

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 un rischio maggiore 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 per il rischio di riattivazione del patogeno, sono i primi ad essere stati sviluppati ma sono tuttora usati.
- **Vaccini inattivati:** Possono contenere subunità virali, virus interi, toxoidi, RNA o DNA.

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

Osservando l'anomalo tasso di sarcomi in alcuni pollai è stata teorizzata (e poi confermata) 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 o DNA, singolo o doppio filamento, polarità positiva o negativa).

Caratterizzati da alta velocità di mutazione. Non contengono molecole ad attività enzimatica (a volte però contengono enzimi utili soprattutto nelle prime fasi di infezioni) 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 in alcuni casi da un **envelope** (che deriva dalla membrana della cellula da cui si è originato) 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 recettoriali (spike) non sono sempre esposte perché potrebbero essere riconosciute facilmente dal sistema immunitario quindi sarebbe un punto di vulnerabilità (esistono sistemi di mascheramento).

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, ha forma allungata che ricorda un filo), 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 con minima perdita di volume).

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 e variazioni di pH e temperatura. Sono tendenzialmente più virulenti perché causano di solito la lisi delle cellule in cui replicano. I virus rivestiti sono favoriti all'interno dell'organismo ospite perché l'envelope maschera gli antigeni e facilita la fusione con le membrane cellulari e quindi l'entrata nella cellula, inoltre i virus rivestiti possono uscire dalla cellula per gemmazione o esocitosi 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.

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 che 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.

Tutte questi espedienti di compressione del materiale genetico sono utili al virus per velocizzare la replicazione in modo che la cellula non abbia tempo di mettere in atto meccanismi di difesa prima che il virus si sia replicato e massimizzare il numero di virioni efficaci prodotti (è più facile inserire nel capsido un genoma più corto).

Nomenclatura dei virus:

Classicamente sono classificati in base alle malattie che causano è un metodo inconsistente perché alcuni 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 basandosi su: morfologia, proprietà antigeniche, tipo di materiale genetico ed omologia di sequenza genetica.

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. Per iniziare è necessario che le proteine virali riconoscano un recettore cellulare che può essere una proteina, un carboidrato o un lipide sulla membrana cellulare. Di solito un recettore è specifico per un virus. Esistono virus capaci di riconoscere più recettori e quindi di entrare attraverso più vie. Per evitare che l'anti-recettore (virale) venga riconosciuto dal sistema immunitario si sono evolute strategie come, ad esempio localizzarlo in fosse profonde dette **"canyon"** sulla superficie del virus.
2. **Penetrazione nel citoplasma:** Per i virus rivestiti avviene di solito tramite fusione dell'envelope con la membrana cellulare, per i virus nudi avviene tramite endocitosi.
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 visibile.

4. **Replicazione del genoma virale:** Il virus esprime i propri geni in un ordine ben preciso, ci sono geni precoci, geni intermedi e tradivi. Il genoma virale serve per produrre enzimi e altre proteine necessarie alla replicazione ed all’assemblaggio ma deve anche replicarsi per essere incluso nei 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.

Infine si ha la **maturazione** che in alcuni casi avviene prima del rilascio ma può avvenire anche nelle vescicole esocitotiche (esempio della cellula che sta crollando: la cellula infetta potrebbe morire da un momento all’altro quindi nella vescicola esocitotica vengono inserite tutte le componenti e viene rilasciata il prima possibile. Successivamente all’interno della vescicola le varie componenti finiscono di assemblarsi).

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 e quindi incapaci di infettare a loro volta.

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. (esistono anche recettori la cui funzione fisiologica è ignota, come ad esempio CCR5).

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

Avviene solitamente per fusione dell’envelope con la membrana della cellula ospite.

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 viene estesa 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 (i quali vengono mantenuti “nascosti” fino a quando non sono necessari quindi il sistema immunitario non può riconoscerli).

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.

Virus ad RNA agiscono generalmente nel citoplasma.

Nei 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 dà origine ad un DNA a doppio filamento il quale 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 perché alcune proteine virali bloccano la traduzione di trascritti cellulari in modo 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 proteine del capsido lasciando un orifizio dal quale viene “tirato dentro” l’acido nucleico. Le molecole di acido nucleico vengono prodotte tutte in serie attaccate le une alle altre e tramite il riconoscimento delle sequenze di inizio e di fine alcune nucleasi tagliano 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.

In realtà appunto perché il virus elimina il più possibile le proteine transmembrana cellulari non fa molta differenza da dove derivi la membrana dell’envelope.

Fase VII: Maturazione

Avviene quando il virus è gemmato (non sempre) tramite specifici tagli o cambiamenti conformazionali nelle proteine virali (sintetizzate come precursori) operate da proteasi virali o enzimi cellulari. Eseguendo questo processo dopo la gemmazione 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 (ad esempio proteine del capsido ed anti-recettori. Ci sono eccezioni, ad esempio le proteine emagglutinina e neuraminidasi dei virus influenzali non sono considerate geni tardivi).

DNA a doppia catena: Il materiale genetico virale è replicato nel nucleo ed è trascritto dalle RNA polimerasi cellulari.

Virus con DNA a singola catena: deve diventare a doppia catena, per fare ciò si porta una DNA polimerasi virale (all’interno del capsido) che sintetizza l’altro filamento. Si procede poi come i virus a DNA a doppio filamento.

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 filamenti positivi che fungono da stampi per i nuovi filamenti a polarità negativa e da messaggeri per la sintesi proteica (necessitano di cap per essere riconosciuti dai ribosomi cellulari, questi cap vengono “rubati” da mRNA cellulari ed aggiunti ai trascritti virali tramite un altro enzima up-front).

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 (dall’enzima virale **trascrittasi inversa** o **retrotrascrittasi**, up-front) che è integrato nel DNA ospite e trascritto da polimerasi cellulari per ottenere i messaggeri per le proteine virali e RNA per i nuovi virioni. La doppia molecola di RNA rende più efficiente il processo: una delle due funge da genoma (viene retrotrascritta) mentre l’altra funge da messaggero per iniziare subito la sintesi proteica.

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, non si producono virioni.
- **Persistente attiva:** Il virus continua a replicare provocando danno al substrato o all’organo nel quale il virus si replica.
- **Persistente latente:** Produzione di virioni intermittente o assente, può rimanere in questo stato per anni, es. herpes, HIV.
- **Persistente trasformante:** Il virus viene danneggiato e perde la capacità di replicare dopo essersi integrato nel genoma cellulare ed averlo modificato. Non può terminare la replicazione ed uccidere la cellula. La cellula può diventare tumorale perché uno dei primi meccanismi con cui interferisce il virus è proprio l’apoptosi.

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 la sintesi delle 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 oppure perché i cap rimossi dagli mRNA cellulari vengono attaccati sui trascritti virali.

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, necessario perché i nucleotidi servono alla replicazione del genoma virale e come substrati energetici.

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 (come farebbe tra membrana cellulare ed envelope). 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 nell’ambiente esterno il virus 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 proteine necessarie ad esempio nella presentazione dell’antigene e nell’apoptosi. Le cellule contengono intrinsecamente proteine che ostacolano i virus: alcune cercano di bloccarne l’ingresso, altre 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, realizzano l’ipermutazione dei recettori. 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 APOBEC3 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 inutili al virus.

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 (dicono ai vicini di proteggerli). 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 di crescita ed una parte interna che cambia conformazione attivando una catena di trasduzione la quale 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 la trasduzione sempre attiva e 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 trasformanti cronici.

I **retrovirus acutamente trasformanti** inducono la formazione di tumore da 1 a qualche settimana dopo l'infezione, agiscono così perché portano nel loro genoma un oncogene cellulare (si sospetta l'origine eucariotica data l'omologia di sequenza, 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 (che è molto grande) a scapito di 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 trasformatore 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 venga a trovare sotto il controllo del 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 trasformatrice per i virus trasformanti acuti non ha importanza il sito di integrazione (hanno il loro oncogene). 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 interferisce con molti geni cellulari tramite numerose vie di segnalazione. Accelera la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, interferisce con i meccanismi di riparazione BER e NER e può causare aneuploidia.

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 sia paracrina che autocrino.

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, che bloccherebbe 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 lasci la cellula bloccata in uno stato in cui ha p53 disattivata, questa cellula può accumulare mutazioni successive 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 la diffusione del virus come un “iceberg” con all'apice le manifestazioni cliniche più gravi ed alla base l'esposizione senza infezione.

Tipi di 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 oppure 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 potrebbe essere trasmesso tramite trasfusioni ematiche.

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

Viremia: presenza del virus nel sangue.

Esempio: Herpes varicella-zoster (Human herpesvirus 3)

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 raggiungano 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 si sono adattati a replicare a temperature intorno ai 33°C perché l'epitelio nasale è naturalmente più freddo rispetto al resto del corpo, sono rapidamente inattivati dal calore, ecco

perché la febbre è un meccanismo di difesa così conservato nell’evoluzione.

I virus che causano il comune raffreddore o comunque infezioni delle prime vie respiratorie sono molti e sono molto diversi tra loro 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** incentrata sul sistema mucociliare. Le **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 e conseguente ristagno di muco permette la crescita batterica quindi apre la strada a sovra-infezioni. Dopo pochi giorni il sistema immunitario generalmente prevale e le cellule dell’epitelio si rigenerano.

La suscettibilità dell’individuo dipende dall’efficienza delle misure di difesa, innate e non, ad esempio la fibrosi cistica producendo muco denso facilita i virus respiratori, così come il fumo di sigaretta che paralizza le ciglia.

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 involucro 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 a carico del sistema gastroenterico 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** (può colpire anche altre sedi cutanee), 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 a causa delle lesioni che permettono l’ingresso del virus, del richiamo di linfociti CD4+ che sono il target di HIV, dell’attivazione cellulare che fa esprimere recettori di membrana che facilitano l’ingresso di HIV nella cellula, oltre a fattori comportamentali come la tendenza ad avere più partner sessuali che causa sia una più alta probabilità di herpes genitale che di contrarre HIV).

Ovviamente non possiamo trascurare HIV.

Epatite B, che si trasmette preferenzialmente per via ematica ma grazie ai controlli sulle trasfusione di sangue e sull’utilizzo di emoderivati la via più comune è diventata quella sessuale. Vaccini sono disponibili ed obbligatori in molti paesi, quasi tutti i soggetti delle nuove generazioni sono vaccinati nei paesi sviluppati.

Infezioni a trasmissione verticale 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 (prima avviene l’infezione più sono gravi). Spesso quando l’infezione è 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 (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 o altro la sua permeabilità si altera permettendo il passaggio di agenti infettivi. Da ricordare che la barriera ematoencefalica risulta permeabile anche nel feto e nel primo periodo post-natale. Modalità poco utilizzata, la maggior parte passa attraverso cellule che possono attraversare 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 anche più predisposti ad encefalite indotta da agenti virali e malattie degenerative.

Il **liquido cefalo-rachidiano** è, in condizioni normali, sterile e 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. Le cause sono infezioni virali, tubercolosi, funghi, infezioni batteriche parzialmente trattate.

Nel caso in cui si sospetti infezione da *H. simplex* si valuta la concentrazione di anticorpi contro *H. simplex* rispetto ad altri virus. Se il livello 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 dà 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: 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**. La 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 infettivi perché il liquido liberato nella rottura delle vescicole è ricco di particelle virali.

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

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

Il deposito di immunocomplessi può causare 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 e del soggetto. 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 (caratteristici di alcuni virus) e stimolano la trascrizione 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 imprecisa: 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 uccisi dalla risposta immunitaria, invece in caso di infezione 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.

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

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

Se l'antigene è in sede extracellulare viene presentato tramite MHC-II con attivazione di risposta **umorale** (linfociti 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 IgG 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** (a cui il sistema immunitario ha accesso ristretto): **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 produrre 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:** si trasferiscono direttamente anticorpi, la protezione è trasferita da un soggetto all'altro e dura al più qualche settimana (finché sono disponibili gli anticorpi inoculati, non si ha produzione di nuovi anticorpi). Ha il vantaggio di essere attiva molto velocemente.

Si ha anche un'immunità passiva naturale, trasferita dalla mamma al bambino tramite il latte, questi anticorpi durano 12-16 o 18 mesi, c'è variabilità individuale e dipende dal fatto che 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 indebolito in modo da essere capace di infettare ma non di dare malattia.

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 una veloce distruzione del vaccino attenuato. (**i vaccini attenuati risentono della presenza di anticorpi circolanti**). Tra i vantaggi riconfermiamo la similarità con l'infezione vera e quindi l'induzione di una protezione efficace e duratura, tra gli svantaggi c'è principalmente il rischio di riattivazione del patogeno, soprattutto nei soggetti immunodepressi.

I **vaccini inattivati** invece non sono capaci di replicare possono contenere solo alcune subunità oppure solo il materiale genetico che codifica per alcune componenti immunogeniche chiave, 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
- Poliomielite

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 importante esempio di vaccino a virus attenuato è stato quello contro la poliomelite, abbandonato intorno agli anni ‘70 perché il rischio di reversione era maggiore del rischio di contrarre la poliomelite senza vaccino (grazie alla vaccinazione infatti si era enormemente ridotta la circolazione del virus), è stato sostituito con vaccini inattivati, più sicuri 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, rende la disponibilità più lunga ed aumenta la probabilità di produzione di una risposta immunitaria), 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 prima che esso possa agire (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 orale è quella che garantisce la stimolazione più completa del sistema immunitario che quindi porta a produzione di anticorpi in sedi diverse.

La via nasale è in 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 vaccio 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 per motivi ignoti.

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 del recettore e quindi della cellula. Es. antagonista CCR5 contro HIV (possibile grazie al fatto che CCR5 non sembra avere rilevanza biologica: i soggetti in cui si presenta mutato non mostrano alcun sintomo).
- **Inibitori di scapsidizzazione:** Processo realizzato tramite enzimi cellulari, 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 perché con un singolo farmaco si combattono infezioni diverse e perché un processo più diffuso tra virus diversi generalmente è fondamentale per il funzionamento del virus ed è meno probabile che si sviluppino mutazioni e quindi resistenza.

Inibitori di fusione ed ingresso: es. da quando si identificò CD4 come la via di ingresso di HIV si è iniziato a tentare la realizzazione di farmaci che bloccassero tale recettore. Per disturbare il meno possibile la normale funzione linfocitaria è necessario che il farmaco sia specifico nell’inibire le interazioni tra CD4 e HIV ma non le altre interazioni di CD4. 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.

In tempi recenti (approvazione FDA 2018) si sono sviluppati anticorpi monoclonali che legano il recettore CD4 ed impediscono il legame del virus.

Inibitori della scapsidizzazione: Usati per combattere virus come Influenza A. I virus in questo caso vengono introdotti come vescicole fagocitiche che poi vengono acidificate avviando la scapsidizzazione, una proteina virale aumenta l’attività della pompa protonica accelerando l’acidificazione. Esistono farmaci che inibiscono la pompa protonica ma disturbano l’intero apparato fagocitico.

Inibitori della sintesi di acidi nucleici: Es. aciclovir (chiamato anche acyclovir), analogo nucleosidico usato spesso contro virus erpetici, capostipite della famiglia di farmaci che bloccano l’allungamento della catena nucleotidica perché sono strutturalmente simili a nucleotidi 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 e non può essere somministrata.

Aciclovir è solubile e si sposta liberamente attraverso le membrane cellulari. Durante la replicazione il virus della varicella (ad esempio) 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 ad accllovir trifosfato. A questo punto viene usato come substrato dalla DNA polimerasi virale.

Meccanismo simile ha la zidovulina (AZT) contro HIV, a differenza di aciclovir viene fosforilata 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 (molto maggiore delle polimerasi cellulari) e la introduce nella catena in allungamento bloccandolo. Il problema è che pur avendo affinità minore, quando il farmaco è presente in elevate concentrazioni 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 in posizioni diverse dal sito attivo dell’enzima bloccandone l’attività.

Un altro target dei farmaci contro HIV è l’enzima **integrase** che permette l’integrazione del genoma virale nel genoma cellulare.

Inibitori delle proteasi: Un target usato nelle infezioni contro i virus in generale sono le proteasi che tagliano le proteine precursori (ricordiamoci che i geni virali sono tradotti in sequenza ed il prodotto genico deve essere tagliato) 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 (emagglutinina) e recettore (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 questi virus sono "bravi" a sviluppare resistenza. Sono in sviluppo farmaci di nuova generazione. Per evitare lo sviluppo della malattia è necessario somministrare il farmaco il prima possibile, idealmente 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 è 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 microscopio. 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 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 di citomegalovirus in soggetti trapiantati si usa tuttora una tecnica chiamata **shell vials** che usa fialette 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 anche 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 fluorescenti (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 meglio nota come **spike**. [#TODO: rivedere].
- **Metodi molecolari:** Danno una valutazione quantitativa oltre che qualitativa. Sono relativamente rapidi ed 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 nel tempo 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 la proliferazione virale i sintomi si riacutizzano, la viremia sale accelerando ulteriormente 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. Un'altra utilità del test quantitativo è quindi stimare il rischio di trasmissione 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 resistenza ad alcune 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": si usa antigene per determinare la presenza di anticorpo.

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 trattato in un pozzetto contentente 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 e visualizzare i risultati.

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 di “prima linea” porta a numeri rilevanti di falsi positivi, è un compromesso per minimizzare i falsi negativi. Conseguenze legali in caso di diagnosi errata). 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 verso il prodotto di 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 per discriminare tra queste due situazioni.

Virologia Speciale

Herpesvirus: Famiglia molto varia, tutti danno persistenza. Sono virus mlto 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 genoma è DNA lineare, in alcuni casi circolarizza.

Una volta nel nucleo il genoma 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 genoma circolarizzato contemporaneamente. Il materiale genetico neosintetizzato è composto di molti segmenti concatenati che vengono poi tagliati in fase di assemblaggio. Il genoma 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, alloreattività.

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 pleiomorfi).

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

Neuroaminidasi: taglia la membrana permettendo l’endocitosi del virus.

La discgregazione 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.

Hanno involucro esterno, capsidi a forma elicoidale. In realtà si tratta di più capsidi ognuno dei quali contiene un segmento del genoma.

Il genoma è RNA a polarità negativa che viene trascritto in un filamento di RNA a polarità positiva dalla RNA polimerasi virale. Questo filamento positivo viene usato come stampo per produrre nuovo genoma virale e come messaggero (dopo aver trasferito i cap da mRNA cellulari a quelli virali). Emagglutinina e neuroaminidasi sono esposte sulla membrana dalle prime fasi, è facilmente riconosciuta la cellula infetta infatti la maggior parte dei sintomi sono riconducibili alla risposta immunitaria che in casi estremi può portare alla morte. Se il soggetto non riesce a mantenere l’infezione contenuta nelle prime vie respiratorie si ha come complicazione la polmonite a cui segue il collasso cardiocircolatorio e la morte in poche ore senza tempestivo intervento.

Può facilitare infezioni opportunistiche, ad esempio polmonite batterica secondaria.

Mediamente si ha il 10-20% della popolazione totale colpita. L’ospedalizzazione riguarda principalmente anziani o bambini.

Deriva antigenica: Piccoli cambiamenti di sequenza degli antigeni virali. Succede in tutti i sierotipi a causa delle imprecisioni nel funzionamento della RNA polimerasi. Grazie alla deriva il virus può evadere la protezione anticorpale e infettare altre persone (epidemia).

Shift antigenico: Più raro ma molto più pericoloso della deriva. Succede principalmente nel sierotipo A a causa di riarrangiamento e mescolamento di segmenti di RNA, ad esempio in caso di infezione contestuale con virus diversi. Può succedere che il virus prodotto contenga emagglutinine e neuroamidasi diverse che non sono riconosciute da anticorpi. Inoltre se gli enzimi sono di origine aviaria sono pericolosi perché nel tratto respiratorio dei volatili sono presenti acidi sialici che nell’umano sono presenti nelle vie respiratorie profonde. È successo ad esempio nel 2009 con la pandemia di influenza suina. Conteneva 5 componenti suine, 2 aviarie e 1 umana. Nell’epidemia di influenza spagnola i soggetti con sistema immunitario più attivo avevano le conseguenze peggiori, nel 2009 si osservò che gli anziani avevano mortalità più bassa ma il principio era diverso: avevano già visto un virus con antigeni simili che circolava negli anni ‘50.

Diagnosi:

Ricerca di anticorpi inutile: tutti ne hanno qualche forma e si instaurano quando ormai la malattia è finita. Si ricorre quindi all’isolamento virale.

Prima si preleva il campione meglio è.

Determinare se è presente un virus influenzale è inutile: per decidere il trattamento si deve conoscere il sierotipo tramite test antigenico o sequenziamento. Anche il vaccino stagionale è costruito in base al sequenziamento delle specie circolanti.

Terapia:

I target principali sono: neutralizzare la neuraminidasi (zanamivir e Oseltamivir) oppure la proteina N2 (presente solo nei sierotipi A, sono farmaci tossici e la maggior parte delle specie circolanti sono ormai resistenti). Si usa anche la ribavirina che è un analogo nucleotidico.

Per produrre il vaccino si coltiva virus nell’uovo, il problema è che esiste la possibilità di integrare proteine dell’uovo ed indurre allergia nei pazienti. È allo studio un processo più costoso e più rischioso che usa cellule invece dell’uovo, la regolamentazione sta spingendo verso questi metodi. I ceppi virali cambiano leggermente tra vaccini coltivati in uovo ed in cellule ingegnerizzate.

Il tipo di vaccino cambia anche in base alla fascia d’età del soggetto.

Human Immunodeficiency Virus

Sembra trasmesso da primati, lo spillover nella specie umana sembra avvenuto più volte tra 300 e 150 anni fa.

È rimasto a lungo confinato in Africa e poi sparso in tutto il mondo anche tramite lo schiavismo.

Può essere trasmesso con rapporti sessuali non protetti, condivisione di siringhe tra tossicodipendenti, trasfusioni di sangue infetto e per trasmissione verticale dalla madre al figlio.

All’inizio una componente rilevante dei soggetti affetti erano persone che avevano bisogno di procedure mediche invasive oppure somministrazione di emoderivati. Uno dei motivi per cui c’erano così tante sacche di sangue contaminato è che la donazione di sangue in America avveniva a pagamento, quindi molti soggetti che lo facevano erano persone che avevano bisogno di soldi, tra cui tossicodipendenti.

Fa parte della famiglia dei retrovirus, a sua volta divisa in sottofamiglie in base alle caratteristiche ed alle malattie causate. Nello specifico fa parte dei **lentivirus**, così chiamati perché la malattia ha una progressione molto lenta in seguito all’infezione. Nella stessa famiglia si trovano virus che infettano altri animali, ad esempio capre, gatti, pecore ecc...

Il capsido è tronco-conico, con envelope. Sull’envelope si trovano principalmente due proteine: gp120 e gp41, nella matrice si ha la proteina p17 ed a costituire il capsido troviamo la proteina p24 (la componente più immunogena, si ricercano anticorpi contro questa per determinare la sieropositività). All’interno del capsido si trovano due molecole di RNA, la trascrittasi inversa e la proteasi coinvolta nella maturazione.

Processo infettivo:

Penetra per fusione di membrana, una volta nel citoplasma la trascrittasi inversa produce un frammento di DNA sulla base del genoma virale. Il DNA così retro-trascritto viene trasportato nel nucleo. I retrovirus a questo punto aspettano la disorganizzazione della membrana nucleare al momento della mitosi (replcano solo in cellule in fase di attiva replicazione). I lentivirus invece hanno proteine accessorie (anch'esse contenute nel capsido) che formano un complesso attorno al DNA e gli fanno attraversare la membrana nucleare, di solito in corrispondenza dei pori (motivo per cui nella terapia genica si usano vettori retrovirali che rendono possibile agire anche su cellule quiescenti). L'integrazione nel genoma ospite avviene ad opera dell'enzima integrasi.

Il virus inizia a trascrivere ed assemblarsi a livello della membrana citoplasmatica.

Matura dopo la gemmazione.

L'integrazione dei retrovirus può indurre trasformazione perché i suoi promotori (LTR) sono molto forti e possono aumentare la trascrizione dei geni cellulari adiacenti. HIV non è trasformante perché i suoi LTR non sono forti ma sono inducibili (da una proteina virale detta tat). Teoricamente può indurre trasformazione interrompendo geni cellulari, nella pratica non è mai stata osservata (in vivo l'osservazione è difficile perché tumori insorgono per soppressione del sistema immunitario).

Un'altra proteina, rev, trasporta i trascritti virali dal nucleo nel citoplasma.

Come fa il virus a regolare la replicazione se ha bisogno di tat e rev? I loro messaggeri come escono dal nucleo? I messaggeri per tat e rev sono abbastanza simili ai messaggeri cellulari da essere esportati normalmente come mRNA cellulari.

Metodo di adsorbimento: Esistono due classi di ceppi, uno macrofago-tropico che usa CD4 e CCR5 ed uno linfotropico che usa i recettori CD4 e CXCR4.

Nel caso in cui il virus infetti per via mucosale è più probabile che l'infezione abbia inizio tramite una variante macrofago-tropica perché queste sono le cellule che il virus ha più probabilità di incontrare. Se l'infezione avviene per immissione diretta nel sangue è più probabile che abbia inizio con la variante linfotropica.

Il virus legandosi attiva i linfociti CD4+, in questi linfociti attivi il virus replica velocemente ed induce lisi. Ecco perché l'infezione progredisce più velocemente in soggetti con sistema immunitario più attivo.

Fasi dell'infezione:

- **Infezione acuta:** Dall'infezione alla sieroconversione, di solito 3-8 settimane, il virus replica raggiungendo un'alta viremia. Possono non essere presenti sintomi oppure sintomi vaghi simili a influenza, epatite oppure mononucleosi. Questa fase dura fino a quando il sistema immunitario riesce a limitare la replicazione virale e mantenere la viremia ad un equilibrio.
- **Fase latente:** Dura da qualche mese ad oltre 15 anni, la replicazione virale continua con progressiva riduzione dei linfociti disponibili. Termina quando la concentrazione di linfociti CD4+ scende sotto a 200 mm³.
- **Fase 3:** Progressione ad AIDS, insorgono infezioni opportunistiche.

Il virus in sé non uccide, lo fanno le infezioni opportunistiche o i tumori che si sviluppano a causa dell'immunodeficienza.

Terapia: Prima è iniziata meglio è. Si usa una terapia che prende il nome di HART: per evitare il problema della resistenza usa una combinazione di farmaci mirati contro più processi virali.

Suscettibilità: Dipende da molti fattori genetici, come la mutazione delta-32 del recettore CCR5 che previene o ritarda l'infezione oppure la mutazione P1 che in omozigosi accelera la progressione. Esistono soggetti che in presenza di infezione non sviluppano malattia senza trattamento, alcuni soggetti invece sviluppano AIDS nonostante il trattamento.

La particolare aggressività dipende dal fatto che il virus produce miliardi di virioni ogni giorno ed ognuno presenta qualche mutazione: si sviluppano milioni di varianti al giorno in un singolo paziente.

Diagnosi: Il test di eccellenza è il western blot.

Epidemiologia: [Da fare]

Epatite

Possono essere dovute a vari fattori, tra cui infezioni virali (ma anche batteriche, fungine, parassiti, farmaci, sostanza tossiche, autoimmune, ecc...).

Se non trattata può causare danni cronici e portare a cirrosi o cancro.

Gli agenti infettivi virali si classificano in A, B, C, D ed E.

Le forme A ed E si trasmette per via orofecale.

Le forme B, C e D si trasmettono per via ematica.

In realtà esistono molti virus che possono dare epatite perché a causa della sua irrorazione e funzione il fegato è “tappa obbligata” per quasi tutti i virus.

Epatite A

Virus della famiglia dei **picornavirus** (virus piccoli con genoma a polarità positiva a singolo filamento). Sono virus nudi molto resistenti, epatite A nello specifico può resistere anche alla clorazione dell'acqua. Appartengono alla stessa famiglia il poliovirus ed altri 200 circa virus trasmessi per via orofecale che possono dare epatite acuta, ed i rinovirus.

Replicazione: Semplice, il capsido ha forma icosaedrica, il genoma è di circa 10 kbp ed è associato ad una proteina (Vpg) che gli permette di essere riconosciuto come messaggero. Sono presenti altre proteine che bloccano la sintesi proteica cellulare. Sono proteasi che agiscono su proteine cellulari. Il virus inocula il suo genoma nel citoplasma che viene tradotto nei ribosomi come poliproteina (tutte le proteine virali una in serie all'altra). Le proteasi cellulari tagliano i primi prodotti genici fino ad ottenere la proteasi virale che continua il lavoro. Tra le proteine virali ottenute si trova anche una RNA polimerasi virale che produce a partire dal genoma uno stampo a polarità negativa in base al quale si replica il genoma virale. Una buona parte dei genomi neosintetizzati va ai ribosomi per amplificare la sintesi proteica: la replicazione virale accelera ed uccide la cellula ospite in poche ore.

Il solo RNA virale introdotto nel citoplasma è capace di dare infezione.

Per ora si è identificato un singolo sierotipo: tutti i virus isolati danno risposta immune che protegge dall'infezione da tutti gli altri isolati (potrebbe cambiare a breve).

Trasmissione: Tramite contatto personale, cibi o acqua contaminati, esposizione a sangue (rara).

Particolarmente diffusa nel sud europa perché un' importante vettore di infezione sono crostacei ed organismi filtratori, che sono a volte consumati crudi.

Patologia: La probabilità di sviluppare epatite aumenta con l'età perché l'epatite non è data direttamente dal danno che il virus apporta al fegato ma alla risposta immunitaria contro gli epatociti infetti.

Complicazioni: epatite fulminante (gli epatociti danneggiati sono trippi ed il fegato non riesce a riparare il danno, se non si ricorre al trapianto entro poche ore il paziente muore), epatite colestatica, epatite ricorrente (dopo qualche giorno i sintomi si attenuano per poi riacutizzarsi).

L'infezione cronica è molto rara perché si sviluppa risposta immune (sono disponibili anche vaccini).

Tempo di incubazione: Piuttosto lungo, i sintomi compaiono tra le 2 e le 6 settimane dopo l'infezione.

Guarigione: di solito il virus viene eliminato spontaneamente, la scomparsa del virus nel sangue precede la scomparsa del virus nelle feci di qualche settimana (il virus ha piccole sacche di replicazione all'interno del fegato e permane nella cistifellea da dove viene riversato nell'intestino).

Prevenzione: Miglioramento delle condizioni igieniche, sanificazione delle sorgenti d'acqua, vaccino, immunoglobuline (pre- e post-esposizione, utilità dubbia perché devono essere somministrate entro pochissimo tempo dall'infezione).

Epatite E

Importanza sottostimata, ogni anno porta a morte circa 60 mln di persone. Fa parte della famiglia herpes. Presente in moltissime specie animali (esempio: praticamente tutti i cinghiali sono infetti). Sono eliminati con le feci e sono molto stabili, possibilità di contaminare cibi.

La presenza del virus nel sangue precede l'insorgenza dei sintomi. Tra l'infezione e la comparsa dei sintomi si hanno 2-3 settimane.

Prevenzione: Controllo su cibo ed acqua, efficacia delle ig scarsa o nulla, vaccino inattivato approvato in Cina ma non in altri paesi.

Epatite B

Ha un diametro di 42 nm, presenta una proteina, HbsAg, che si presenta nell'involucro esterno in varie forme. Funge da anti-recettore ed è il target contro cui si sviluppano anticorpi neutralizzanti (usata nel vaccino). Viene prodotta in eccesso, molta più di quella necessaria al virus: nel soggetto oltre a trovare le particelle infettanti si riconoscono corpuscoli formati dalla proteina in surplus come agglomerati sferoidali oppure allungati.

All'interno del rivestimento si ha un capsido icosaedrico che contiene il DNA circolare parzialmente bicatenato: il filamento negativo è completo, quello positivo è completo dal 50 all'80%, il filamento è completato nelle prime fasi di infezione. Sembra che dato che tale DNA è sintetizzato nel capsido la polimerasi ad un certo punto finisca i nucleotidi da aggiungere. Il fatto di non essere veramente a singolo filamento né a doppio complica il riconoscimento del materiale genetico esogeno da parte della cellula.

I metodi diagnostici non hanno bisogno di essere estremamente sensibili perché vengono prodotti virioni in quantità enorme.

Tra i geni abbiamo la DNA polimerasi che svolge varie funzioni, HBsG, la proteina C (capside) e la proteina E che serve al virus per infettare altri distretti. I geni sono parzialmente sovrapposti. Si ha una regione detta X che non ha una funzione ben identificata, probabilmente coinvolta nella regolazione e forse nella trasformazione.

Ciclo vitale: il virus non è mai eliminato del tutto, sangue, organi, cordone ombelicale ecc... di un soggetto guarito possono indurre infezione nel ricevente.

Una volta entrato nella cellula la doppia catena viene completata e passa alla forma rcDNA che si comporta come un "mini-cromosoma" e induce la produzione di nuovi virioni. Dal rcDNA si ottiene il cccDNA, DNA a doppia catena covalentemente chiuso. Tra i trascritti che si ottengono dal cccDNA si ha un pgRNA (RNA pre-genomico) che viene inserito nel capsido. Nel capsido viene introdotta anche una polimerasi che trasforma l'RNA in un filamento di DNA negativo e poi quello positivo durante il processo di maturazione (il secondo filamento non arriva a completamento, DNA parzialmente bicatenario. Il completamento della seconda catena avviene al momento dell'infezione). A questo punto il virione può raggiungere il Golgi e ricevere lì il suo rivestimento (il Golgi sarà pieno di proteina HBsAg). Oppure vescicole di HBsAg vengono rilasciate formando i corpuscoli non infettanti visti prima.

Sintomi e segni: Variano, da infezione asintomatica, al dolore nel quadrante superiore destro, perdita di appetito, nausea e vomito, dolore addominale, artralgia, affaticamento, prurito. Si possono riscontrare ittero, febbre e colorazione scura delle urine.

Se l'infezione avviene nel soggetto molto giovane (sotto i 6 anni) è facile che l'infezione sia subclinica o asintomatica. Con l'aumentare dell'età la probabilità di infezione asintomatica diminuisce di molto.

Normalmente il periodo di incubazione è di 6 mesi.

La malattia (morte degli epatociti) dipende fortemente dall'azione del sistema immunitario che distrugge le cellule infette.

Epatite B da molto spesso infezione cronica in cui il virus è prodotto continuativamente a causa dell'incapacità del sistema immunitario di contenere l'infezione. Infatti nei bambini mancano i sintomi e quindi il danno epatico ma l'infezione tende a cronicizzare.

L'infezione cronica può portare a ridotta aspettativa di vita a causa di complicazioni come cirrosi o carcinoma epatocellulare.

Gli anticorpi neutralizzanti sono quelli contro HBs, rilevarli in un soggetto infetto è una buona notizia, la loro concentrazione durante la malattia è ridotta perché sono sequestrati dalle particelle non infettanti di cui abbiamo già parlato; per questo quando si trovano in forma libera significa che la produzione di anticorpi da parte del soggetto è molto alta. Se questi anticorpi non compaiono entro 6 mesi dall'infezione è molto probabile che l'infezione abbia decorso cronico.

La presenza di HBeAg è indice di replicazione attiva del virus.

Nei soggetti in fase cronica abbiamo anticorpi anti-HBc e anti HBe ma sono assenti quelli contro HBs perché anche se prodotti sono sequestrati dalle grandi quantità di proteina virale prodotta.

Test diagnostici: Per determinare la positività si usa la rilevazione di HBsAg, a causa della forte produzione di questa proteina non sono necessari test molto sensibili come il test molecolare. Se contemporaneamente sono presenti anticorpi anti-IgM siamo di fronte ad un'infezione acuta oppure alla riacutizzazione di un'infezione cronica.