

# Struttura del corso di Virologia

Classificazione dei virus

Struttura dei virus

Replicazione virale

Infezione virale

Rapporti virus-ospite

Tecniche virologiche

# Virologia

I virus sono gli organismi capaci di replicarsi più piccoli in natura

Sono ai limiti fra materia inanimata e vivente

**PARASSITI INTRACELLULARI OBBLIGATI**

**acellulari**

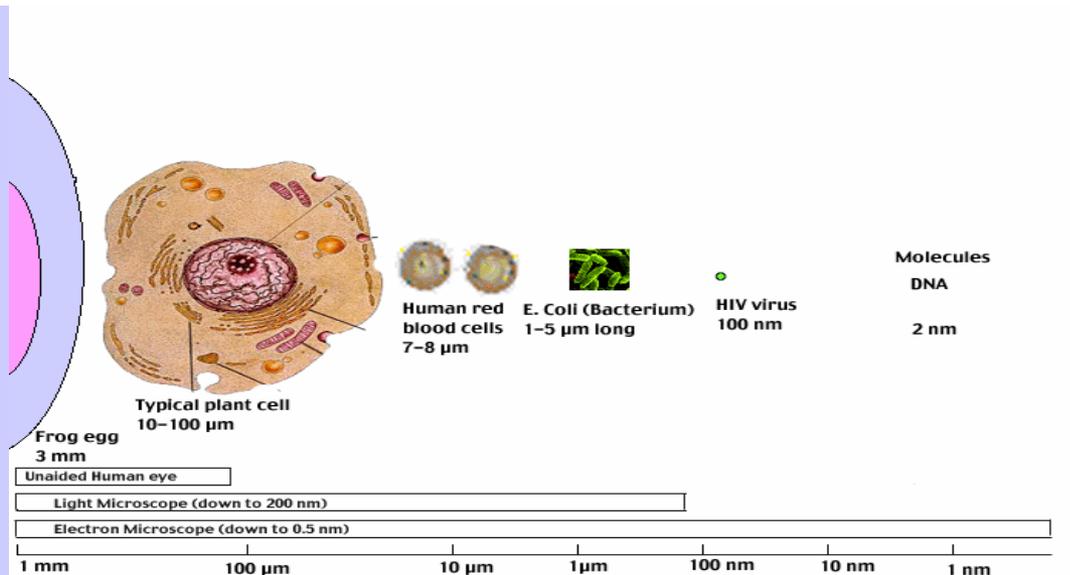
# OSSERVARE I MICROBI

## LIMITE DI RISOLUZIONE:

la distanza più piccola fra 2 oggetti che consente di vederli come separati

Metro:            m                    cm                    mm                     $\mu\text{m}$  ( $10^{-6}$  m)                    nm ( $10^{-9}$  m)

Occhio umano: 0,2 mm      microscopio ottico: 0,2  $\mu\text{m}$  max                    microscopio elettronico: 0,5 nm circa



# STRUTTURA DEI VIRUS

La particella virale ha la funzione di:

- **Proteggere l'acido nucleico DENTRO LA CELLULA E FUORI**  
(assemblaggio, riconoscimento)
- **Trasmettere l'informazione genetica del virus** (legame al recettore e fusione con cellula ospite)

Conseguentemente una caratteristica comune dell'involucro virale è la **stabilità** ma anche la capacità di liberare l'acido nucleico in seguito alle interazioni con il recettore cellulare **METASTABILITA'**

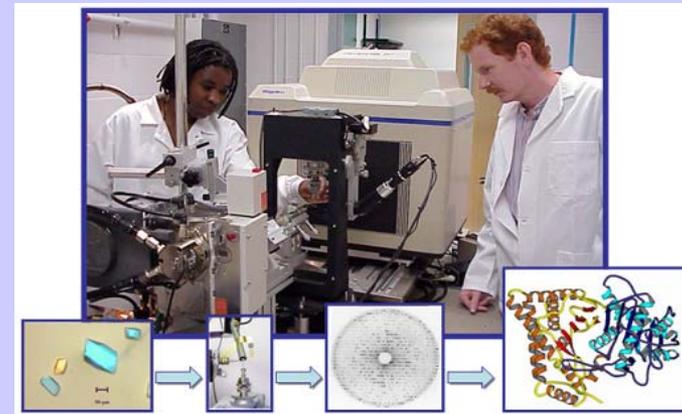
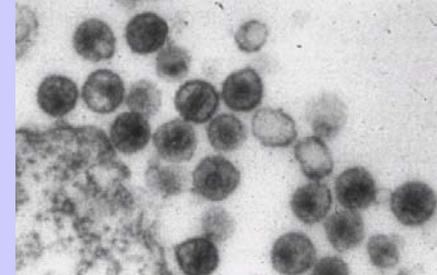


## CARATTERISTICHE COMUNI:

- Un acido nucleico da 3 a 10-20 kb
- Un involucro proteico CAPSIDE
- (Nei virus rivestiti) Un involucro lipidico PEPLOS, PERICAPSIDE

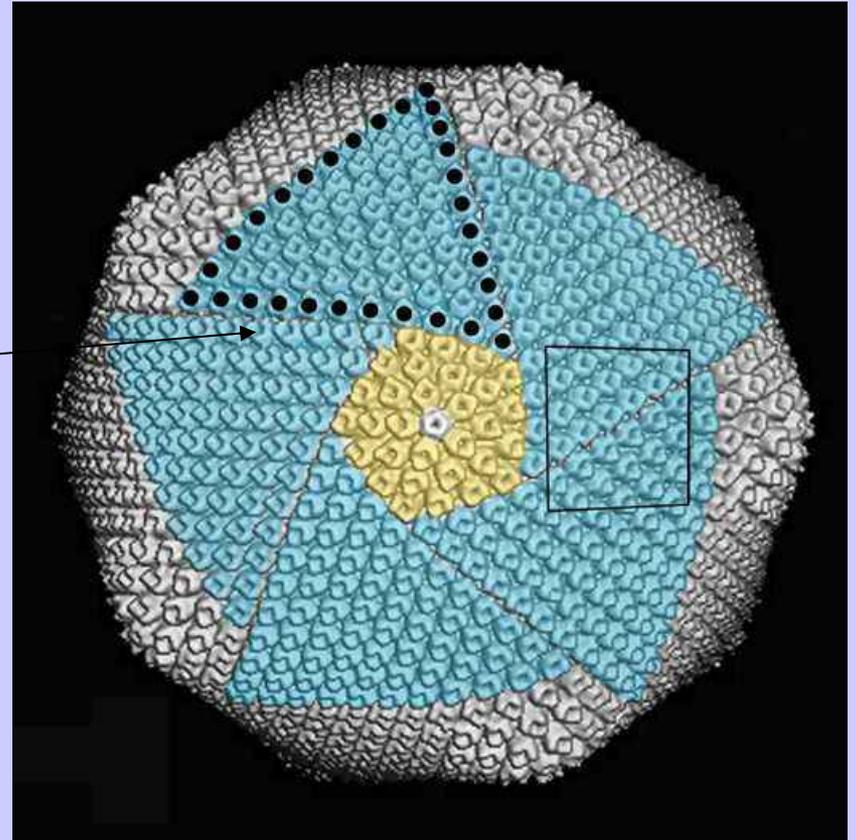
# COME SI STUDIA LA MORFOLOGIA VIRALE?

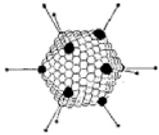
- **Microscopia elettronica** Il metodo più impiegato a partire dagli anni '50. Risoluzione 50-70 Å.
- **Immunolettromicroscopia:** identificazione e visualizzazione contemporanea.
- **Cristallografia a raggi X** Solo su virus cristallizzati per diffrazione dei raggi X.
- **Risonanza magnetica nucleare** su virus in soluzione



# CAPSIDE VIRALE

- Struttura proteica che protegge il genoma virale
  - da enzimi litici
  - da condizioni chimico fisiche avverse
- **Capsomero:** struttura superficiale visibile al microscopio elettronico come una struttura cava
- Unità strutturale o protomero: formata da una o più subunità





# Nomenclatura

**Subunità strutturale (protomero):** le singole proteine che costituiscono il capside

**Unità morfologica (capsomero):** la struttura più piccola visibile al microscopio elettronico, formata dall'interazione di più protomeri

- **Pentoni:** capsomeri formato da cinque protomeri

- **Esoni:** capsomeri formati da sei protomeri

**Peplomeri:** strutture proteiche che protrudono dall'involucro pericapsidico spesso chiamato anche pericapside

# CAPSIDE VIRALE

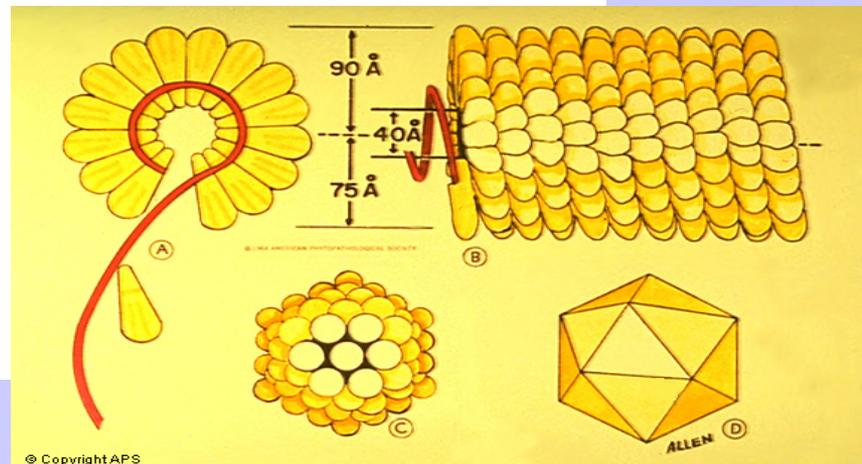
Tutti i virus hanno un CAPSIDE composto da PROTOMERI fatti da una o poche specie di proteine.

TUTTI I CAPSIDI VIRALI SONO IN GRADO DI AUTOASSEMBLARSI.  
Vedi virus-like particles

Le proteine hanno caratteristiche chimiche simili:

- in grado di combinarsi spontaneamente tramite legami non covalenti
- in grado di combinarsi con acidi nucleici (molti residui aminoacidici basici)
- alcune contengono segnali per il trasporto al nucleo
- si combinano producendo capsidi a simmetria

- **ELICOIDALE**
  - Simmetria elicoidale
- **ICOSAEDRICA**
  - Simmetria cubica o sferica



# SIMMETRIA ELICOIDALE

Il più semplice. Quasi solo per virus a RNA

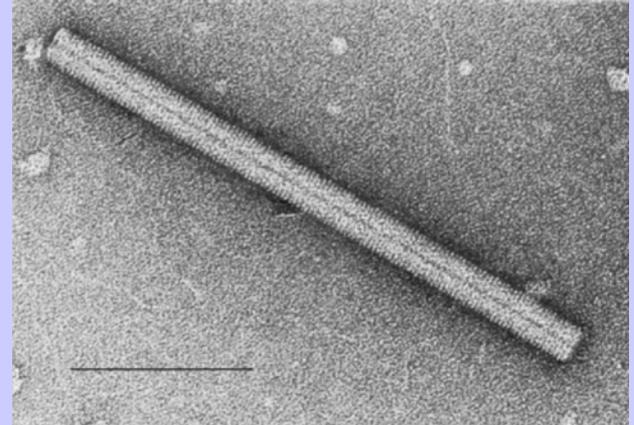
Struttura aperta a filamento di monomeri

Una molecola di acido nucleico per filamento

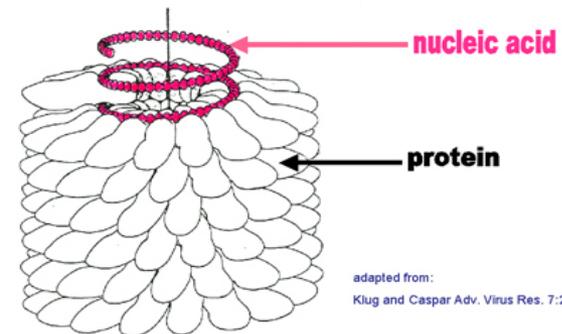
Ogni protomero lega 3 nt

Interazione con la polimerasi virale

**Un solo tipo di proteina:** i protomeri si combinano direttamente fra loro



TOBACCO MOSAIC VIRUS

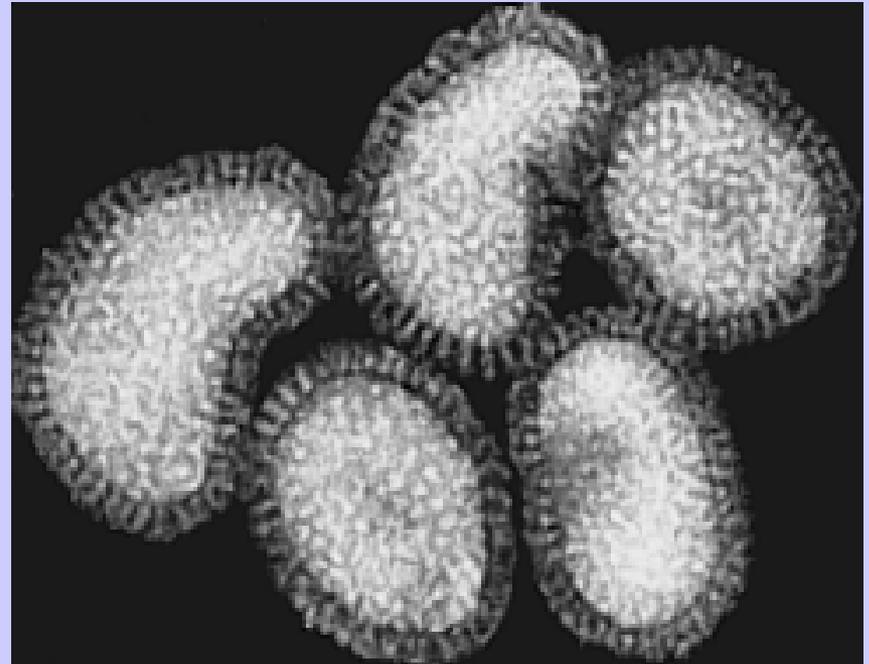


## VIRUS CON IL CAPSIDE ELICOIDALE, esempi:

- RABBIA
- Influenza
- Morbillo

Tutti a ssRNA (-)

- Virus del mosaico del tabacco (nudo)



# CAPSIDE ICOSAEDRICO

**Icosaedro**: solido a **20** facce triangolari e **12** vertici

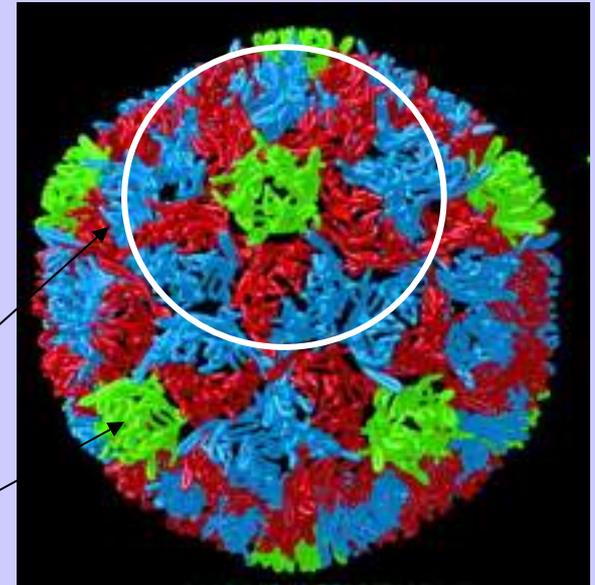
Numero minimo teorico di subunità: 60

Struttura chiusa

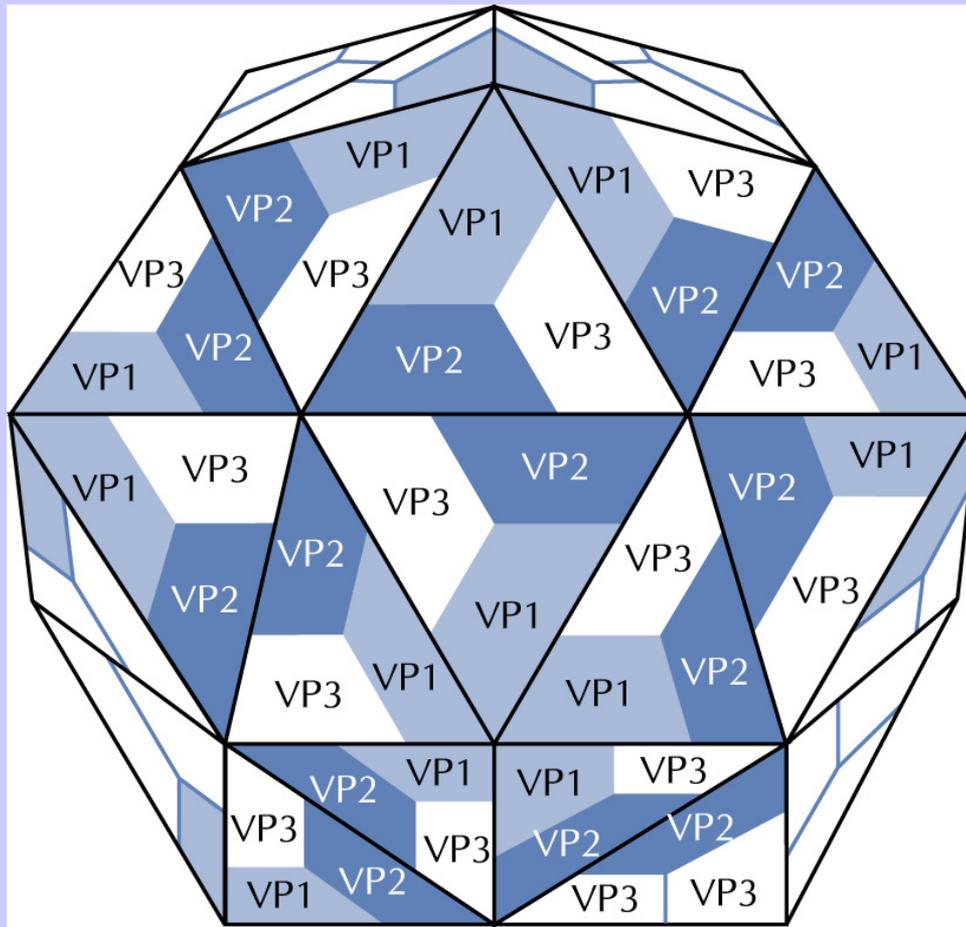
Il più semplice: **POLIOVIRUS**

**VP1** + **VP2** + **VP3** fanno l'unità strutturale

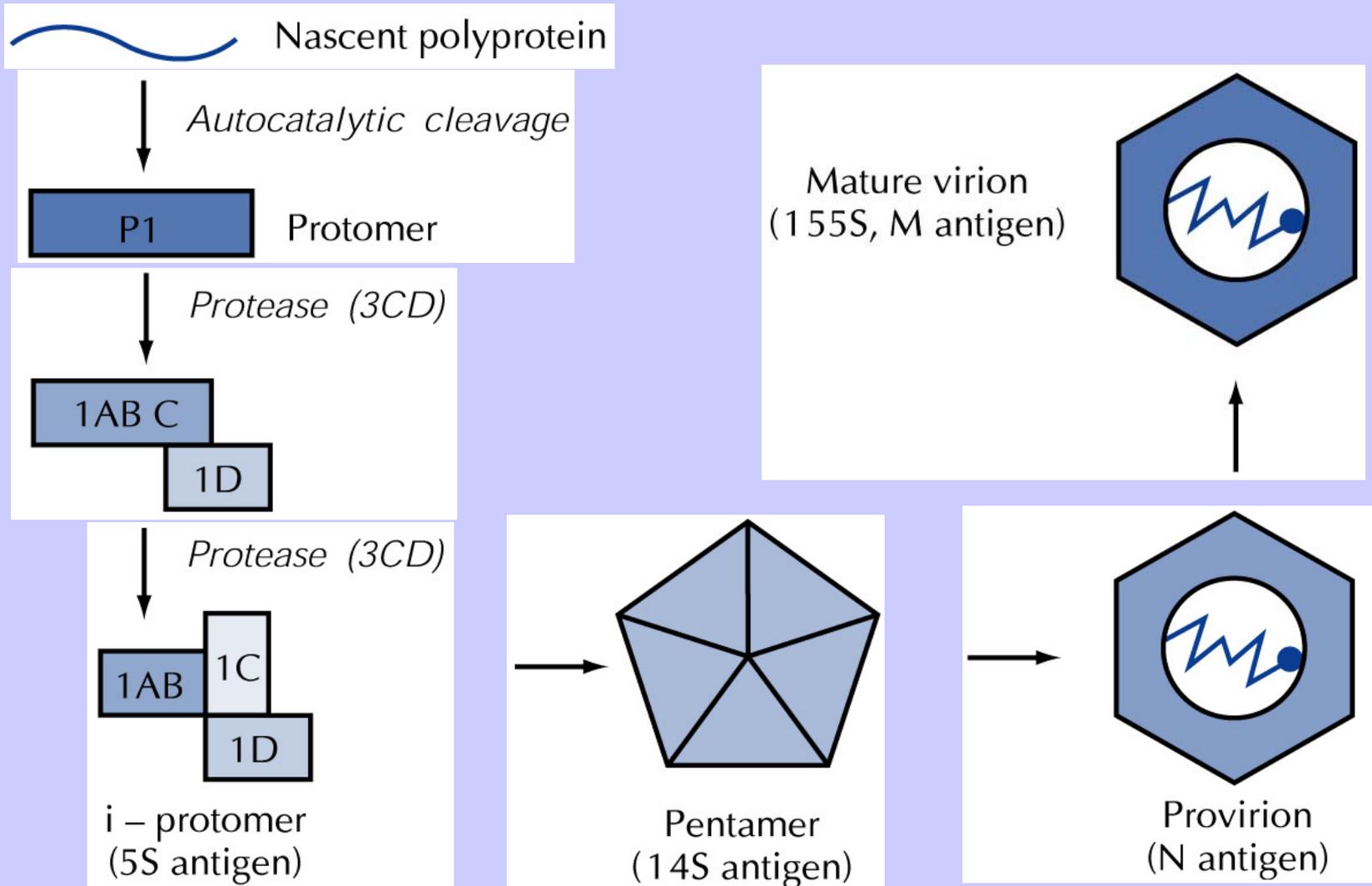
L'interazione fra 5 VP1 forma un vertice



# Picornavirus capsid



# Assemblaggio Picornavirus



# CAPSIDE ICOSAEDRICO

Icosaedro complesso. Esempio: adenovirus

L'icosaedro complesso permette dimensioni maggiori

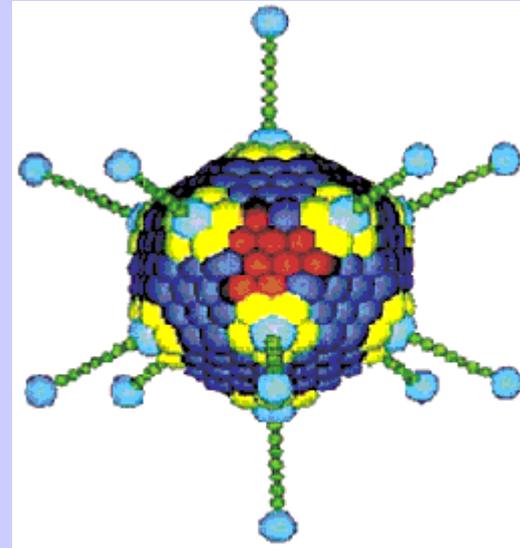
240 subunità composte da trimeri di una stessa proteina ESONI

+

12 subunità ai vertici: PENTONI

Totale: 252

Nel caso specifico degli Adenovirus ci sono anche le FIBRE



Rosso: esoni

Giallo: base del pentone

Verde: fibra

celestino: globosità o recettore

# L'involucro virale

Anche detto **peplos** o **envelope**

Membrana lipidica acquisita durante la gemmazione dalla cellula ospite:

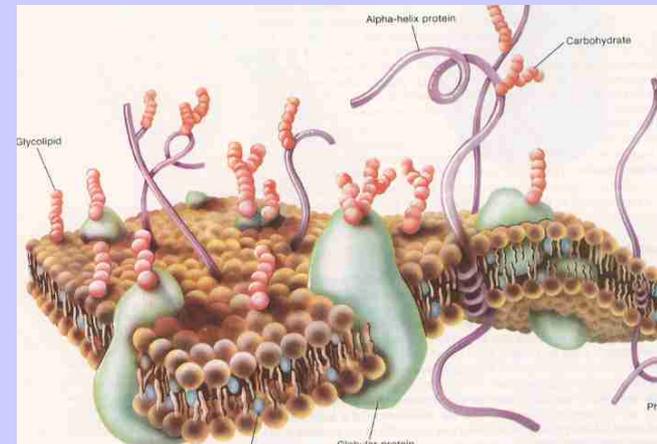
- dalla m. plasmatica (HIV)
  - dalla m. del reticolo endoplasmatico (Vaccinico)
  - dalla m. nucleare (Herpes)
- La porzione della membrana che farà parte dell'involucro virale contiene glicoproteine di origine virale che si assemblano in oligomeri (Es: HA) visibili a volte come **SPICOLE** con funzioni
    - recettoriali
    - antigeniche
    - di fusione
    - enzimatiche (es: Neuraminidasi)

# L'involucro virale

- Stessa struttura di una tipica membrana cellulare

MA...

Grande quantità di una o due glicoproteine virali



## SINTESI

I VIRUS USURPANO LE VIE BIOSINTETICHE DELLE GLICOPROTEINE CELLULARI:

ER: sintesi delle proteine e N-glicosilazione.

Golgi: O-glicosilazione

Trasporto alla membrana tramite vescicole secretorie

## Altre componenti strutturali dei virioni

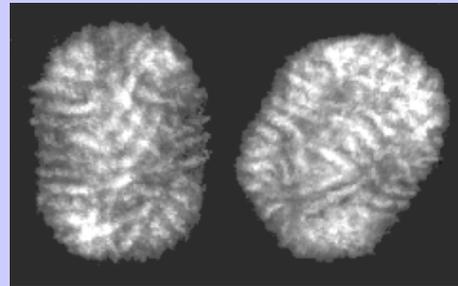
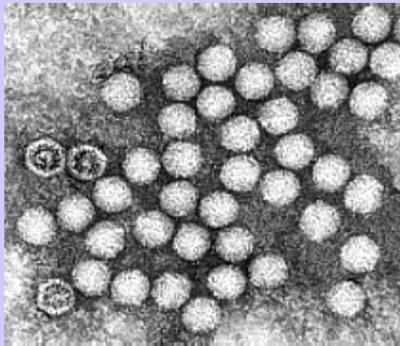
I virus più grossi e complessi possono contenere altre componenti:

- **MATRICE:** Ortho- e Para-myxovirus
- **TEGUMENTO:** Herpesvirus
  - **Enzimi virali:** RNA polimerasi RNA-dipendente, trascrittasi inversa
- **Istoni:** Papillomavirus
- **Proteine della cellula ospite:** Retrovirus

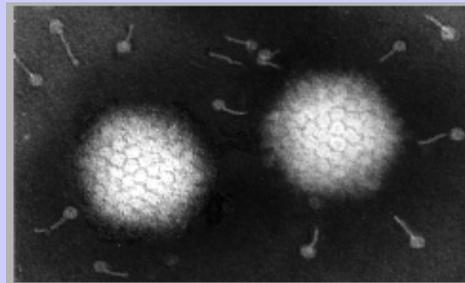
# Virus al Microscopio elettronico

Poxvirus

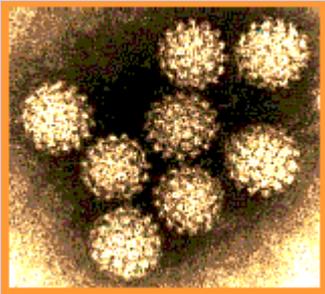
Enterovirus



adenovirus

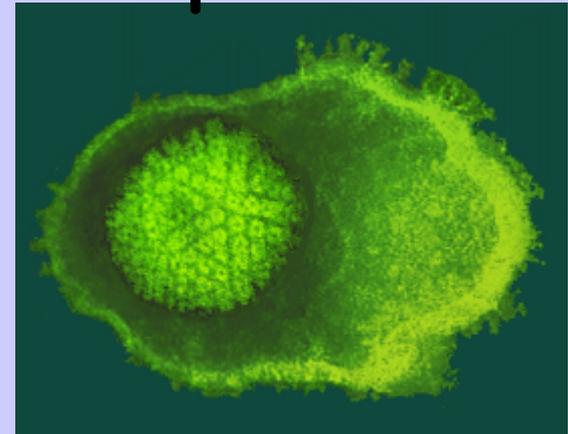


# Virus al Microscopio elettronico

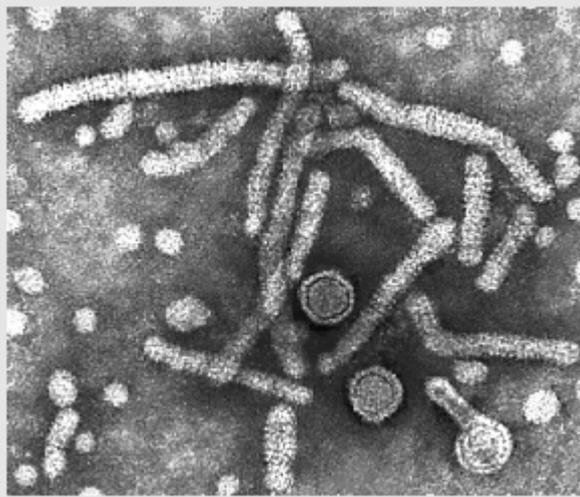
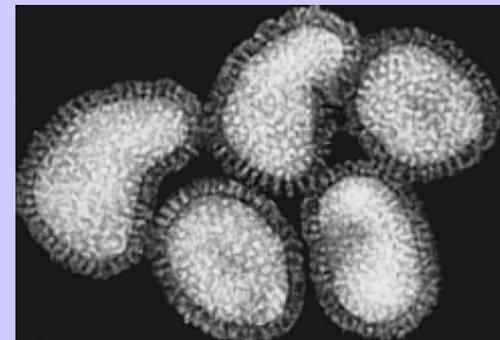


Papillomavirus

Herpesvirus



Influenza virus



HBV

# TASSONOMIA VIRALE

## Classificazione dei virus:

I virus si suddividono in:

Virus dei batteri

**Batteriofagi**

Raggruppati  
solo in famiglie

Virus delle cellule eucariote

**Virus animali e delle piante**

Per la suddivisione tassonomica dei virus non ci sono tutti i criteri utilizzabili per gli organismi superiori:

# TASSONOMIA VIRALE

## Classificazione dei virus:

**ORDINE:** suffisso -virales Es: Mononegavirales.  
Poco utile nella pratica e non c'è un ordine per tutte le famiglie

**FAMIGLIA** suffisso -viridae Es: Retroviridae. Si basa sulla struttura del virione:

<b>Rivestimento</b>	-nudi o con involucro
<b>Simmetria capsidica</b>	-elicoidale, icosaedrica o complessa
<b>Dimensioni del virione</b>	-piccoli, medi o grandi
<b>Genoma</b>	- DNA o RNA, ss o ds, + o -, frammentato o intero

Spesso i nomi riflettono questi criteri: Rhabdoviridae, Picornaviridae etc.

**GENERE** suffisso -virus. Esempio:  
Famiglia Retroviridae, generi Lentivirus e Oncovirus

I generi sono gruppi di specie con caratteristiche in comune che li differenziano dagli altri generi della stessa famiglia. Il nome spesso evidenzia caratteristiche patogenetiche.

# Per esempio

**Ebola virus di Kikwit:**

**Ordine**      **Mononegavirales**

**Famiglia**   *Filoviridae*

**Genere**      *Filovirus*

**Species**     *Ebola virus Zaire*

# Classificazione dei virus

## SPECIE

E' la più difficile da definire per i virus per la grande variabilità dei virus:  
"A virus is defined as a polythetic class of viruses that constitute a replicating lineage and occupies a particular ecological niche".

**Classe politetica:** i membri hanno caratteristiche comuni ma non tutti le hanno tutte e nessuna è essenziale

I virus che appartengono ad una stessa specie:

- infettano tutti lo **stesso ospite** e lo **stesso tessuto** (usano lo stesso recettore)
- causano la **stessa patologia**
- hanno la **stessa mappa genomica** (ma non necessariamente sequenza nucleotidica identica)

## TIPI

**SIEROTIPI** differiscono per alcuni epitopi antigenici

**GENOTIPI** differiscono nella sequenza genomica

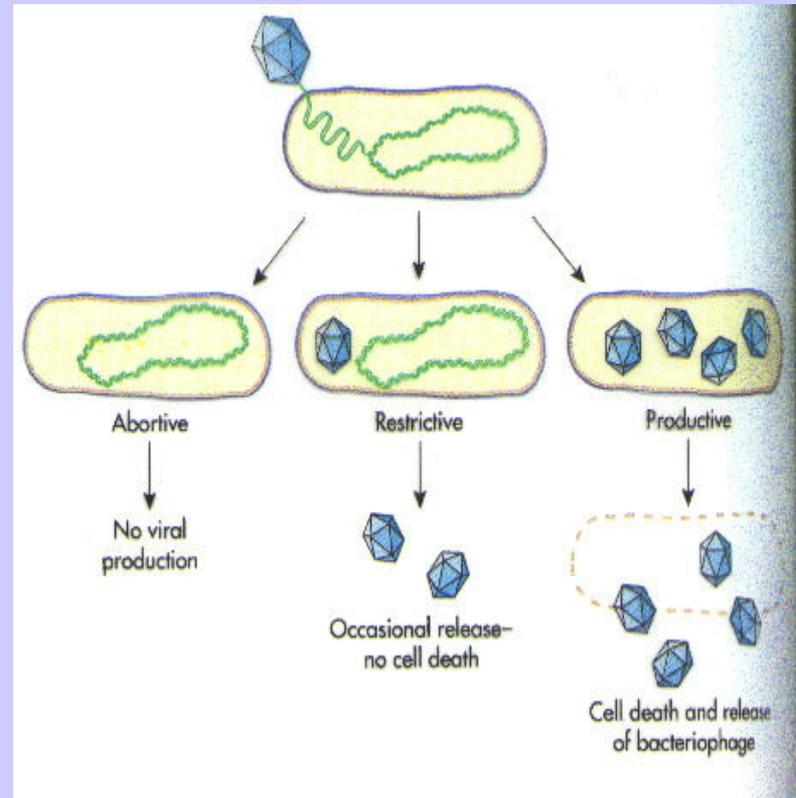
**CEPPO:** non è una suddivisione tassonomica. Il termine indica un isolato virale appartenente ad una sola specie che è stato ben definito.

## CLASSIFICAZIONE DI BALTIMORE

genoma	catene	Polarità	rivestito	FAMIGLIE
		+	NO	Picornaviridae, Caliciviridae
		+	SI	Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae
RNA	SS	+...	SI	Retroviridae
		-	SI	Paramyxo-, Rhabdo- e Filiviridae
		- ...	SI	Orthomyxo-, Arenaviridae
	DS	n.a. segm.	NO	Reoviridae
	SS	-	NO	Circo- , Parvoviridae
DNA	DS	n.a.	NO	Papova- , Adenoviridae
		n.a.	SI	Herpes-, Poxviridae
		n.a. ...	SI	Hepadnaviridae

# REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI

- ADESIONE o adsorbimento
- INGRESSO
- CICLO
  - LISOGENO
  - ABORTIVO (INIZIO NORMALE MA PERDITA DEL VIRUS COL TEMPO)
  - PRODUTTIVO o litico: RILASCIO VIRIONI PROGENIE



# La cellula ospite

- ⓐ Le cellule che permettono la produzione di progenie sono dette:  
**PERMISSIVE**

Caratteristiche:

- Recettori in grado di legare gli antirecettori virali (CONDIZIONE NECESSARIA MA NON SUFFICIENTE)
- Condizioni intracellulari "adatte"

- ⓐ Le cellule che permettono infezione ma non necessariamente la produzione virale sono dette

**SUSCETTIBILI**

**TROPISMO O SPECIFICITA' TISSUTALE:** Capacità del virus di riconoscere un tipo di cellula particolare

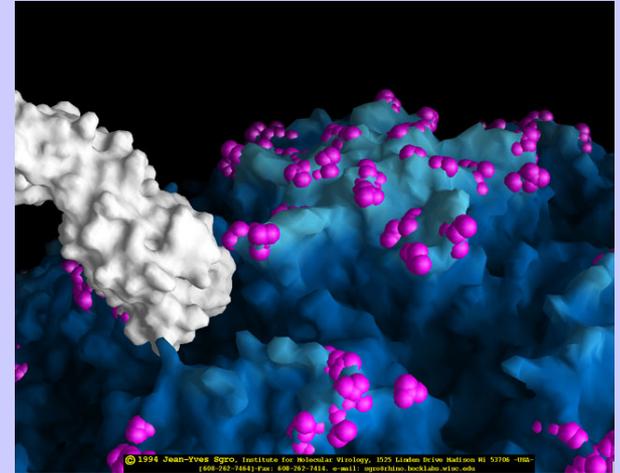
# Assorbimento

- Interazione dapprima casuale e poi ad alta affinità.
- Avviene fra recettore cellulare e

## antirecettore virale

- ❖ Si trova sulla superficie virale (capside o peplos)
  - ❖ Interagisce col recettore con un meccanismo chiave-serratura
- Il recettore viene sfruttato dal virus ma NON è la sua funzione....

**EMAGGLUTINAZIONE:** interazione fra antirecettori virus particolari e molecole sui globuli rossi di specie definite



# Assorbimento

## antirecettore virale

- Di due tipi:
  - **A gancio**. Legano il virus alla cellula senza mediane l'entrata (Es: Poliovirus)
  - **A ZIP**. Una volta legati, mediano l'entrata del virus grazie a modifiche CONFORMAZIONALI (Es: HIV, influenza)

## CORECETTORE

Molecola superficiale che interagisce col virus dopo il legame al recettore.

Media fusione e passaggio all'interno delle cellule

Es: CxCR4 e CCR5

La trasfezione permette il bypass del legame al recettore

## Recettori noti di virus animali

Virus	Recettore	Tipo di molecola	Corecettore
Adenovirus	CAR ( <i>Coxsackie and adenovirus receptor</i> );	Immunoglobulin (Ig)-like	$\alpha_v\beta_5$ , $\alpha_v\beta_3$ integrins.
Herpes simplex virus	Heparan sulfate. <i>Also used by AAV, Dengue, others</i>	Glycosaminoglycan; part of extracellular matrix	HveA, Prr ( <i>Herpes virus entry mediator A</i> ; Pvr-related protein 1).
HIV-1	<b>CD4</b> . <i>Also used by human herpesvirus 7.</i>	Ig-like; role in helper T cell function.	CCR5, CXCR4. Chemokine receptors.
Influenza virus	<b>Sialic acid</b> . <i>Also used by reo-, corona- virus.</i>	Carbohydrate	
Measles virus	SLAM. <i>Some vaccine strains can use CD46;</i>	T/B cell surface protein; involved in cellular activation	
Poliovirus	Pvr ( <i>poliovirus receptor, aka CD155</i> )	Ig-like	
Rabies virus	<b>Acetylcholine receptor</b> , NCAM (CD56)	Neuronal receptor or adhesion molecule	
Rhinovirus ( <i>major subtypes</i> )	<b>ICAM-1</b> ( <i>intercellular adhesion molecule 1</i> );	Ig-like; role in cell adhesion	
Vaccinia virus	EGF receptor ( <i>epidermal growth factor</i> )	Growth factor receptor	

# Entry o penetrazione virale

Avviene subito dopo l'adsorbimento

E' un processo che richiede energia.  
A differenza che per i fagi, la

Due possibili modi:

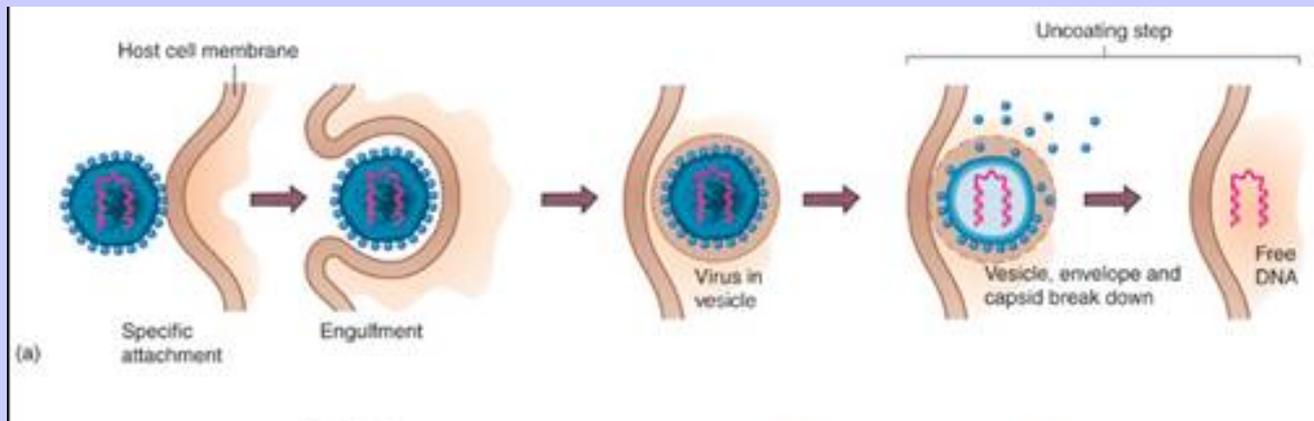
- ❖ Endocitosi mediata da clatrina

- ❖ il più comune.
- ❖ pH-dipendente

- ❖ Fusione alla membrana plasmatica.

- ❖ Solo per rivestiti.
- ❖ Mediata da glicoproteine F o fusogene solo dopo il legame col recettore
- ❖ PEPTIDE F: peptide N terminale idrofobico esposto dopo il legame fra recettori

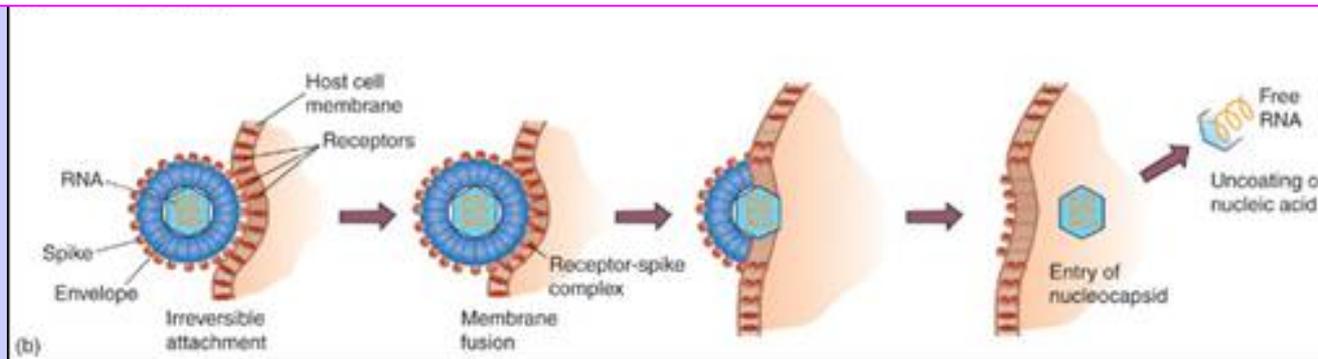
# Penetrazione o *entry*



- ❖ Endocitosi mediata da clatrina (il più comune).
- ❖ Es: influenza. A pH acido fonde l'envelope con membrana endosomiale.
- ❖ Anche i virus nudi possono entrare così. Es: Adenovirus, che poi lisano la vescicola con proteine pentoniche attivate a pH acido.

# Penetrazione o entry

- ❖ Fusione alla membrana plasmatica.
  - ❖ Solo per rivestiti.
  - ❖ Può essere pH-dipendente o non-dipendente
  - ❖ Es: HIV, Herpes, paramyxovirus



# Scapsidamento

Liberazione dell'acido nucleico virale dall'involucro proteico.

Avviene per gradi e si completa solo dopo l'inizio dell'espressione

Si puo' liberare il NUCLEOCAPSIDE o il semplice acido nucleico

Essenziale alla replicazione dell'acido nucleico

ESEMPI:

**Paramyxovirus:** fusione alla membrana cell. Tramite proteina F

**Orthomyxovirus:** la proteina M2, pH dipendente, all'interno del fagosoma

**Adenovirus:** parziale perdita alla membrana delle fibre e scapsidamento finale al poro nucleare

**Picornavirus** inoculo RNA tramite poro nella membrana endosomiale o direttamente alla membrana?

**Reovirus:** simili a Picorna ma sfruttano attività enzimi lisosomiali

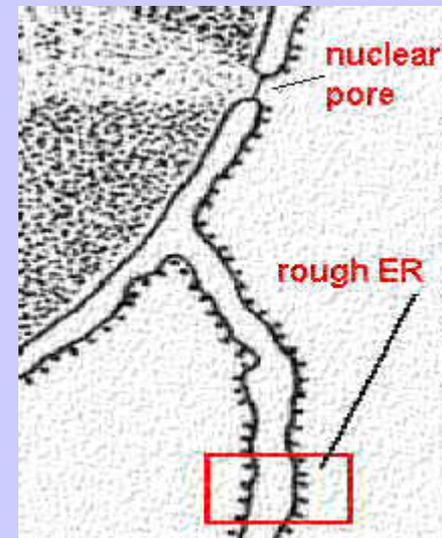
# Importazione al nucleo (Traslocazione)

I virus che si replicano nel nucleo (Retrovirus, virus a DNA, virus influenzale) devono arrivarci.

L'acido nucleico da solo non ci sa arrivare....

## SEQUENZE CARIOFILICHE (nuclear targeting sequences)

- ❖ Sequenze aminoacidiche delle proteine capsidiche.
- ❖ Hanno affinità per le proteine citosoliche che riconoscono il poro nucleare.
- ❖ Permettono il trasporto del nucleocapside non completamente scapsidato al nucleo dove poi verrà liberato l'acido nucleico.



# Espressione virale

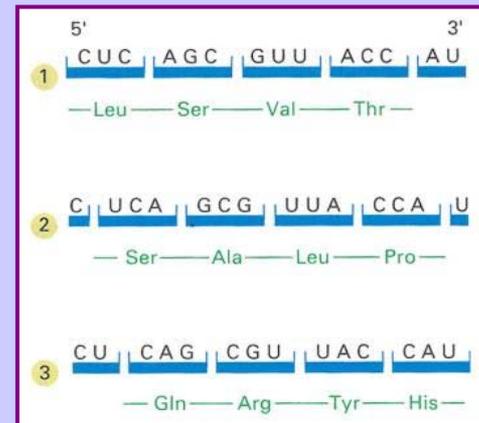
Essendo per lo più effettuata da enzimi CELLULARI, i virus devono sottostare alle regole cellulari:

- ❖ mRNA si formano nel **nucleo**, le **proteine** nel **citoplasma**
- ❖ Non ci sono enzimi cellulari che copiano stampi di RNA
- ❖ Gli mRNA cellulari sono monocistronici

I virus per **economia genetica** hanno genomi piccoli ma il numero di proteine è aumentato da:

- Lettura con diverse cornici
- Editing e splicing dell'mRNA
- Codoni di inizio alternativi

Inoltre le proteine virali sono spesso polifunzionali



# Espressione dei virus a DNA

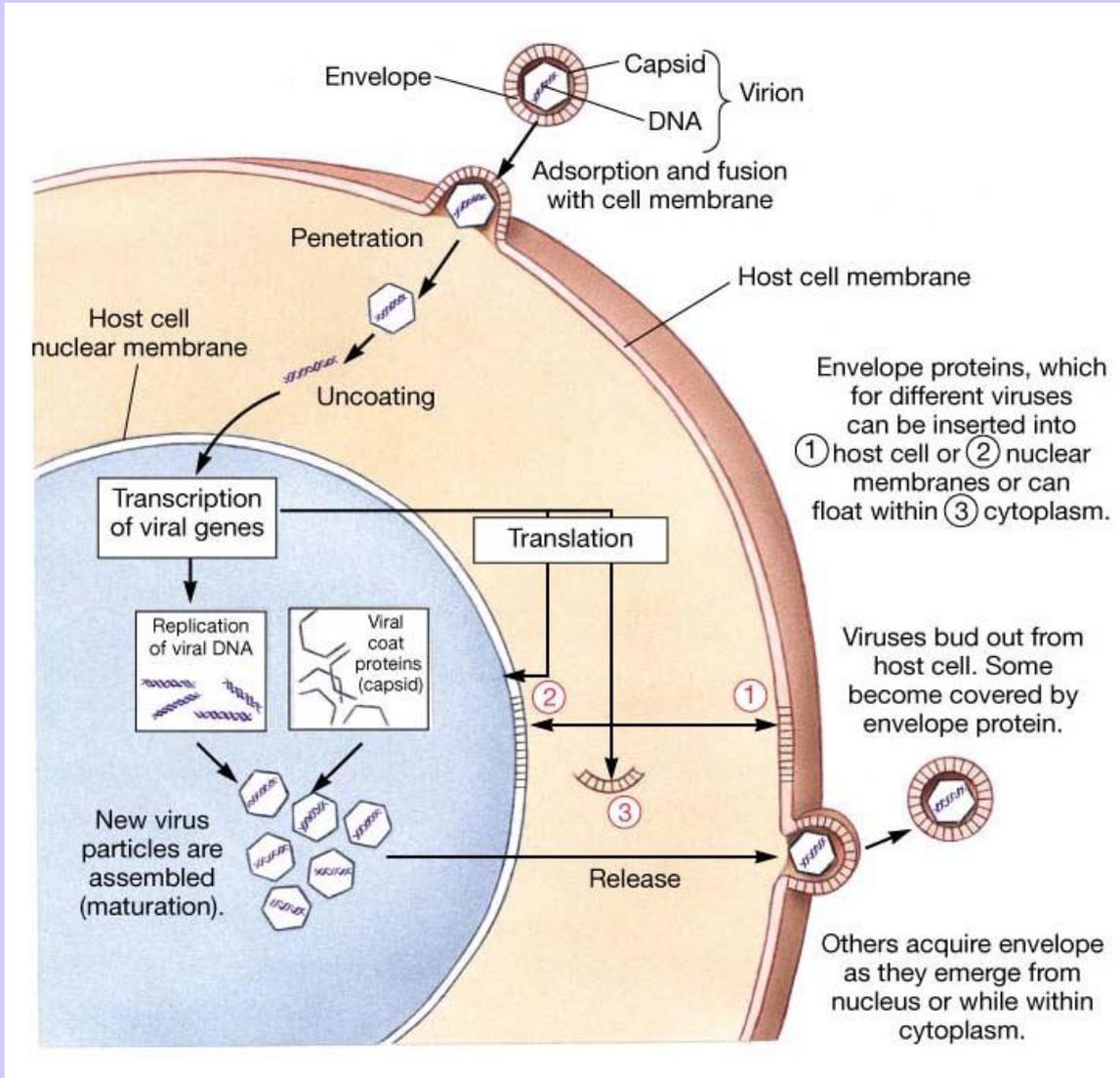
Una trascrizione regolata nel tempo e che interessa tratti diversi del DNA è tipica di questi virus

**Geni precoci:** da regioni genomiche E. Proteine di regolazione.  
Un paio d'ore dopo l'entrata del virus

**Geni tardivi:** strutturali. da regioni genomiche L.  
Sintetizzati dopo la duplicazione del DNA

# Replicazione dei virus a DNA

<http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna1.htm>



I virus a DNA replicano il DNA solo DOPO la produzione delle proteine virali precoci.

Se il genoma è lineare (Adeno, Herpes) si formano intermedi di replicazione circolari e concateneri

# Replicazione virus a RNA

Cose in comune:

- ❖ Tutti sintetizzano RNA da uno stampo di RNA. **TUTTI SINTETIZZANO UN ENZIMA RNA DIPENDENTE** (RNA polimerasi o trascrittasi inversa)
- ❖ Tutti (fuorchè influenzale e retrovirus) si replicano nel citoplasma

I virus a RNA possono essere

ss RNA polarità +  
ssRNA pol -  
Interi  
frammentati  
ds RNA

--- auc ggc uau acu auc---	mRNA
---A---B---C---D---A--	proteina
--- auc ggc uau acu auc- ----	RNA genomico+
--- uag ccg aua uga uag ---	complementare polarità -
--- uac ccg aua uga uag ---	
--- E ---F---G-stop-D---	proteina corrispondente

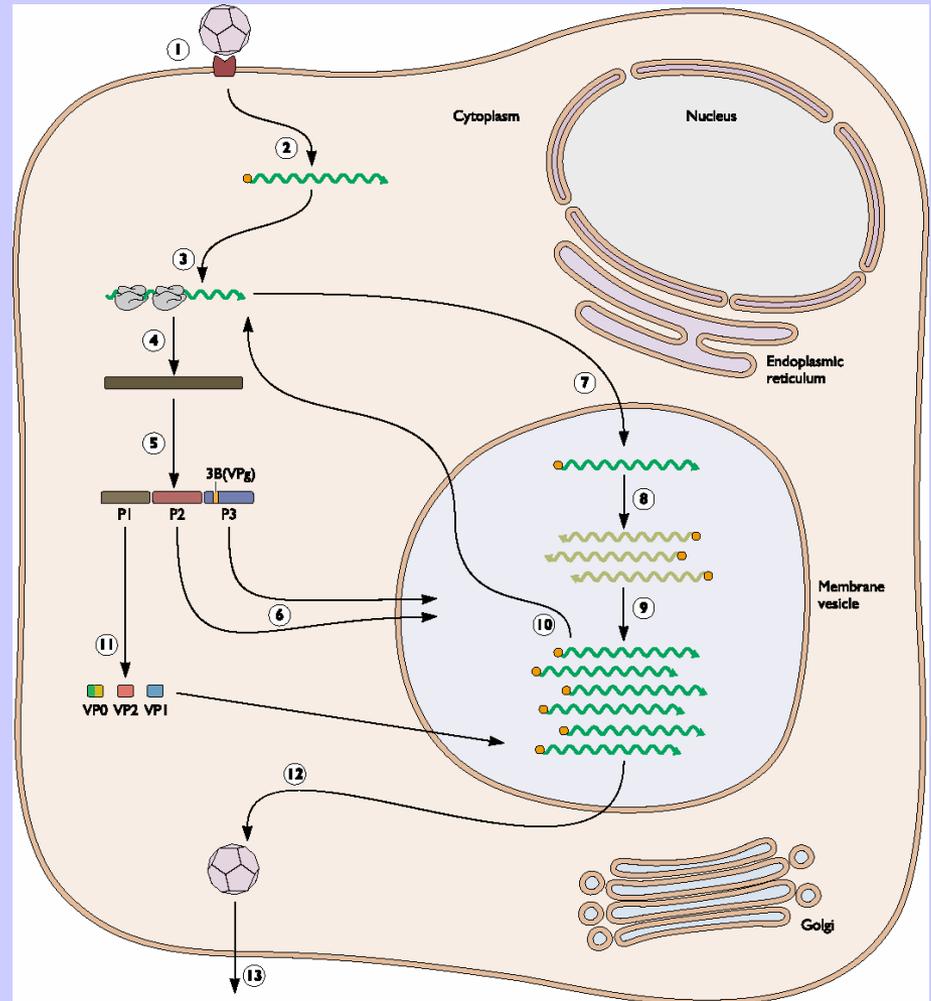
## Replicazione dei virus a RNA. CLASSIFICAZIONE DI BALTIMORE

<b>1</b>	+ polarità (mRNA)	No	Si	Misura quanto il genoma	Poliproteina	Picornavirus Flavi
<b>2</b>	“	No	Si	Unità genica	Singole proteine	Coronavirus
<b>3</b>	- polarità (anti-mRNA)	Si	No	Unità genica	Singole proteine	Paramyxovirus
<b>4</b>	Segmentato - polarità	Si	No	Unità genica	Singole proteine	Orthomyxovirus
<b>5</b>	ds RNA	Si	No	Unità genica	Singole proteine	Reovirus
<b>6</b>	Ambi-senso (+ & - polarità)	Si	No	Unità genica	Singole proteine	Arenavirus
<b>7</b>	RNA (+ polarità) con intermedio a DNA	Si	No	Misura quanto il genoma / Unità genica (splicing)	Poliproteina e Singole proteine	Retrovirus (HIV, HTLV)

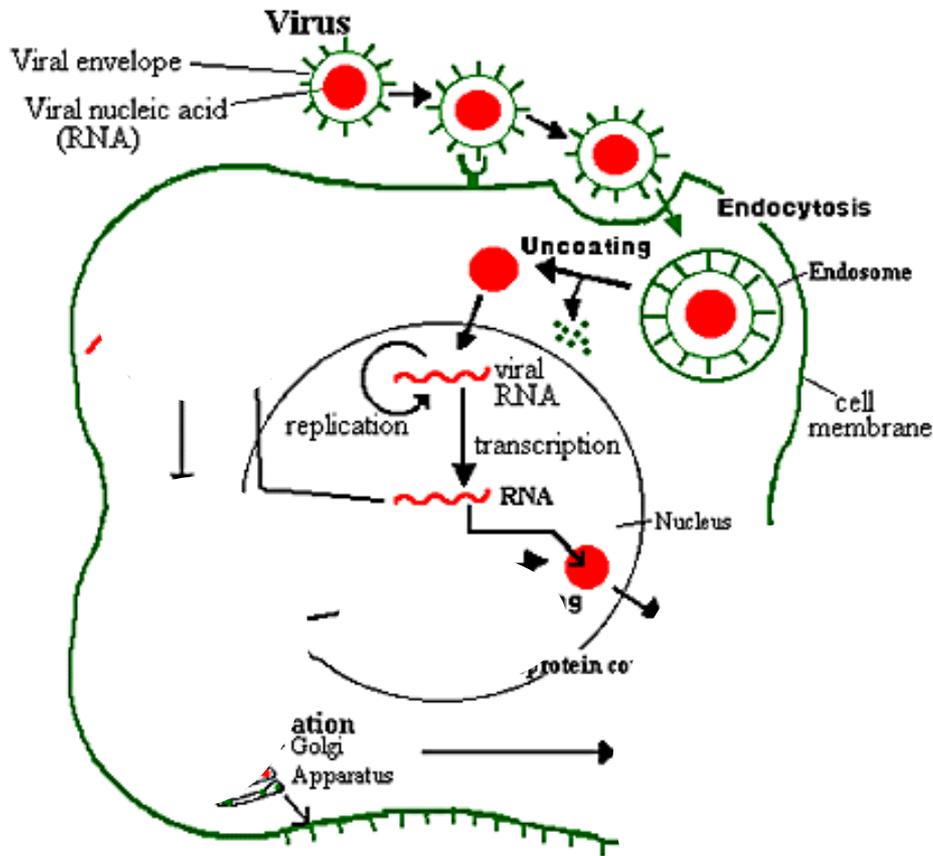
# Replicazione virus a ss RNA +

## Esempio: Poliovirus

- Replicazione nel citoplasma
- Non richiede polimerasi virale nelle prime fasi perchè l'RNA è infettivo
- IRES sequenze genomiche per il legame ai ribosomi
- A bassa concentrazione di proteine strutturali prevale sintesi mRNA
- A alta con prevale incapsidamento

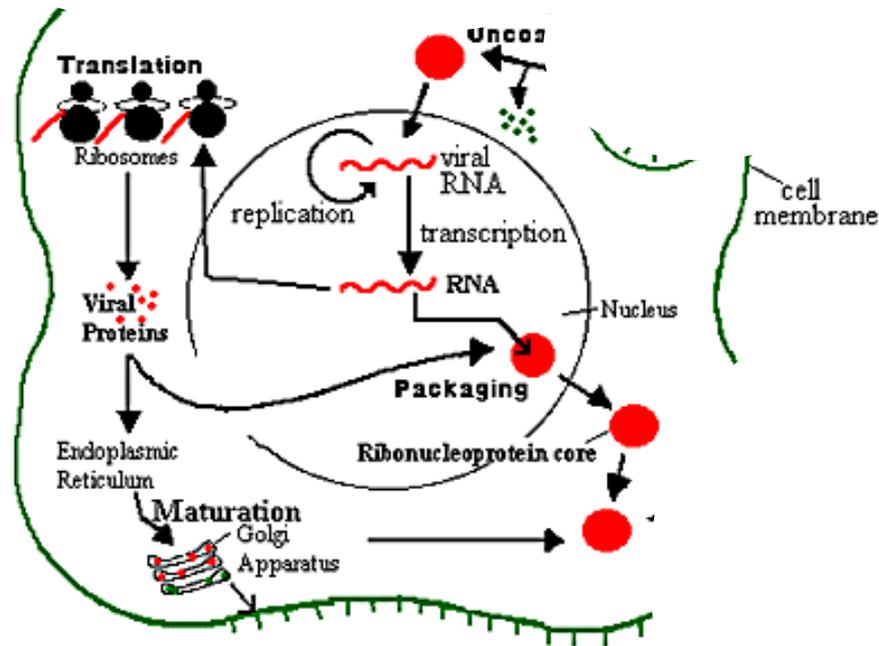


# Replicazione virus influenzale entrata e trascrizione



**Influenza A Virus Replication**

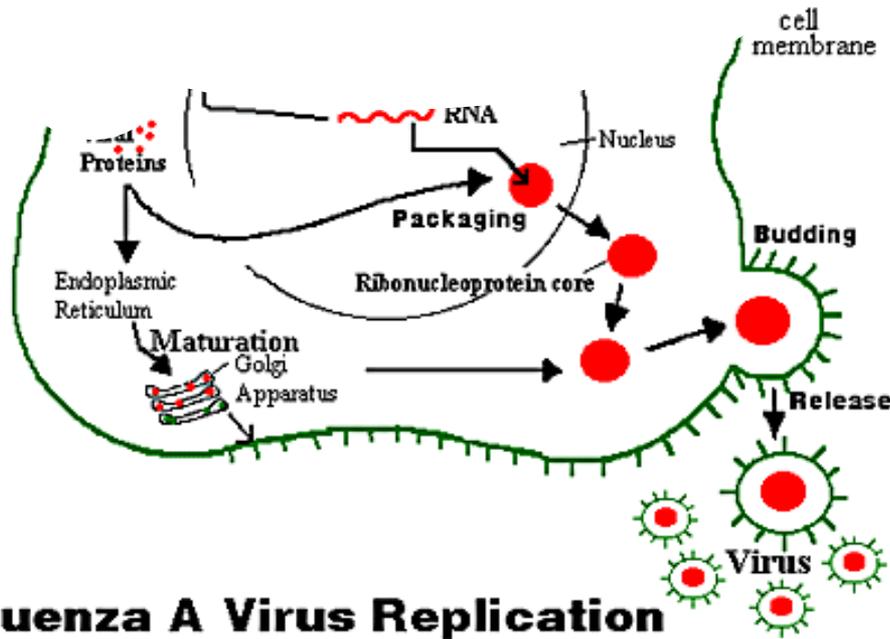
# Replicazione virus influenzale traduzione



**Influenza A Virus Replication**

# Replicazione virus influenzale maturazione e rilascio

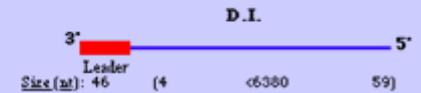
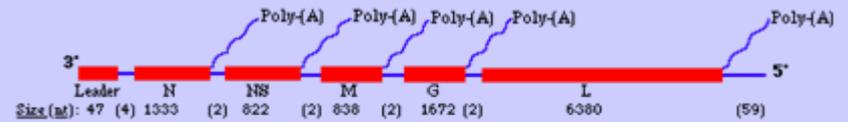
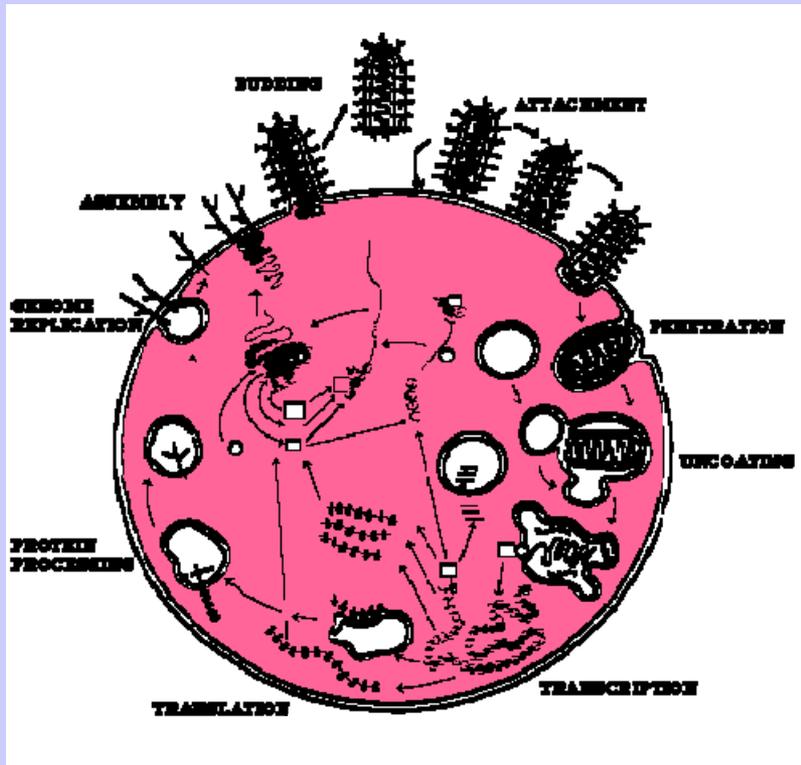
Viral



**Influenza A Virus Replication**

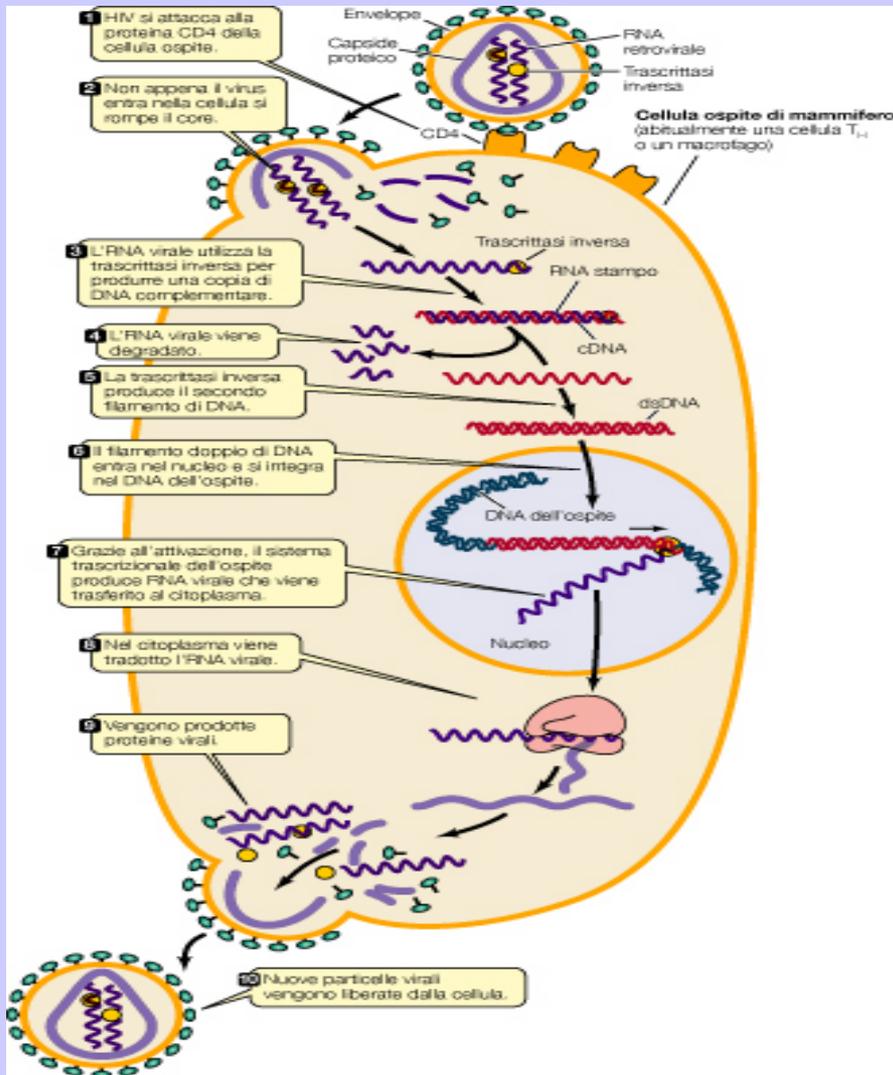
# Replicazione Rhabdovirus

## RNA ss polarità negativa intero



# Replicazione **Retrovirus**

## VIRUS A RNA CON INTERMEDIO A DNA



Il genoma dei Retrovirus è (+) RNA.

La sua caratteristica è di essere diploide e di non servire da mRNA ma da STAMPO ALLA RETROTRASCRIZIONE DI DNA

IL DNA FUNGE DA INTERMEDIO DI REPLICAZIONE

SI INTEGRA NEL CROMOSOMA DELLA CELLULA

# Incorporazione del genoma (Incapsidamento)

## AUTOMONTAGGIO

**I virus devono distinguere all'interno della cellula il proprio acido nucleico da quello cellulare**

Avviene nella sede di replicazione dell'acido nucleico

3 meccanismi:

- ❖ Contatto diretto col capsid: virus elicoidali semplici. Avviene durante la sintesi dei 2 componenti
- ❖ Tramite apposite proteine virali . Esempio NP dei retrovirus interagisce con RNA e poi con capsid
- ❖ Tramite proteine cellulari (ISTONI E ALTRE)

# Rilascio dei virioni maturi

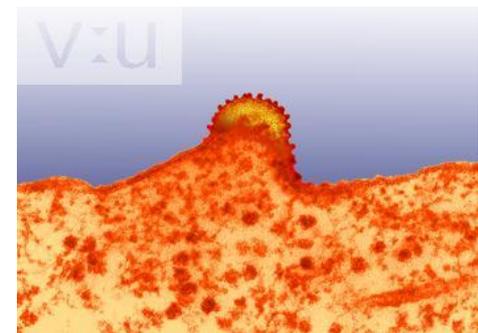
La progenie virale lascia la cellula ospite secondo diverse

**LISI** Poliovirus e molti virus nudi;  
Herpesvirus.

Distruzione della cellula ospite.  
Lascia un buco o **PLACCA LITICA**  
sul monostrato cellulare in vitro

**Gemmazione** HIV, virus rivestiti.  
Da una membrana della cellula ospite

Si possono avere entrambe: per es gli herpesvirus  
gemmano dalla m. nucleare e lisano poi la cellula



# IL SISTEMA INTERFERON NELLE INFEZIONI VIRALI

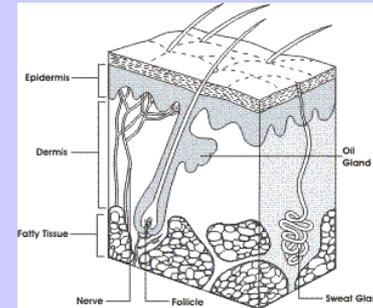
# DIFESE CONTRO LE INFEZIONI: la prima linea

## BARRIERE CHIMICHE

pH  
Salinità

## FISICHE

Cute  
Mucose



## COMPETIZIONE MICROBICA

nell'intestino e vie genitali

# DIFESE CONTRO LE INFEZIONI: seconda linea

## IMMUNITA' ASPECIFICA o innata

- primitiva
- agisce contro qualsiasi microbo dopo attivazione

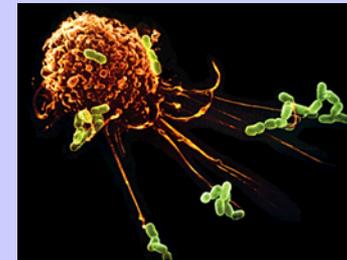
*Cellule dendritiche*

*Natural Killer*

*Macrofagi*

*Mediatori infiammazione*

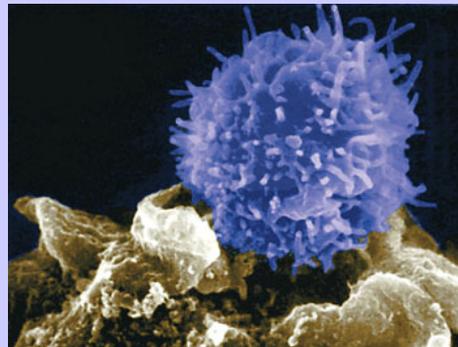
*Complemento*



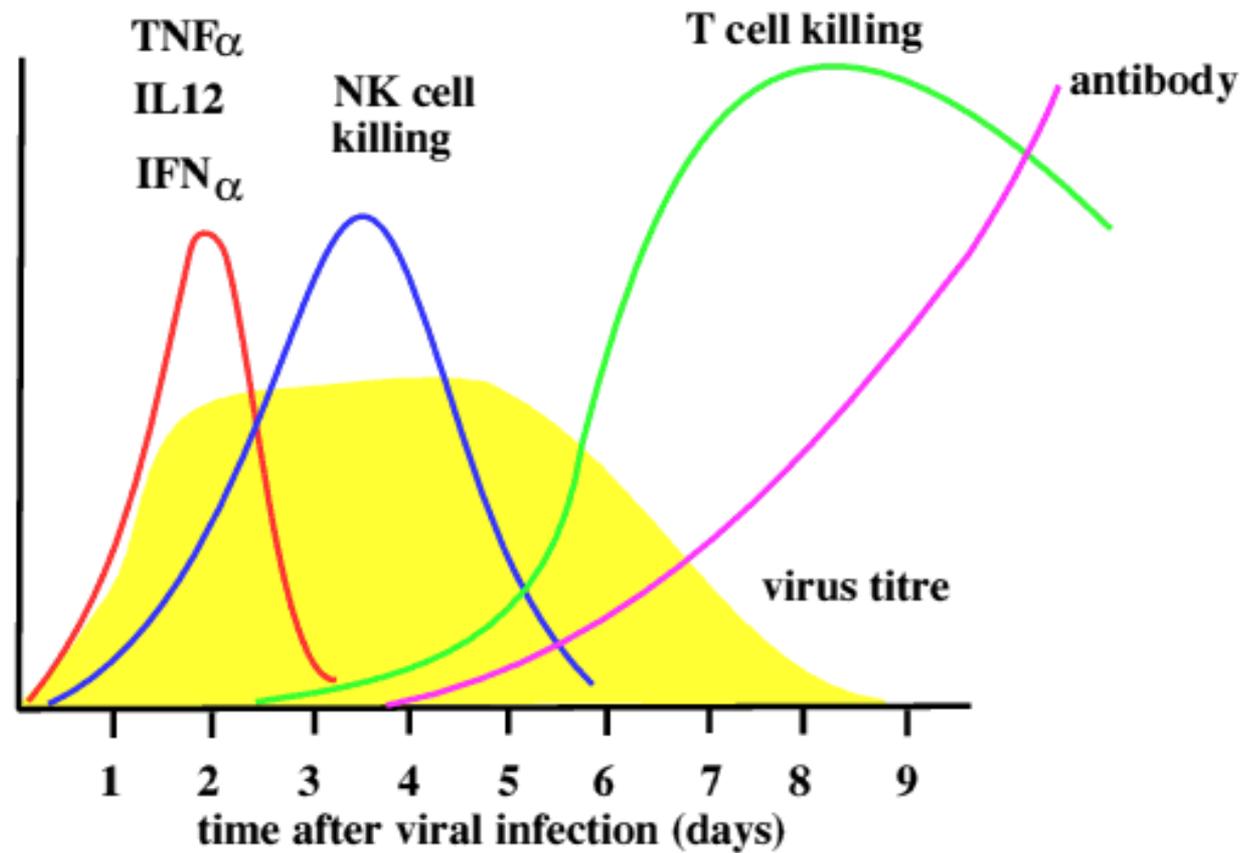
## IMMUNITA' SPECIFICA

- Agisce **solo** contro microbo attivatore
- Memoria
- Discrimina il self dal non-self

*Linfociti T e B*



## Cinetica di intervento delle varie difese contro una infezione virale



# L'IMMUNITA' ASPECIFICA

Detta anche **innata** perchè non si modifica con l'incontro con l'agente infettivo:

**non** da' luogo a MEMORIA

è rapida: agisce da subito a entro poche ore

Riconosce dei PATTERN antigenici (e non epitopi). **PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)**

Natura chimica: polisaccaridi o polinucleotidi NON proteine

Circa 103 diversi fra cui:

- Batteri: LPS, pili, flagellina, peptidoglicano, DNA batterico etc.
- Virus: ds RNA (intermedio di replicazione)

Riconoscimento dei pattern attraverso RECETTORI che sono già presenti nel DNA germinale:

- Per fagocitosi (mannosio, etc)
- Che segnalano al nucleo (*toll-like* o TLR)
- Secreti dal fegato che rendono microbi aggredibili per fagocitosi e complemento (*mannose-binding protein*)

# Interferenza Virale

Isaacs e Lindenmann, 1957.

Fenomeno per cui l'infezione con un virus, **anche inattivato**, inibisce la replicazione di un virus (virulento...) nelle stesse cellule.

Dovuta a secrezione di INTERFERONE  $\alpha$  e  $\beta$  da parte di cellule infettate da virus.

# Interferenza Virale

MECCANISMO:

Infezione virale



Produzione di ds RNA (intermedio di replicazione)



Produzione e rilascio di INTERFERON  
potentissimo, prodotto per 20-50h in grandi qt



Captazione da parte di cellule sane (recettori superficiali specie-specifici)



Attivazione di produzione di proteine "antivirali" (MHC, e altre).  
Blocco della trascrizione dell'mRNA e della sintesi proteica.  
Attivazione delle cellule NK.

# GLI INTERFERONI

Citochine scoperte nel 1957 da Isaacs e Lindenmann

ESSENZIALI per la resistenza ai microbi e quindi essenziali alla vita (vedi topi knockout)

Caratteristiche comuni:

Sono proteine

Agiscono tramite recettori tipo-specifici. Azione come per ormoni (e non ad attività enzimatica...) a concentrazioni nM.

Agiscono attraverso l'attivazione dei geni (interferon-stimulated genes)

# Interferon (IFN)

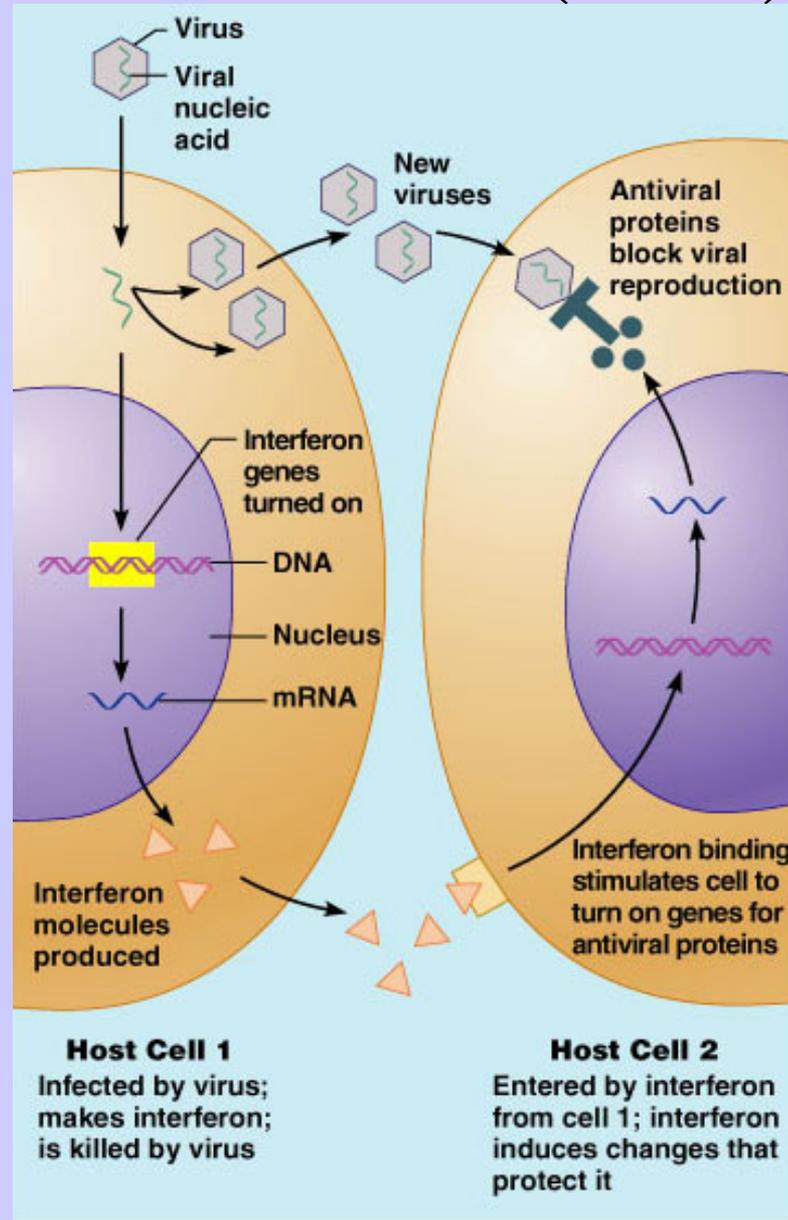


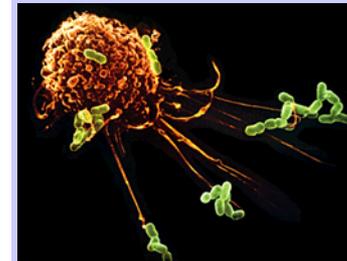
Figure 21.4

# DIFESE CONTRO LE INFEZIONI:

## IMMUNITA' ASPECIFICA o innata

- primitiva
- agisce contro qualsiasi microbo dopo attivazione

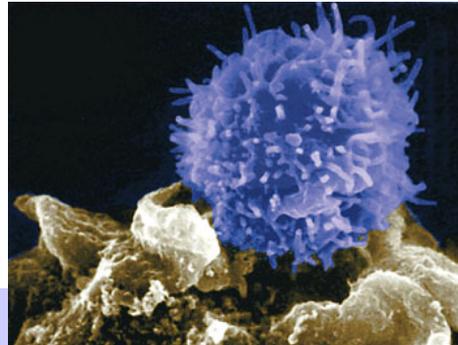
*Cellule dendritiche*  
*Natural Killer*  
*Macrofagi*  
*Mediatori infiammazione*  
*Complemento*



## IMMUNITA' SPECIFICA

- Agisce **solo** contro microbo attivatore
- Memoria
- Discrimina il self dal non-self

*Linfociti T e B*



# Immunita' acquisita

- **MEDIATA DA LINFOCITI T E B.**
- **ESTREMAMENTE SPECIFICA**
- **DOTATA DI MEMORIA**

**Puo' essere:**

**Naturale attiva**

**Indotta da infezione da patogeni naturali  
Dura spesso tutta la vita**

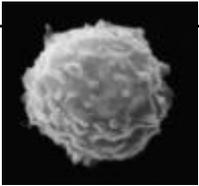
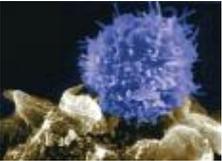
**Naturale passiva**

**Anticorpi materni  
Dura da settimane a mesi**

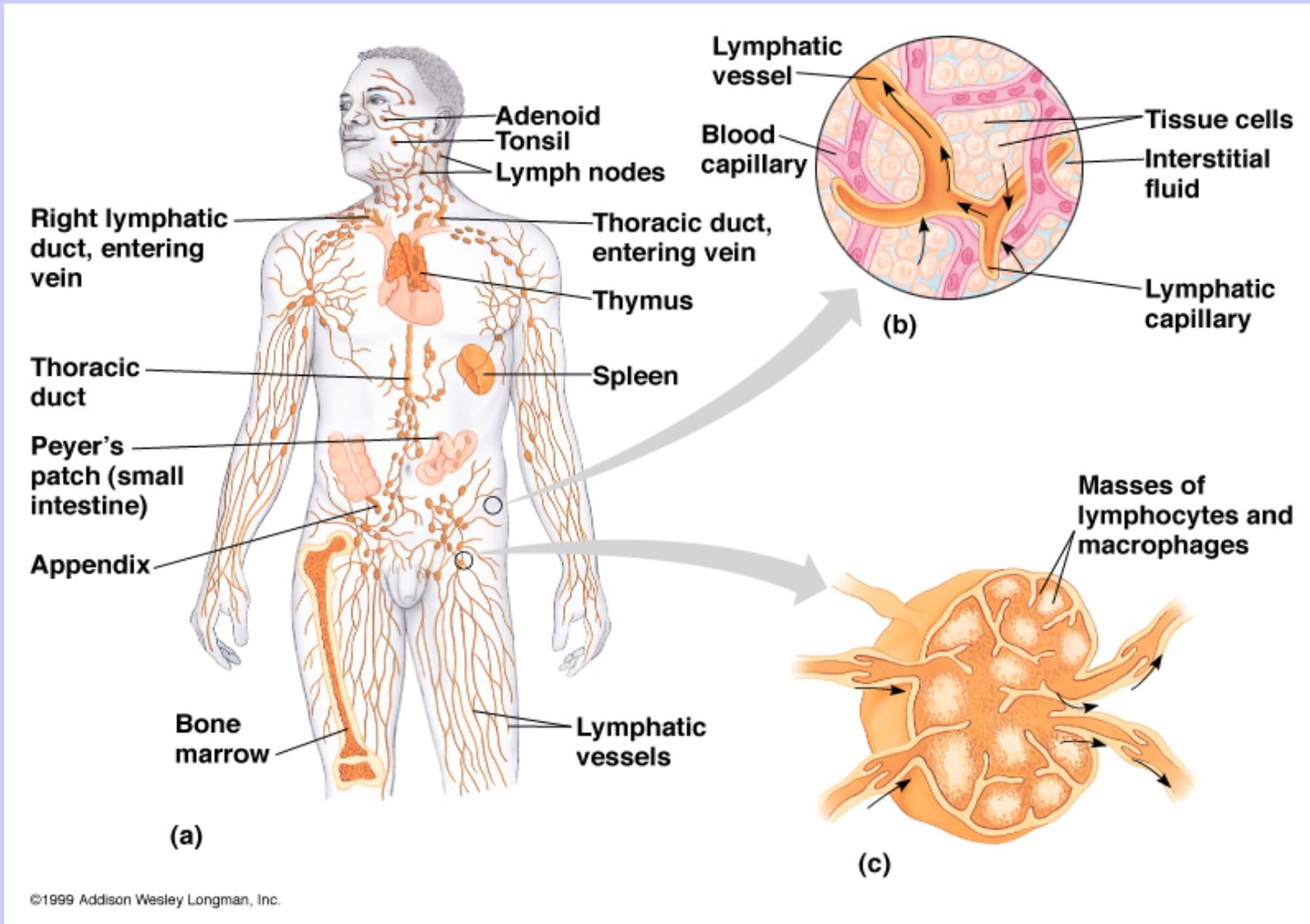


# Gli effettori del sistema immunitario: Linfociti B e T

- $2 \times 10^{12}$  linfociti.                      Equivalenti in massa a fegato o cervello
- Sono circa il 20-25% delle cellule del sangue ma il 100% delle cellule della linfa

RISPOSTA UMORALE	RISPOSTA CELLULO-MEDIATA
LINFOCITI B 	LINFOCITI T 
Recettore: <b>immunoglobulina di superficie</b>	Recettore: <b>TCR o T-cell receptor</b>
Antigene: <b>proteina nativa</b> , anche in fase fluida	Antigene: <b>peptide proteico</b> nel contesto dell'MHC

# Componenti del sistema immune



# termini

## **SIERO**

Parte liquida del sangue DOPO la coagulazione

## **ANTISIERO**

Siero contenente anticorpi contro un antigene specifico

## **SIEROLOGIA**

Studio delle reazioni fra antigeni e anticorpi

## **GAMMA- O IMMUNOGLOBULINE o anticorpi**

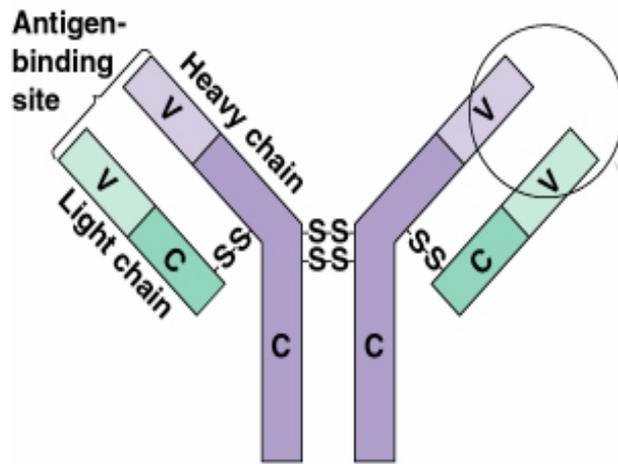
Frazione di proteine seriche addette al legame con antigeni (per lo più microbici)

# Anticorpi: struttura base

PROTEINE CHE SI LEGANO AD  
ANTIGENI SPECIFICI

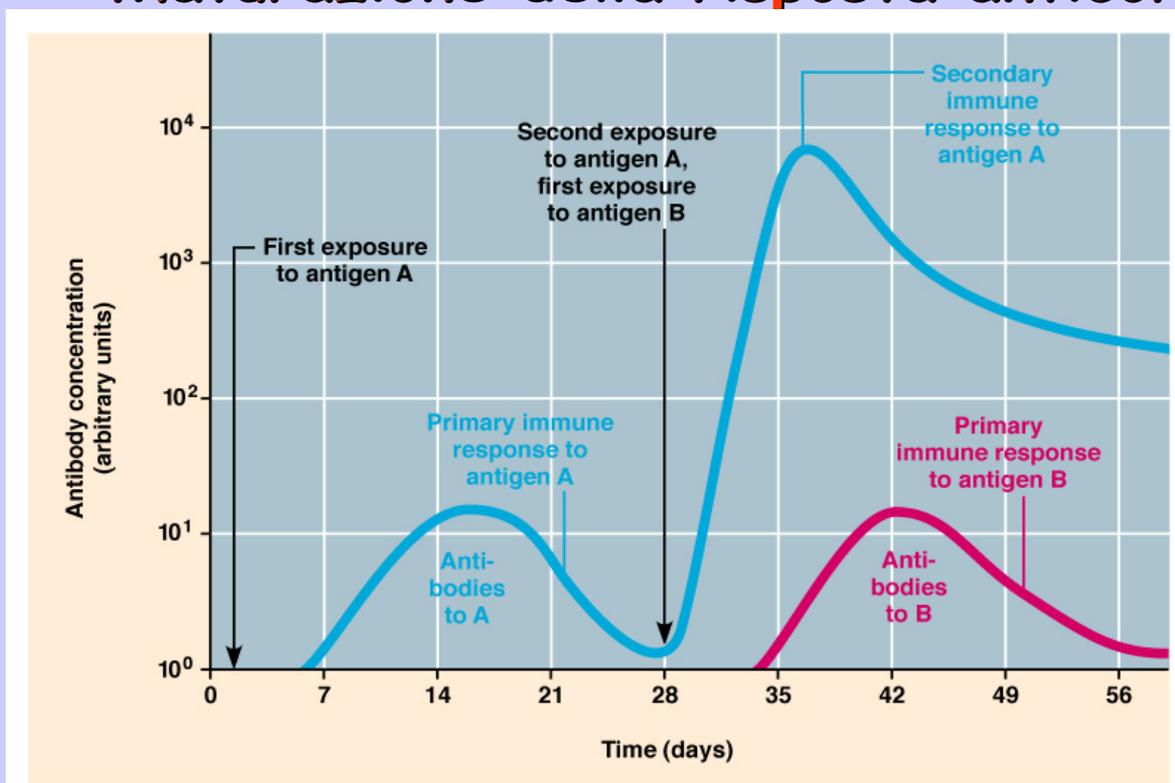
PRODOTTI DA LINFOCITI B

PRESENTI NEL SIERO



(a) Antibody molecule

# Maturazione della risposta anticorpale



	Primaria	Secondaria
Isotipo prevalente	IgM	IgG (siero) IgA (mucose)
Durata	Settimane-mesi	Mesi- anni-sempre
Picco conc. Anticorpi	7-20 gg	10 gg
Affinità all'antigene	bassa	alta

# Tipi di Immunita' acquisita



## **ATTIVA**

generata dai propri linfociti

Artificialmente acquisita: tramite **VACCINAZIONE**  
Immunità puo' durare da anni a sempre

passiva Artificiale (**sieroprofilassi**)

Inoculo di immunoglobuline preformate  
Solo in pazienti in cui si sospetta l'infezione  
Durata: max 2 mesi (emivita 2-3 settimane)

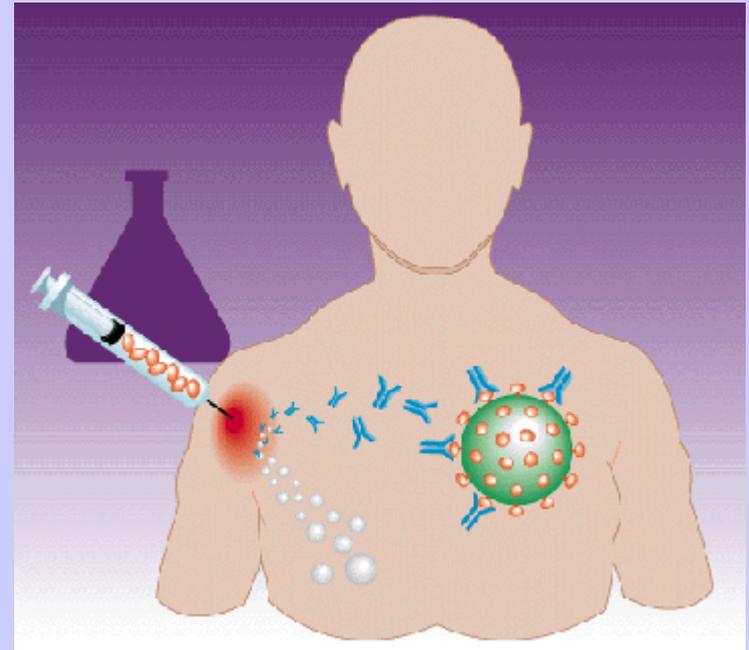
# I vaccini

Preparazione che contiene un agente patogeno modificato (o porzione/prodotto di)

Inoculato, induce una risposta immune protettiva contro la malattia indotta dal patogeno stesso

Si somministrano a persone sane a SCOPO PREVENTIVO

La loro efficacia è dovuta all'immunità ACQUISITA



# Tipi di vaccino

## Vivi attenuati

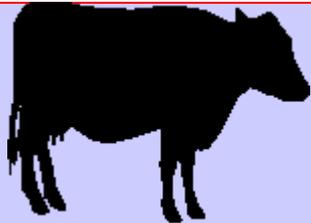
Tramite colture successive in condizioni diverse da quella naturale

- Derivati da ceppi "wild"
- Si replicano e mimano infezione naturale MA...
- HANNO PERSO IL POTERE PATOGENO (ATTENUATI)

Possono revertire alla forma virulenta

Es: antiPolio di Sabin

Oppure "attenuati" perchè specifici per ospiti diversi (vaccinia)



# Tipi di vaccino

## Inattivati

Tramite procedimento che conserva l'antigenicità

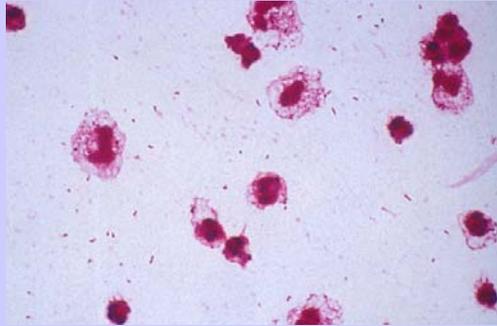
Non si replicano

Richiedono richiami periodici

Es: antiPolio di Salk



# Tipi di vaccino



## Purificati

Una porzione dell'agente è purificata da preparazioni industriali dell'agente stesso.

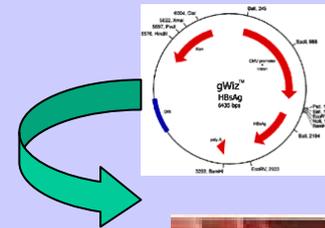
Es: polisaccaridi capsulari di *Haemophilus*

## Ricombinanti

Tramite ingegneria genetica, viene clonato il gene dell'antigene più significativo dal punto di vista della protezione

Il gene, inserito in un plasmide viene espresso da lieviti

Es: anti HBV



## Effetti negli USA, per esempio

Malattia	Casi totali	Anno	Casi nel 1994	% differenza
<b>Difterite</b>	206,939	1921	2	-99.9%
<b>Morbillo</b>	894,134	1941	963	-99.9%
<b>Parotite</b>	152,209	1968	1537	-99.9%
<b>Pertosse</b>	265,269	1934	4617	-99.9%
<b>Poliomielite</b>	21,269	1952	0	-100%
<b>Rosolia</b>	57,686	1969	227	-99.9%
<b>Tetano</b>	1,560	1923	51	-99.9%



## Diagnosi di infezione virale

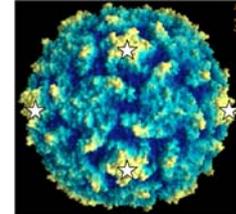
### Obiettivi:

- Stabilire una terapia, se possibile (herpes, epatite B e C)
- Stabilire conseguenti procedure preventive (aborto in caso di rosolia, vaccinazioni)
- Stabilire misure di sicurezza
- A fini epidemiologici

## Diagnosi di infezione virale

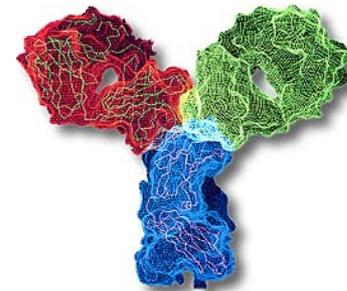
### DIRETTA:

ricerca di proteine o altri componenti (=antigeni) del virus



### INDIRETTA:

ricerca di anticorpi specifici per il virus d'interesse



# Metodi diretti

- Isolamento (e identificazione con anticorpi)
- ELISA
- Immunofluorescenza IFA
- Microscopia elettronica IEM

# Metodi indiretti o serologici

- Neutralizzazione
- Fissazione del complemento
- Inibizione dell'emagglutinazione
- **ELISA**
- Western blot



## Scelta del metodo diagnostico

DIAGNOSI DIRETTA: maggiore specificità ma...

DIAGNOSI INDIRETTA: generalmente meno costosa, e più accessibile

### La scelta dipende da:

#### •FASE DELLA MALATTIA

•Il virus o gli anticorpi devono essere presenti nel campione da analizzare

#### •CARATTERISTICHE VIRALI

•Il virus, se si sceglie il metodo diretto, deve essere coltivabile (isolam) o in grande quantità (ELISA)

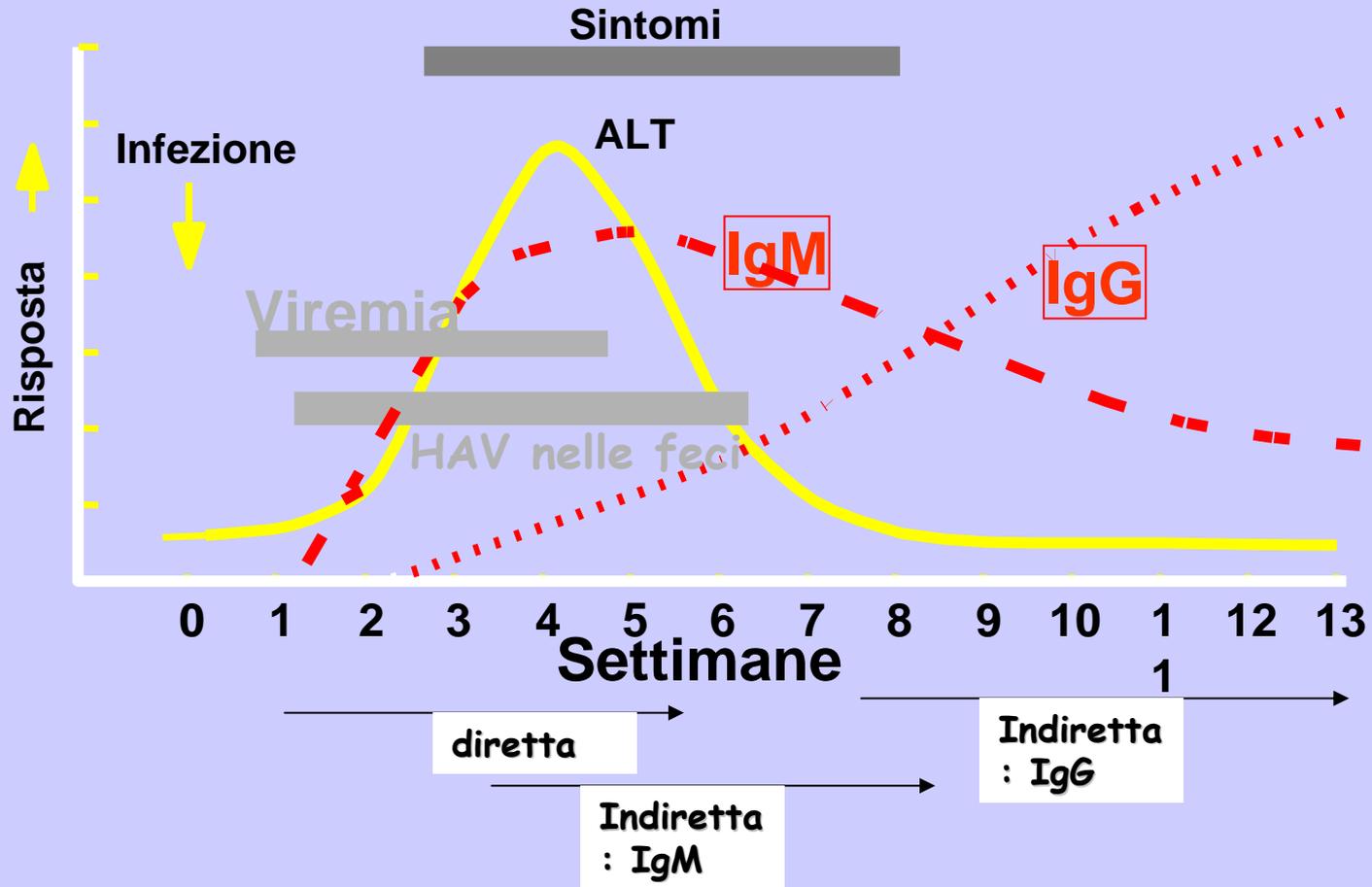
#### •VALORE DIAGNOSTICO DI UN EVENTUALE TITOLO ANTICORPALE

•Gli Ac devono, se presenti, voler dire qualcosa...

#### •TIPO DI TEST

•Screening, test su caso sospetto e conferma?

# Eventi nel corso dell'infezione da HAV



# ESEMPI DI PATOGENESI DI VIRUS ANIMALI

VIRUS	Porta d'entrata	VIA DI DIFFUSIONE	ORGANO BERSAGLIO	ESCREZIONE
<b>Poliomielite, Epatite A</b>	alimentare	sangue	SNC fegato	feci
<b>Morbillo, Rosolia</b>	Faringe, tratto respiratorio	sangue	pelle	Vie respiratorie
<b>HSV 1 (acuta)</b>	Vie respiratorie Pelle, mucose	Nervi, leucociti	molto	Vie respiratorie, epitelio
<b>HSV 1 (ricorrente)</b>	Gangli	Nervi	Pelle, occhio	Pelle, occhio
<b>HSV 2</b>	Vie genitali	Nervi	Vie genitali	Vie genitali
<b>rabbia</b>	Sottocutanea	Nervi	SNC	saliva
<b>Epatite B, C</b>	Discontinuità della pelle	Sangue	Fegato	Sangue

Spesso l'organo bersaglio non è la sede di prima scelta per il prelievo del campione clinico.

Il prelievo per la diagnosi virologica DIRETTA va fatto tenendo conto di:

- quale agente si sospetta essere responsabile
- dove si ritiene che il virus si trovi nel momento del prelievo

# CAMPIONI CLINICI per la diagnosi diretta

## CAMPIONI MONOMICROBICI

### DAL SANGUE

Plasma Frazione liquida del sangue non coagulato.  
importante l'anticoagulante

Siero Frazione liquida del sangue coagulato  
Solo per HBsAg.

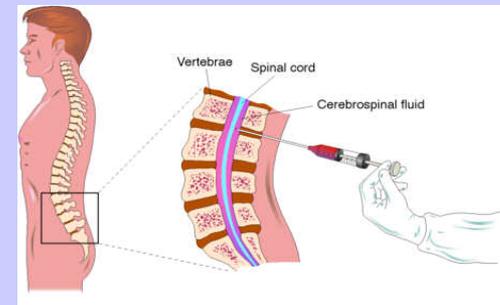
PBL Ricerca di CMV e EBV.

Preparato per

- Lisi emazie
- Gradiente di densità

## LIQUOR CEFALORACHIDIANO

Usare tale e quale



# CAMPIONI CLINICI per la diagnosi diretta

**CAMPIONI POLIMICROBICI:** di solito vanno trattati

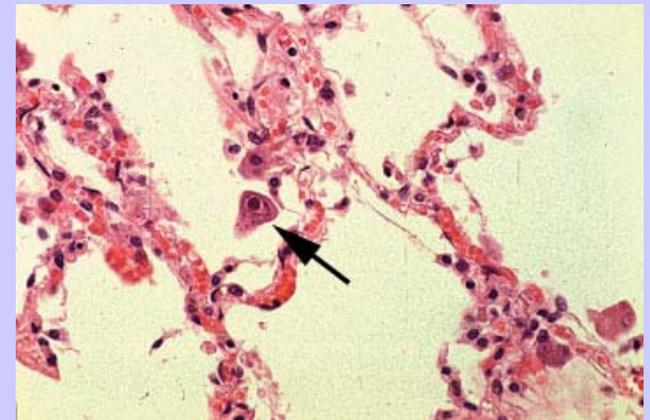
**TAMPONI** immersi in liquido di trasporto  
(PBS, 20% FCS o BSA, antibiotici,  
antimicotici)

**URINA** diluita 1:2 in VIB  
Filtrata, centrif a 15000  
Semina del pellet

**FECI** Diluite 1:5 o 10 in VIB.  
Centrif a bassa velocità.  
Supernatante centrif a alta velocità.  
Semina del pellet (cloroformio)

**BRONCOLAVAGGI** diluiti, rimosso muco.  
**GARGARIZZATI** Tenute le cellule

**BIOPSIE** omogenate in VIB, centrif.



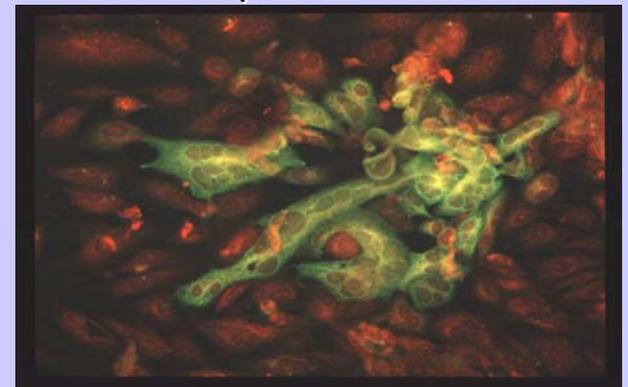
# gli anticorpi nella diagnosi diretta

Nella diagnosi diretta, la sierologia è deputata al

riconoscimento dell'agente infettante.

Si acquistano già pronti anticorpi di origine animale, marcati diversamente a seconda del loro uso.

Molto usati sono gli  
ANTICORPI MONOCLONALI.



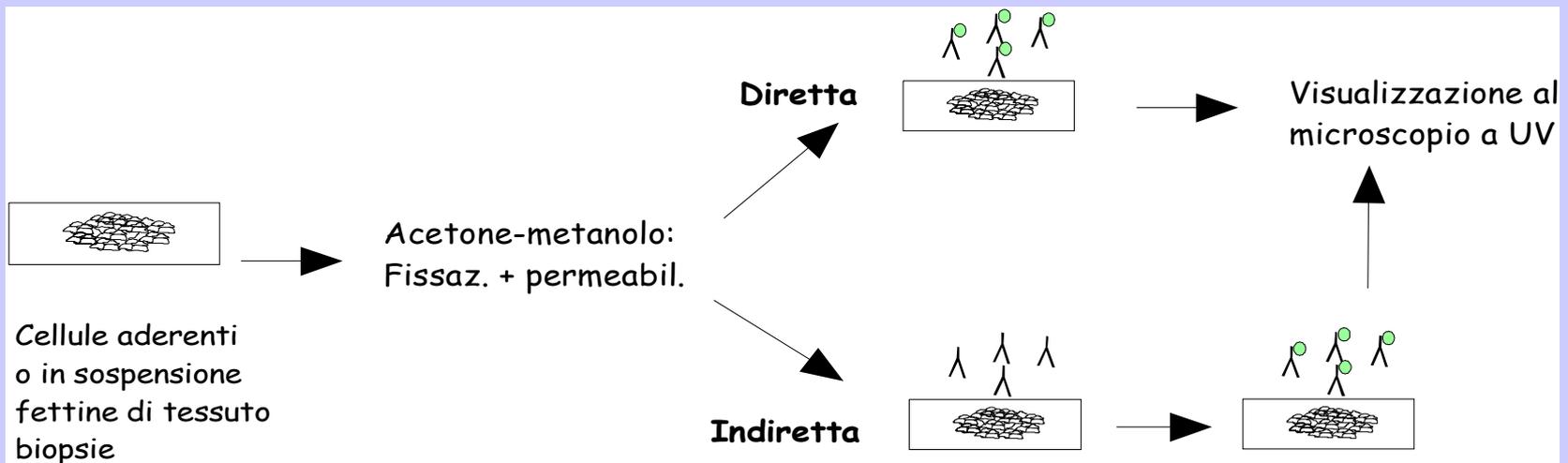
# IMMUNOFLUORESCENZA

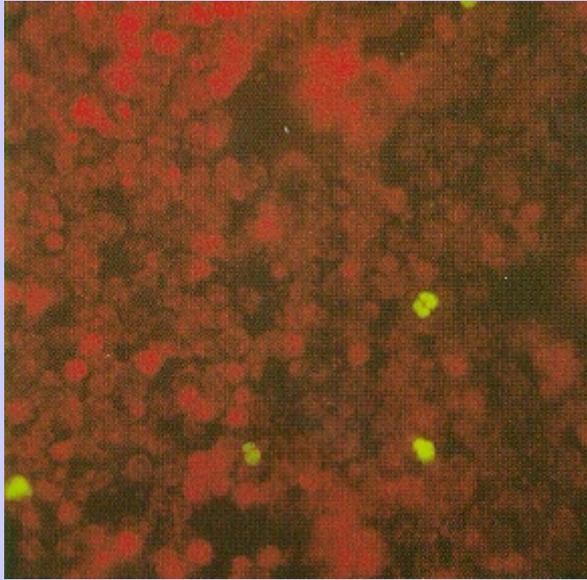
E' una delle tecniche più sensibili (fino a 1000 molecole antigeniche se localizzate).

Serve sia per rilevare anticorpi ( si adoperano antigeni noti) MA SOPRATTUTTO per rilevare antigeni (si adoperano anticorpi noti).

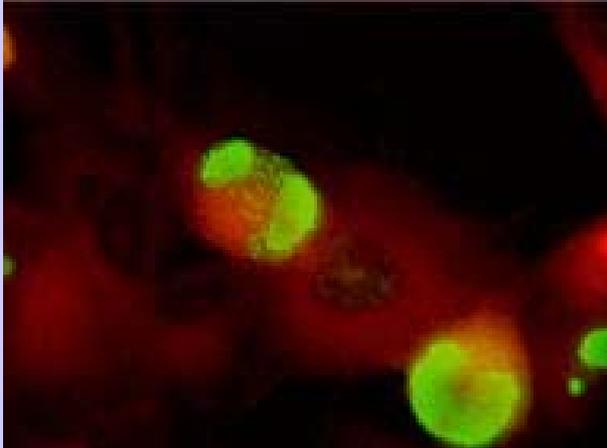
Permette di:

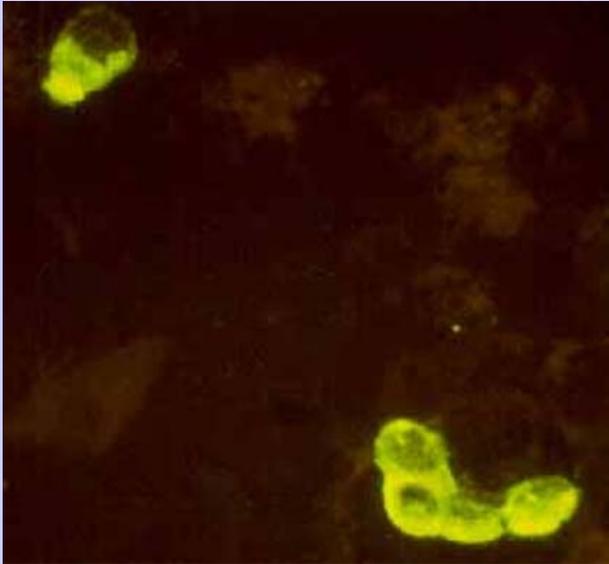
- visualizzare la localizzazione di un antigene (citoplasmatica, di membrana, nucleare).
- determinare più antigeni o marcatori sulla stessa cellula, utilizzando fluorocromi diversi



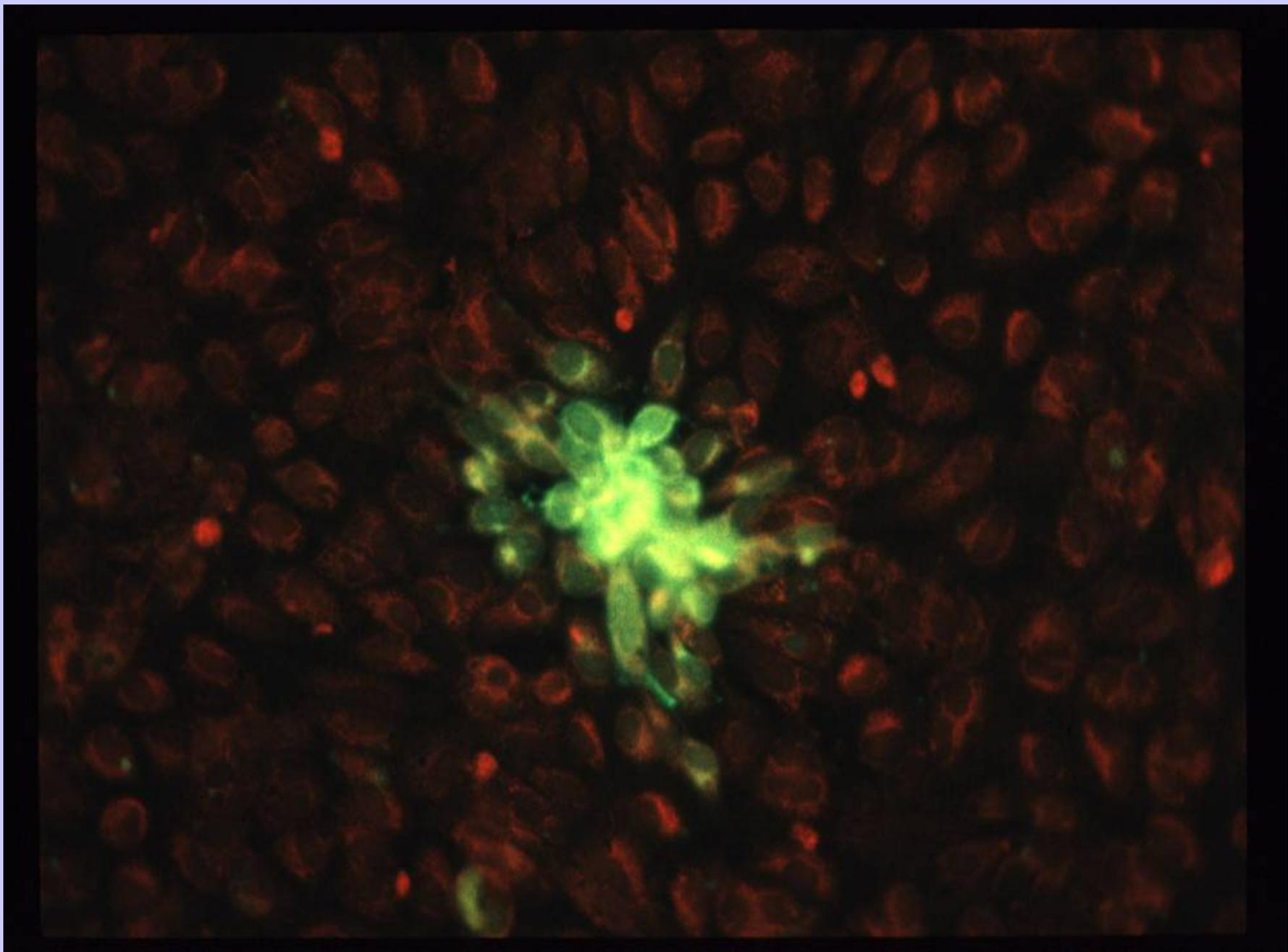


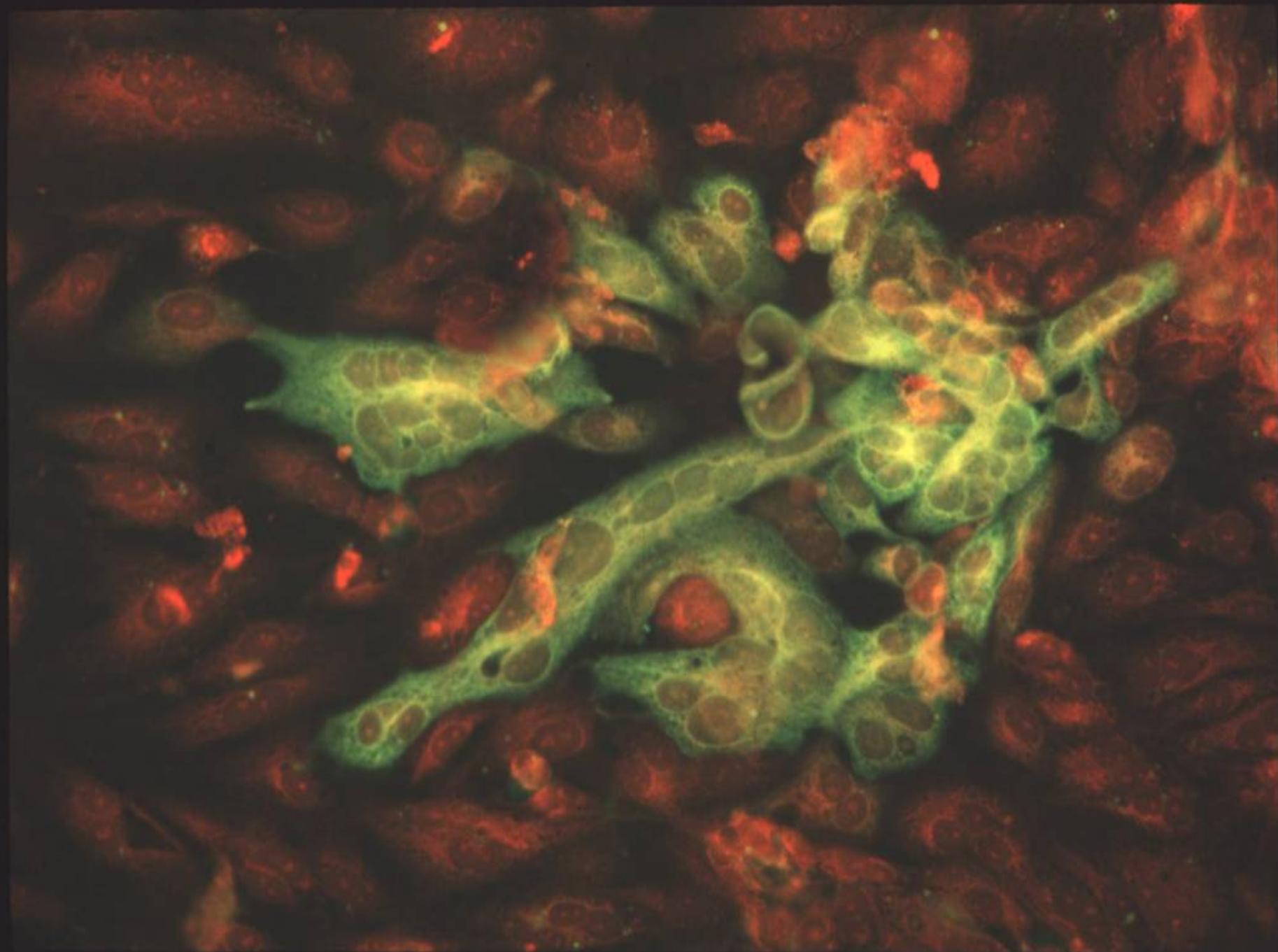
- Antigenemia CMV





- RSV in striscio tampone nasofaringeo  
campione non contrastato





# SIERODIAGNOSI

Per la **ricerca delle IgG** occorrono campioni appaiati:

- A 7 gg dalla comparsa dei sintomi    IN FASE ACUTA
- A 1-2 settimane dal primo            IN CONVALESCENZA

E' considerato indicativo di infezione virale un titolo almeno 4 volte maggiore nel secondo campione

Per la **ricerca delle IgM** basta un campione solo.

- Compaiono nei primi giorni
- Il picco è dopo 7-10 gg
- Scompaiono nei mesi successivi. SONO QUINDI INDICATORI DI INFEZIONE ACUTA
- Ricompaiono durante le infezioni ricorrenti e riacutizzazioni (es: HCV)
- Determinate nel sangue cordale, indicano infezione neonatale

# SIERODIAGNOSI

Gli anticorpi possono essere chiamati diversamente a seconda del saggio usato per determinarli e della loro funzione :

**Agglutinanti o opsonizzanti** (agglutinine e opsonine)

**Neutralizzanti** ma i test sono difficili e lenti, non determinabili per tutti i virus

**fissanti il complemento** ...compaiono più lentamente e spariscono prima..  
I test disponibili danno come risultato il titolo delle Ig totali.  
Poco sensibili.

**Inibenti l'emagglutinazione** ...compaiono alla comparsa dei sintomi e durano nel tempo.  
Solo per virus che agglutinano le emazie

**Ig totali**

- » ...misurate con RIA o ELISA o IFA.
- » I test possono determinare anche la classe IgM, IgG, IgA.

Test di conferma: **Western blot o Immunoblot**

# TEST DI FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO

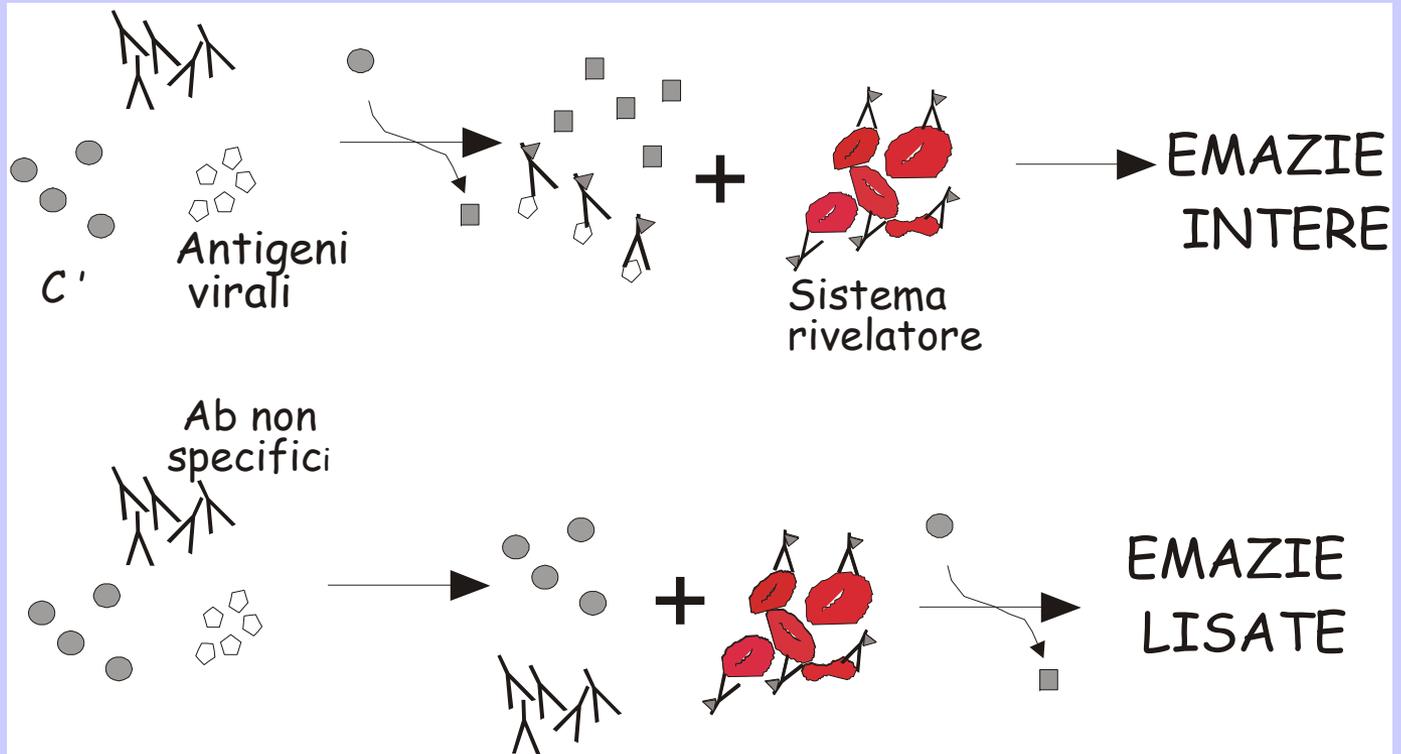
- Originariamente messo a punto da Wassermann per la diagnosi di sifilide.
- Misura IgG e IgM (ossia gli anticorpi in grado di attivare o fissare il complemento C') nel siero

Vantaggi: stessi reagenti eccetto l'antigene, per tutti i test

Svantaggi: componenti labili, stretto margine di condizioni ottimali

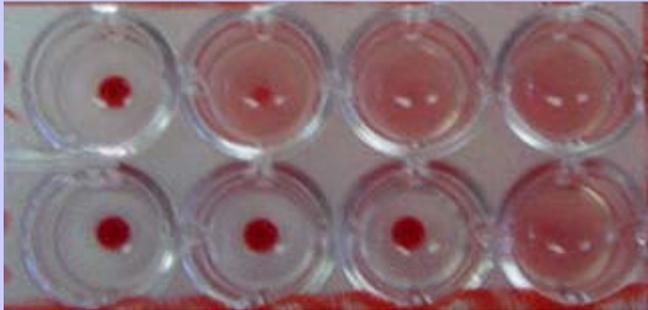
Usato per Adenovirus, CMV, Influenza A-B, Parainfluenza 1-3, RSV, Rotavirus...

# TEST DI FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO



**Sistema rivelatore:** un altro complesso antigene anticorpo VISIBILE, cioè globuli rossi con anticorpi anti-globulo rosso (si dicono **sensibilizzati**)

# TEST DI FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO



+/-

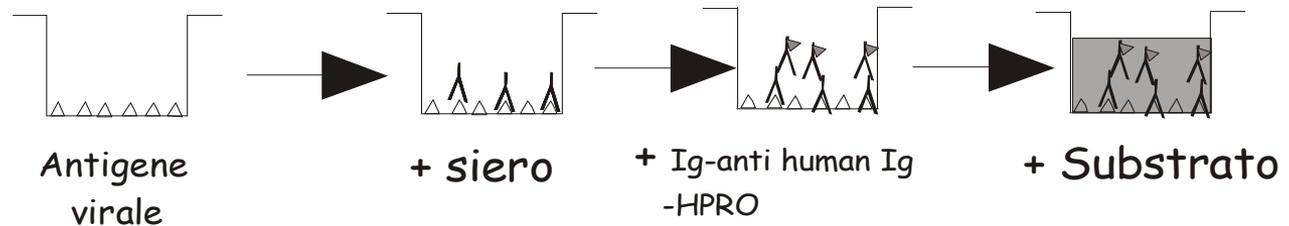
+

# ELISA

- E' una tecnica fra le più usate: Semplice, sensibile, veloce (2 ore alla risposta), economica, reagenti stabili.
- Puo' essere resa quantitativa con una curva di taratura.

## •CATTURA DI ANTICORPO per diagnosi indiretta

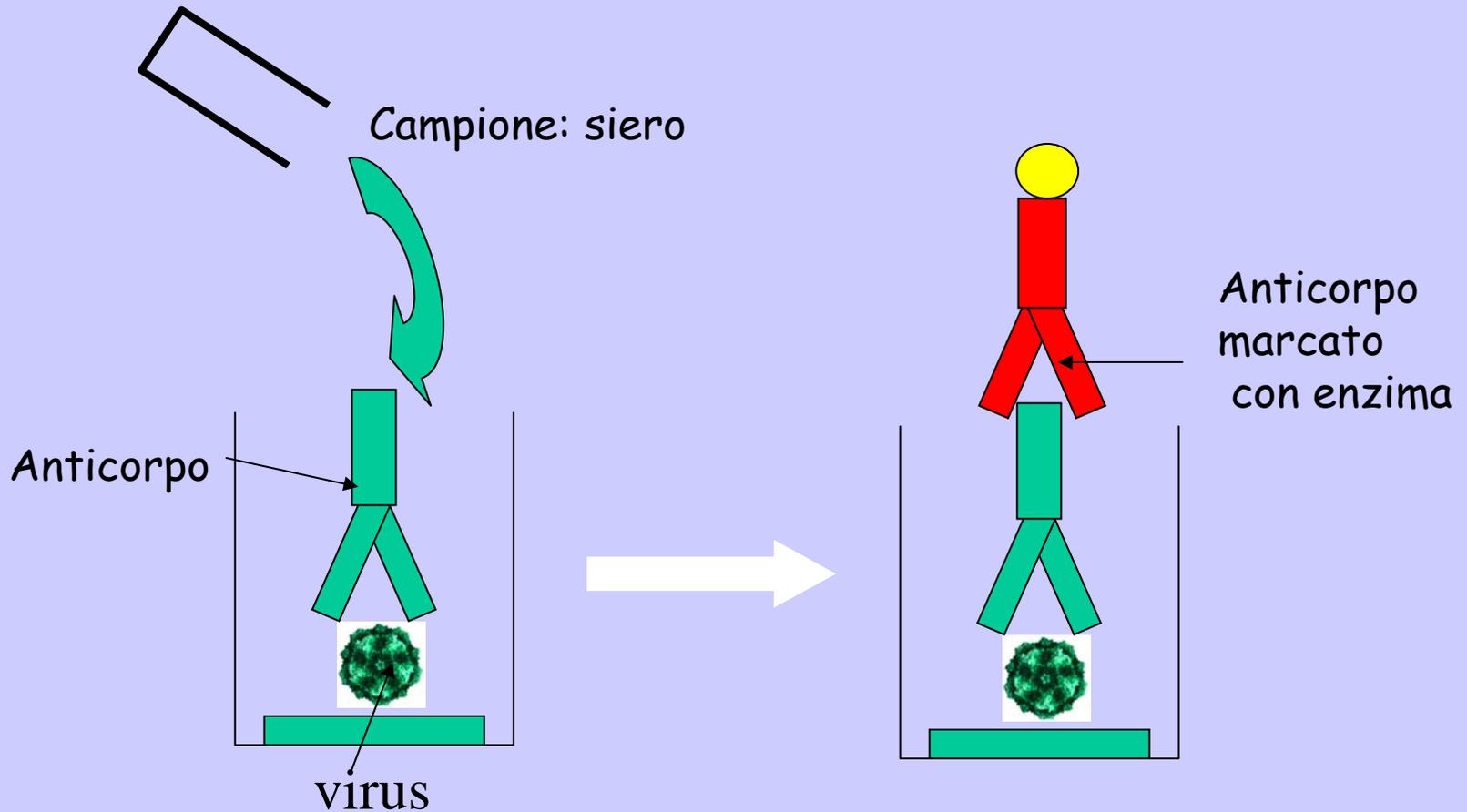
A, legato a supporto solido (fondo di piastra o biglia), è antigene virale  
B è un anticorpo specifico per A (per es: nel siero di un paziente sieropositivo).





# A cattura

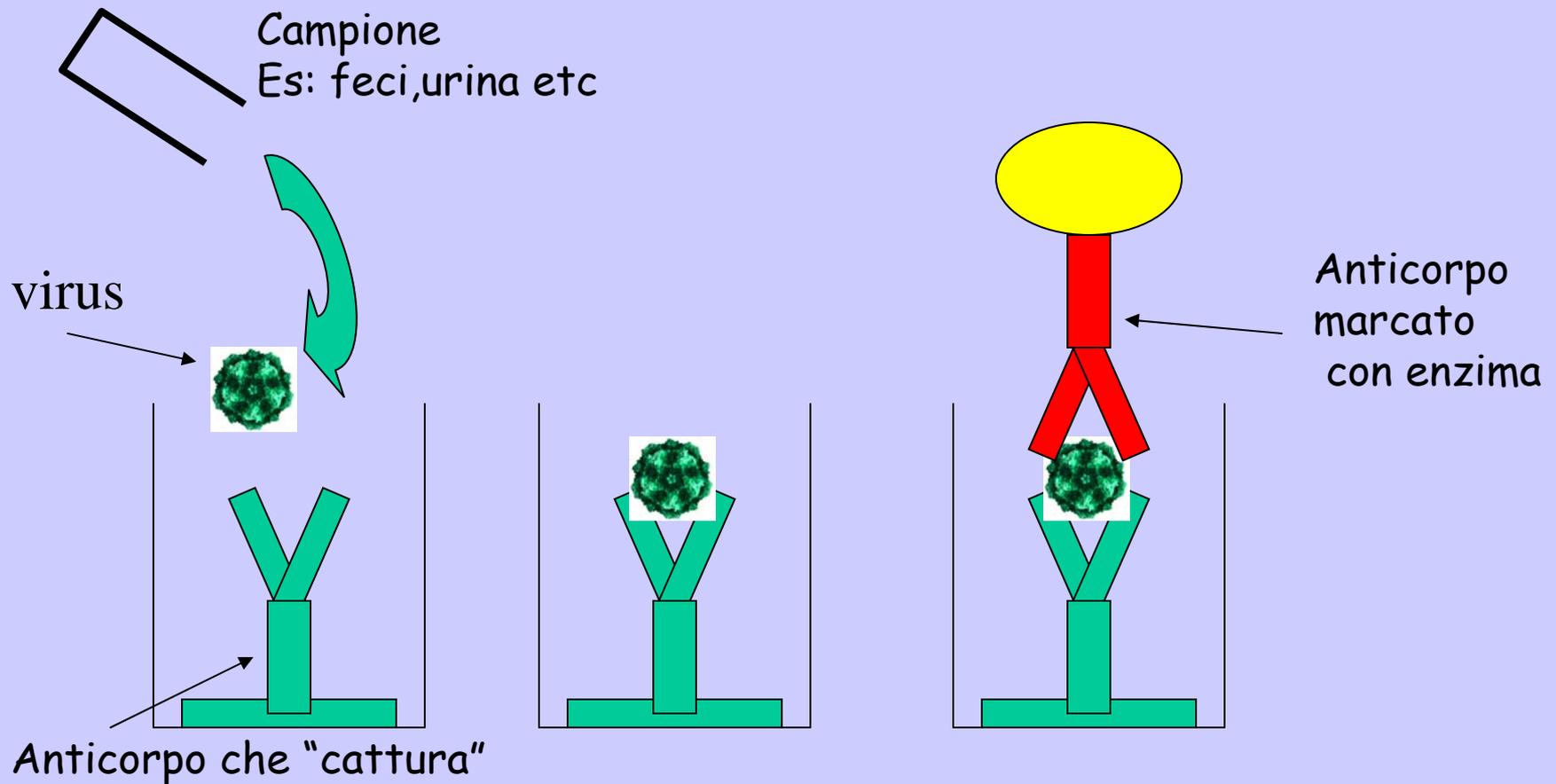
- Un virus, o antigeni di, è legato al supporto. Si ricerca nel siero l'anticorpo.
- Nel passaggio successivo si usano Ig anti-Ig umane marcate con perossidasi.





# A sandwich

- Un anticorpo commerciale è legato al supporto. Si ricerca nel campione il virus.
- Nel 3° passaggio si usano Ig anti B marcate con perossidasi.



# ELISA

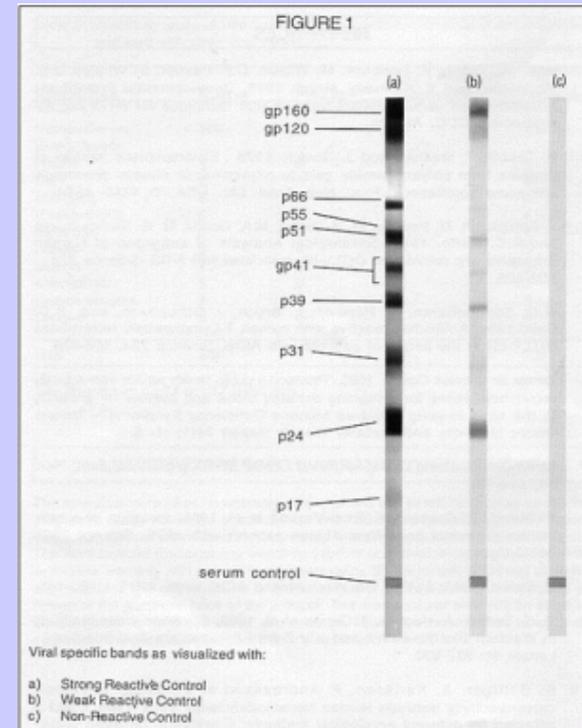


# WESTERN BLOT o IMMUNOBLOT

Test che misura la PRESENZA di anticorpi nel siero.  
Non è quantitativo.

E' utilizzato solo come test di conferma a causa del  
suo costo e/o laboriosità.

**CONSENTE LA VISUALIZZAZIONE DEI SINGOLI  
ANTIGENI CONTRO CUI E' RIVOLTA LA  
RISPOSTA ANTICORPALE**





# HCV RIBA

