

**Le slide sono già su teams.**

**Prof. Mauro Pistello**

Corso diviso in 3 blocchi: Batteriologia (generale e speciale), Virologia (generale e speciale) e Micologia (generale e speciale).

**Virologia Generale:**

Antibiotici: Alexander Fleming, 1928: Osservò che sulle piastre Petri contaminate da muffa i batteri non crescevano in un alone attorno alla muffa, dalla muffa isolò la penicillina.

L'uso massiccio di antibiotici sta rendendo l'antibiotico-resistenza un problema in continuo peggioramento.

Per quanto riguarda la virologia invece stiamo assistendo ad un periodo d'oro degli antivirali.

Lo sviluppo degli antivirali è iniziato più tardi rispetto agli antibiotici perché i virus per replicarsi usano i meccanismi molecolari della cellula, quindi c'è il rischio che il farmaco risulti tossico.

Jenner, 1700: Vaccino del vaiolo.

Esistono vari tipi di vaccino:

- Vaccini vivi attenuati: Efficaci ma con controindicazioni, specialmente in pazienti immunodepressi (ovviamente), tuttora usati.
- ...

I virus sono diventati visibili solo dopo l'invenzione del microscopio elettronico, prima si era capita la loro esistenza ma non erano mai stati osservati direttamente.

Osservano l'anomalo tasso di sarcomi in alcuni polli è stata osservata l'esistenza dei virus oncogeni.

**I Virus**

Il nome deriva da Venom = veleno. È un patogeno che veicola informazione genetica e usa i macchinari molecolari della cellula ospite per generare copie di se stesso. È costituito da una porzione di materiale genetico variamente strutturato (RNA, DNA, singolo o doppio filamento).

Caratterizzati da alta velocità di mutazione. Non contengono molecole ad attività enzimatica quindi non sono capaci di sintesi proteica o di metabolismo energetico.

**Morfologia e struttura:**

Materiale genetico complessato con proteine (che costituiscono il **capside**) a sua volta ricoperto da un **envelope** (che deriva dalla membrana della cellula da cui si è originato) e sul quale vengono esposti i recettori virali, necessari all'entrata del virus nella cellula bersaglio. Le singole proteine che formano il virus sono dette **capsomeri**. La maggior parte dei virus (virus nudi) non hanno l'envelope. L'envelope caratterizza i virus detti **rivestiti**. Le proteine recettori (spike) non sono sempre esposte perché potrebbero essere riconosciute facilmente dal sistema immunitario quindi sarebbe un punto di vulnerabilità.

La struttura del capsido è molto variabile e caratteristica delle famiglie di virus, ad esempio Ebola appartiene ai filovirus (genoma compattato da proteine disposto a spirale con i capsomeri attaccati intorno a difenderlo), altri virus hanno struttura ad icosaedro o altre forme ancora.

Esistono virus con genomi molto più complessi, come ad esempio l'Herpes virus, altri virus ancora hanno la necessità di portare enzimi virali che non sono disponibili nella cellula. Per contenere questo materiale aggiuntivo si è sviluppata la struttura icosaedrica (approssimazione più facile da costruire rispetto alla sfera).

I processi di replicazione ed assemblaggio virale devono essere veloci per evitare che i meccanismi di difesa della cellula abbiano il tempo di attivarsi.

I virus nudi tendono ad essere più resistenti ai disinfettanti mentre quelli rivestiti sono favoriti all'interno dell'organismo ospite, inoltre i virus rivestiti possono uscire dalla cellula senza rompere la membrana (infezioni persistenti).

Nei virus rivestiti si trovano proteine tra l'envelope e il capsido dette **proteine della matrice**.

La presenza o meno di un envelope porta a differenze sostanziali nelle modalità di entrata e di uscita dalla cellula.

I virus nudi escono quasi sempre per lisi della cellula, quelli rivestiti per esocitosi (infezioni persistenti).

I virus rivestiti presentano una matrice proteica tra il capsido e l'envelope, queste proteine aumentano la rigidità della struttura del virus.

L'involucro esterno è perso nelle prime fasi di entrata nella cellula e va ad inattivare alcuni meccanismi di difesa.

All'esterno dell'organismo ospite i virus rivestiti sono molto più resistenti.

Il genoma dei virus è molto piccolo rispetto al genoma delle cellule, alcuni si sono ridotti a 3-4 kb. Le proteine virali svolgono molte funzioni (moonlighting, aumenta la compattezza del codice).

Il genoma virale, tranne pochissime eccezioni, non presenta introni.

Alcuni genomi virali presentano geni sovrapposti, danno origine a prodotti proteici differenti se la traduzione inizia in punti diversi.

Nei virus a doppia elica alcuni geni sono codificati in una catena e altri nell'altra.

**Nomenclatura dei virus:**

Classicamente classificati in base alle malattie che causano, metodo inconsistente perché virus possono dare malattie differenti e virus diversi possono dare sintomi molto simili.

Esempio: virus dell'epatite, ne esistono molti tipi (A, B, C, D, E, F, G, forse altri) estremamente diversi tra loro come struttura, biochimica, modalità di trasmissione e quindi approccio terapeutico.

I virus erpetici invece danno malattie molto diverse pur essendo strutturalmente indistinguibili al microscopio elettronico.

I virus, a differenza degli organismi superiori, hanno un tasso di mutazione genetica molto alto, nel giro di ore o giorni si generano nuove varianti e ceppi.

Nella nomenclatura dei virus si parla di quasi-specie e non di specie appunto per questo.

Nella nomenclatura corrente si segue un approccio gerarchico organizzato in famiglie, sottofamiglie, generi e quasi-specie.

**Ciclo replicativo dei Virus:**

**Fase precoce:**

1. Attacco (adsorbimento) alla cellula ospite. Fase più critica, se ha successo quasi sempre il virus arriverà a replicarsi (??? dopo il prof dice il contrario).
2. Penetrazione nel citoplasma.
3. Uncoating (scapsidizzazione), disassemblaggio della particella infettiva. Il punto in cui avviene dipende dal tipo di genoma, i virus a DNA lo fanno nel nucleo, i virus a RNA lo fanno nel citoplasma. È il momento in cui il virus è più vulnerabile, in cui la cellula può riconoscere il materiale genetico esogeno e i farmaci antivirali possono agire. Questa fase è anche detta eclissi perché il virione non è più viribile.
4. Replicazione del genoma virale. Il virus esprime i propri geni in un ordine ben preciso, ci sono geni precoci, geni intermedi e tardivi. Il genoma serve sia per produrre enzimi e altre proteine virali necessari alla replicazione ed all'assemblaggio ma deve anche replicarsi per generare nuovi virioni.

**Fase tardiva:**

1. Assemblaggio dei virioni figli. Avviene nel punto dove si è replicato il genoma, i virus a DNA importano le proteine del capsido nel nucleo e si assemblano lì, i virus a RNA si assemblano nel citoplasma.
2. Rilascio dalla cellula ospite. Dipende dalla natura del virus, virus nudi generalmente escono per lisi, i virus rivestiti per gemmazione.
3. Maturazione.

I virus infettano preferenzialmente cellule in attiva replicazione (es. mucose) perché hanno il metabolismo più attivo, il virus può accelerare il metabolismo di cellule quiescenti ma risulta meno efficiente.

Virus che replicano più lentamente generano pochi virioni per cellula infettata ( $10^3$ ) ma sono quasi tutti infettanti, virus più veloci generano molti più virioni figli ( $10^6 - 10^8$ ) ma molti sono incompleti.

#### **Fase I, attacco:**

Legame tra una proteina virale (anti-recettore) ed un elemento della membrana della cellula ospite (recettore).

I recettori possono essere proteine, carboidrati, glicoproteine o glicolipidi.

Il recettore cellulare è specifico per un virus.

Alcuni virus hanno più anti-recettori diversi quindi hanno multiple vie di entrata nella cellula (anche 5 diverse).

In alcuni casi (es. dengue) il dominio Fc degli anticorpi facilita il legame del virione alla cellula (tramite i recettori per il dominio Fc). In questi casi la presenza di una risposta immune è uno svantaggio.

I recettori ovviamente non esistono per far entrare il virus ma servono alla funzione normale della cellula, molte sono integrine o molecole di adesione (molti virus infatti infettano gli epiteli, come detto prima). Oppure sono proteine transmembrana o canali.

Ad esempio il virus HIV lega la molecola CD4 sui linfociti.

Gli anticorpi neutralizzanti legano l'anti-recettore virale nel punto di legame con il recettore impedendo così l'entrata (problema risolto). Lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti è l'obiettivo del sistema immunitario e dello sviluppo dei vaccini.

Per difendersi i virus hanno sviluppato strategie, ad esempio alcuni presentano i recettori introflessi (canyon)

#### **Fase II, entrata nel citoplasma:**

##### **Virus Rivestiti**

Es. HIV presenta due glicoproteine, una responsabile dell'attacco ed una della fusione delle membrane. La glicoproteina di superficie CD4 è il recettore primario, CCR5, CXCR4 ed altre sono i co-recettori. Una volta realizzata l'interazione con il recettore principale e con i co-recettori si estende la glicoproteina necessaria alla fusione e si procede alla fusione delle membrane.

Il recettore in questo caso è una struttura dinamica che cambia nel tempo, la prima glicoproteina (gp120) varia molto spesso impedendo al sistema immunitario di sviluppare anticorpi neutralizzanti, pur mantenendo la stessa struttura per gli altri attori coinvolti.

L'entrata dei virus rivestiti avviene generalmente per fusione di membrana facendo entrare il capsido nel citoplasma cellulare.

##### **Virus Nudi**

Entrano principalmente per endocitosi.

Esistono molte situazioni intermedie in cui, ad esempio, virus rivestiti entrano per endocitosi.

#### **Fase II, uncoating:**

Virus con genoma a DNA raggiungono i pori nucleari e penetrano nel nucleo. In questa fase i virus modificano il citoscheletro per attraversare il citoplasma più velocemente.

I virus che entrano per endocitosi il capsido si disgrega parzialmente ad opera della vescicola endocitotica liberando il materiale genetico.

HIV è un virus ad RNA che però da origine ad un DNA a doppio filamento che viene trasportato nel nucleo ed integrato nel genoma ospite, la produzione del DNA avviene nel citoplasma ad opera dell'enzima retrotrascrittasi (virale).

#### **Fase V: Assemblaggio**

Abbiamo molte copie dell'acido nucleico e delle proteine che compongono il capsido. È una fase in cui la cellula è molto danneggiata, non ha capacità di sintetizzare proteine, perché il sistema ribosomiale è sfruttato per la sintesi di proteine virali e per impedire la sintesi di molecole necessarie ai meccanismi di difesa. I nucleotidi servono invece per sintetizzare genoma virale e per il metabolismo energetico. Deve essere veloce per terminare prima che la cellula muoia.

Si assemblano le protene del capsido lasciando un orifizio dal quale viene “tirato dentro” l'acido nucleico. Le molecole di acido nucleico vengono prodotte tutte in serie attaccate e tramite il riconoscimento delle sequenze di inizio e di fine alcune nucleasi taglia le porzioni destinate a ciascun virione.

#### **Fase VI: Rilascio**

Virus nudi: lisi cellulare.

Virus con involucro: escono per gemmazione, si assemblano in prossimità della membrana.

I virus rivestiti che assemblano nel nucleo prendono il proprio rivestimento dalla membrana nucleare, altrimenti lo prendono dalla membrana citoplasmatica.

Durante l'inserzione delle proteine virali nella membrana il virus cerca il più possibile di eliminare le proteine le proteine naturalmente presenti nella membrana perché potrebbero presentare ostacolo alla diffusione essendo riconosciute come non-self da altri organismi ospiti.

#### **Fase VII: Maturazione**

Avviene quando il virus è gemmato, specifici tagli o cambiamenti conformazionali nelle proteine virali (sintetizzate come precursori) operate da proteasi virali ed enzimi cellulari. Con questo processo il virione neoformato spende meno tempo all'interno della cellula morente.

L'espressione genica virale, la replicazione del genoma virale e la sintesi proteica sono determinate dalla struttura del genoma virale.

Buona parte dei geni **precoci** virali servono a fare il dirottamento (hijack) dei meccanismi metabolici della cellula.

Le DNA/RNA polimerasi virali funzionano a velocità più che tripla rispetto a quelle eucariotiche, ciò si traduce in un tasso di mutazione molto più elevato, in congiunzione con la mancanza (tranne poche eccezioni) di un sistema di proof-reading ciò porta ad una molto rapida produzione di nuove varianti. I geni **intermedi** codificano per proteine che tengono sotto controllo il processo replicativo. I geni **tardivi** infine realizzano proteine necessarie all'assemblaggio.

**DNA a doppia catena:** Quando il materiale genetico virale è replicato nel nucleo esso è trascritto dalle RNA polimerasi cellulari (virus a DNA a doppia catena).

**Virus con DNA a singola catena:** deve diventare a doppia catena, per fare ciò si porta una DNA polimerasi virale che sintetizza l'altro filamento. Si procede poi come i virus a DNA ds.

**Virus ad RNA:** tranne alcune eccezioni si replicano nel citoplasma e quasi sempre usano RNA polimerasi virali.

**RNA singolo filamento a polarità positiva:** filamento di RNA sufficiente a produrre la progenie, viene tradotto dai ribosomi, il prodotto è tagliato nelle varie proteine virali tra cui la RNA polimerasi che duplica il genoma virale. Si produce così un filamento di RNA a polarità negativa che è usato come stampo per produrre i nuovi filamenti a polarità positiva.

**RNA a singolo filamento a polarità negativa:** portano nel capsido (up-front) la RNA polimerasi che produce i messaggeri che portano alla sintesi proteica e filamenti positivi che fungono da stampi per i nuovi filamenti a polarità negativa.

**RNA a doppia catena:** Anche questi hanno bisogno di una RNA polimerasi up-front.

**Retrovirus:** Hanno all'interno della particella virale due molecole di RNA a polarità positiva che sono retrotrascritte in DNA (da enzimi virali up-front) che è integrato nel DNA ospite e trascritto da polimerasi cellulare per ottenere i messaggeri per le proteine virali e RNA per i nuovi virioni.

## **Impatto sulla cellula**

Si possono avere vari tipi di infezione:

- **Produttiva (citolitica):** la cellula produce virioni e poi muore, maggior parte dei casi.
- **Abortiva:** i meccanismi di difesa della cellula funzionano e bloccano uno stadio della replicazione virale.
- **Persistente attiva:** Il virus continua a replicare, danno al substrato o all'organo nel quale il virus si replica.

- **Persistente latente:** Produzione di virioni intermittente o assente.
- **Persistente trasformante:** Il virus perde la capacità di replicare, il virus modifica il genoma cellulare ma non può terminare la replicazione ed uccidere la cellula. La cellula può diventare tumorale.

#### **Infezione Produttiva o Citolitica:**

Una delle prime cose che fa il virus è il blocco della sintesi proteica cellulare per avere a disposizione l'intero macchinario ribosomiale e per bloccare le proteine dei sistemi di difesa cellulari. I meccanismi sono diversi ma il concetto di fondo è che rendono molto difficile la traduzione dei messaggeri cellulari. Alcuni bloccano componenti proteiche dei ribosomi, altri rimuovono i cap dagli RNA messaggeri, altri degradano la coda di poli-A, ecc...

La sintesi virale può procedere perché RNA virali hanno cap diversi che sono riconosciuti ugualmente dal ribosoma ma con meccanismi diversi rispetto a come vengono riconosciuti i messaggeri cellulari.

Quest'operazione è realizzata dalle proteine dei geni precoci o da proteine già presenti nel capsido o nella matrice del virus.

Un altro effetto precoce è il rallentamento/blocco della replicazione del DNA cellulare.

Avvengono molte altre alterazioni delle vie metaboliche della cellula, in ogni fase di replicazione il virus interagisce con 300-500 o più proteine cellulari. Le proteine con cui interagiscono i virus dipendono dalla tipologia del virus, alcune vie metaboliche (circa 150 proteine) però sono alterate da praticamente tutti i virus indipendentemente dalla loro natura.

#### **Alterazioni osservabili dell'infezione virale (effetti citopatici)**

- Corpi di inclusione
- Cambiamenti morfologici
- Distruzione del nucleo
- Vacuoli
- Sincizi
- Gemmazione di virioni sulla membrana

**Corpi di inclusione:** Si osservano nel punto dove avviene l'assemblaggio dei virioni (nucleo o citoplasma).

**Sincizi:** vengono dati principalmente da virus con involucro esterno che entrano per fusione della membrana. Le proteine virali che agganciano la membrana della cellula ospite durante la replicazione virale vengono inserite sulla membrana della cellula ospite, può succedere che interagisca con il recettore delle cellule vicine e che induca la fusione tra cellule vicine. Per il virus è un vantaggio perché aumentano le risorse disponibili per la replicazione virale e perché la diffusione cosiddetta cell-to-cell è molto più efficiente, non uscendo il virus nell'ambiente esterno non può essere bloccato dal sistema immunitario.

#### **Come può la cellula cercare di bloccare il ciclo replicativo?**

Uno dei sistemi più filogeneticamente conservati è la sintesi di small-RNA. Hanno la funzione di modulare l'espressione genica ma si possono associare e bloccare l'espressione di materiale genetico virale. Alcuni invece hanno effetto indiretto, vanno a distruggere messaggeri cellulari di proteine che aiutano la replicazione virale. HIV ad esempio nelle prime fasi aumenta l'espressione di alcune proteine cellulari perché queste proteine sono utili ad aumentare la trascrizione del genoma virale. Per ostacolare questo passaggio la cellula produce sRNA o miRNA che bloccano questi messaggeri. Anche i virus hanno i propri miRNA che ostacolano ad esempio la presentazione dell'antigene e l'apoptosi.

Le cellule contengono intrinsecamente proteine che ostacolano i virus, alcune cercano di bloccare l'ingresso, altri l'uncoating, l'uscita dalla cellula, ecc...

**Esempio HIV e APOBEC3:** Meccanismo che riduce la produzione di virioni di circa 1 milione di volte. Sono molecole presenti a livello dei linfociti T, modificano la sequenza genetica coinvolta nel riconoscimento dell'antigene. In ambito antivirale esse vengono incluse nelle particelle virali che si formano, quando questa particella infetta una nuova cellula le due molecole di RNA virali vengono normalmente usate per produrre un DNA a doppio filamento (retrotrascrizione). Se APOBEC è stata incorporata nella particella essa toglie un gruppo amminico alla maggior parte delle citosine del genoma virale convertendo la citosina in uracile, la trascrittasi inversa inserisce adenina (complementare dell'uracile) invece di guanina. (ipermutazione G-to-A). I trascritti prodotti dal materiale genetico ipermutato portano a prodotti proteici aberranti.

Altro meccanismo è rappresentato dalla produzione di interferoni in risposta alla captazione di molecole non-self che stimolano la produzione di proteine necessarie alla difesa ed essendo rilasciati in maniera paracrina stimolano lo stesso aumento di produzione nelle cellule vicine. Ovviamente i virus antagonizzano anche la produzione di interferoni.

#### **Meccanismo di Trasformazione:**

Si tratta di un processo multi-step con inizio, promozione e progressione.

I virus sono responsabili probabilmente del 20% dei tumori umani, fattore di rischio secondo solo al tabacco.

Il ciclo di replicazione cellulare è strettamente regolato da fattori positivi e negativi, tra i regolatori positivi principali si trovano circa 150 proteine captate da recettori transmembrana con una porzione esterna che lega il fattore ed una parte interna che cambia conformazione che (dopo catena di trasduzione) attiva geni che stimolano la cellula a replicare. In caso di mutazioni che causano ad esempio legame irreversibile del fattore o cambiamento conformazionale della porzione interna del recettore si ha segnale pro-replicativo anomalo.

Tra i regolatori negativi troviamo i sistemi di controllo che bloccano la replicazione in situazioni anomale, ad esempio in caso di danno al DNA, se la replicazione non è possibile la cellula viene indirizzata verso l'apoptosi, purtroppo non funzionano sempre.

Esistono virus ad RNA trasformanti (es. retrovirus) e virus differenti che pur senza avere meccanismi simili ai retrovirus promuovono la mutazione cellulare (es. epatite C HCV).

I virus trasformanti ad RNA agiscono sui regolatori positivi. I virus trasformanti a DNA agiscono sui regolatori negativi.

**I retrovirus:** I retrovirus si dividono in acutamente trasformanti e virus cronici.

**I retrovirus acutamente trasformanti** inducono tumore da 1 a qualche settimana dopo l'infezione, agiscono così perché portano nel loro genoma un oncogene cellulare (di origine eucariotica data l'omologia di sequenza, che è stato integrato nel genoma virale e successivamente mutato). Questi virus sono quasi sempre difettivi, cioè non sono in grado di portare a compimento il processo replicativo a causa dell'inclusione dell'oncogene a scapito dei alcuni geni virali. Riescono a replicare in natura grazie al fatto che parte del genoma eucariotico è costituito da retrovirus che sono stati integrati nel genoma ed hanno perso la capacità di replicare ma sono comunque in grado di produrre sintesi proteica, il retrovirus trasformante può "prendere in prestito" proteine prodotte da questi geni.

**I virus trasformanti cronici/lenti** prevedono una fase in cui integrano il loro genoma nel genoma cellulare. Se l'inclusione del genoma virale si inserisce in prossimità di un gene cellulare si possono verificare varie situazioni: Si può perdere l'LTR di destra (di norma sono presenti LTR ad entrambe le estremità del genoma retrovirale) e quindi produrre proteine ibride virale/cellulare, oppure può succedere che il virus si inserisca in corrispondenza del promotore cellulare e che quindi il gene cellulare si trovi sotto il promotore virale (più forte, sovraespressione).

L'inclusione dei retrovirus si pensava avvenisse a caso, poi si è scoperto che prevalentemente si integrano nell'eucromatina (attivamente trascritta) e che esistono alcuni punti nei quali l'inserzione è più probabile.

Per quanto riguarda la capacità trasformante per i virus trasformanti acuti non ha importanza il sito di integrazione. Invece nei virus trasformanti cronici ha importanza il sito di integrazione (ecco perché il tempo di latenza dei virus trasformanti acuti è così tanto più bassa).

#### **Human T-cell leukemia virus (HTLV-1 e 2)**

Hanno bassa capacità di indurre tumori ma si tratta di tumori molto aggressivi.

Sono virus più complessi dal punto di vista genetico, che ricorda in qualche modo HIV. Sia HIV che HTLV producono una proteina (rispettivamente

TAK e TAX) che va ad interagire con le proteine cellulari attivando il sito di riconoscimento dell’LTR e inducendo la trascrizione virale. Oltre ad attivare l’attivazione dei geni virali TAX attiva il metabolismo cellulare (trans-attivazione). TAX va anche ad attivare la trascrizione di interleuchina-2 (IL-2) e del suo recettore (IL-2R) (fattori di crescita per i linfociti-T). IL-2 viene rilasciato all’esterno ed ha effetto paracrina ed autocrino sulla cellula.

### **Virus trasformanti a DNA**

Inducono tumori in misura poco efficiente e lenta. Producono proteine precoci che hanno la capacità di legare ed inattivare regolatori negativi come p53 o RB. Il meccanismo è la poli-ubiquitinazione, oppure il legame ed inattivazione o il legame e successiva degradazione.

p53 è una proteina coinvolta nell’apoptosi, bloccando così la replicazione virale. Spesso i virus che hanno un ciclo di replicazione lento bloccano le proteine pro-apoptotiche come p53, può succedere che il virus non riesca a portare a compimento il suo ciclo replicativo (e quindi lisare la cellula) e rimanga bloccata in uno stato in cui ha p53 disattivata, questa cellula può accumulare mutazioni che possono portarla a diventare tumorale.

Non sempre il contatto con il virus porta a infezione e non sempre l’infezione produce lisi cellulare, si può rappresentare come un “iceberg” con all’apice le manifestazioni cliniche più gravi ed alla base l’esposizione senza infezione.

Si possono avere diverse dinamiche di infezione:

- Infezione acuta.
- Infezione acuta e a distanza di molti anni si può manifestare una malattia dovuta alla risposta dell’organismo.
- Infezione acuta con altra manifestazione differente a distanza di anni (es. varicella / zoster).
- Infezione latente: continua produzione e rilascio di virus anche dopo l’attenuazione dei sintomi (es. HBV).
- Infezione che dà manifestazioni cliniche solo nelle fasi tardive (es. HIV).
- Infezione lenta (es. Creutzfeldt-Jakob) (Cosa c’entra con i virus? Niente ma è interessante per le malattie neurodegenerative che dipendono da accumuli proteici anomali, es. Alzheimer).

Si può avere infezione asintomatica alla quale può o meno seguire la scomparsa del virus, infezione a cui segue convalescenza e guarigione, soggetto che presenta malattie ricorrenti, infezione con progressivo peggioramento fino alla morte.

Le condizioni dell’ospite modificano la risposta all’esposizione ad un agente infettivo, tra cui: gravidanza, malnutrizione, età, terapia steroidea, inquinamento atmosferico.

## **Vie di ingresso dei virus**

La principale via di ingresso risulta l’apparato respiratorio, che è anche il distretto che presenta più difese. Nei paesi in via di sviluppo il secondo apparato più colpito è quello gastroenterico, nei paesi sviluppati è il sistema genito-urinario.

In aumento sono le infezioni per via ematica (per-cutanee) e tramite vettori (insetti).

I virus hanno un minimo di attività replicativa nella sede di infezione, poi si riversano nel sangue e raggiungono altre sedi di replicazione intermedie da cui vengono rilasciati nel sangue e raggiungono l’organo bersaglio.

Altre possibili vie di ingresso sono il tratto digerente, le mucose, la cute lesa, occhi, orecchie, le vie genitali e la placenta.

In generale ogni virus ha una via di ingresso predefinita, ciò non toglie che il virus possa entrare tramite altre vie in condizioni particolari, ad esempio un virus a trasmissione alimentare tramite trasfusioni ematiche.

Il virus si può replicare e riversare nel torrente circolatorio a livello di capillari ematici ma più spesso tende a raggiungere capillari linfatici.

**Viremia:** presenza del virus nel sangue.

### **Esempio: Varicella Zoster**

Entra per via respiratoria, si replica inizialmente a livello della rinofaringe, dopo 3-4 giorni tramite il torrente ematico raggiunge altre sedi come polmoni, reni, tratto gastrointestinale. Dopo 9 giorni circa dal contagio il virus raggiunge la cute di nuovo per via ematica e manifesta i sintomi tipici. Il sistema immunitario efficiente può bloccare il virus in sede ematica, evitando che raggiunga l’organo bersaglio.

### **Infezioni respiratorie:**

Di solito durano poco perché il sistema immunitario è organizzato in modo da bloccare rapidamente virus in questa sede, sono però facili le reinfezioni.

Virus diversi si sono adattati a sostenere infezioni a livelli diversi dell’albero respiratorio, ad esempio i virus delle riniti sono adattati a replicare a temperature intorno ai 33°C, perché l’epitelio nasale è naturalmente più freddo, sono rapidamente inattivati dal calore, ecco perché la febbre p un meccanismo di difesa così conservato nell’evoluzione.

I virus che causano il comune raffreddore o comunque infezioni delle prime vie respiratorie sono molti, molto diversi ma hanno più o meno quadri sintomatici sovrapponibili, perché devono contrastare le stesse misure di difesa delle prime vie respiratorie.

L’epitelio respiratorio superiore, proprio per la sua esposizione presenta importanti misure di protezione, la cosiddetta immunità innata:

- Ciglia: creano un’onda che porta verso l’alto il muco, questo muco riveste e protegge le cellule ciliate intrappolando particolato inspirato. Il virus infatti una volta entrato tende a bloccare il movimento ciliare. La morte delle cellule in seguito all’infezione causa il rilascio di fattori pro-infiammatori che inducono aumento della produzione di muco (e muco più denso del normale) da parte delle cellule mucipare (spiega i sintomi del raffreddore). La perdita dell’orletto a spazzola permette la crescita batterica quindi apre la strada a sovra-infezioni. Dopo pochi giorni il sistema immunitario prevale e le cellule dell’epitelio si rigenerano.

La suscettibilità dell’individuo dipende dall’efficienza delle misure di difesa, innate o meno, ad esempio la fibrosi cistica producendo muco denso facilita i virus respiratori.

La frazione di incidenza delle infezioni respiratorie cambia molto con l’età, è molto diffusa nei primi anni di vita.

Nel tratto gastrointestinale come misure di difesa innate abbiamo il pH gastrico ed i sali biliari che emulsionando i lipidi danneggiano i virus con involucri esterno, di natura lipidica.

Il bersaglio principale dei virus che entrano tramite il tratto gastrointestinale sono le cellule dell’epitelio intestinale, queste cellule vanno incontro a ricambio velocissimo e la loro desquamazione rilascia particelle virali. La morte delle cellule per l’infezione e la loro uccisione da parte del sistema immunitario portano ad accorciamento dei villi e perdita della capacità assorbente con accumulo di fluido nel lume (diarrea).

Nei bambini le infezioni più comuni sono dovute a rotavirus mentre negli adulti diventano più comuni i norovirus, in Italia la prevalenza di questi ultimi è più bassa rispetto a molti altri stati grazie ai sistemi di controllo che abbiamo messo in atto sugli alimenti.

Molti virus che infettano per via gastroenterica utilizzano le cellule M come punto di ingresso.

### **Infezioni del tratto urogenitale**

Per quanto riguarda i virus è generalmente una via di importanza minore.

L’infezione virale più diffusa in questa sede è il papillomavirus, per il quale esiste un vaccino.

Altra infezione importante sono gli herpes, per i quali non abbiamo un vaccino e le cui lesioni aumentano la possibilità di contrarre altre infezioni (ad esempio il rischio di HIV è aumentato di 100-1000 volte).

Abbiamo poi HIV.

Epatite B, che si trasmette per via ematica ma grazie ai controlli sulle donazioni di sangue ecc... la via più comune rimane quella sessuale. Vaccini disponibili, quasi tutti i soggetti delle nuove generazioni sono vaccinati nei paesi sviluppati.

### **Infezioni a trasmissione madre-bambino**

Si distinguono in 3 categorie:

- **Infezioni per via verticale propriamente dette o congenite:** per continuità del sangue materno con quello del feto, le conseguenze per il feto sono molto gravi, inversamente proporzionali con la fase dello sviluppo a cui avviene il contagio. Spesso quando l’infezione p trasmessa nei primi 2 trimestri si ha aborto spontaneo. Principalmente sostenute da virus (batteriemie sono possibili ma rare). I casi più comuni di trasmissione congenita sono il citomegalovirus ed il parvovirus.
- **Infezioni perinatali:** avvengono al momento della nascita. Si distinguono dalle precedenti per il passaggio dall’esterno del patogeno.
- **Infezioni postnatali:** contratte entro un anno dalla nascita. (tramite latte, sangue, saliva).

### Infezioni virali e SNC

Interessato spesso dalle infezioni virali, a volte in maniera indiretta.

Vie di ingresso:

- **Neurale:** Sfrutta il trasporto assonale retrogrado, es. herpes, rabbia.
- **Nervo olfattivo:** es. coronavirus.
- **Ematica:** meno diffusa a causa della barriera emato-encefalica.

**Trasmissione neurale:** Usata anche da molte infezioni che fanno il loro ingresso tramite l’apparato digerente, asse cervello-intestino rappresentato dal nervo vago.

**Trasmissione olfattiva:** Fanno il loro ingresso tramite l’epitelio olfattivo, danneggiando le fibre stesse (es. causa della perdita di sensibilità olfattiva nel COVID).

**Via ematica:** In condizioni fisiologiche la barriera emato-encefalica impedisce il passaggio di molte proteine e virus. A seguito di traumi, somministrazione di farmaci, processi infiammatori ecc.. la sua permeabilità si altera permettendo il passaggio di agenti infettivi. Modalità poco utilizzata, la maggior parte passa attraverso cellule che possono passare la barriera naturalmente, es. macrofagi. (HIV fa così). Queste cellule infettate sono irriconoscibili dall’esterno (meccanismo noto come “cavallo di Troia”).

I pazienti possono essere predisposti ad aggressione autoimmune del sistema nervoso, in questi casi un vaccino può indurre encefalite di tipo autoimmune. Questi pazienti sono più predisposti ad encefalite indotta da agenti virali e malattie degenerative.

Il **liquido cefalo-rachidiano** è, in condizioni normali, completamente trasparente, acellulato e con concentrazioni proteiche e di glucosio inferiori rispetto al plasma.

Si presenta opalescente nelle meningiti purulente, con aumento di neutrofili, le cause sono di solito infezioni da amebe o batteri.

Le meningiti a “liquor limpido” possono presentare aumento di cellularità, principalmente dovuto a polimorfonucleati, contenuto. Le cause sono infezioni virali, tubercolosi, funghi, infezioni batteriche parzialmente trattate.

Nel caso in cui si sospetta infezione da H. simplex si valuta la concentrazione di anticorpi contro H. simplex rispetto altri virus. Se il libello di IgG contro H. Simplex nel liquor si presenta più alta rispetto al plasma si deduce produzione intratecale di IgG. Se invece aumentano anche a livello plasmatico si deduce un aumento di permeabilità della EBB.

Se si riscontrano IgM a livello plasmatico (infezione acuta) e a livello cerebrale si deduce infezione diffusa anche in questa sede (encefalite) perché le IgM **NON** oltrepassano la EBB.

Procedura simile si applica anche per indagare eventuali infezioni trasmesse al feto: IgM nel liquido amniotico sono necessariamente prodotte dal feto perché non passano la barriera emato-placentare.

### Infezioni della cute

Frequentemente bersaglio di infezioni, protetto da uno strato (epidermide) di cellule morte che quindi non possono subire infezione virale.

Es. Papilloma virus: penetra nell’epidermide per raggiungere lo strato sottostante di cellule in attiva replicazione. Non da infezione a livello sistemico.

Altri virus possono dare infezione a livello mucosale e poi dare infezione sistemica oppure fare il percorso “al contrario” cioè diffondersi a livello sistemico e poi dare infezione mucosale (malattie con manifestazioni esantematiche): si presentano nelle fasi iniziali con la presenza di chiazze rossastre appiattite (macule) che evolvono in papule (chiazze rossastre rilevate, palpabili). Si parla di **esantemi maculo-papulati**. Sa formazione di questi esantemi avviene con meccanismo immuno-mediato.

In altri tipi di esantemi il processo replicativo del virus porta a necrosi del tessuto (**esantemi vescicolari**), questo tipo di esantemi sono invettivi perché il liquido liberato nella rottura delle vescicole è ricco di agente infettante.

Le verruche (sostenute da agenti infettanti sopraggiunti dall’esterno e che replicano in questa sede) sono anch’esse infettanti, sia per contatto diretto che indiretto.

Virus come epatite ed HIV possono dare nella fase acuta manifestazioni esantematiche papulate nella fase acuta dovute a deposito di immunocomplessi.

Il deposito di immunocomplessi può dare infiammazioni a livello articolare.

## Caratteristiche dell’immunità adattiva ed innata

Nelle due sottocategorie si hanno altre classificazioni.

Nell’immunità innata si hanno le difese di prima linea, ovvero la cute, mucose, secrezioni delle stesse. E di seconda linea rappresentate da cellule bianche fagocitiche, proteine antimicrobiche, ecc...

Tra gli elementi di protezione si annovera anche il microbioma, costituito da virus, batteri e funghi, a composizione diversa a seconda del disretto in cui risiede, per competizione ostacola l’infezione da parte di patogeni.

Durante la prima fase, in cui si attivano le risposte innate, si assiste ad una produzione di citochine come gli interferoni di tipo I poche ore o pochi giorni dopo l’infezione, queste citochine iniziano a rallentare la produzione di particelle virali. Successivamente si attiva la risposta cellulo-mediata, incentrata sull’eliminazione delle cellule infette. Gli interferoni favoriscono la degradazione degli RNA, specialmente quelli a doppia elica e stimolano la trascrizioni di geni che codificano per proteine che tentano di bloccare varie fasi della replicazione virale.

Si conoscono 6 tipi di interferoni, i più importanti in ambito virologico sono 3 tipi: alfa, beta e gamma. Prima si usava una nomenclatura basata sui citotipi che li producono ma è sbagliata, alfa e beta sono prodotti da praticamente tutti i citotipi. IFN-gamma è prodotto dai linfociti T che hanno riconosciuto l’antigene, fa parte della risposta adattiva.

Più tardivamente rispetto agli IFN si attivano le cellule Natural Killer. Nel complesso si ha l’induzione di un processo infiammatorio.

La risposta infiammatoria decide l’outcome dell’infezione, alcuni virus realizzano principalmente un danno diretto ai distretti infettati, in altri casi il danno è principalmente causato dai processi di risposta immunitaria. Ad esempio nell’epatite B si ha massiccia morte di epatociti ma si tratta di epatociti infetti, invece in caso di infezioni in soggetti immunodeficienti non si ha epatite.

### Attivazione della risposta adattiva:

Prima si pensava che fosse necessaria la presentazione dell’antigene da parte di cellule professioniste come macrofagi e cellule dendritiche.

Ovviamente insieme all’antigene vengono presentati altri segnali che comunicano la necessità di stimolare la produzione di anticorpi. Principalmente la presentazione antigenica avviene nel circolo linfatico. (E ora?).

La risposta adattiva si realizza in modo cellulo-mediato e umorale. Come si sceglie una via rispetti all’altra?

Se l’antigene viene processato in sede intracellulare porta a presentazione tramite MHC-I ed attivazione di risposta **citotossica** (CD8+).

Se l’antigene è in sede extracellulare viene presentato tramite MHC-II con attivazione di risposta **umorale** (CD4+).

L’azione dei linfociti T citotossici consiste nel riconoscere ed uccidere le cellule infettate.

La produzione di anticorpi invece presenta meccanismi più variegati. Si hanno innanzitutto anticorpi di tipo diverso: IgM, prodotte nella prima fase, di

solito indice di infezione acuta, hanno affinità inferiore. IgA e IgM sono anticorpi detti “secretori” perché sono presenti nelle mucose e hanno un importante ruolo nel contrastare le reinfezioni. Le IgA hanno una sequenza peptidica che ne favorisce l’esternalizzazione.

In ambito antivirale gli anticorpi agiscono in 5 modi:

1. **Agglutinazione:** formano un reticolo immobilizzano le particelle virali che poi possono essere eliminate per fagocitosi.
2. **Lisi da complemento:** Meccanismo di difesa che si realizza soprattutto sulle cellule infettate, molto efficace nelle prime fasi dopo l’infezione. Molto importanti per attivare questo meccanismo sono le IgM che legano molto bene la proteina del complemento C1.
3. **Neutralizzazione:** Sfrutta gli anticorpi neutralizzanti, che si legano sull’antirecettore impedendo il legame con il recettore cellulare.
4. **Opsonizzazione:** simile alla neutralizzazione ma avviene a livello della singola particella virale, alcuni virus sfruttano questa via per essere fagocitati ed infettare le cellule.
5. **Attività citotossica anticorpo-mediata:** sfruttano anticorpi che legano le cellule infette che richiamano cellule NK e inducono la lisi cellulare.

**Meccanismi virali per evadere i processi immunitari**

- **Variazione antigenica.**
- **Espressione ristretta dei geni virali.**
- **Regolazione dei geni cellulari: es. inattivazione degli MHC-I**
- **Regolazione di molecole accessorie coinvolte nel riconoscimento immunitario.**
- **Infezione di siti privilegiati: es. sistema nervoso centrale, siti della gametogenesi.**
- **Infezione diretta delle cellule immunitarie.**
- **Induzione dell’espressione di antigeni self (tolleranza).**
- **Induzione di linfociti T soppressori.**

Possiamo indurre artificialmente una risposta immunitaria in due classi di modi:

- **Immunità attiva:** Es. vaccini, la risposta è indotta nel sistema immunitario dell’ospite e dura anni o decenni.
- **Immunità passiva:** la protezione è trasferita da un soggetto all’altro, dura al più qualche settimana. Ha il vantaggio di essere attiva molto velocemente.

Si ha anche un’immunità passiva naturale, trasferita dalla mamma al bambino, questi anticorpi durano 12-16 o 18 mesi, c’è variabilità individuale e dipende dal fatto se il bambino sia allattato al seno o meno.

L’immunità attiva si ottiene tramite la vaccinazione o tramite l’infezione.

I vaccini si suddividono in 2 grandi categorie: i **vaccini vivi attenuati** che cercano di riprodurre artificialmente l’infezione naturale tramite un agente patogeno inattivato in modo da essere capace di infettare ma non di dare malattia. Ad esempio nel caso dei vaccini contro virus il vaccino contiene solo una parte della particella virale.

I vaccini vivi attenuati possono essere somministrati a bambini ad un’età più tardiva perché il neonato ha ancora un’alta quantità di anticorpi materni che porterebbero ad un’azione inefficace del vaccino attenuato. (**i vaccini attenuati risentono della presenza di anticorpi circolanti**).

I **vaccini inattivati** invece non sono capaci di replicare, generalmente non sono efficaci come i vaccini vivi e richiedono la somministrazione di più dosi. Non replica quindi non risente della risposta anticorpale. La risposta anticorpale indotta è principalmente umorale (l’antigene è captato dall’esterno) e tende a ridursi nel tempo in modo più marcato rispetto alla risposta indotta da vaccino attenuato.

I vaccini vivi attenuati più usati oggi contro infezioni virali sono:

- Morbillo
- Varicella
- Influenza
- Poliomelite

La tecnologia classica per produrre vaccini attenuati consisteva nel prendere un il virione e farlo replicare per centinaia di generazioni in cellule di una specie diversa. Per adattarsi alla crescita in un ospite diverso il virus accumula mutazioni che lo rendono più adatto a replicare nel nuovo ospite e meno adatto all’ospite umano. In alcuni individui le mutazioni accumulate venivano perse (processo noto come “reversione”) ripristinando il genotipo (ed il fenotipo) del virus patogeno iniziale.

Uno dei primi importanti esempi di vaccino a virus attenuato è stato la poliomelite, abbandonato intorno agli anni ‘70 perché il rischio di reversione era maggiore del rischio di contrarre la poliomelite senza vaccino, sostituito con vaccini diversi ma meno efficaci. Adesso i vaccini attenuati si usano contro virus con genoma molto grande in cui l’adattamento non avviene grazie a mutazioni ma a delezioni. Più modernamente i virus vengono attenuati tramite processi di ingegneria genetica.

**Vaccini inattivati:**

Possono essere costituiti da **virus vivo intero** (inattivato tramite fissativi che creano ponti tra le proteine, impedendo la scapsidizzazione).

Oppure da **subunità virale** iniettando solo alcune componenti proteiche del capsido, la scelta su quali componenti usare nello specifico si fa per favorire lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti.

In concomitanza deve essere presente un **adiuvante** che ha funzione di deposito (viene miscelato con l’antigene, forma un deposito di antigene nel sito di iniezione), ha un effetto sul processo infiammatorio che poi porterà allo sviluppo della risposta immunitaria, un’altra funzione è “ingannare” le cellule per fare sì che l’antigene assorbito dall’esterno si comporti come se fosse di origine intracellulare (presentato con MHC-I, induce risposta cellulo-mediata anziché umorale).

**Vaccini a mRNA o DNA:**

L’antigene è sintetizzato nella cellula, la risposta è cellulo-mediata. Il materiale genetico è contenuto in microparticelle che si fondono con la cellula portando l’mRNA nel citoplasma dove istruisce i ribosomi a produrre la proteina. È stato tentato per anni ma veniva indotta una risposta immune immediatamente, poi si è scoperto (premio Nobel) che usare le basi azotate naturali non va bene, modificando le basi azotate si riduce la risposta immune, si rende il materiale genetico più stabile e si riduce l’attività delle nucleasi che tenderebbero a degradare il materiale genetico (tecnica usata da Pfizer e Moderna, invece Astrazeneca, Sputnik e J&J usano un vettore virale in cui è stata inserito il gene per la proteina spike). Il vantaggio di questi virus è che è molto facile modificare il messaggero per adattarsi alle nuove varianti.

La sede e la schedule temporale con cui si somministrano i vaccini non è casuale. Il tipo di risposta immunitaria dipende dalla via di ingresso dell’agente immunizzante.

Le vie orali sono quelle che garantiscono la stimolazione più completa del sistema immunitario che quindi porta a produzione di anticorpi in sedi diverse.

La via nasale è in via di studio perché induce produzione di anticorpi nella mucosa respiratoria e induce una risposta protettiva nei confronti delle infezioni contratte per via sessuale.

La copertura vaccinale dipende anche dall’età di somministrazione, diminuire l’intervallo tra le dosi o somministrare il vaccino prima dell’età indicata può interferire con l’attività immunitaria e con la produzione anticorpale riducendo l’efficacia del vaccino.

La somministrazione di vaccino attenuato in gravidanza è controindicata perché esiste sempre il rischio che il virus dia infezione e attraversi la barriera emato-placentare.

In età molto precoce (2 mesi) si somministra il vaccino esavalente (virus inattivati, richiedono 3 somministrazioni) per 2 motivi: aumentare la copertura vaccinale e ridurre i costi.

Dopo i 65 anni (o prima in condizioni particolari) si consiglia il vaccino contro H. zoster (fuoco di Sant’Antonio). Si è cercato di usare lo stesso vaccino che si usa contro la varicella ma non funziona.

## Farmaci antivirali

I target sui quali agiscono sono vari:

- **Inibitori di fusione:** Molto efficaci, molto difficili da produrre. Farmaci che perturbano l'interazione tra recettore ed anti-recettore rischiano di perturbare la funzione fisiologica della cellula. Es. antagonista CCR5 contro HIV.
- **Inibitori di scapsidizzazione:** Processo realizzato dalla cellula, si rischia anche qui di interferire con le funzioni fisiologiche.
- **Inibitori di sintesi di acidi nucleici:** I virus usano molto spesso polimerasi proprie che possono essere inibite indipendentemente dalle polimerasi normali della cellula.

I farmaci che interferiscono con processi molecolari comuni a molti virus diversi sono preferibili.

**Inibitori di fusione ed ingresso:** es. HIV, prima si tentarono inibitori per CD4 (risultati disastrosi), poi si è passati ad inibire CCR5 dopo aver visto che soggetti che la presentano mutata non mostrano segni patologici e sono resistenti all'infezione.

È stato poi sviluppato un farmaco che si lega al recettore CD4 impedendo l'ingresso sempre di HIV.

**Inibitori della scapsidizzazione:** Usati per combattere virus come Influenza A. Vengono introdotti come vescicole fagocitiche che poi vengono acidificate avviando la scapsidizzazione (una proteina virale aumenta l'attività della pompa proteica). Esistono farmaci che inibiscono la pompa proteica.

**Inibitori della sintesi di acidi nucleici:** Es. aciclovir, analogo nucleosidico, capostipite della famiglia di farmaci che bloccano l'allungamento della catena di nucleotidi perché sono strutturalmente simili ma modificati in modo da non poter formare i legami necessari. Si tratta di profarmaci perché la forma attiva è quella trifosfata, che non è solubile.

Durante la replicazione il virus della varicella produce la timidina chinasi virale che fosforila aciclovir bloccandolo nel citoplasma della cellula in questione. La forma monofosfato è un substrato per le chinasi cellulari che completano la fosforilazione a 3P. A questo punto viene usato come substrato dalla DNA polimerasi virale.

Meccanismo simile ha la zidovulina (AZT) contro HIV, vengono fosforilate in tutte le cellule dagli enzimi cellulari, la selettività d'azione deriva dal fatto che la trascrittasi inversa ha un'affinità molto elevata per AZT-3P e la introduce nella catena in allungamento bloccandolo. Il problema è che pur avendo affinità minore, quando il farmaco è utilizzato anche dalle polimerasi cellulari risultando tossico a concentrazioni elevate. Il problema di HIV è che sviluppa resistenza molto velocemente, quando l'unico farmaco era AZT si combatteva somministrando dosi elevate, adesso invece si usano più farmaci in concomitanza mirati contro molecole diverse.

Queste classi di farmaci sono detti inibitori competitivi perché competono con il substrato naturale che sono i nucleotidi normali.

Esistono poi inibitori non competitivi che si legano all'esterno del sito attivo dell'enzima bloccandone l'attività.

Un altro target dei farmaci contro HIV è l'enzima **integrasi** che impedisce l'integrazione del genoma virale nel genoma cellulare.

Un target usato nelle infezioni contro i virus in generale sono le proteasi che tagliano le proteine precursori realizzando la maturazione del virus. In questo modo la maggior parte delle particelle virali prodotte sono incapaci di infettare.

In questo caso sono stati progettati inibitori non competitivi che legano la proteasi all'esterno del sito attivo facendole perdere la funzionalità.

**Inibitori del rilascio:** Usati ad esempio contro i virus influenzali. Hanno come target le molecole neuraminidasi ed emagglutinina. L'interazione tra anti-recettore e recettore (contenente acido sialico) non è di per se sufficiente a far entrare il virus, è necessaria la neuraminidasi che taglia l'acido sialico permettendo l'ingresso. Un meccanismo praticamente speculare avviene quando il virus neoformato lascia la cellula in cui si è formato. Non potendo tagliare l'acido sialico il virus non può essere liberato in circolo. È un meccanismo abbastanza diffuso, è stato tentato anche contro herpes ed HIV ma i virus sono bravi a sviluppare resistenza, sono in sviluppo farmaci di nuova generazione.

Per evitare lo sviluppo della malattia è necessario somministrare il farmaco ai primi sintomi della malattia.

## Diagnosi dell'infezione virale

Importante distinguere tra diagnosi di infezione e diagnosi di malattia.

**Diagnosi diretta:** Determinazione della presenza dell'agente virale o suoi componenti nel materiale patologico.

**Diagnosi indiretta:** Determinazione della presenza di reazione contro l'agente virale (anticorpi nel siero o fluidi corporei).

L'approccio indiretto è da utilizzare nelle fasi tardive, quando il sistema immunitario ha avuto il tempo di sviluppare anticorpi specifici.

La rilevabilità di agente virale e di anticorpi è variabile a seconda dello stadio dell'infezione.

Per selezionare l'approccio diretto o indiretto si tiene conto di:

- **Stadio dell'infezione.**
- **Tipo di infezione sistemica/locale** (in caso di infezione locale la sede del prelievo deve corrispondere alla sede dell'infezione, o alle principali vie di ingresso).
- **Presunto agente infettivo.**
- **Caratteristiche dell'agente infettivo** (es. nel caso di ricerca di virus o batteri tramite coltura è necessario prestare attenzione alle condizioni ed alla durata della conservazione del campione per evitare la morte del patogeno o la contaminazione del campione).
- **Terapia antimicrobica in corso.**
- **Tecniche disponibili e preparazione del personale.**

**Tecniche di diagnosi diretta:**

- **Microscopia elettronica:** Richiede tempi lunghi, molto legato alle capacità dell'operatore, poco sensibile rispetto alle alternative. Uno dei virus per cui era più utilizzato era l'epatite B, che viene prodotto in quantità enormi in fase acuta ed è facilmente riconoscibile nelle microfotografie, i virus erpetici invece hanno tutti la stessa morfologia visti al microscopi. Anche in altre famiglie di virus è impossibile distinguere la tipologia precisa.
- **Amplificazione biologica in coltura cellulare:** Si fa riprodurre il virus su un substrato di cellule ospiti. In molti casi non è utilizzabile, es. papilloma virus o epatite perché crescono in tessuti molto difficili o impossibili da riprodurre in vitro. Può richiedere molto tempo, a volte richiede fino a 4 settimane per una risposta negativa. Un altro svantaggio è che si rischia di propagare il virus. Soprattutto per la ricerca di infezioni neonatali o in soggetti trapiantati di citomegalovirus si usa tuttora una tecnica chiamata **shell vials** sul cui fondo si trova un vetrino con una coltura di cellule suscettibili al virus. Su questo terreno si inocula il campione e si centrifuga la provetta in modo da portare il virus sul fondo in corrispondenza delle cellule. Per capire se il virus replica si ricercano le proteine che il virus esprime per poter replicare, preferibilmente una prodotta nelle fasi iniziali. Si usano anticorpi monoclonali specifici legati a marcatore fluorescente per rilevare e quantificare la presenza di proteina.
- **Metodi sierologici:** Richiedono meno lavoro e possono essere automatizzati, stanno soppiantando le altre tipologie. La rilevazione del virus avviene su componenti residue, non solo sul virus intero.
  - **Ricerca degli antigeni:** Sono generalmente semplici da eseguire e veloci, funzionano tramite agglutinazioni, anticorpi legati a porzioni ad attività enzimatica o immunofluorescenza. L'epidemia di COVID ha contribuito ad espandere enormemente la diffusione dei test ad immunocromatografia a flusso laterale (i "test rapidi"), nel caso del COVID la ricerca si fa verso la proteina nucleocapsidica. [#TODO: rivedere].
- **Metodi molecolari:** Danno una valutazione quantitativa oltre che qualitativa. Sono relativamente rapidi, estremamente sensibili. Uno dei problemi dei primi tentativi era la saturazione: oltre una certa concentrazione il risultato era sempre lo stesso. Adesso sono disponibili test con range di linearità molto ampio. La sensibilità permette di rilevare anche poche particelle virali nel sangue che non indicano una fase replicativa

acuta ma attiva replicazione in un distretto, cosa che può depauperare il sistema immunitario, è importante quindi che la terapia tenda a minimizzare il più possibile la viremia. Parentesi **infezione da HIV**: suddivisibile in 3 fasi: all’inizio si ha un periodo di incubazione, poi i virioni diventano rilevabili nel sangue ed aumentano sempre più, parallelamente si osserva una riduzione di linfociti CD4+. Dopodiché il soggetto sviluppa una risposta immune che limita ma non riesce a bloccare la replicazione virale, la viremia raggiunge un equilibrio ed i sintomi scompaiono (**latenza clinica**) la riserva di linfociti T CD4+ continua però a scendere. Quando la presenza di linfociti non riesce più a mantenere sotto controllo i sintomi si riacutizzano, la viremia sale accelerando la perdita di linfociti ed iniziano a svilupparsi infezioni opportunistiche e tumori che, in assenza di trattamento, portano il paziente a morte.

Più elevata è la viremia nella fase di latenza clinica, più rapida è la degenerazione quindi un test quantitativo aiuta a prevedere il decorso clinico. Inoltre la viremia è direttamente correlata al rischio di trasmissione. Altra utilità del test quantitativo, sia orizzontale (rapporti sessuali, per trasfusioni e trapianti non si considera accettabile comunque) che verticale (madre-figlio).

Per alcuni virus (es. epatite B con terapia a base di interferoni) il livello di viremia è correlato a resistenza ad alcuni tipi di terapia.

Il controllo della viremia è usato per misurare l’efficacia della terapia e quindi monitorare varianti virali resistenti alla terapia.

## Test di genotipizzazione:

Ne esistono 5 tipi principali, usati per avere indicazioni su base genomica. Prima si usavano sonde per sequenze specifiche, adesso grazie alla riduzione dei costi si ricorre sempre più spesso al sequenziamento. In alcuni virus (es. epatite C) la genotipizzazione può aiutare a scegliere la terapia, ad esempio caratteristiche genomiche possono predisporre a resistenze alle terapie.

In alcuni virus (es. HPV) la tipizzazione genomica permette di prevedere la gravità e la progressione dell’infezione. Si usano sonde contro sequenze che contraddistinguono i ceppi oncogeni oppure il sequenziamento, il sequenziamento spesso da problemi perché sono comuni infezioni da più ceppi contemporaneamente.

**Test di rilevazione dell’anticorpo:** Meccanismo simile a quanto visto per la ricerca di antigeni ma “al contrario”.

**Test immunoenzimatici:** es test ELISA, nei pozzetti si possono preparare differenti combinazioni di antigeni/anticorpi e quindi stabilire anche lo stadio dell’infezione (ad esempio analizzando la concentrazione relativa di IgG e IgM). In realtà per i virus si hanno moltissime eccezioni: es. in soggetti con epatite C le IgG persistono per lunghi periodi. La presenza di IgM permette anche di distinguere una reinfezione da una riacutizzazione.

**Test di avidità:** Misura la forza di legame tra anticorpo ed antigene. Quando il sistema immunitario entra in contatto per la prima volta con l’antigene produce molti anticorpi a bassa affinità. Con il progredire del tempo ci si stabilizza su uno spettro di produzione di anticorpi con affinità superiore. Si realizza aggiungendo quantità sempre più elevate di urea che destabilizza ed alla fine rompe il legame tra anticorpo ed antigene.

**Test di fissazione del complemento:** Implica la ricerca di anticorpi capaci di attivare il complemento (per definizione IgM). Si scalda il siero in modo da inattivare le proteine del complemento interne. Si aggiunge il siero trattate in un pozzetto contenente l’antigene. Si aggiunge poi una piccola quantità di proteine del complemento dall’esterno, se sono presenti anticorpi attivanti il complemento (adesso legati all’antigene) essi sequestrano il complemento aggiunto. Si aggiungono poi emazie (eritrociti) legati ad anticorpi anti-emazie fissanti il complemento. Se sono presenti anticorpi fissanti il complemento nel campione in esame essi hanno fissato il complemento aggiunto e non si ha lisi delle emazie, e viceversa. Alla fine si centrifuga per indurre la sedimentazione delle emazie eventualmente rimaste intere.

**Test di neutralizzazione:** valuta la presenza di anticorpi neutralizzanti. Al siero diluito viene aggiunta una quantità titolata di virus, al termine del periodo di incubazione si aggiunge una preparazione di cellule suscettibili all’infezione. Se sono presenti anticorpi neutralizzanti essi hanno legato le particelle virali che non sono più in grado di dare infezione. Test eseguito ad esempio dopo il trapianto di midollo.

**Western blot:** Usato ad esempio nella conferma della diagnosi sierologica di HIV (l’estrema sensibilità dei test porta a numeri rilevanti di falsi positivi, conseguenze legali in caso di falsa diagnosi). Per HIV, a differenza di altri virus, la presenza di anticorpi indica che il paziente è infetto. Si tratta di un test diverso dal western blot classico perché qui sappiamo quali proteine inoculiamo e cerchiamo se sono presenti. Si moltiplica il virus in coltura, si lisa nelle sue componenti proteiche e si fa l’elettroforesi. Il substrato è un foglio di nitrocellulosa appositamente preparato per questo test. Il soggetto si dice positivo quando presenta anticorpi prodotti da due o più geni (virali?) diversi. Può risultare indeterminato (anticorpi presenti ma a meno di due geni) se il soggetto è effettivamente negativo (anticorpi naturalmente presenti, raro ma possibile) oppure se è nelle prime fasi dell’infezione: si ripete il test dopo un certo tempo.

## Virologia Speciale

**Herpesvirus:** Famiglia molto varia, tutti danno persistenza. Sono virus molto grandi (180-200 nm), hanno envelope esterno. Presentano un capsido di forma icosaedrica, tra l’envelope e il capsido si hanno proteine che prendono il nome di tegumento. Il genome è anch’esso molto grande, tra 130 e 230 kbp che naturalmente include molti geni, molti dei quali sono probabilmente di natura cellulare pesantemente modificati, ad esempio per citochine volte a ridurre la risposta cellulare.

Entrano con un processo di fusione che provoca il rilascio delle proteine del tegumento, tra le funzioni di queste proteine si ha l’arresto della sintesi proteica dell’ospite ostacolando la produzione di molecole antivirali.

Il capsido raggiunge la membrana nucleare e vi inietta il proprio materiale genetico (il capsido non entra nel nucleo anche se prima si pensava di sì). Il genome è DNA lineare, in alcuni casi circolarizza.

Una volta nel nucleo il genome può entrare in fase di latenza, in cui esprime i trascritti LAT. Oppure può andare in replicazione produttiva: vengono spenti i geni LAT e si attivano quelli per la replicazione. Nella maggior parte dei casi lo switch tra latenza e replicazione avviene in risposta a segnali di sofferenza o senescenza cellulare (il virus “scappa” da una casa non più accogliente).

Tra i geni espressi appena il virus entra in fase replicativa produttiva si hanno i geni alfa che hanno lo scopo di bloccare la sintesi proteica cellulare. I trascritti alfa realizzano un feedback negativo sui geni alfa stessi ed attivano i geni beta. Tra i geni beta si hanno quelli che codificano per la replicazione. La replicazione avviene nel nucleo quindi i trascritti beta devono essere trasportati nel nucleo. Infine si attivano i geni gamma, o strutturali.

Tutti i geni virali sono trascritti dalla RNA polimerasi cellulare.

Diverse DNA polimerasi si associano al genome circolarizzato contemporaneamente. Il materiale genetico neosintetizzato è composto di molti segmenti concatenati che vengono poi tagliati in fase di assemblaggio. Il genome virale di questa famiglia infatti presenta molto spesso sequenze ripetute terminali che servono da segnale per il taglio.

Se la produzione di virioni è importante la cellula è lisata, ma in condizioni normali il virus si assembla in prossimità della membrana nucleare, gemma attraverso il reticolo, il golgi e alla fine la membrana cellulare.

Per quanto riguarda l’uomo le 8 specie conosciute si dividono in 3 gruppi:



- **Alphaherpesviridae** : comprende i virus herpes simplex 1 e 2 e varicella zoster (Herpes virus umano tipo 3). Indipendentemente dalle modalità di trasmissione il target primario di replicazione sono le cellule mucose. Come sito di latenza usano i neuroni. Hanno un ciclo replicativo abbastanza breve (ca. 15 ore). Hanno replicazione essenzialmente citolitica.
- **Gammaherpesviridae**: Virus che hanno proprietà tumoreli, si riconoscono Hepstein-Barr (tipo 4) e virus del sarcoma di Kaposi (tipo 8). Il sito di latenza sono le cellule linfoidi.
- **Betaherpesviridae**: Citomegalovirus (tipo 5), herpes linfotropico (tipo 6) ed herpesvirus umano 7. Sono i virus a replicazione più lenta della famiglia, infettano una grande varietà di cellule. Non danno cross-immunità.

### Herpes simplex (HSV-1 e 2)

Comunemente ritrovati nella saliva, nelle lacrime, nelle secrezioni genitali e altri fluidi.

Sono tra i primi virus contratti. Le infezioni a livello della mucosa orale sono più gravi se date da HSV-1, quelle genitali da HSV-2, si hanno però infezioni da entrambi i ceppi in entrambe le sedi. A volte si hanno infezioni miste. Si hanno normalmente riattivazioni.

Il tempo di incubazione è piuttosto breve, poi si ha la formazione di vescicole ricche di virus a cui segue risposta immunitaria. Si possono avere sintomi locali (dolore, prurito, ecc ...) ed occasionalmente sintomi sistemici (febbre, mal di testa). Generalmente nell'arco di 1-2 settimane i sintomi acuti si risolvono.

Per le infezioni genitali la sede di latenza sono generalmente i gangli sacrali, per le infezioni orali il ganglio trigemino.

Le manifestazioni cliniche sono abbastanza varie e dipendono dal sito di ingresso del virus. A volte il movimento centripeto del virus non si arresta nel ganglio ma raggiunge il sistema nervoso centrale, può portare ad encefalite.

In caso di infezione contratta allo stadio fetale è capaci di indurre aborto, se è contratta durante il parto può avere conseguenze fatali.

Per la diagnosi si usano: immunofluorescenza, PCR, coltivazione (più facile con i sierotipi 1 e 2, risultati in 1-5 giorni). La classificazione del sierotipo si fa di solito per documentare un'infezione recente o riattivazione. Gli anticorpi impiegano 1-2 settimane per essere prodotti.

Per il **trattamento** si usa principalmente Acyclovir, sono usati anche famciclovir, penciclovir e valacyclovir, tutti derivati da acyclovir ma più costosi, se il virus diventa resistente ad acyclovir diventa resistente anche a questi però.

Prima si usavano altre molecole con effetti collaterali tossici.

### Varicella

Malattia endemica, altamente trasmissibile, una delle malattie classiche dell'infanzia. Adesso esistono vaccini molto efficaci. Ha una certa stagionalità, la forma zoster invece si presenta uniformemente durante l'anno.

L'infezione avviene di solito a livello della mucosa respiratoria a cui segue replicazione nel tessuto linfoide circostante. Il virus poi si sposta a replicare in milza, fegato ed altri organi. La viremia non è data solo da virus libero ma anche da virus trasportato da cellule ematiche. A circa 16 giorni dal contagio appare il caratteristico rash cutaneo con rilascio di vescicole piene di particelle virali. Il nome chickenpox deriva dalla somiglianza delle lesioni con quelle provocate da vaiolo. Si hanno due picchi di viremia: uno poco dopo l'infezione e l'altro alla comparsa del rash. Si ha importante risposta immunitaria con produzione di anticorpi abbastanza duratura che previene la reinfezione e permette lo sviluppo di vaccini.

Le complicazioni sono rare, soprattutto in soggetti anziani e/o immunocompromessi. Tra di esse ricordiamo la varicella emorragica, in cui la formazione di vescicole avviene a livello del rivestimento degli organi interni.

Viene trasportato a livello dei gangli dalle cellule linfoidi.

Tende a riattivarsi, prima si riteneva questo fenomeno come causa dello zoster, adesso si è capito che la riattivazione è normale e migliora la risposta immunitaria, lo zoster si instaura in casi particolari a seguito della riattivazione.

Il problema principale della forma zoster è la distruzione delle terminazioni nervose che è accompagnato da intenso dolore che può durare mesi, costringendo il paziente a ricorrere ad anestetici locali.

Per il trattamento si usa anche in questo caso acyclovir.

Si hanno due vaccini: uno usato in ambito pediatrico, contro la forma chickenpox, spesso in configurazione tetravalente insieme a morbillo, parotite e rosolia. Sono vaccini vivi attenuati con i classici pro e contro di questa tipologia. Ed uno a virus inattivato/subunità che si usa contro la forma zoster, è sicuro anche per soggetti immunodepressi.

Per motivi non chiari i virus contro la forma chickenpox non sono molto efficaci contro la forma zoster.

### Cytomegalovirus (CMV)

Trasmesso verticalmente od orizzontalmente, di solito ha pochi effetti sull'ospite. Estremamente diffuso, dal 2 al 10% dei bambini sono già stati infettati a 6 mesi nei paesi occidentali. L'infezione permane per tutta la vita e si può riattivare più volte l'anno con ricomparsa di virioni in urina e saliva. È possibile la reinfezione con un ceppo diverso o lo stesso ceppo, clinicamente non distinguibile da una riattivazione.

L'infezione è quasi sempre asintomatica ma il soggetto diventa portatore. Più tardi si contrae l'infezione, più grave è la malattia. La malattia classica da CMV è la **mononucleosi** (data anche da Hepstein-Barr). La forma dipende dalla modalità di infezione. Uno dei problemi fondamentali dati da CMV è la sua azione nei soggetti trapiantati o immunodepressi (es. AIDS) (sindrome virale da CMV oppure malattia tissutale invasiva). Tra gli effetti indiretti si ha la riduzione dell'efficienza del sistema immunitario, produzione di citochine pro-infiammatorie, alloroattività.

Per prevenire CMV si usavano due strategie: **profilattica**, che prevede la somministrazione di antivirale per un periodo prefissato e **preventiva** che prevede la somministrazione di antivirale se la viremia supera un valore soglia determinato in base ai fattori di rischio dell'individuo.

La terapia profilattica può risultare tossica, soprattutto a livello renale, e non si ha la debole riattivazione periodica che mantiene il sistema immunitario "allenato".

### Diagnosi:

Ricerca di antigeni o anticorpi, per la diagnosi rapida in pazienti immunodepressi si cercano gli antigeni pp65 CMV. Usate anche la ricerca di DNA e l'isolamento virale (4-5 settimane per il metodo convenzionale, 24-48h con il metodo rapido).

La sierologia anche qui ha poco significato, soprattutto si analizzano gli anticorpi che si vanno a formare.

### Terapia:

I target sono principalmente: la polimerasi del virus, una chinasi virale ed il complesso proteico che include il materiale genetico nel capsido.

L'acyclovir non funziona perché CMV non ha la timidina chinasi.

Il farmaco più usato si chiama ganciclovir che viene fosforilato da una chinasi (diversa dalla timidina chinasi) ed agisce da terminatore di catena come acyclovir.

In casi particolari si usa il letermovir che inibisce il complesso proteico che include il genoma virale nel capsido (maturazione del virione).

Le immunoglobuline sono a volte usate per la profilassi ma la loro efficacia è incerta.

### Virus di Epstein-Barr

Ha principalmente due target di replicazione. La modalità più diffusa di trasmissione è tramite secrezioni respiratorie o saliva. Il virus penetra nei linfociti B in fase di riposo che differenziano in plasmacellule e producono anticorpi e citochine. I linfociti B (ma anche linfociti T o cellule NK) infettati possono essere immortalizzati e continuare a produrre particelle virali, cellule in questo stato sono riconoscibili perché esprimono sulla loro superficie antigeni virali, contemporaneamente vengono prodotti antigeni nucleari che sostengono l'immortalizzazione.

Il destino di maturazione in plasmacellule prevale nelle prime fasi di infezione.

Il virus prodotto dai linfociti infetti può infettare le cellule epiteliali nelle quali ha un ulteriore ciclo replicativo e le particelle virali si ritrovano nuovamente nella saliva.

L'infezione può bersagliare qualsiasi tessuto con componente linfoide.

### Malattie

È un'infezione molto diffusa, quando colpisce gli adulti è più facile che induca mononucleosi. In casi sporadici può indurre epatite acuta.

- Mononucleosi.
- Linfoma di Burkitt. (nei soggetti immunocompetenti).
- Carcinoma nasofaringeo. (nei soggetti immunocompetenti).
- Malattia linfoproliferativa e linfoma. (negli immunodepressi, come tutte le seguenti).
- Sindrome linfoproliferativa legata al cromosoma X.

### Mononucleosi infettiva:

Tra i sintomi più caratteristici si ha splenomegalia, una delle complicazioni più gravi, soprattutto nell'infezione contratta in età adulta, è la rottura della membrana di rivestimento della milza. Altri sintomi caratteristici sono faringite essudativa e linfadenopatia insieme ad affaticamento, febbre, lieve mal di testa. Sebbene possibile la diagnosi clinica non è più correntemente usata, si ricorre al titolo virale nel sangue intero (importante la quantità, bassi livelli sono presenti in quasi tutti).

### Linfoma di Burkitt:

Tumore più diffuso nei bambini nei paesi in via di sviluppo. Risponde bene alla chemioterapia, è limitato alle zone con malaria endemica (che causa continua stimolazione del sistema immunitario, quindi anche dei linfociti contenenti il virus). Nelle zone in cui è stata eradicata o quasi la malaria è quasi scomparso anche questo.

### Carcinoma naso-faringeo:

Complicazione più prevalente in alcune aree geografiche, tumore maligno dell'epitelio squamoso della nasofaringe. Tumore più comune nell'uomo e secondo più comune nella Cina del sud. Normalmente la speranza di vita è breve.

Tra i fattori di rischio si conoscono: cucinare cibi su fiamma libera (presenza di nitrosammine) ed assumere alimenti molto caldi.

### Neoplasie maligne in soggetti immunodepressi:

Tendono a colpire il tratto gastrointestinale ed il sistema nervoso centrale.

### Malattia linfoproliferativa da Epstein-Barr post-trapianto:

Tra le cause principali di rigetto. I soggetti devono essere monitorati attentamente per evitare questa convenienza.

### Human Herpes virus type 6-7-8:

I virus 6 e 7 sono considerati "imparentati", ubiquitari, quasi tutti i soggetti presentano anticorpi contro questi virus. Trasmessi tramite saliva ed allattamento al seno. L'infezione è contratta di solito dopo il 4° mese di vita, quando cala l'effetto degli anticorpi materni.

Herpes 7 non è associato a malattia.

In herpes 6 si riconoscono le forme 6a e 6b, 6b è il più diffuso, associato a Roseola Infantum. In alcuni casi può portare ad encefalite o dare sintomi che ricordano la mononucleosi. La forma A è stata associata a patologie autoimmuni o infertilità femminile idiopatica.

Herpes 8 è collegato al sarcoma di Kaposi ed alcune neoplasie meno note come la malattia di Castleman. A differenza delle altre forme di herpes virus non ha distribuzione ubiquitaria.

**Diagnosi:** Isolamento virale poco praticabile, si usa la PCR per DNA virale.

Sierologia poco rilevante.

**Terapia:** Aciclovir funziona bene contro HHV-6, non esistono terapie specifiche contro le forme 7 ed 8.

## Virus influenzali

### Ortomixovirus:

Genoma ad ssRNA a polarità negativa (è necessario che il virus contenga una RNA polimerasi), segmentato. Presente envelope.

In base alle nucleoproteine si riconoscono 4 forme:

1. Infetta umani ed animali, malattia da moderata a grave.
2. Infetta solo umani, malattia meno grave.
3. Raramente riportato.
4. Infetta animali, occasionalmente umani (con conseguenze gravi).

L'involucro esterno contiene due proteine per tutti i tipi, tranne il tipo A che presenta una proteina aggiuntiva. Le proteine comuni sono la emagglutinina e la neuroaminidasi.

La particella virale assemblata può avere forma variabile (virioni pleomorfi).

**Emagglutinina:** lega le molecole di acido sialico dell'epitelio che riveste l'orofaringe.

**Neuroaminidasi:** taglia la membrana permettendo l'endocitosi del virus.

La discregazione del capsido avviene grazie all'acidificazione della vescicola endosomica. Nel sierotipo A l'acidificazione è favorita dalla proteina M2 (?).

Il genoma del virus entra nel nucleo e da lì trascrive i messaggeri. Il trascritto non viene riconosciuto come mRNA, è necessaria un'ulteriore enzima che trasferisce i CAP dai trascritti cellulari agli RNA trascritti a polarità positiva virali. Sono virus che inducono massiccia produzione di interferoni a causa di questa manipolazione delle vie di sintesi proteica cellulare.