

**SVILUPPO E UTILIZZO DI CULTURE CELLULARI 3D NELLA DIAGNOSI D'INFEZIONE VIRALE**

A. Rosellini<sup>3</sup>, G. Freer<sup>1</sup>, P. Quaranta<sup>1</sup>, V. Dovere<sup>2</sup>, M. Menichini<sup>2</sup>, F. Maggi<sup>2</sup>, P. Mazzetti<sup>2</sup>, M. Pistello<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Ricerca Translazionale, Università di Pisa

<sup>2</sup>Dipartimento Ricerca Translazionale, Università di Pisa e UOC Virologia Universitaria, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana

<sup>3</sup>UOC Virologia Universitaria, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana

**INTRODUZIONE**

Negli ultimi anni l'uso delle colture cellulari per l'isolamento di virus ha subito un progressivo sviluppo, anche se molto resta da comprendere sulle modalità con cui i virus interagiscono con l'ambiente circostante e sulle caratteristiche di questo microambiente. Dal punto di vista tecnico, le colture cellulari bidimensionali (2D) riflettono solo parzialmente il pattern morfo-molecolare del tropismo virale non rispecchiando la complessità del microambiente in vivo. Le colture cellulari tridimensionali (3D) costituiscono un approccio alternativo se non superiore alle 2D, rappresentando il legame tra la coltura cellulare tradizionale e i modelli in vivo. L'utilizzo di sferoidi uni-cellulari si sta dimostrando un sistema efficiente per ottimizzare e superare le limitazioni legate ai sistemi convenzionali in vitro nell'isolamento virale.

**METODI**

Nello studio, il classico sistema delle shell vials per l'isolamento virale è stato confrontato con il metodo di coltura degli sferoidi basato sulla tecnica di inibizione dell'adesione con il polyHema. Le linee cellulari più diffuse nell'isolamento virale e utilizzate nel nostro laboratorio (VERO, A549, MRC5, HUH-7, CaCo2, KB) sono state impiegate per la produzione di sferoidi. Sensibilità ed efficienza dell'isolamento virale in queste linee in 3D sono state valutate con test d'immunofluorescenza e di real-time PCR dopo infezione con ceppi virali e isolati primari di interesse medico (adenovirus, citomegalovirus, virus herpes simplex tipo 1).

**RISULTATI**

Le colture 3D hanno mostrato una maggior sensibilità all'infezione da virus rispetto alle colture cellulari tradizionali. Tutti e 3 i virus utilizzati hanno evidenziato una capacità di infettare le cellule 3D a più basso titolo e l'espressione delle proteine virali avveniva più rapidamente nelle colture 3D che in quelle 2D.

**CONCLUSIONI**

I risultati mettono in luce come l'istituzione di sistemi di coltura 3D risulti fondamentale nel miglioramento e nell'evoluzione di protocolli più accurati per l'isolamento virale.