

Emoagglutinazione

Lavaggio degli eritrociti

Le attività emolitica ed emoagglutinante del virus Sendai richiedono una soluzione di eritrociti umani lavati in tampone PBS e diluiti al 2% (v/v).

Protocollo

Reagenti

- Sangue umano fresco.
- Tampone PBS: 150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7,4.

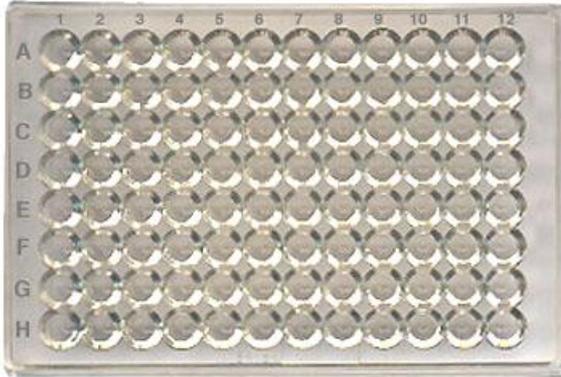
Esecuzione del lavaggio

Il sangue intero è diluito con PBS, in volume triplicato rispetto al sangue, e gli eritrociti vengono sedimentati per centrifugazione 10 a 3000 rpm. Plasma, leucociti e piastrine vengono rimossi; gli eritrociti sono risospesi in PBS, in volume triplicato, e centrifugati nuovamente. Questa operazione si ripete altre due volte. Dopo l'ultima centrifugazione si elimina tutto il supernatante e gli eritrociti ottenuti si diluiscono al 2% (v/v) con tampone PBS e si utilizzano entro le 24 ore.

Saggio di emoagglutinazione

- L'attività emoagglutinante virale è diretta esclusivamente verso cellule bersaglio che presentano sulla membrana residui di acido sialico come gli eritrociti umani.
- L'attività emoagglutinante viene perciò testata facendo procedere la reazione a 4°C, in quanto a questa temperatura viene dosata, della glicoproteina HN, solo l'attività di legame con il suo recettore specifico. Essa è in grado di formare dei ponti tra i diversi eritrociti formando una sorta di reticolo che non precipita sul fondo del pozzetto, ma rimane a costituire un colore rosso diffuso.

SAGGIO DI EMOAGGLUTINAZIONE



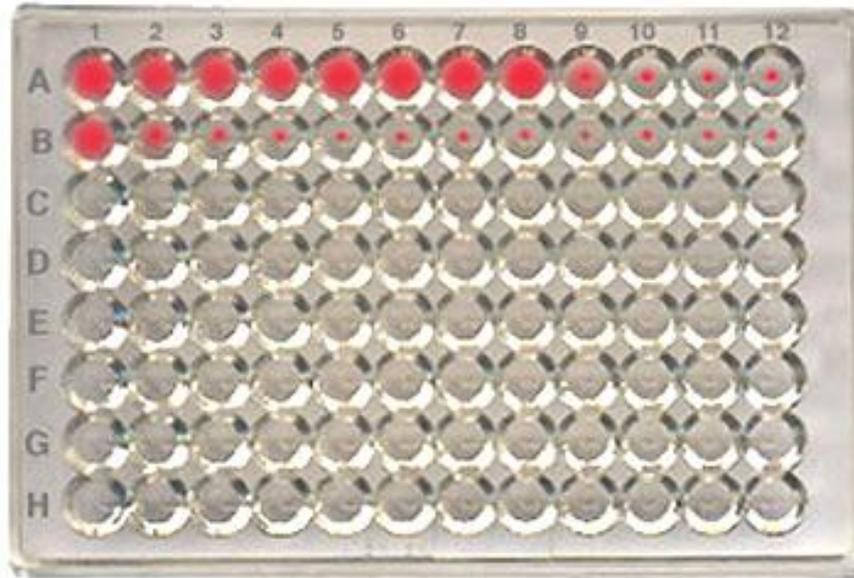
Basato sulla proprietà di alcuni virus (influenza, poxvirus) di agglutinare eritrociti

Diluizioni seriali della sospensione virale si mescolano con una diluizione standard di eritrociti



Gli eritrociti agglutinati sedimentano in maniera disordinata ricoprendo tutto il fondo del pozzetto, mentre quelli non agglutinati formano un anello circoscritto al centro della base del pozzetto

EMOAGGLUTINAZIONE



Il titolo virale è dato dall'ultima diluizione di virus che dà ancora emoagglutinazione

Protocollo

Reagenti

- Eritrociti umani freschi: diluiti al 2%(v/v) in tampone PBS.
- Tampone PBS: 150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7,4.
- Virus Sendai: 0.2-0.3 mg/ml in tampone PBS

Esecuzione del saggio

L'attività emoagglutinante è determinata in piastre da 96 pozzetti a fondo conico. In ciascun pozzetto sono messi 50 μ l di una soluzione virale in PBS, con diluizioni progressive 1:2, e 50 μ l di una sospensione di eritrociti al 2%.

Le piastre possono essere esaminate già dopo 1 ora a 4°C.

Una unità emoagglutinante è la più bassa concentrazione virale che induce emoagglutinazione.

Emolisi

Saggio di emolisi

➤ L'attività fusogena virale è rilevata usando come cellule bersaglio eritrociti umani. In seguito alla fusione, la membrana eritrocitaria subisce delle alterazioni che portano alla lisi delle emazie con fuoriuscita di emoglobina. L'attività fusogena del virus Sendai è direttamente proporzionale alla quantità di emoglobina rilasciata, determinabile spettrofotometricamente a 413 nm.

➤ Il grado di emolisi, invece, non è direttamente proporzionale alla concentrazione virale; infatti la curva che descrive il rilascio di emoglobina in funzione della concentrazione virale è di tipo sigmoide, perciò il fenomeno emolitico è di tipo cooperativo. I saggi di emolisi richiedono, quindi, l'impiego di concentrazioni virali tali da permettere la determinazione del 50% di lisi rispetto ad un campione completamente lisato, ottenuto da una soluzione ipotonica.

Protocollo

Reagenti

- Eritrociti umani freschi: diluiti al 2%(v/v) in tampone PBS.
- Tampone PBS: 150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7,4.
- Virus Sendai: 0.02-0.03 mg/ml in tampone PBS

Esecuzione del saggio

L'attività emolitica è determinata mescolando 50 μ l di una soluzione virale in PBS, con diluizioni progressive, con una sospensione di eritrociti al 2%.

Dopo 30 min di incubazione a 37°C, la reazione viene arrestata con 1 ml di PBS freddo. Il campione è centrifugato 3 min a 3000 rpm per sedimentare gli eritrociti. La concentrazione dell'emoglobina nel supernatante è determinata allo spettrofotometro a 413 nm.

Lo 0% di emolisi è costituito dal solo PBS. Il 100% di emolisi viene determinato per lisi ipotonica degli eritrociti. Una unità emolitica è la più bassa concentrazione virale che induce il 50% di emolisi.