

# **Genotipizzazione virale**

## **Typing**

Separazione basata su maggiori differenze genetiche tra i membri di una singola specie virale

## **Subtyping**

Individuazione di differenze stabili all'interno di un gruppo di virus identificati mediante tipizzazione

## **Fingerprinting**

Individuazione di isolati individuali di alcuni virus

## Sierotipizzazione virale

Uso di specifici anticorpi che definiscono differenze antigeniche stabili

Influenza virus A - C

Parainfluenza types 1 - 4

Poliovirus types 1 - 3

Herpes Simplex virus types 1 - 2

Hepatitis B virus

Adenovirus types 1 - 49

Subtypes: ayw

Più di 100 Rhinovirus types

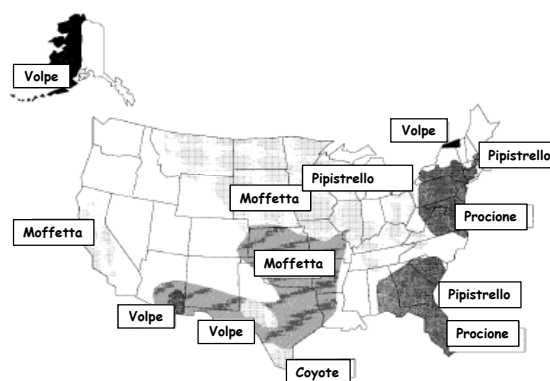
ayr

adw

adr

## Anticorpi Monoclonali

Centres for Disease Control and Prevention (CDC) - Atlanta - USA  
8 MAbs contro la proteina N del virus della rabbia



## Antibody-based virus typing

Metodi tradizionali → Fissazione del complemento  
Inibizione dell'emagglutinazione  
Inibizione dell'emadsorbimento  
Neutralizzazione

Metodi attuali → Immunofluorescenza  
Saggi immunoenzimatici

Limiti: - assenza di differenze antigeniche significative  
- impossibilità di distinguere tra isolati individuali all'interno di un sierotipo

**Avvento delle tecniche di biologia molecolare**

## Resistenza ai farmaci antivirali

Difficoltà di valutare la resistenza ai farmaci antivirali mediante metodi basati su coltura

**Fallimento nel trattamento dei pazienti infetti da HIV**

Identificazione di mutazioni specifiche in geni che codificano per proteine bersaglio di antivirali

HIV trascrittasi inversa

HIV proteasi

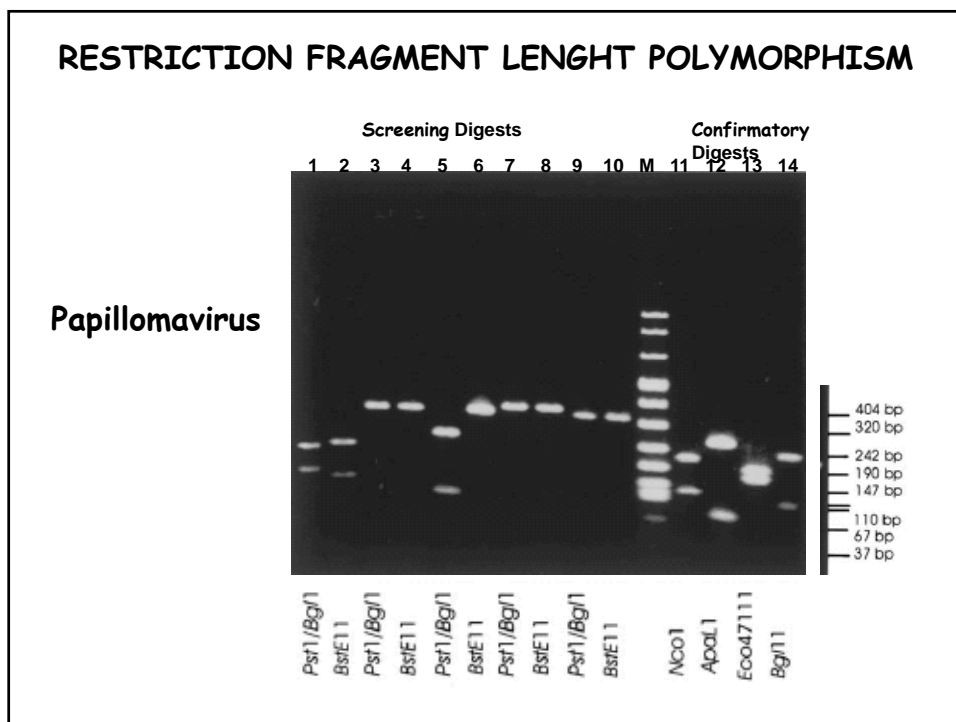
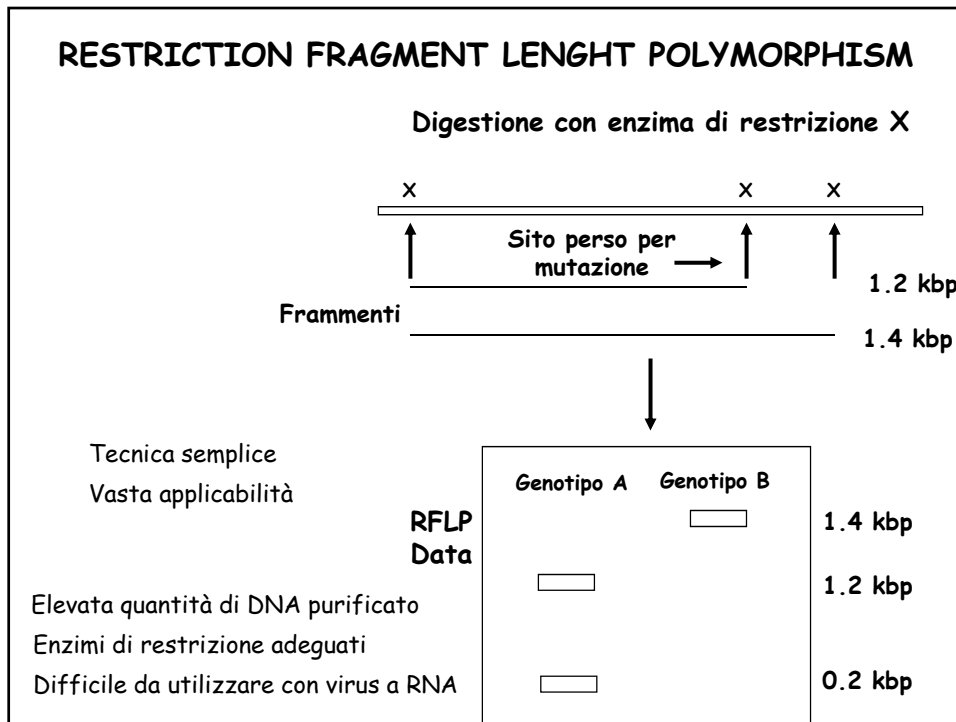
HIV genotipizzazione

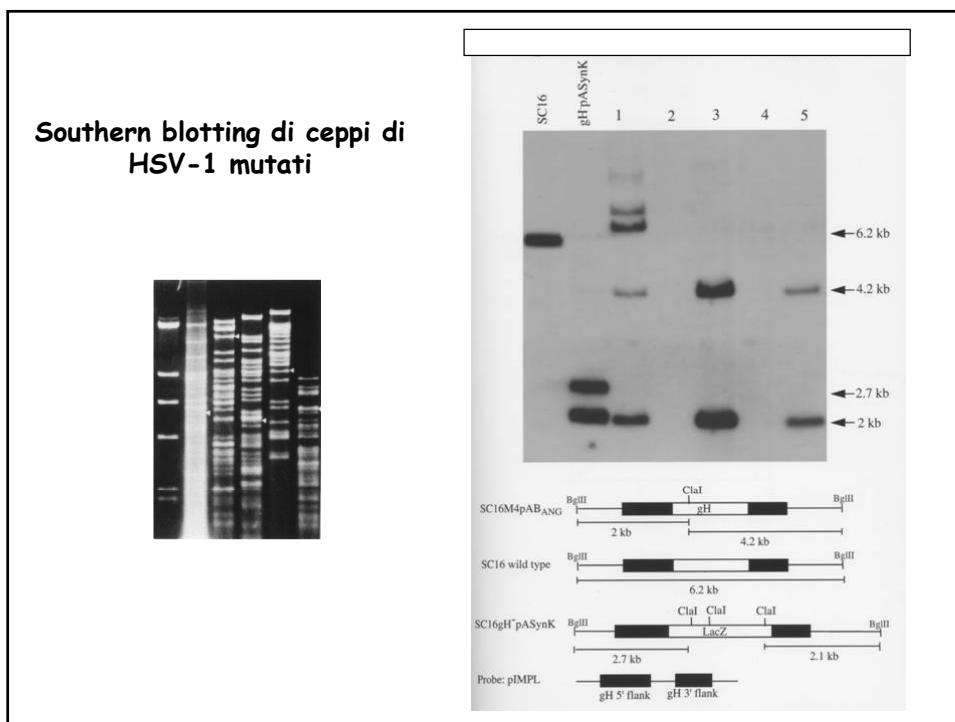
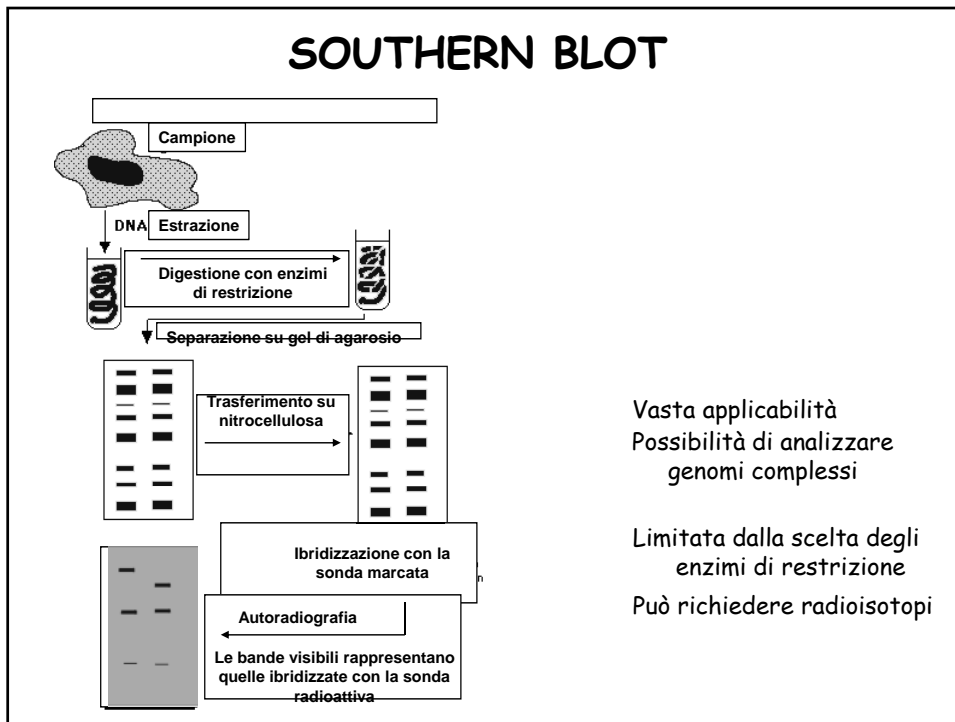
### Metodi molecolari per la caratterizzazione dei virus

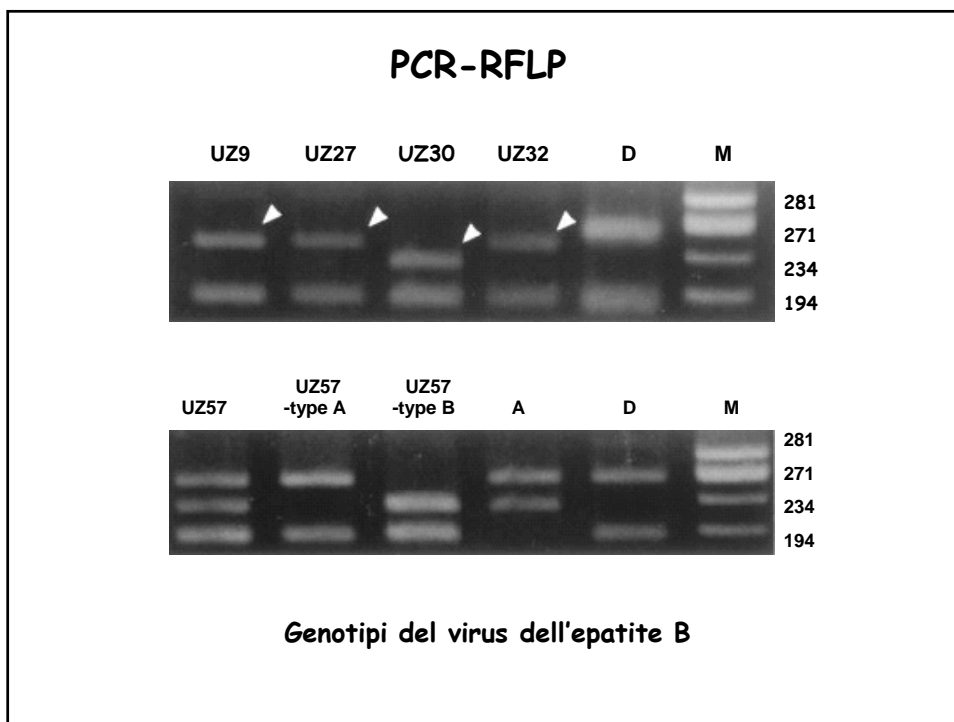
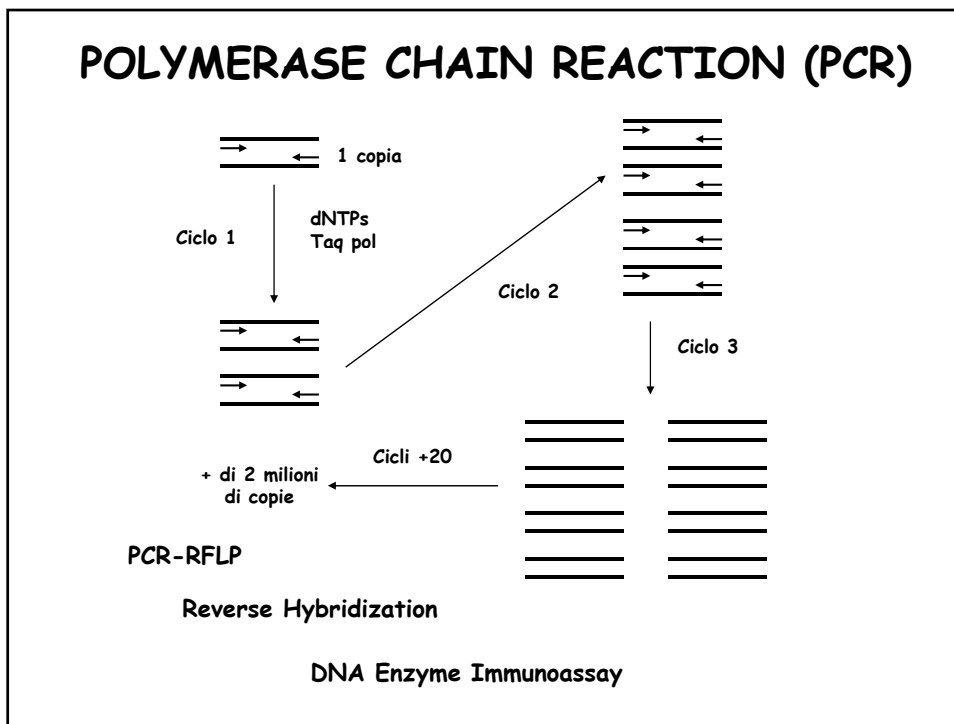
Metodo	Enzimi di restrizione	Sonda	Tipo di risoluzione	Livello di risoluzione
Restriction fragment length polymorphism (RFLP)	SI	NO	Siti di restrizione	Subtypes
Southern blot	SI	SI	Siti di restrizione e siti nella sonda	Subtypes
Oligonucleotide fingerprinting	NO	NO	Siti di clivaggio dell'RNase T1	Subtypes Quasispecies
PCR products analysis	NO	SI	Siti nella sonda	Subtypes
Ribonuclease protection assay	NO	SI	Siti nella sonda	Subtypes
Single-strand conformation polymorphism (SSCP)	NO	NO	Differenze di mobilità	Subtypes
Heteroduplex mobility assay (HMA)	NO	NO	Differenze di mobilità	Quasispecies
Nucleotide sequencing	NO	NO	Sequenza nucleotidica	Single genome
Genome segment length polymorphism	NO	NO	Lunghezza della sequenza	Subtypes

### Applicazione dei metodi di genotipizzazione per specifici virus

Virus	Metodo
Adenovirus	RFLP
Cytomegalovirus	RFLP, PCR-RFLP, Southern blot, Glycoprotein B genotyping
Epstein-Barr virus	RFLP, Analysis of termini
Enterovirus	RFLP, RT-PCR RFLP, Olig. Fingerprinting, SSCP, Nucleotide sequencing
Hepatitis B virus	Southern blot, SSCP, PCR-SSCP, Nucleotide sequencing
Hepatitis C virus	SSCP, PCR-SSCP, Reverse hybridization, Nucleotide sequencing
HIV	HMA, HTA, Nucleotide sequencing
Herpes simplex virus	RFLP, PCR-RFLP, Southern blot
Influenza	Ribonuclease protection assay, HMA, Nucleotide sequencing
Rabies	Monoclonal antibody typing, Nucleotide sequencing
Respiratory syncytial virus	Ribonuclease protection assay, PCR-RFLP, Nucleotide sequencing
Rhinovirus	Serotyping, Nucleotide sequencing
Rotavirus	Genome segment length polymorphism
Varicella-zoster virus	RFLP, PCR-RFLP







### Single-strand conformation polymorphism analysis



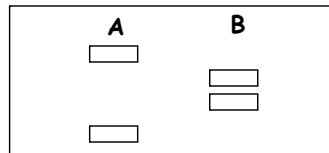
Amplificazione di un frammento contenente una mutazione puntiforme mediante PCR



Milioni di copie



Le eliche dei prodotti della PCR vengono separate mediante denaturazione

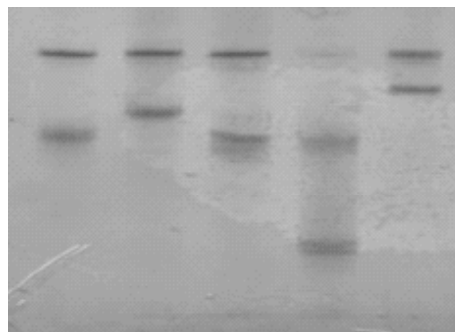


Elettroforesi su gel di poliacrilamide

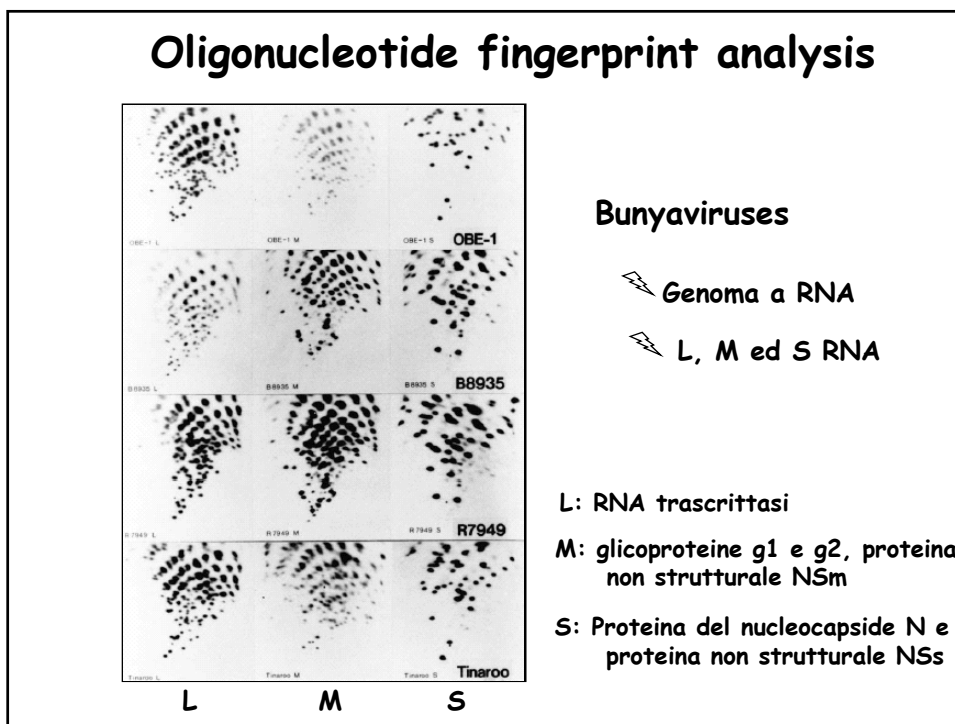
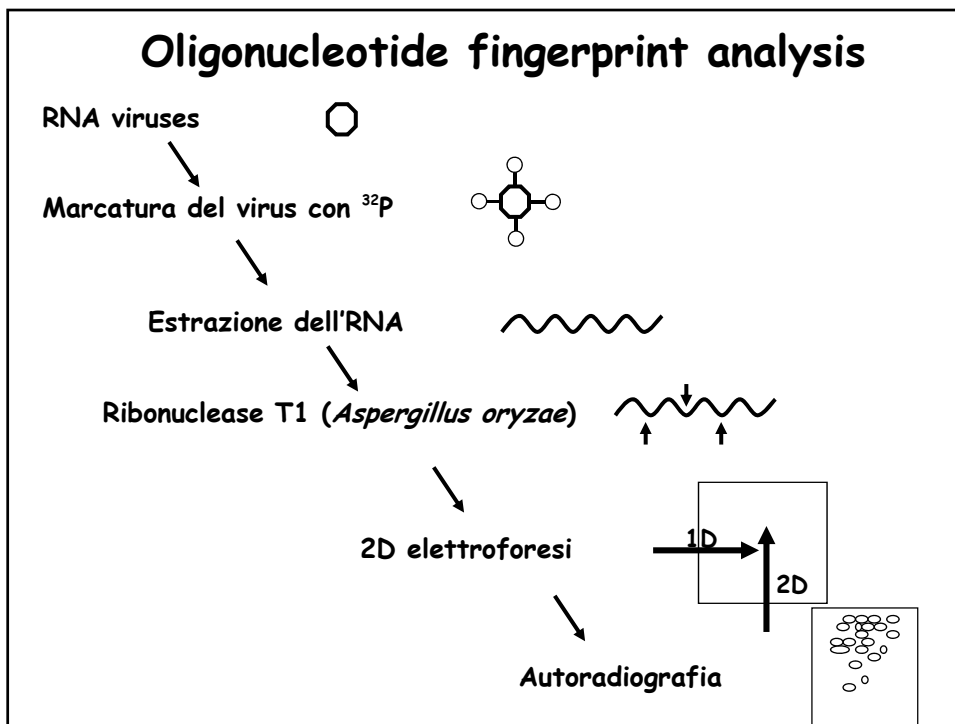
### SSCP analisi

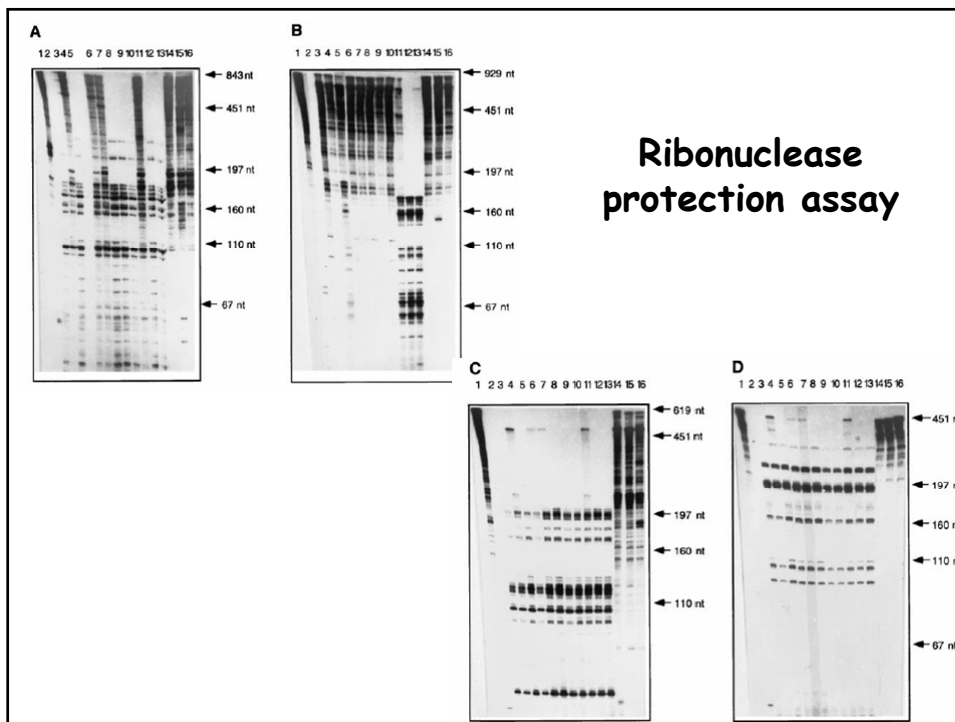
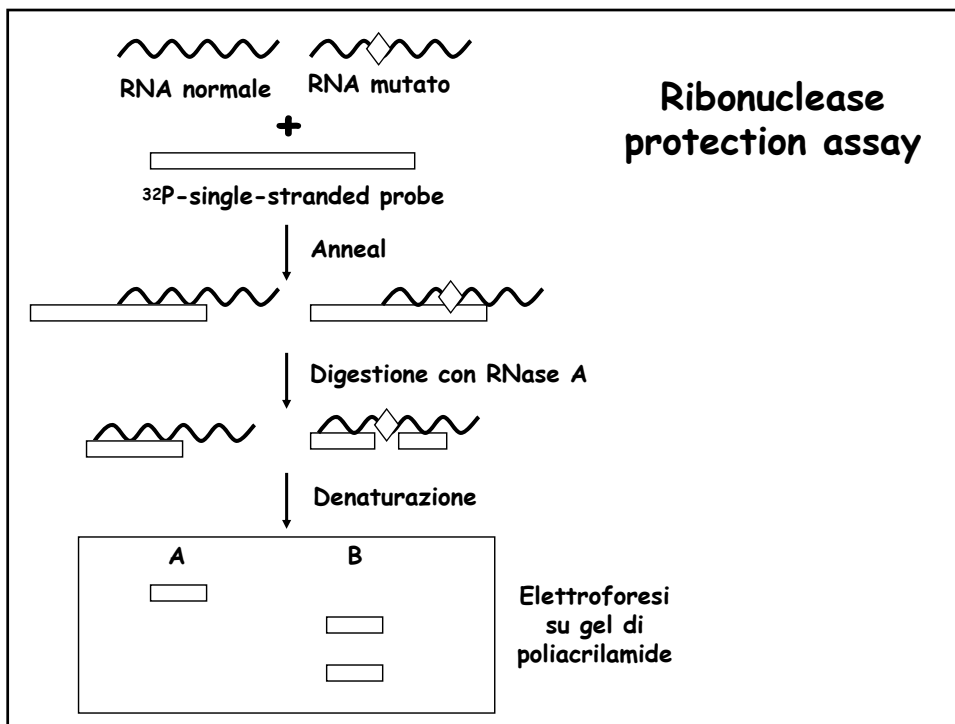
Glicoproteina B del Cytomegalovirus

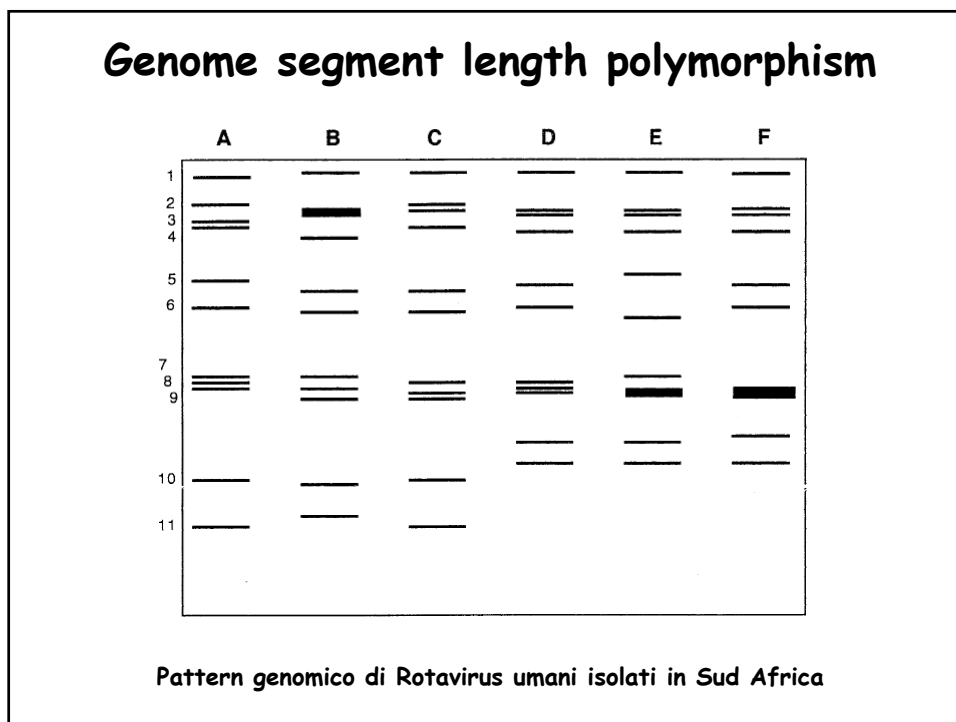
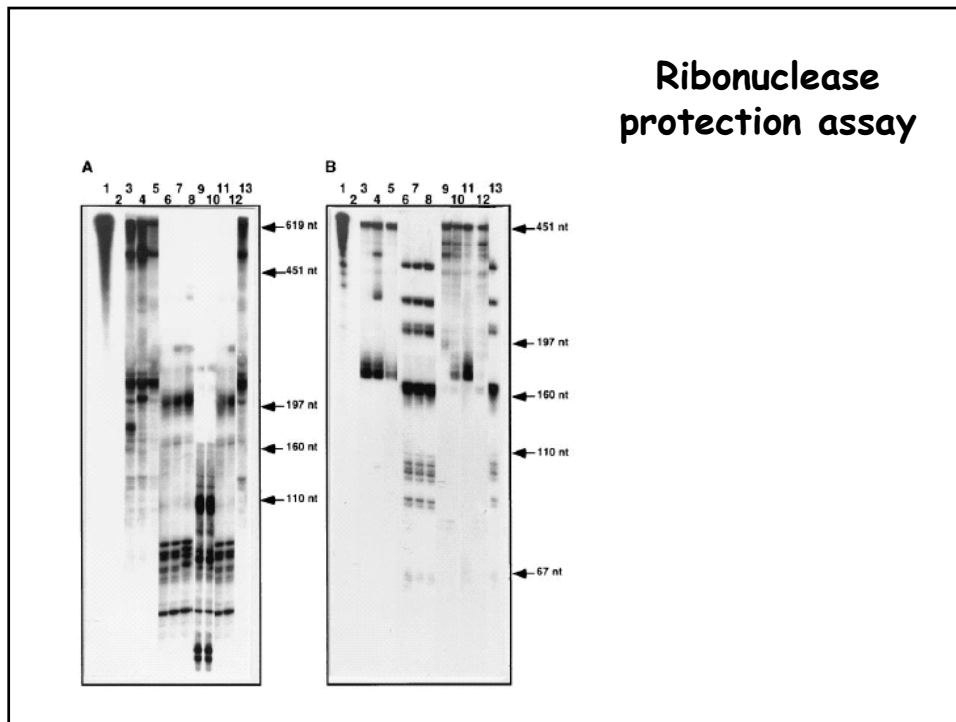
1 2 3 4 5

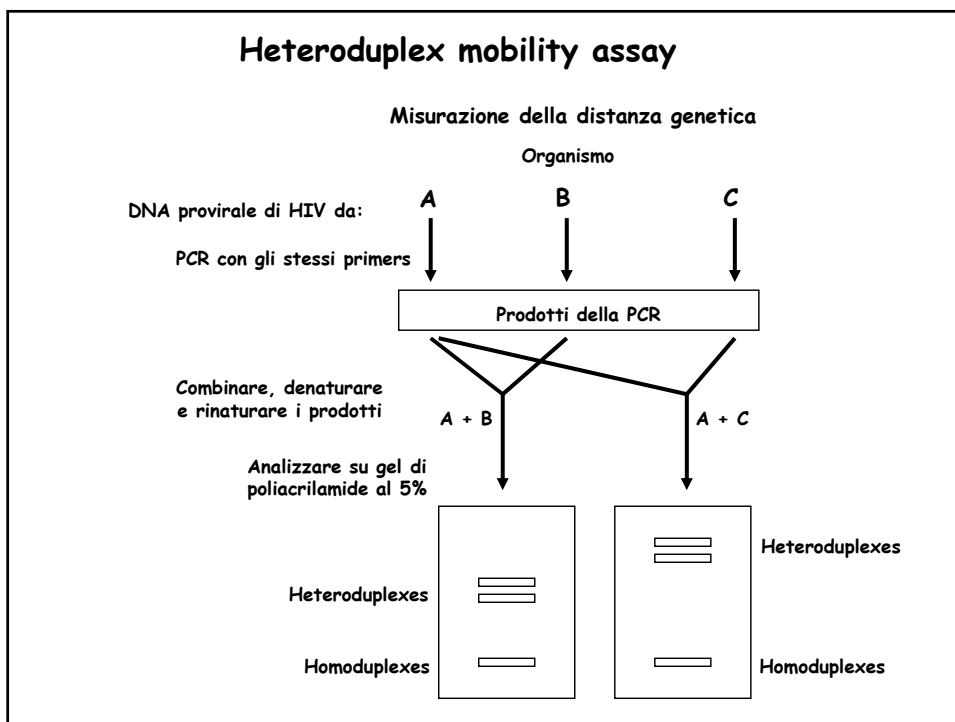
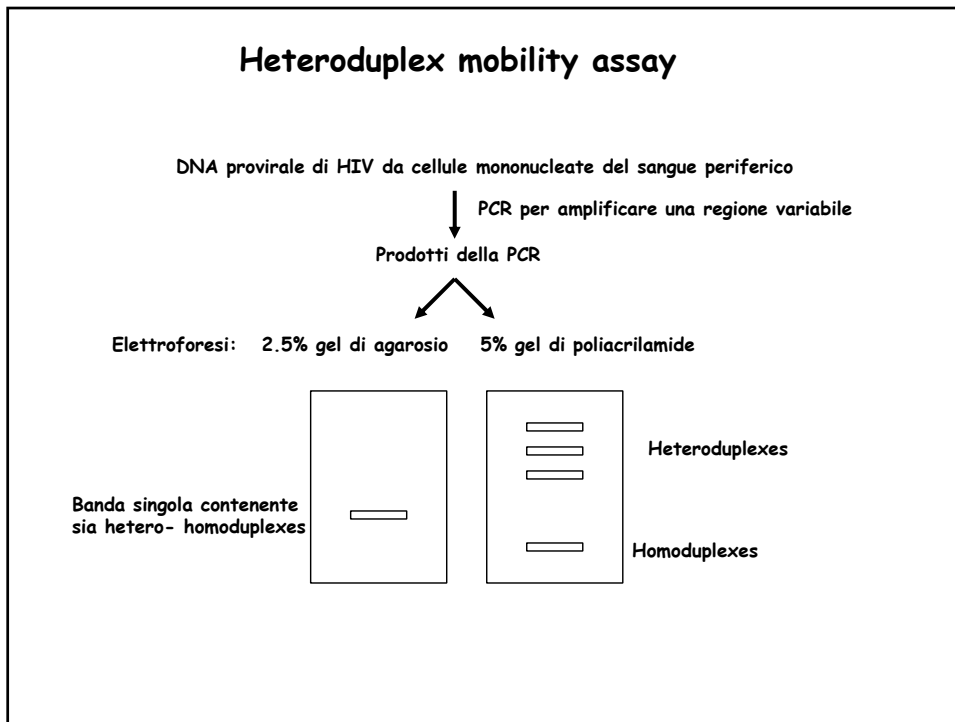


Gel di poliacrilamide al 20%

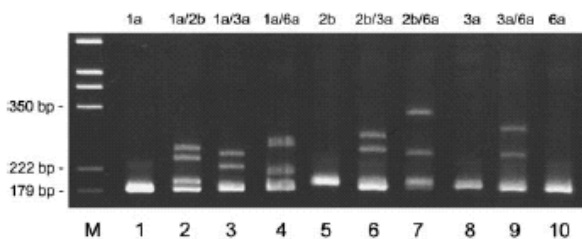




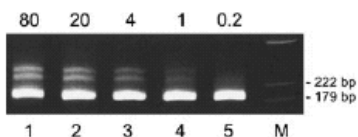




### Infezioni con due genotipi della stessa specie virale

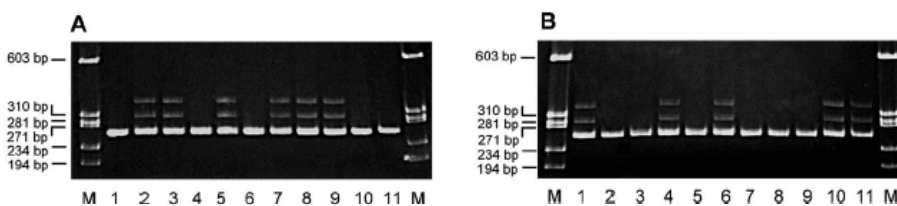


### Sensibilità dell'HMA per evidenziare infezioni miste



### Virus dell'epatite A

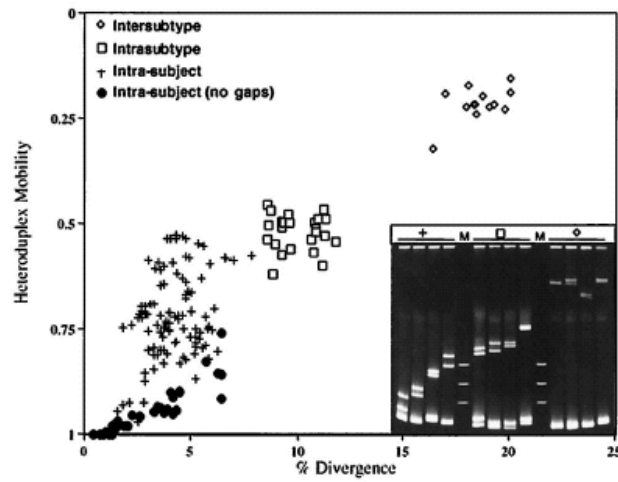
- HAV: - singolo sierotipo
- genotipi da I a VII
- sottogenotipi A e B



80% degli isolati umani appartiene al genotipo I

Sottogenotipi IA e IB sono stati osservati in Francia, Italia, Spagna, Olanda, Sud Africa

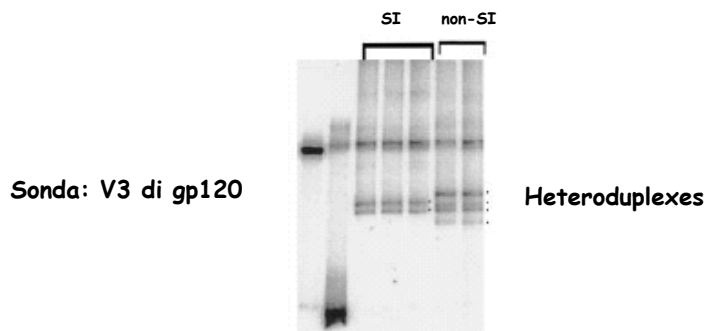
### HMA per studiare l'evoluzione dei virus



### Heteroduplex tracking assay

Modificazione dell'HMA

I prodotti della PCR vengono ibridizzati ad una sonda a DNA marcata



HMA: tutte le heteroduplex che si formano

HTA: solo le heteroduplex che si formano con la sonda radioattiva

### Sanger ddNTP chain termination sequencing

Template: 3' -----GCATTGGGAACC-----5'  
 Primer: 5' -----CGTA 3'

