

MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO CITOFUORIMETRICO PER ANALIZZARE IL PROFILO IMMUNOLOGICO DI PAZIENTI CON INFEZIONI DA PATOGENI DI GRUPPO 3/4

E. Cimini¹, D. Viola¹, F. Turchi¹, A. Romanelli¹, V. Bordoni¹, A. Sacchi¹, R. Casetti¹, N. Tumino¹, F. Besi¹, F. Martini¹, C. Agrati¹

¹Laboratorio di Immunologia Cellulare, INMI-IRCCS "L. Spallanzani", Roma

INTRODUZIONE

L'emergere di nuovi patogeni in grado di rappresentare una minaccia per la salute pubblica richiede studi sulla patogenesi e sui marcatori di protezione per sviluppare strategie terapeutiche e vaccinali. Tuttavia, lo studio della risposta immunitaria in pazienti con infezione da patogeni di gruppo 3/4 richiede la manipolazione dei campioni biologici in laboratori BSL-4 dove il lavoro sperimentale risulta estremamente complesso a causa delle procedure di biosicurezza molto stringenti che rendono articolate e lunghe anche le procedure più semplici. In questo contesto, si rende urgente lo sviluppo e l'ottimizzazione di procedure sperimentali che permettano di ridurre al minimo il tempo di permanenza in BSL-4. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di mettere a punto un protocollo multiparametrico di citofluorimetria a flusso che riducesse al minimo le fasi di manipolazione dei campioni in BSL-4.

METODI

Il protocollo standard di citofluorimetria (marcatura con una mix di anticorpi e fissazione con PFA) è stato paragonato con un protocollo BSL-4 (fissazione con PFA e marcatura con la mix di anticorpi). Il sangue intero di donatori sani (n=5) e di pazienti con infezione da HIV (n=4) è stato lisato per 10 min, trattato con le due procedure citofluorimetriche diverse e acquisito al FACS Canto II. L'analisi della frequenza delle sottopopolazioni (CD4, CD8, V α 2) del profilo differenziale (CD45RA, CD27) dell'espressione di marcatori di proliferazione (Ki67) e di citotossicità (Granzima B) ottenuti con i due metodi sono stati messi in correlazione utilizzando il test Pearson.

RISULTATI

Le frequenze delle diverse popolazioni di linfociti T ottenuti con il metodo standard e con il metodo BSL-4 risultano significativamente correlate: CD4 (r=0.95, p<0.0001), CD8 (r=0.99, p<0.0001), V α 2 (r=0.71, p<0.04). Risultati simili sono stati ottenuti analizzando la frequenza di tutte e quattro le sottopopolazioni differenziali dei linfociti T (naive: r=0.95, p<0.0008; memoria centrale: r=0.94, p<0.001; effetttrici: r=0.94, p<0.001; terminalmente differenziate: r=0.98, p<0.0001) e analizzando l'espressione dei marcatori di proliferazione (Ki-67: r=0.89, p<0.007) e di citotossicità (Granzima B: r=0.99, p<0.0001). Questo studio dimostra l'efficacia di un protocollo di marcatura citofluorimetrica che prevede la fissazione preventiva dei campioni in BSL-4 e la successiva manipolazione in BSL-2.

CONCLUSIONI

L'utilizzo di tale procedura permette di semplificare la gestione dei campioni di pazienti infetti con patogeni altamente contagiosi, di ridurre i rischi per l'operatore, fornendo così uno strumento flessibile per studiare il profilo immunologico in corso di infezioni emergenti.