticorpo secondario coniugato ad un fluoroforo (che lega l'anticorpo primario).

Per validare la titolazione effettuata con la metodica "In cell Western" è stata inizialmente preparata una curva standard con diluizioni seriali del virus ed in parallelo tale curva standard è stata valutata anche con la metodica tradizionale di "plaque formation assay". Una volta messa a punto la tecnica con la curva standard sono stati titolati differenti campioni già titolati con la metodica tradizionale. I risultati ottenuti titolando il virus con l'utilizzo della nuova metodica che utilizza l'Odyssey sono esattamente confrontabili ai risultati ottenuti con il metodo tradizionale del Plaque Assay, come si evince dalla seguente figura.



I vantaggi di questo metodo innovativo di titolazione virale sono molteplici, *in primis* c'è una riduzione della quantità di campione necessaria per l'analisi, infatti grazie all'utilizzo delle multiwells da 96 rispetto alle multiwells da 24 richieste nella metodica tradizionale la quantità di campione è ridotta di ben 10 volte. Inoltre il tempo necessario per la titolazione tramite Odyssey è senza dubbio inferiore, sia perché si riduce il tempo di attesa dopo l'infezione (24 ore e non 48/72 come nella metodica tradizionale), sia perché è possibile titolare molti più campioni contemporaneamente. Una possibile applicazione di questo metodo riguarda i test di attività antivirale, dove un numero elevato di nuovi composti potrebbe essere saggiato in tempi più rapidi e meno costosi.

La titolazione tramite "In cell western" Odyssey messa a punto per l'HSV-1 può essere utilizzata anche per la titolazione di altri virus sia a DNA che a RNA. In questa prima fase del progetto, abbiamo iniziato la messa a punto della titolazione del virus influenzale A/PR8/H1N1, eseguendo l'infezione con diluizioni seriali di virus su cellule epiteliali polmonari A549 e ottenendo risultati molto promettenti e confrontabili con il classico test dell'emoagglutinazione.

Attività previste per il II anno del progetto:

Durante il secondo anno di progetto l'obiettivo della Unità Palamara sarà la messa a punto in modo dettagliato di tale metodica sul modello di infezione da virus influenzale. Parallelamente, in questo modello sarà messa a confronto l'analisi in western blot delle proteine virali, che saranno evidenziate col metodo classico della chemiluminescenza e con lo strumento Odyssey. Il vantaggio di quest'ultimo consiste nella maggiore stabilità e nella durata nel tempo del segnale. In questo modo sarà possibile valutare l'espressione di proteine virali e/o cellulari anche a distanza di 24/48 ore dalla colorazione con gli anticorpi specifici. Inoltre sarà possibile evidenziare contemporaneamente proteine diverse con diversi anticorpi secondari così da ridurre i tempi di esposizione e ottenere i risultati in minor tempo.