

# Virologia

Elisa Nerli

26 maggio 2015

# Indice

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introduzione</b>                                | <b>5</b>  |
| <b>2</b> | <b>Morfologia e struttura</b>                      | <b>5</b>  |
| 2.1      | Classificazione dei virus . . . . .                | 6         |
| 2.1.1    | Involucro esterno . . . . .                        | 7         |
| 2.2      | Struttura del genoma . . . . .                     | 7         |
| 2.3      | Nomenclatura . . . . .                             | 7         |
| <b>3</b> | <b>Replicazione</b>                                | <b>7</b>  |
| 3.1      | Adsorbimento . . . . .                             | 8         |
| 3.2      | Penetrazione . . . . .                             | 9         |
| 3.3      | Uncoating . . . . .                                | 9         |
| 3.4      | Replicazione . . . . .                             | 9         |
| 3.5      | Assemblaggio . . . . .                             | 10        |
| 3.6      | Maturazione . . . . .                              | 10        |
| 3.7      | Classificazione di Baltimore . . . . .             | 11        |
| 3.8      | Cosa fa la cellula ospite? . . . . .               | 12        |
| 3.8.1    | Infezione produttiva . . . . .                     | 12        |
| 3.8.2    | Infezione abortiva . . . . .                       | 13        |
| <b>4</b> | <b>Trasformazione tumorale</b>                     | <b>13</b> |
| 4.1      | I protooncogeni . . . . .                          | 14        |
| 4.2      | Virus trasformanti ad RNA . . . . .                | 14        |
| 4.2.1    | Retrovirus trasformanti acuti . . . . .            | 14        |
| 4.2.2    | Retrovirus trasformanti cronici . . . . .          | 15        |
| 4.3      | Virus trasformanti a DNA . . . . .                 | 16        |
| <b>5</b> | <b>Infezione e malattia</b>                        | <b>16</b> |
| 5.1      | Vie di penetrazione . . . . .                      | 17        |
| 5.1.1    | Apparato respiratorio . . . . .                    | 18        |
| 5.1.2    | Apparato gastroenterico . . . . .                  | 18        |
| 5.1.3    | Tratto urogenitale . . . . .                       | 19        |
| 5.1.4    | Infezioni in gravidanza . . . . .                  | 19        |
| 5.1.5    | SNC . . . . .                                      | 19        |
| 5.1.6    | Cute . . . . .                                     | 20        |
| <b>6</b> | <b>Sistemi di difesa</b>                           | <b>21</b> |
| 6.1      | Immunità innata e adattativa . . . . .             | 22        |
| 6.2      | Evasione della sorveglianza immunologica . . . . . | 23        |
| 6.3      | Immunità passiva . . . . .                         | 24        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 6.4       | Immunità attiva . . . . .                 | 24        |
| 6.4.1     | Vaccini vivi ed attenuati . . . . .       | 24        |
| 6.4.2     | Vaccini inattivati . . . . .              | 25        |
| 6.4.3     | Controindicazioni e precauzioni . . . . . | 25        |
| 6.5       | Terapia . . . . .                         | 26        |
| <b>7</b>  | <b>Diagnosi di infezione</b>              | <b>26</b> |
| 7.1       | Metodi per l'analisi diretta . . . . .    | 26        |
| 7.1.1     | Microscopia elettronica . . . . .         | 27        |
| 7.1.2     | Isolamento virale . . . . .               | 27        |
| 7.1.3     | Rilevazione di antigeni virali . . . . .  | 28        |
| 7.1.4     | Detezione degli acidi nucleici . . . . .  | 28        |
| 7.2       | Metodi molecolari . . . . .               | 28        |
| <b>8</b>  | <b>Herpesvirus</b>                        | <b>28</b> |
| 8.1       | Replicazione . . . . .                    | 28        |
| 8.2       | Tipi di virus . . . . .                   | 29        |
| 8.3       | Herpes Simplex . . . . .                  | 30        |
| 8.3.1     | Patogenesi . . . . .                      | 30        |
| 8.3.2     | Diagnosi del virus . . . . .              | 31        |
| 8.4       | Varicella-zoster . . . . .                | 31        |
| 8.4.1     | Patogenesi . . . . .                      | 31        |
| 8.4.2     | Diagnosi . . . . .                        | 31        |
| 8.5       | Cytomegalovirus . . . . .                 | 32        |
| 8.5.1     | Patogenesi . . . . .                      | 32        |
| 8.6       | Epstein-Barr . . . . .                    | 32        |
| 8.6.1     | Patogenesi . . . . .                      | 32        |
| 8.7       | HErpersvirus 6-7-8 . . . . .              | 34        |
| <b>9</b>  | <b>Virus dell'epatite</b>                 | <b>34</b> |
| 9.1       | Virus dell'epatite A . . . . .            | 34        |
| 9.2       | Virus dell'epatite E . . . . .            | 35        |
| 9.3       | Virus dell'epatite B . . . . .            | 35        |
| 9.3.1     | Replicazione . . . . .                    | 36        |
| 9.3.2     | Segni clinici . . . . .                   | 36        |
| 9.4       | Virus dell'epatite D . . . . .            | 37        |
| 9.5       | Virus dell'epatite C . . . . .            | 37        |
| <b>10</b> | <b>HIV</b>                                | <b>39</b> |
| 10.1      | Diagnosi e trattamento . . . . .          | 41        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>11 Vettori virali e terapia genica</b>         | <b>41</b> |
| 11.1 Struttura di un vettore . . . . .            | 42        |
| 11.2 Gene editing . . . . .                       | 43        |
| 11.3 Replicazione di HIV: trial clinici . . . . . | 44        |
| 11.4 Riparazione di un gene . . . . .             | 45        |
| <b>12 Influenza virus</b>                         | <b>45</b> |
| 12.1 Farmacologia e diagnostica . . . . .         | 47        |
| 12.2 Paramixovirus . . . . .                      | 47        |
| 12.3 Classificazione . . . . .                    | 48        |
| 12.4 Virus del morbillo . . . . .                 | 48        |

## Todo list

(24.02.2015) Le slides sono su elearning.  
mauro.pistello@med.unipi.it

## 1 Introduzione

Un virus è un organismo *acellulare* il cui genoma consiste di un acido nucleico che obbligatoriamente replica all'interno della cellula ospite per formare un pool di particelle virali chiamate *virioni*.

Un virus differisce da una cellula in tre modi:

1. Ha un solo tipo di acido nucleico<sup>1</sup>
2. I virus contengono enzimi che non servono per produrre energia
3. Non hanno un macchinario enzimatico per la sintesi dei componenti macromolecolari

Le dimensioni dei virus sono molto più piccole delle cellule batteriche ed eucarioti (molti hanno dimensioni paragonabili agli anticorpi).

I Virus sono sempre stati associati a malattie: in greco virus significa veleno. Ci sono però tantissimi virus commensali, oppure che inducono benefici all'individuo prassitato.

Dal 1800 in poi si sono susseguiti esperimenti che hanno dimostrato la presenza di un qualcos'altro che prima non si conosceva. Nel 1911 Peter Rouss aveva notato che in alcuni pollami si sviluppavano sarcomi<sup>2</sup> con incidenza molto alta, in altri no. Evidentemente in quel pollaio c'era qualcosa di trasmissibile.

## 2 Morfologia e struttura

Il *virione* o particella virale definisce la particella fisica. Essa è costituita da un core, ovvero l'acido nucleico con proteine associate, che legano l'acido nucleico e lo compattano.

Il core è contenuto all'interno di un *capside*<sup>3</sup>, un involucro proteico le cui proteine sono state sintetizzate dall'informazione genetica del virus: esso

---

<sup>1</sup>che può essere profondamente diverso da quello eucariota

<sup>2</sup>tumore del connettivo

<sup>3</sup>I capsidi hanno forme diverse

contiene il core e lo protegge dall'ambiente esterno. Inoltre permette che l'acido nucleico si liberi nel punto esatto dove deve avvenire la replicazione.

I *capsomeri* costituiscono il capsido. Per nucleocapside si intende core + capsido.

I virus con solo capsido sono chiamati *virus nudi*. Quelli che invece presentano un ulteriore involucro sono *virus rivestiti*: l'involucro, detto *envelope*, è un doppio strato lipidico che il virus acquisisce fuoriuscendo dalla cellula. Questo fa acquisire modalità di interazione virus-ospite molto diverse.

Sulla superficie più esterna i virus, indipendentemente che siano nudi o meno, hanno dei *recettori virali*: proteine che protrudono dalla porzione più esterna, fondamentali per interagire con un recettore posto sull'ospite che viene usato dal virus per penetrare nelle cellule dell'ospite.

## 2.1 Classificazione dei virus

I virus *pleiomorfi* differiscono per la forma del capsido.

I virus devono essere piccoli e semplici da costruire, ma comunque molto raffinati. La maggior parte dei virus ha capsidi con simmetria *elicoidale* e con simmetria *icosaedrica*.

**Simmetria elicoidale** Vedi virus mosaico del tabacco.

Il genoma del virus è avvolto come se fosse una spirale, sul quale si inseriscono i capsomeri.

**Simmetria icosaedra** L'icosaedro è una soluzione per i virus per occupare poco spazio<sup>4</sup>. Tutte le facce sono costituite da capsomeri uguali che si assemblano. L'Adenovirus ha facce esagonali con pentoni (che tengono insieme più esagoni) dalle quali sporgono delle fimbrie.

Questi capsidi possono essere nudi o rivestiti. I virus con involucro esterno entrano nelle cellule con un meccanismo simile all'endocitosi: visto che questo processo deve avvenire rapidamente, il virus deve avere all'interno un'impalcatura rigida che permette di mantenere la forma. Questa è data dalle *proteine della matrice*, fondamentali perchè appena il virus entra nella cellula e si libera del capsido, esse si liberano e bloccano alcuni sistemi di difesa che la cellula ospite mette in atto.

---

<sup>4</sup>La cosa migliore sarebbe una sfera, ma è difficile da comporre

### 2.1.1 Involucro esterno

Esso conferisce varie proprietà:

- Diverse proprietà chimico fisiche
- Diversi meccanismi di interazione

I virus con involucro escono dalla cellula per *gemmazione*. La cellula infettata non muore per forza. I virus rivestiti sono più suscettibili a variazioni ambientali.

## 2.2 Struttura del genoma

(manca) Il genoma è circondato da proteine che ne riducono lo spazio e permettono di impaccarlo nel capsido.

## 2.3 Nomenclatura

Ci sono virus il cui nome deriva dalle malattie a cui sono associati: Poxvirus, morbillo.

Altri in cui il nome deriva dagli effetti citopatologici, da dove si trovano nell'organismo, dai posti in cui sono stati scoperti<sup>5</sup>, dalle persone che lo hanno scoperto, dalle caratteristiche biochimiche.

Abbiamo virus diversi che hanno nomi simili (vedi epatiti) e causano malattie completamente diverse, e virus che sono identici fra loro ma causano malattie diverse.

I virus sono organizzati in famiglie il cui suffisso è *-viridae*. Per famiglie più composite si parla di *sottofamiglie* e si usa il suffisso *-virinae*. All'interno della famiglia/sottofamiglie abbiamo i *generi*: *enterovirus*, *Poliovirus* (si mette virus alla fine).

## 3 Replicazione

La replicazione del virus differisce molto a seconda che esso sia a DNA, RNA, nudo ecc.

Si hanno varie fasi:

1. Adsorbimento : attacco sulla cellula grazie al recettore cellulare

---

<sup>5</sup>Epstein-Barr virus, della mononucleosi

2. Penetrazione : la modalità con cui penetra dipende dal fatto se sia rivestito e meno. Si ha anche il trasporto dell'acido nucleico ad opera del capsido per arrivare al punto giusto
3. Uncoating : Il genoma deve essere liberato dal capsido per essere decodificato (scapsidizzazione)
4. Replicazione del genoma : le vie differiscono molto a seconda che l'acido nucleico sia a DNA o ad RNA
5. Assemblaggio delle particelle virali
6. Rilascio delle particelle virali dalla cellula : diversi se si hanno virus nudi (lisi cellulare) o rivestiti (gemmazione)
7. Maturazione : le particelle virali grezze<sup>6</sup> rilasciate dalla cellula devono maturare. Delle proteasi virali tagliano i precursori proteici e fanno assumere alla particella la morfologia della particella virale matura

Un ciclo replicativo si distingue in due fasi:

1. Fase precoce : comprende dall'adsorbimento alla replicazione
2. Fase tardiva : dall'assemblaggio alla maturazione

(3.03.2015)

### 3.1 Adsorbimento

Per adsorbimento si intende il legame del recettore virale al recettore cellulare. I recettori possono essere proteine normali o glicosilate. Ogni virus utilizza il proprio recettore, che è uno solo<sup>7</sup>; è raro che virus di famiglie diverse usino lo stesso recettore.

Molti virus sfruttano il fatto di essersi legati agli anticorpi per entrare in cellule che hanno il recettore per FC.

Molti anticorpi vanno a legare i recettori virali per impedire che essi si associno al loro target (chiave, sul virus) ed entrino nella cellula: si dicono *anticorpi neutralizzanti*. Le chiavi, ovvero le proteine recettoriali, sono ben nascoste nel virus: ci sono ad esempio nel Poliovirus delle fossette nelle quali sono contenute queste chiavi. Queste fossette sono troppo piccole per far sì che gli anticorpi vi entrino.

---

<sup>6</sup>Le particelle immature non sono infettanti

<sup>7</sup>Gli herpes virus e i virus del vaiolo invece hanno più recettori e riescono ad infettare un ampio range di cellule



Il virus HIV sfrutta meccanismi diversi: ha un envelope di proteine gp120 e gp41. Per entrare, utilizza più proteine recettoriali. In un primo momento si ha l'incontro col CD4 : avvengono modifiche conformazionali della proteina gp120 per aumentare l'affinità di legame con CD4 e per legare il corecettore sulla cellula ospite. Quando c'è il contatto con il secondo recettore, la chiave esce e avviene il riconoscimento. La chiave quindi è interna e viene eposta al momento giusto: l'interazione è così rapida che non c'è modo di bloccarla.

### 3.2 Penetrazione

I virus nudi entrano con un meccanismo assimilabile al processo di endocitosi: il virus lega il recettore della cellula ospite e questo legame crea un'invaginazione della membrana e il virione viene racchiuso in una vescicola.

Per i virus rivestiti si ha un meccanismo di  *fusione*  con la membrana plasmatica tramite legame a un recettore di membrana della cellula ospite.

### 3.3 Uncoating

Il capsido deve viaggiare all'interno della cellula e difendersi da attacchi della cellula, per portare il genoma virale nel punto in cui deve esserci espressione genica e replicazione del genoma virale. A quel punto il capsido si disgrega per liberare il genoma virale.

Gli Herpes virus si replicano a livello nucleare perchè hanno genoma a dsDNA. Esso attraversa il citoplasma sfruttando corridoi di tubulina e a livello della membrana nucleare il capsido si disorganizza, ad opera di proteasi virali ma spesso anche di proteine cellulari.

I virus che replicano nel citoplasma sono quelli ad RNA: la disgregazione del capsido inizia subito dopo l'entrata nella cellula.

Il genoma del virus viene quindi liberato nella cellula.

### 3.4 Replicazione

Nel nucleo se il virus è a DNA, nel citoplasma se è ad RNA<sup>8</sup>. È un meccanismo ordinato dal punto di vista spaziale e terminale.

- Geni precoci : codificano per proteine che servono per la replicazione e che il virus non trova nella cellula (DNA Pol e RNA Pol che funzionano in modo diverso da quelle cellulari)<sup>9</sup>. Sono geni regolatori. Una volta

---

<sup>8</sup>Ci sono alcune eccezioni

<sup>9</sup>Sono proteine NON strutturali

espressi, si ha una regolazione a feedback negativo: vengono spenti una volta prodotte le proteine

- Geni che codificano per le proteine strutturali
- Geni per la replicazione del genoma

Alla fine tutto converge in un punto nel quale abbiamo l'assemblaggio.

### 3.5 Assemblaggio

Si forma il guscio, che è ancora aperto e consente l'ingresso del genoma virale.

Vi sono proteine presenti nell'apertura del guscio che sono in grado di riconoscere i segnali di inizio e di fine del genoma. Ogni capsida virale, dopo la replicazione, contiene una copia di genoma virale. Siamo sempre all'interno della cellula! Il virus deve fuoriuscire e ci sono 2 meccanismi:

1. Virus nudi : escono per *lisi* cellulare
2. Virus rivestiti : non implica la morte della cellula, si ha una *gemma-zione*. Normalmente essi assemblano in prossimità di una membrana, dove convergono tutti i costituenti della particella virale. Tutte queste componenti vanno a formare il capsida, il quale spinge verso l'esterno, si forma la gemma. L'involucro esterno quindi si richiude e ciò provoca il distacco della particella. Il recettore virale è presente sulla superficie esterna dell'involucro, e quindi le proteine che costituiscono la chiave saranno inserite nella membrana cellulare<sup>10</sup> alla quale il virus si porta in prossimità<sup>11</sup>

Le membrane sono ricche di proteine cellulari, che vengono in questo caso allontanate in modo che il virus abbia solo proteine virali sul suo capsida. Man a mano che il capsida va assemblandosi, si assemblano anche le proteine della matrice che fanno da impalcatura.

### 3.6 Maturazione

HIV si organizza, si assembla in prossimità della membrana plasmatica. La particella virale immatura esce all'esterno della cellula : segue una serie di

---

<sup>10</sup>esse sono inserite un po' dappertutto, ma si raccolgono in quel punto preciso

<sup>11</sup>Le proteine recettoriali virali sono prodotte nella fase tardiva e solo quando il virus ha una replicazione produttiva

interventi da parte di proteasi virali che tagliano i precursori virali fino all'assunzione della forma e della conformazione definitiva di particella matura. Se questo non avviene, la particella non è infettante.

Il blocco della maturazione è il target principale dell'attuale farmacologia virale.

### 3.7 Classificazione di Baltimore

Suddivide i virus per come replicano a seconda del genoma che hanno:

- Classe I : virus *double-stranded DNA*. Essi replicano nel *nucleo*. Un esempio sono gli Herpes virus. Entrano a livello del nucleo, il genoma circularizza e viene riconosciuto dall'RNA Pol<sup>12</sup>; produce geni precoci ed indipendentemente dallo stato di salute del virus o della cellula, sceglie di persistere in condizione latente o di esprimere geni precoci per un'infezione produttiva
- Classe II : *single-stranded DNA*, a polarità + o -. L'espressione dei geni virali può avvenire solo in presenza di un DNA a doppia catena: il virus porta al proprio interno un DNA Pol virale, la quale fa sì che il genoma del virus venga prodotto come un DNA a doppia catena (a quel punto avviene la sintesi)
- Classe III : *double-stranded RNA*. Servono delle RNA Pol RNA dipendenti, che però non si trovano nelle cellule ospite, quindi il virus se le porta. Questa RNA Pol sarà sintetizzata nelle fasi tardive: essa comincerà ad esprimere i vari geni del virus e alcuni messaggeri prodotti saranno utilizzati per sintetizzare il filamento complementare → nuove copie di genoma. La sintesi proteica avviene in modo distinto
- Classe IV : *single-stranded (+) sense RNA*. Ha la funzione di messaggero, quindi viene immediatamente tradotta in un'unica poliproteina, che viene tagliata da proteasi cellulari: uno dei tagli produrrà la proteina RNA Pol che prenderà lo stesso filamento per dare origine ad un intermedio di replicazione, un RNA (-) usato sempre dalla polimerasi per produrre RNA a polarità +
- Classe V : *single-stranded (-) sense RNA*. Stessa cosa di quello precedente

---

<sup>12</sup>La DNA Pol è prodotta nelle fasi precoci o intermedie, in modo da arrivare alla sintesi delle proteine con l'acido nucleico già replicato

- Classe VI : *single-stranded (+) sense RNA with DNA intermediate*. Sono i *retrovirus*. Il virus, una volta entrato nel nucleo, vede il genoma ad RNA convertito in dsDNA da parte della trascrittasi inversa, una DNA pol RNA dipendente. Il dsDNA viene veicolato all'interno del nucleo e integrato nel genoma della cellula. L'integrazione è mediata dall'enzima *integrasi* che il virus porta all'interno della cellula
- Classe VII : *double-stranded DNA with RNA intermediate*. Sono ad esempio i virus dell'epatite. Il dsDNA entra nel nucleo e produce degli RNA (o li fa produrre alle RNA pol cellulari). Uno di questi viene integrato all'interno della particella virale perchè *rappresenta l'intero genoma*: una volta incorporato nella particella virale matura, la DNA pol virale converte l'RNA in DNA

### 3.8 Cosa fa la cellula ospite?

Con l'entrata di una particella virale si ha un'*infezione produttiva* o citolitica, perchè porta sempre a morte della cellula (anche sul lungo periodo). Per fortuna questo tipo di infezione non è comune.

L'infezione è spesso *abortiva* per cui il virus viene bloccato ed eliminato dalla cellula ospite.

Abbiamo poi una serie di vie intermedie:

- Infezione persistente *attiva*, in cui il virus è all'interno della cellula e produce particelle virali, ma non in modo invasivo. La cellula va incontro a morte naturale, quindi non a livello di replicazione virale<sup>13</sup>. Oppure si può arrivare ad un equilibrio tra le cellule che muoiono e quelle che si rigenerano. L'infezione può essere *latente*: il virus persiste all'intero della cellula, ma senza replicarsi
- Infezione trasformante : il virus inizia a replicare, ma non riesce a terminare o perchè la cellula si difende, o perchè ci sono modificazioni. Nella maggior parte dei casi la cellula si trasforma e diventa *tumorale*. Il 20 % dei tumori deriva proprio da ciò.

#### 3.8.1 Infezione produttiva

I danni che la cellula assume si dicono *effetti citopatici* CPE. Essi includono:

- Formazione di corpi di inclusione all'interno di una cellula

---

<sup>13</sup>che deperirebbe la cellula

- Cambiamenti morfologici
- Sincizi : tipici dei virus con involucro. Una cellula infetta espone i recettori virali; una cellula adiacente sana espone i recettori cellulari; esse possono fondere le loro membrane, mimando l'internalizzazione del virus. Se ciò va avanti, si formano dei sincizi. I nuclei delle cellule vengono spinti all'esternità in modo che all'interno il virus possa replicarsi quanto vuole → cellule giganti multinucleate

(10-03-2015)

### 3.8.2 Infezione abortiva

Ci sono fattori antivirali intrinseci che le cellule hanno evoluto. La cellula mette blocchi a valle o a livello dell'entrata del virus, quindi esso viene allontanato.

## 4 Trasformazione tumorale

Avviene attraverso vari passaggi. Il *carcinoma* è un tumore degli epitelii ed implica una trasformazione delle cellule epiteliali. Il *sarcoma* è un tumore del connettivo.

Si verifica casualmente una trasformazione in un gene: le cellule morfologicamente sono indistinguibili da quelle normali, ma iniziano a proliferare. Con la proliferazione aumenta la probabilità di avere una seconda modificazione. *Promozione* : le cellule iniziano a proliferare e a crescere come vogliono: si parla di *displasia*, ovvero un tumore benigno. Più le cellule replicano, più è probabile che ci siano altre mutazioni e che la displasia diventi un *carcinoma* con caratteristiche di *metastasi*<sup>14</sup>.

Il virus può contenere in sé il messaggio completo per la trasformazione o intervenire nei processi di trasformazione.

Le mutazioni a carico di un *proto-oncogene*<sup>15</sup> sono dominanti. I geni *onco-soppressori* vanno a riparare danni dovuti alla replicazione di DNA. Mutazioni non corrette portano ad una trasformazione della cellula, ma non per meccanismo diretto; queste mutazioni sono recessive.

I virus ad RNA (retrovirus) agiscono sugli acceleratori della replicazione, ovvero i proto-oncogeni. I virus a DNA invece agiscono sugli onco-soppressori, che frenano il ciclo replicativo.

---

<sup>14</sup>entrano in circolo

<sup>15</sup>Se modificati diventano oncogeni

## 4.1 I protooncogeni

Portano uno stimolo alla replicazione cellulare, la quale è controllata da fattori di crescita che stimolano la cellula: il fattore di crescita extracellulare si lega al recettore sulla cellula epiteliale, il legame fa sì che il recettore cambi conformazione (fosforilato/defosforilato). Questo cambio di conformazione fa sì che la cellula inizi a replicarsi.

Questo segnale viene portato da una serie di staffette<sup>16</sup> fino al nucleo, dove ci sono fattori di trascrizione che avviano la replicazione. È un *sistema dinamico*. Una mutazione nel recettore che lo lascia attivo segnala a valle che il fattore di crescita è sempre legato, anche se non è così: si ha una continua replicazione.

## 4.2 Virus trasformanti ad RNA

Si riscontrano due categorie:

- Virus acutamente trasformanti : possono causare tumori velocemente, da 2 a poche settimane. In qualsiasi cellula entrino, quella si trasforma. Sono così efficienti perché portano un oncogene all'interno della cellula. L'alta efficienza di trasformazione avviene sia in vitro che in vivo
- Virus trasformanti cronici (slowly transforming) : causano tumori con un tempo di latenza più lungo, perché non portano oncogeni ma creano le premesse affinché i proto-oncogeni cellulari si possano modificare. Efficienza di trasformazione più bassa perché devono crearsi le premesse affinché interagiscano con il proto-oncogene.

### 4.2.1 Retrovirus trasformanti acuti

Portano un oncogene all'interno della cellula. Il genoma del retrovirus è formato da 3 geni:

- GAG : ha a che fare con la costruzione del capsid
- Pol : codifica per gli enzimi replicativi (trascrittasi inversa, integrasi ecc)
- Env : glicoproteine virali

Questi tre geni sono governati da sequenze terminali LTR<sup>17</sup>, che sono promotori forti.

---

<sup>16</sup>messaggeri intermedi, in particolare trasduttori di segnale

<sup>17</sup>Long Terminal Repeats

Essi incorporano un proto-oncogene (di natura cellulare) a scapito di una porzione di genoma virale di eguali dimensioni: essi sono difettivi dell'informazione virale completa. In natura si trasmettono per *complementazione*, che avviene in conseguenza del fatto che qualsiasi cellula al mondo è ricca di *retrovirus endogeni*<sup>18</sup>. La complementazione avviene tra due virus simili.

Questi virus sono tutti difettivi, tranne il Sarcoma di Rous, che porta l'oncogene *src* a valle di Env.

I V-onc, gli oncogeni virali, non contengono introni, sono porzioni del gene cellulare che danno origine a proteine tronche, ma comunque sufficienti per dare trasformazione. Per questi virus non è importante il sito di integrazione.

#### 4.2.2 Retrovirus trasformanti cronici

Ad ogni replicazione integrano il loro genoma all'interno del genoma cellulare e se ciò avviene vicino ad un proto-oncogene cellulare, e questo è alterato nella sua normale espressione a causa dell'integrazione, abbiamo trasformazione. Il meccanismo non è quindi diretto. La probabilità di trasformazione è  $1/10^6$ .

Per la trascrizione, alla fine di env c'è un segnale di stop LTR: se questo non viene visto o si perde, si ha un messaggero aberrante che dà origine ad una proteina in parte virale ed in parte cellulare. Oppure si può avere che l'LTR di stop, essendo un promotore forte rispetto a quello cellulare, inizi a trascrivere (l'effetto può essere a monte o a valle).

In alcuni casi l'integrazione può avvenire *all'interno* di un proto-oncogene. Per questi virus è importantissimo il sito di integrazione.

Sembra che l'integrazione dei retrovirus avvenga in maniera random. In realtà essi integrano preferibilmente nelle regioni di *eucromatina*, ovvero in zone trascrizionalmente attive.

**HIV** tende ad integrarsi lontano dai promotori cellulari: i suoi LTR hanno un'attività basale di espressione molto bassa, che viene aumentata da una proteina, *tat* prodotta da HIV stesso quando sente il bisogno di replicare.

C'è un terzo sistema di trasformazione per i retrovirus trasformanti: il virus HTLV-1 sviluppa tumori molto aggressivi, è poco diffuso (più che altro nel sud-est asiatico e Giappone). Ha un ciclo di trasformazione simile ad HIV: hanno come cellule target i *linfociti T*. Hanno i 3 geni classici gag, pol ed env, ma anche altri geni che troviamo in HIV e che regolano il ciclo replicativo, come *tax*, omologa di TAT in HIV: sono prodotte quando c'è bisogno di

---

<sup>18</sup>Circa il 10 % delle nostre sequenze è di origine retrovirale

replicare. *tax* è una proteina trans-attivante, ovvero si lega ad una regione specifica dell'LTR (tax responsive element) → inizio trascrizione geni virali.

Tax è una proteina trans-attivante, perchè oltre ad attivare la trascrizione dei geni virali, stimola quelli cellulari che codificano per IL-2 ed i recettori per IL-2 (IL-2R). IL-2 è un fattore di crescita per i linfociti T.

### 4.3 Virus trasformanti a DNA

Agiscono sui frenatori della replicazione cellulare, gli oncosoppressori, che inducono apoptosi se la cellula ha problemi → ciò dà fastidio al virus. Il virus quindi blocca questi geni nelle fasi precoci di infezione grazie a proteine. Sono tumori a lento decorso: le mutazioni normalmente corrette dagli oncosoppressori possono accumularsi.

Il blocco degli oncosoppressori avviene in 3 modi:

- Proteine legano la P53, la sequestrano ed essa non riesce più ad agire
- Proteine che stimolano l'ubiquitinazione della P53 → degradazione nel proteosoma
- Altre proteine si legano al complesso P53-proteina virale, e lo degradano

## 5 Infezione e malattia

Nella maggior parte dei casi, un'infezione virale è persistente e può avvenire sia che l'infezione sia asintomatica che sintomatica. Il recupero dopo la convalescenza non comporta che l'infezione sia risolta<sup>19</sup>: si parla di *infezione latente*, c'è ma non riusciamo a trovarla.

In altri casi invece si ha un'infezione latente *cronica*: il virus continua a replicare.

Le infezioni persistenti (e latenti) si possono istaurare attraverso vari piani: per la varicella, la prima infezione dà la malattia, poi il virus non viene eliminato; se si riattiva abbiamo una ripresa della replicazione del virus e ci dà la malattia del fuoco di Sant'Antonio (zoster).

Le infezioni croniche: come l'epatite B, permangono nell'ospite.

Alla malattia spesso concorrono sia il patogeno che l'ospite, tramite il suo sistema immunitario.

Per molte infezioni la malattia è più associata alle classi più estreme d'età dell'ospite: virus respiratori classici, presenti normalmente nell'ambiente,

---

<sup>19</sup>per questo si dice persistente



sviluppano nei bambini sintomi più importanti che negli adulti, nei quali non danno alcun sintomo.

(17.03.2015)

## 5.1 Vie di penetrazione

Ogni virus utilizza una particolare porta di ingresso e solo quella.

La porta di ingresso più utilizzata è l'*apparato respiratorio*. Solo alcuni dei virus contratti per via respiratoria danno un'infezione che si conclude in quel distretto: essi poi vanno ad infettare altri organi.

La seconda è il *tratto gastroenterico*: questa infezione è molto legata alle condizioni igienico-sanitarie.

La terza è il *tratto urogenitale*: mentre i batteri colonizzano il tratto urinario, i virus si trasmettono sessualmente.

La quarta sono le *mucose esposte*. La pelle invece è difficilmente attraversata dai virus, ma alcuni virus infettano la *cute*, dove ci sono microferite e microtraumi che consentono ai virus di entrare negli strati profondi. Il fine ultimo è introdurre il virus nel circolo ematico.

Abbiamo anche delle vie *percutanee* che sono graffi, ferite, punture, piercing, tatuaggi ecc.

La trasmissione con *artropodi*, che qui era una rarità, adesso sta iniziando a diffondersi.

Indipendentemente dal punto di ingresso, i virus hanno una replicazione a livello del *sito di ingresso* per qualche giorno. Dopo ci sono 2 possibili andamenti:

1. Infezione locale : influenza, raffreddore, papilloma virus delle verruche
2. Infezione che di solito entra a livello di un capillare linfatico: il virus come particella libera da qui va in un linfonodo ed entra nel circolo ematico. È la modalità più comune, anche se a volte entra nel circolo sanguigno quando l'infezione è in prossimità di un capillare sanguigno

La varicella, caratterizzata dalla comparsa di vescicole (esantema), viene contratta per via respiratoria. Il virus, dopo 3 giorni, entra in circolo: si ha una *viremia primaria* (c'è ancora poco virus in circolo), poi il virus si eclissa perchè incontra gli organi del sistema reticolo endoteliale, nei quali entra ed inizia a replicare. Lì trovano le cellule endoteliali, suscettibili di infezione: il virus inizia una seconda e massiccia fase replicativa. All'ottavo/decimo giorno si ha una *viremia secondaria*: il virus raggiunge l'organo bersaglio. Se ciò non avviene, non si ha malattia.

Quando in virus arriva ai primi organi, si hanno i *prodomi*, sintomi specifici di reazione ad un processo infiammatorio. L'impedimento dell'organismo del raggiungimento dell'organi bersaglio da parte del virus dipende dal fatto che il soggetto abbia sviluppato una risposta immunitaria in grado di contenere l'infezione.

### 5.1.1 Apparato respiratorio

L'infezione è tanto più grave quanto profonda è. Il virus del raffreddore, o meglio i virus, hanno il massimo della replicazione nelle vie aeree superiori, e si replicano bene ad una temperatura adattata a quella delle cellule delle vie aeree superiori, quindi un po' meno di 37 °C.

I virus della *parainfluenza* possono provocare infezione sia nelle vie aeree superiori che in quelle profonde, dove provocano ispessimento del tessuto dei bronchioli.

Questi virus respiratori danno sintomi respiratori, ma altri no. Quali sono questi sintomi? Mal di gola, muco, tosse. Il nostro apparato respiratorio è costituito da cellule con ciglia vibratili, che spingono il muco prodotto da altre cellule verso l'alto: il muco o evapora o viene deglutito. Se i virus entrano nelle cellule, per prima cosa bloccano il movimento cigliato. Questi sono virus litici: questa lisi spinge la risposta dell'ospite. Si possono verificare però delle situazioni in cui alcuni batteri che fanno parte della nostra flora microbica iniziano a replicarsi troppo a causa delle condizioni dell'ospite: in questo caso, quando le cellule infettate vengono eliminate, la membrana basale resta scoperta → infezioni secondarie o opportunistiche da parte di batteri commensali.

### 5.1.2 Apparato gastroenterico

Poco diffuse in Italia, anche se alcuni virus si trasmettono con l'acqua (Rotavirus, Giardia, Adenovirus).

**Rotavirus** a livello della mucosa intestinale infettano le cellule presenti nella porzione apicale dei *microvilli*. Questi virus citolitici infettano la porzione più esterna e uccidono quelle cellule: l'uccisione è ulteriormente provocata dalla reazione del nostro organismo, che recluta monociti, fagociti ed altre molecole le quali contribuiscono all'uccisione delle cellule infette. I microvilli quindi si accorciano: ciò riduce la superficie esposta agli alimenti, inoltre vengono uccise cellule specializzate per l'assorbimento. Sali, acqua e zucchero si accumulano nel lume intestinale → diarrea<sup>20</sup>.

---

<sup>20</sup>la dissenteria si ha quando c'è anche sangue

### 5.1.3 Tratto urogenitale

Possiamo avere infezioni che si concludono a livello locale ed altre il cui organo bersaglio è distante dal sito di infezione. Il *Papilloma virus* è il virus più trasmesso sessualmente: solo il 10 % di queste infezioni sono sintomatiche (es verruche genitali, condilomi). La seconda è l'infezione erpetica, sostenuta da *Herpes simplex 1 e 2*: si ha infezione da herpes genitale, che però nella maggior parte dei casi è silente. Queste sono infezioni tipicamente locali.

Per altri virus si ha trasmissione sessuale, anche se non è il metodo privilegiato: HIV, epatite C. Tutti i virus che danno viremia<sup>21</sup> possono essere trasmessi per via sessuale.

### 5.1.4 Infezioni in gravidanza

Ci sono 3 vie di trasmissione:

1. Infezione congenita: si verifica con passaggio diretto del patogeno dalla madre al feto. Avviene durante la fase di gestazione ed è una via di *trasmissione verticale*
2. Infezione perinatale: si manifesta alla nascita, durante il passaggio del bambino dal canale vaginale. Se la madre ha un'infezione lì, il bambino può contrarla: il papilloma virus ad esempio può essere inalato dal bambino. Alcuni batteri invece passano nel canale vaginale durante il parto tramite il retto. Questa è un tipo di trasmissione *orizzontale*
3. Infezione post-natale: anche qui si ha trasmissione orizzontale con allattamento ecc

Se l'infezione è trasmessa durante i primi 2 mesi di gestazione, si ha aborto spontaneo. Se invece sono nell'ultimo trimestre di gravidanza, si hanno danni ma che non sono incompatibili con la vita.

I virus che danno viremia costante o infezione cronica possono essere trasmessi in qualsiasi momento della gravidanza al feto.

Per alcune malattie trasmissibili durante il parto, si ricorre al taglio cesareo.

### 5.1.5 SNC

È separato dall'organismo dalla *barreira ematoencefalica*, costituita da elementi che filtrano tutto quello che è contenuto nel sangue. Molti virus raggiungono il SNC in tre modi:

---

<sup>21</sup>presenti cioè nel sangue

- Via neurale : entrare nel SNC dalla periferia e risalire. È utilizzata da molti virus, come i virus erpetici, che vedono spesso una ripresa dell'infezione che si manifesta in punti diversi rispetto al sito iniziale della replicazione: ciò avviene in maniera centrifuga o centripeta
- Via olfattiva: coinvolgimento del SNC, che viene raggiunto facilmente. Pochi virus fanno ciò
- Via che prevede l'attraversamento della barriera ematoencefalica: essa è costituita da una trama fitta di cellule. Alcuni virus riescono a passarla. Il SNC è molto irrorato: i capillari sono circondati da una trama di cellule, ma i virus penetrano attraverso 2 vie:
  1. Come particelle virali libere
  2. Utilizzando cellule che hanno un facile accesso al SNC, che sono i macrofagi, con un sistema detto *cavallo di troia*

(24.03.2015)

### 5.1.6 Cute

I due settori principali sono *epidermide* e *derma*. L'epidermide non contiene cellule effettrici della risposta immunitaria, ma il derma sì: contiene macrofagi, dendriti, capillari ecc.

La cute è uno strato refrattario alla replicazione di tutti i virus, tranne alcuni che riescono a raggiungere lo strato sottostante dell'epidermide tramite lesioni intracutanee. I Papilloma virus riescono a proliferare (verruche). Nella maggior parte dei casi i virus arrivano trasportati dalla circolazione sanguigna:

- Come particelle virali libere
- Come particelle circondate da anticorpi : immunocomplessi

La deposizione della particella virale nel derma fa scatenare un processo infiammatorio, che comincia a richiamare effettori della risposta immunitaria. Nei pressi di questi virus abbiamo la comparsa di *esantemi*<sup>22</sup>. Un *aspetto maculare* indica un processo infiammatorio a livello del derma: orticaria, allergeni, qui il virus è circondato da immunocomplessi. Accanto al rossore si sviluppa anche un rigonfiamento. Abbiamo quindi macule che evolvono in *papule* a causa di questo ampliamento dell'infezione. Molti esantemi sono

---

<sup>22</sup>arrossamento

di tipo maculo-papulari. Questi esantemi, se il virus non replica, tendono a scomparire.

Se il virus invece replica, il processo infettivo va avanti e il virus replicando causa la morte delle cellule in cui replica: si forma essudato e vescicole, le quali possono rompersi e provocare ulcere. Un esantema vescicolare è quindi dovuto ad un'azione diretta del virus nelle cellule a livello del derma. Tante malattie esantematiche dell'infanzia hanno esantema maculo-papulare.

Le lesioni in cui si hanno immunocomplessi non sono infettate. Questi immunocomplessi che circolano possono depositarsi anche altrove: ad esempio, *coxsiachievirus 19* si deposita nelle articolazioni.

Abbiamo quindi pochissimi virus che raggiungono la cute dall'esterno e moltissimi virus che sono trasportati dall'interno e provocano un'infezione a livello del derma.

## 6 Sistemi di difesa

A vari livelli:

- Cellulare
- Organismo: innata, adattativa, la quale produce memoria immunologica

A livello cellulare, ad ogni punto del processo replicativo ci sono elementi di difesa che le cellule hanno introdotto e che sono specifici per il virus che arriva. Per HIV, ci sono proteine prodotte che prevengono la scapsidizzazione, oppure che portano il capsido in un punto lontano rispetto a quello verso cui il capsido è diretto. Ci sono sistemi di difesa che introducono mutazioni a livello del genoma virale per cui si producono delle proteine aberranti.

Vi sono molti microRNA o siRNA che riconoscono in modo specifico molti messaggeri virali e li portano a degradazione.

Uno dei sistemi più utilizzato contro molti virus, potenziato da farmaci antiinfluenzali, è mediante i complessi delle *teterine*: i virus restano attaccati alla cellula nella loro fuoriuscita in questo modo non vanno ad infettare altre cellule. Queste teterine sono presenti sulla membrana esterna della cellula, legano il capsido virale e lo trattengono.

Anche il *sintema interferon* (interferone) è usato da moltissimo tempo: è un complesso di proteine che vengono prodotte a seguito del riconoscimento di uno stato di infezione da parte della cellula, ad esempio perchè trova materiale che normalmente non c'è. I virus ad RNA si trovano ad uno stadio

di doppia catena durante il proprio ciclo replicativo: questo non c'è fisiologicamente nella cellula, quindi gli interferoni vengono prodotti a seguito del riconoscimento di queste molecole estranee.

**Interferoni** Gli interferoni più importanti in ambito virologico sono:

- Interferoni  $\alpha$
- Interferoni  $\beta$
- Interferoni  $\gamma$

Qualsiasi cellula che viene infettata ha la capacità di produrre interferoni.  $\alpha$  e  $\beta$  sono prodotti da tutte le cellule, il  $\gamma$  solo dalle cellule T. I primi due stanno nell'immunità innata, il  $\gamma$  nell'immunità adattativa.  $\alpha$  e  $\beta$  sono prodotti in seguito al riconoscimento di un pattern non self, come un RNA a doppia catena, mentre il  $\gamma$  viene prodotto dopo il riconoscimento dell'antigene. Essi hanno meccanismi di azione diversi:  $\alpha$  e  $\beta$  hanno una potente azione antivirale, agiscono all'interno della cellula che li ha prodotti, mentre  $\gamma$  potenzia la risposta immune contro quell'antigene.

IFN  $\alpha/\beta$  hanno azione antivirale sia all'interno della cellula stessa sia nelle cellule circostanti la cellula infetta. Vengono prodotte delle chinasi proteiche che eliminano alcune componenti di base della sintesi proteica cellulare, oltre a oligoadenilato sintetasi, che portano alla degradazione dell'mRNA virale. Questi IFN avvisano le cellule circostanti che c'è un'infezione in atto. I legami di questi interferoni sul recettore esterno creano uno stato di refrattarietà all'infezione che dura da poche ore a 2 giorni.

**Cellule NK** Riconoscono le proteine virali che il virus espone sulla sua superficie ed eliminano la cellula.

## 6.1 Immunità innata e adattativa

Una delle barriere esterne più importanti è proprio la cute. A livello delle vie aeree profonde abbiamo dei macrofagi alveolari. Nello stomaco il pH acido compromette la sopravvivenza di molti virus.

Nelle mucose abbiamo una flora microbica che costituisce un'importante difesa contro gli agenti esterni.

L'attività fagocitaria di neutrofilo e macrofago comporta l'attivazione del processo infiammatorio, che allerta il sistema immunitario, e l'attivazione di una risposta immunitaria disegnata per quel particolare virus.

**Opsonizzazione** facilita la fagocitosi di particelle virali e batteri.

**Agglutinazione** reticolo che si forma tra anticorpi e particelle virali

**Neutralizzazione** anticorpi ad attività neutralizzante promossi contro il virus, si legano alla porzione del recettore virale che impedisce l'interazione con il recettore cellulare. Un anticorpo neutralizzante è quindi in grado di impedire che il virus entri nella cellula.

**Citotossicità** mediata da anticorpi, si dirige contro le cellule infette, non contro le particelle libere. L'anticorpo che è stato prodotto lega una proteina virale presente sulla cellula infetta e ciò permette il legame di cellule ad attività citotossica a questo anticorpo → uccisione della cellula: attività citotossica anticorpo mediata.

**Anticorpi fissanti il complemento** sono IgM, anticorpi a struttura pentamerica, utile per attaccare la molecola C1q, che comporta l'attivazione del complemento. In alcuni casi anche le IgG possono attivare il complemento.

## 6.2 Evasione della sorveglianza immunologica

Esistono sistemi che permettono al virus di scansare l'immunità:

- Variazione antigenica, che si esplica a tutti i livelli
- Ristretta espressione genica, come quando il virus entra in latenza: la cellula dall'esterno non viene vista perchè dormiente
- Down-regulation della produzione di MHC di classe I, che compromette la presentazione dell'antigene
- Ridotta l'espressione di proteine ad attività *costimolatoria*
- Alcuni virus persistono ed infettano siti nei quali il sistema immunitario ha un difficile accesso, come il sistema nervoso
- Infezione delle cellule del sistema immunitario. HIV infetta i linfociti CD4+
- Mimetismo antigenico: si induce uno stato di tolleranza immunologica

(31.03.2015)

Immunità attiva → con vaccinazione.

Immunità passiva → somministrazione di Ig dirette contro un determinato patogeno. È temporanea.

### 6.3 Immunità passiva

Post-espositiva. Le Ig non sono proprie dell'individuo e l'organismo attua una risposta immunitaria. Si utilizza quando c'è un'infezione e non siamo stati vaccinati (ambito *post-espositivo*). Anche se devo andare in un posto dove ad esempio c'è epatite B e non ho il tempo di vaccinarmi.

Per epatite B e rabbia vengono somministrati anticorpi e poi si parte con la vaccinazione, in modo tale che quando la protezione delle ig esterne si esaurisce, il vaccino ha già iniziato a dare una risposta.

C'è anche un'*immunità passiva naturale*, data dalla madre al feto mediante l'allattamento.

### 6.4 Immunità attiva

Ci sono 2 tipi di vaccini:

- Vaccini vivi e attenuati : dà infezione senza causare malattia, ma stimola comunque il sistema immunitario evocando una risposta immunitaria simile a quella naturale
- Vaccini inattivati : non replicano, meno efficaci dei vivi ed attenuati. Per produrre un livello di risposta immune protettiva servono 3-5 dosi: la risposta è principalmente di tipo umorale

Un vaccino inattivato produce una risposta di tipo umorale, mentre un vaccino attenuato evoca una risposta cellulo-mediata.

#### 6.4.1 Vaccini vivi ed attenuati

Morbillo, parotite, rosolia, varicella. Questi microrganismi devono essere trattati in modo da mantenere la capacità replicativa ma perdere la patogenicità.

Il primo e più importante è il vaccino antipolio: è stato preso il virus in cellule umane e forzata la replicazione in cellule diverse (scimmia). Il virus si è quindi adattato sia in vitro che in vivo, ha accumulato mutazioni in modo da acquisire la capacità di replicare in cellule umane, e successivamente da perderla ed acquisirla per le cellule di scimmia.



Noi siamo però stati vaccinati col vaccino inattivato: questa propagazione infatti faceva accumulare mutazioni fino a che il rischio che i soggetti vaccinati con il vaccino attenuato contraessero la polio a causa del vaccino era più alto rispetto al rischio di contrarlo naturalmente, perchè tutti i soggetti erano stati vaccinati. Questi vaccini attenuati avevano vari problemi, tra cui il fatto che se somministrati a soggetti immunocompetenti, potevan tornare indietro al fenotipo patogeno, ovvero le mutazioni accumulate in vitro potevano essere perse. Si chiama *rischio della reversione*.

I *geni della virulenza*, se eliminati, non compromettono la capacità replicativa: è quello che si fa per questi vaccini. In questo modo la reversione è più difficile, perchè spesso si eliminano grandi quantità di genoma.

#### 6.4.2 Vaccini inattivati

La specie virale è stata uccisa cristallizzandola: ciò non modifica la capacità di infezione, ma compromette la replicazione. Questi vaccini possono essere:

- Vaccini interi: polio, epatite A
- A subunità : epatite B, influenza, papillomavirus

Questi vaccini vengono somministrati o per via intradermica e sottocutanea, oppure per via mucosale a livello orale, vaginale, nasale (per virus respiratori e genitali).

Gli *adiuvanti* servono a:

1. Creare emulsione con l'antigene in modo tale che, quando questo viene inoculato, l'adiuvante faccia da *deposito* per cui l'antigene viene rilasciato lentamente
2. Avvisare il sistema immunitario che è arrivato qualcosa: crea quindi una *risposta infiammatoria*
3. A Siena sono stati sviluppati adiuvanti che trascinano l'antigene all'interno delle cellule inducendo una risposta di tipo cellulo mediata

#### 6.4.3 Controindicazioni e precauzioni

Se una persona è allergica ai componenti e non ci sono alternative, non si somministra il vaccino, così come in caso di encefalopatia.

In gravidanza i vaccini attenuati sono controindicati perchè il virus potrebbe arrivare il bambino, che non ha ancora un sistema immunitario sviluppato.

## 6.5 Terapia

Un vaccino si somministra ad un soggetto sano, un farmaco ad un soggetto malato, per cui i gradi di tollerabilità alle reazioni avverse sono diversi. Nei farmaci, specificità e tossicità sono più bassi rispetto ai vaccini per evitare reazioni avverse.

Dal punto di vista farmacologico possiamo:

1. Bloccare l'ingresso del virus: farmaci contro HIV vanno a bloccare la fusione<sup>23</sup>, oppure bloccano una molecola con cui HIV interagisce sulla superficie della cellula
2. Bloccare la scapsidizzazione: questi farmaci bloccano il processo di endocitosi, quindi sono piuttosto tossici
3. Bloccare l'espressione dei geni virali e la sintesi degli acidi nucleici virali, che è condotta da enzimi virali: nella maggioranza dei casi inibiscono le polimerasi
4. Bloccare l'assemblaggio delle particelle virali grezze, operata da proteasi virali: questi farmaci sono *inibitori di proteasi*

## 7 Diagnosi di infezione

Per la diagnosi di infezione possiamo cercare il patogeno attraverso rilevazione del genoma, colture cellulari (approccio diretto) o ricerca di anticorpi (approccio indiretto).

**Diagnosi diretta** porta alla determinazione della presenza dell'agente virale nel campione patologico. Si usa in caso di infezione manifesta, in atto. Più precocemente è attuata, più sono alte le probabilità di successo.

**Diagnosi indiretta** consiste nella ricerca di anticorpi nel siero ed in altri fluidi biologici del paziente. Si usa in caso di infezione che può essere latente o nelle fasi tardive.

### 7.1 Metodi per l'analisi diretta

Un metodo di diagnosi deve essere veloce, sensibile, pratico.

---

<sup>23</sup>HIV ha una membrana esterna che si fonde con la membrana plasmatica

### 7.1.1 Microscopia elettronica

Non si usa più. L'unico virus per il quale è servito è il virus dell'epatite B: intorno alle particelle virali infettanti si trovavano dei filamenti proteici. Inoltre questo virus viene prodotto in grande quantità, quindi la sensibilità non era un problema.

### 7.1.2 Isolamento virale

Sta avendo tempi duri. È da sempre considerato il gold standard: c'è la possibilità di dare una diagnosi certa, ma grazie alle nuove tecnologie molecolari si possono superare i limiti intrinseci che ha:

- La coltivazione di un virus richiede un mezzo che la contenga e che eviti la propagazione agli operatori
- Per alcuni virus importanti in ambito medico non si può applicare: i virus dell'epatite ad esempio non crescono in vitro, così come papilloma virus, perché non ci sono substrati biologici adatti in ambiti diagnostici
- L'isolamento virale richiede tempo, alcuni virus crescono lentamente e per dare un elemento visibile di crescita serve molto tempo, tempo che spesso il paziente non può permettersi

Prendiamo il campione, lo sottoponiamo ad un trattamento con antibiotici per uccidere i batteri, poi lo poniamo a contatto con cellule suscettibili a infezione. Si utilizzano cellule il più possibile simili a quelle utilizzate in vivo dal virus, come cellule di espunti di tessuti di adulti (umani o animali), oppure cellule diploidi di derivazione fetale.

Troviamo un *danno citopatico* che porta a morte delle cellule. Posso prendere le cellule danneggiate metterle su un vetrino e somministrare anticorpi per identificare il virus.

Per ovviare alla lentezza di questa metodica, si ricorre alle *Shell Vials*: tubo con sul fondo delle cellule suscettibili ad infezione, immerse in terreno di coltura. Aggiungiamo il campione e centrifughiamo: se il virus è presente nella superficie, viene pressato sulle cellule e si potrà dentro la cellula. Incubiamo quindi a 37 °C per un certo tempo: non ci aspettiamo la comparsa di effetto citopatico, ma il virus ha iniziato a produrre delle proteine per la replicazione (che però non è avvenuta), quindi possiamo usare anticorpi marcati con fluorescenti.

### 7.1.3 Rilevazione di antigeni virali

Rapido, ma poco sensibile. Utilizziamo anticorpi monoclonali specifici per il virus che cerchiamo. Applicato molto nell'ambito di lesioni a livello cutaneo

### 7.1.4 Detezione degli acidi nucleici

?

## 7.2 Metodi molecolari

Possono essere quantitativi e qualitativi.

(21.04.2015)

## 8 Herpesvirus

Involucro esterno ricco di glicoproteine, soprattutto virali. Essi hanno più glicoproteine che fanno da recettori rispetto agli altri virus (5 contro 1). È quindi difficile bloccarne l'entrata.

All'interno dell'involucro c'è una fitta trama di proteine, dette *proteine del tegumento*, che danno solidità e bloccano molte delle difese delle cellule. Il tegumento circonda il capsido, a simmetria icosaedrica. Il DNA, piuttosto lungo (130-200 Kbp), è lineare a doppia catena.

Non c'è specie al mondo che non sia colonizzata dai propri herpesvirus.

### 8.1 Replicazione

Entrano per fusione classica; le proteine del tegumento vengono liberate in seguito alla fusione e bloccano la sintesi proteica cellulare. Il capsido viaggia attraverso il citoplasma usando i corridoi di tubulina, per portarsi a livello dei pori della membrana nucleare, dove inocula l'acido nucleico.

L'acido nucleico circolarizza: si ha espressione ordinata di geni virali, divisa in 3 fasi:

- Geni  $\alpha$ , precoci: il trascritto viene esportato nel citoplasma e tradotto. Le proteine sono le fondamenta per l'inizio della replicazione. La produzione delle proteine  $\alpha$  è un feedback negativo: spengono i geni  $\alpha$  e si accendono geni a valle
- Geni  $\beta$ : codificano per enzimi di replicazione, sono i geni a valle di  $\alpha$ . Le proteine  $\beta$  da un lato spengono i geni  $\beta$  ed attivano i geni tardivi

$\gamma$ , dall'altro iniziano la replicazione con la DNA Polimerasi virale. Sono geni regolatori

- Geni  $\gamma$ : codificano per proteine strutturali, che poi vengono portate nel nucleo
- Assemblaggio del virus nel nucleo

Replicazione con meccanismo *a nastro rotante*. La *gemmazione* di questo virus avviene *a livello nucleare*. L'espressione dei geni virali è regolato sia da proteine virali ma anche dalla RNA Polimerasi cellulare, che trascrive i geni.

Ci sono sistemi di proteine che scorrono sul genoma e che, quando trovano segnali di terminazione del genoma, tagliano il concatamero che si è formato, e il segmento viene inserito nella testa vuota.

Le proteine  $\gamma$  che si inseriscono nella membrana esterna del virus, si inseriscono sia a livello della membrana cellulare, sia della membrana nucleare, che nelle cisterne ecc. Questo virus gemma a livello della membrana nucleare  $\rightarrow$  involucro esterno del virus. Viene poi portato all'esterno grazie ad un sistema di cisterne tra RE ed AG. Il virus quindi *non lisa la cellula*. La fuoriuscita di questo virus non implica necessariamente la morte cellulare.

Questo virus persiste all'interno della cellula: non è uno stato passivo, ma governato dal virus stesso. Nella fase replicativa, una volta spenti i geni  $\alpha$ , può decidere anche di restare nella cellula: invece di fare esprimere i geni  $\beta$  esprime i geni LAT (trascritti associati a latenza), i quali permettono al virus di restare all'interno della cellula. Essi rendono difficile l'eliminazione del virus dal sistema immunitario, poichè la cellula non risulta infetta. Questi geni LAT possono essere poi spenti se il virus decide di fuoriuscire.

## 8.2 Tipi di virus

Nella famiglia delle Herpesviridae si distinguono 3 sottofamiglie:

1. Alphaherpesvirinae: contengono i 3 virus più conosciuti, *Herpes simplex 1 e 2* e *Varicella-zoster*, essi infettano elementi della mucosa (cellule muco-epiteliali) e persistono a livello delle cellule nervose. Replicano molto rapidamente rispetto agli altri virus herpetici e producono un effetto citopatico caratteristico.
2. Betaherpesvirinae: contengono 3 virus, *Citomegalovirus*, *Herpesvirus umano di tipo 6* ed *Herpesvirus umano di tipo 7*. Possono persistere ed infettare cellule di specie diverse. Possiamo trovarli in linfociti, monociti, cellule epiteliali ecc.

3. Gammaherpesvirinae: virus *Epstein-Barr* (Herpesvirus 4) e virus del *sarcoma di Kaposi* (Herpesvirus umano di tipo 8). Entrambi possono indurre *tumori*: epstein barr, agente eziologico della mononucleosi, porta anche a malattie linfoproliferative. Entrambi infettano cellule linfoidi e cellule epiteliali

Tutti questi virus sono facilmente trasmissibili ed utilizzano vari mezzi di trasmissione.

### 8.3 Herpes Simplex

Tipo 1 e tipo 2. Presenti nella saliva, lacrime, secrezioni genitali, allattamento ecc, in generale in moltissimi *fluidi biologici*. Circa il 10% della popolazione lo contrae per via genitale. HSV2 dà infezioni più gravi al di sotto della cintura, HSV1 sopra xD.

Questi virus possono *riattivarsi* ogni 6 mesi: in molti casi la riattivazione non si traduce in una manifestazione evidente.

#### 8.3.1 Patogenesi

Periodo di incubazione breve (5-6 giorni) nel quale il virus inizia a replicare nelle cellule dell'epitelio della mucosa. Se avvertita dal punto di vista clinico, si manifestano vari sintomi. Questo però solo nel 10% dei casi: di solito infatti non si hanno manifestazioni a questo stadio.

Dopo si ha ingrossamento dei linfonodi, produzione di vescicole che poi cicatrizzano (effetti locali), oppure sintomi sistemici.

La latenziazione si ha quando i virus entrano a livello delle fibre assonali e vanno a localizzarsi nel nucleo dei neuroni, dove persistono.

Ci sono dei fattori che inducono il virus a riattivarsi: il virus discende verso le mucose e ricomincia l'infezione come la prima volta. La riattivazione non avviene sempre nello stesso punto: ciò dipende dalla fibra eretica che il virus ha seguito per discendere. Questi fattori sono: esposizione ai raggi UV, febbre, forti stress emotivi o fisici, allergie, cibi speziati, acidi ecc.

Questi virus possono dare manifestazioni importanti: a livello oculare, orale (gengivostomatite, tonsillite, faringite), genitale, perianale. Visto che sta nelle cellule nervose, può succedere che nella riattivazione, anziché ridiscendere, risalga attraverso le vie assonali per portarsi a livello dei SNC →encefaliti erpetiche sono comuni.

Possiamo avere infezione verticale (da mamma a bambino): infezione erpetica neonatale che può da un lato concludersi e limitarsi ad infezione locale, dall'altro può arrivare al SNC.

### 8.3.2 Diagnosi del virus

Diretta: immunofluorescenza (si cercano anticorpi) o metodi molecolari.

Sierologia: poco utile.

Uno dei farmaci di elezione per l'Herpesvirus è la Acyclovir, omologa alla guanina, ma differisce perchè non ha il ribosio. È un *profarmaco*: per diventare farmaco deve essere attivato. Nella cellula infetta da herpes ci sarà un enzima prodotto dal virus, una *timidina chinasi*. Il profarmaco Acyclovir entra ed esce in tutte le cellule, ma non in quelle infette, perchè la timidina chinasi lo fosforila, lo converte in Acyclovir monofosfato e lo intrappola nella cellula infetta. Delle chinasi cellulari infine lo convertono in *Acyclovir trifosfato*: diventa un analogo nucleotidico che viene utilizzato dalla polimerasi, che incorpora questa molecola nel DNA. Mancando l'-OH per l'attacco della base successiva, la catena termina.

Ci sono molti ceppi che hanno sviluppato resistenza a questo farmaco: si hanno mutazioni a livello della timidina chinasi.

## 8.4 Varicella-zoster

Infezione prevalente nei bambini tra 4-10 anni. Ha un tasso di attacco del 90%. C'è anche una malattia che è conseguenza della riattivazione: si chiama *herpes zoster*, il fuoco di sant'antonio.

### 8.4.1 Patogenesi

Infezione ha inizio a livello della mucosa respiratoria. Nei linfonodi, si ha un primo ciclo replicativo che porta il virus a localizzarsi nel sangue ed in altri organi. Un ulteriore ciclo di replicazione porta il virus alla massima contagiosità e alla comparsa del rash vescicolare.

Il nostro organismo inizia a difendersi per contenere l'infezione: l'infezione di solito diventa evidente con l'infezione a livello cutaneo e la comparsa del rash (esantema) vescicolare.

Per Herpes zoster il virus ridiscende dai gangli dorsali, dove sta in forma latente, e provoca l'esantema. All'esantema si accompagna un dolore diffuso, perchè oltre alla lisi delle cellule epiteliali provoca la lisi delle terminazioni nervose (neuralgia post-erpetica) →ipersensibilità cutanea.

### 8.4.2 Diagnosi

Stessa cosa per Herpes simplex, funziona bene anche l'immunità passiva.

C'è un vaccino attenuato, normalmente combinato con morbillo, parotite e rosolia. Si somministra al 15esimo-18esimo mese di vita.

## 8.5 Cytomegalovirus

È uno dei virus più diffusi al mondo. La trasmissione avviene in utero, per via perinatale o post-natale. Si ha anche trasmissione orizzontale.

L'infezione è persistente, il virus persiste in distretti diversi: nei polimorfonucleati, nelle cellule epiteliali di varie mucose, nelle quali si riattiva periodicamente. Si trova nell'orofaringe, nella saliva, nelle urine.

### 8.5.1 Patogenesi

Non causa grandi conseguenze. Il 90% dei soggetti ha infezione asintomatica: trovare anticorpi contro Cytomegalovirus significa che il soggetto è infetto, perché la sua è un'infezione persistente. Se l'infezione è contratta in età adulta, un soggetto normale può sviluppare una mononucleosi.

Se viene contratta in gravidanza, ci sono grossi problemi per il feto: possiamo avere la *malattia da inclusione citomegalica* che porta all'aborto spontaneo. (dal punto di vista di trasmissione verticali, le riattivazioni non sono un problema).

Se viene contratta da un soggetto immunosoppresso (es. sieropositivi o anziani o sottoposti a trattamento farmacologico), cytomegalovirus si riattiva in modo consistente e produce tantissime malattie (polmoniti, retiniti, coliti, encefalopatie). La riattivazione di Cytomegalovirus è uno dei principali fattori di rigetto dei trapianti.

## 8.6 Epstein-Barr

Nei paesi sviluppati ci sono 2 tipi di infezione:

- In età scolare, è silente
- Negli adulti, si ha la mononucleosi

### 8.6.1 Patogenesi

Il virus viene contratto attraverso secrezione respiratoria (goccioline di saliva). La prima sede di infezione è a livello dell'orofaringe, in particolare nelle cellule della mucosa epiteliale: lisi delle cellule epiteliali. Il virus viene rilasciato e ritrova nella saliva, ma una quota va ad infettare i linfociti B inattivi, che si attivano: se plasmacellule secernono anticorpi, non necessariamente diretti verso epstein-barr. Questa attivazione fa sì che questo virus instauri *equilibri dinamici* con queste cellule B; esso può infettare e persistere all'interno di queste cellule → infezione persistente e latente, può esprimere



antigeni nella cellula infettata che diventano target di attacco per il sistema immunitario. Oppure può provocare lisi delle cellule B.

Il virus può ripresentarsi periodicamente nell'orofaringe.

Epstein-barr è associato a tante malattie:

- Mononucleosi infettiva
- Malattie neoplastiche: linfoma di Burkitt e il carcinoma naso-faringeo. Si manifestano in soggetti immunocompetenti
- Malattie linfoproliferative: causate dalla iperproliferazione dei linfociti B, dalla stimolazione continua del virus e dalla mancata eliminazione da parte del sistema immunitario

**Mononucleosi infettiva** il virus infetta le cellule dell'orofaringe causando la lisi, ma infetta anche i linfociti B  $\rightarrow$  *linfoadenopatia*<sup>24</sup> e ingrossamento epatico della milza, che negli adulti può portare alla rottura della membrana di rivestimento.

Questo tipo di mononucleosi si distingue perché nel soggetto, oltre a trovare anticorpi contro l'epstein-barr, troviamo anche *anticorpi eterofili*, prodotti a seguito dell'attivazione dei linfociti B.

Si manifesta con sintomi respiratori e sintomi dovuti alla massiccia proliferazione di linfociti B. Se questa non viene eliminata, possono svilupparsi dei carcinomi.

**Linfoma di Burkitt** tumore comune in Africa tra i bambini in età dai 3 ai 14 anni. Risponde favorevolmente alla terapia. Si sviluppa in parallelo ad altre infezioni endemiche o situazioni ambientali che portano ad una continua stimolazione del sistema immunitario, come la presenza della malaria, che porta uno stimolo proliferativo dei linfociti B.

**Carcinoma nasofaringeo** è un tumore dell'epitelio squamoso dell'orofaringe. Si manifesta in età adulta ed è estremamente aggressivo: anche in questo caso sono importanti componenti ambientali. Il mangiare cibi estremamente caldi e velocemente porta le cellule dell'orofaringe a proliferare più velocemente per rigenerarsi.

(27.04)

---

<sup>24</sup>Ingrossamento linfonodale

## 8.7 HErpersvirus 6-7-8

Omologia nucleotidica e antigenica elevata. Il 7 non ha malattie associate. Il 6 è la causa della *sesta malattia*, che ha un picco di incidenza tra i 4 mesi e i due anni. Il bambino sviluppa un rash macropapulare ed ha un picco di febbre.

Può dare encefalite; se contratta da adulto, si ha una sindrome simile alla mononucleosi.

L'8 è diffuso in Africa ed è un virus oncogeno, che causa il sarcoma di Kaposi: si hanno macchie sulla pelle. Si presenta in soggetti immunodepressi. Uno dei fattori che herpes 8 prende dalle cellule sono *fattori angiogenici*, che inducono il rimodellamento dei capillari sanguigni. È un tumore del connettivo. La sua presenza non porta necessariamente allo sviluppo del sarcoma

## 9 Virus dell'epatite

I virus al fegato ci arrivano molto spesso. L'epatite comporta una sofferenza epatica e si può avere da intossicazioni da alcool, farmaci, funghi ecc... Nella maggior parte dei casi le epatiti sono di natura infettiva. All'interno delle epatiti virali ci sono tantissimi virus che possono causarle.

I virus dell'epatite canonici (in ordine cronologico di scoperta):

1. Epatite A : trasmessa per via oro-fecae (epatite infettiva)
2. Epatite B : epatite da siero, si contrae venendo a contatto con sangue contaminato
3. Epatite D : epatite da siero (antigene  $\delta$ )
4. Epatite NANB (non A non B):
  - Epatite C : assimilabile come trasmissione al B (epatite da siero), trasmesso per via parentelare
  - Epatite E : trasmesso per via gastro-enterica come l'A

A, B, D scoperti negli anni 60. C negli anni 80, E di recente.

### 9.1 Virus dell'epatite A

È un Picornavirus a RNA single strand a polarità positiva, senza involucro esterno → resistenti nell'ambiente.

Nella famiglia dei Picornavirus si hanno i Poliovirus, Rhinovirus ecc, è una famiglia numerosa.

Il genoma ha funzione di messaggero: si ottiene una unica poliproteina tagliata dalle proteasi cellulari. Dal taglio, si libera la proteasi virale. Per la replicazione si ha un intermedio a polarità negativa, dal quale vengono prodotte molte copie positive. Sono virus che lisano la cellula, si replicano molto rapidamente.

È costituito da un singolo sierotipo<sup>25</sup>.

L'incidenza di questa malattia è stata sempre alta in Italia. Infezione trasmessa per via oro-fecale.

Non danno infezioni croniche. Si ha ittero, l'infezione è più evidente con l'età. L'ittero è una conseguenza della distruzione degli epatociti ed accumulo della bilirubina: il sistema immunitario riconosce le cellule infettate e le distrugge, quindi contribuisce alla malattia.

Il periodo di incubazione è di 4 settimane. La presenza del virus nel sangue è inferiore alla presenza del virus nelle feci: il virus, presente nell'intestino, viene concentrato a livello degli epatociti nella cistifellea ed immesso a livello duodenale. Questa infettività si protrae per 2-3 settimane dalla scomparsa dei sintomi.

LA trasmissione si ha per ingerimento di cibi contaminati, per contatto con persone infette o espizione al sangue (raro).

## 9.2 Virus dell'epatite E

Il periodo di incubazione è circa 4 settimane, bassa mortalità associata all'infezione (aumenta se la donna è in gravidanza).

Non dà infezioni croniche, ma l'importanza dei sintomi aumenta con l'aumentare dell'età.

Sia per A che per E c'è un vaccino, che viene però somministrato solo a soggetti a rischio. Mentre il virus A si contrae per trasmissione da uomo ad uomo, il virus E è una zoonosi: è endemico nei maiali, nella selvaggina, in pollami ecc, quindi è un problema anche per la sanità pubblica, perchè in molte zone si mangia carne cruda.

## 9.3 Virus dell'epatite B

Ha un involucro esterno sul quale è presente l'antigene HSB (HBS-ag, antigene di superficie). Il genoma è a DNA circolare parzialmente bicatenato:

---

<sup>25</sup>l'isolato che appartiene allo stesso sierotipo fornisce all'individuo che è stato infettato una protezione verso tutti gli isolati che appartengono allo stesso sierotipo. Se A e B sono dello stesso sierotipo, se siamo infettati da A siamo protetti sia per A che per B

una parte è ssDNA e una a dsDNA.

È una particella di circa 40 nm. Questo virus produce da 500 a 1000 volte più antigene di superficie del necessario: questo surplus di HSB-ag viene rilasciato nel siero e si formano aggregati sferici o bastoncellari.

I geni sono inoltre *parzialmente sovrapposti*: il gene per la DNA Pol copre il 70% del genoma; il gene per HSB è parzialmente sovrapposto ecc.

HBC è una proteina che va a costituire uno dei capsomeri (core) e un'altra che è HBE-ag. Entrambe sono codificate dal gene C, un gene strutturale. Il gene X dà luogo ad una proteina strutturale.

### 9.3.1 Replicazione

Il virus entra a livello degli epatociti grazie ad un recettore che fisiologicamente serve ad internalizzare l'albumina. Entra con un processo di  *fusione*  e il capsido entra a livello nucleare: durante la disorganizzazione del capsido si mette in moto la DNA pol del virus per completare la doppia catena del genoma virale ( *completamento del double-stand* ). Si forma il CCC DNA (chiusa covalente circolare).

Uno dei messaggeri espressi, il  *pregenoma* , rappresenta l'intero genoma: esso viene inserito, impaccato nel capsido che si va a formare. La particella virale che si forma nella primissima fase contiene quindi il trascritto ad RNA, il pregenoma. Nell'impaccamento viene inserita la DNA pol del virus, la quale trascrive una catena di DNA a polarità negativa: funziona come la  *trascrittasi*  dei retrovirus. Poi trascrive lo stamo complementare, quindi DNA a polarità positiva, che però si blocca: questa interruzione avviene perchè sono finiti i nucleotidi.

### 9.3.2 Segni clinici

Il periodo di incubazione può essere molto lungo.

Se l'infezione è contratta in età giovanile (<5 anni) la malattia si ha nel 10% dei casi; il numero aumenta con l'aumento dell'età. Lo sviluppo di un'infezione cronica invece si ha in tenera età piuttosto che in età adulta.

Quando diminuisce la cronicità, aumenta la probabilità di sviluppare una sintomatologia. Alla nascita il nostro sistema immunitario non è efficiente e il virus continua ad infettare gli epatociti, tanto che a volte si sviluppa una tolleranza immunologica. Se l'infezione avviene nell'adulto, il sistema immunitario sviluppa una risposta immune importante che distrugge gli epatociti. Si ha un danno epatico immediato, ma viene eliminata l'infezione. La comparsa dei sintomi della malattia è data da un danno immunomediato, non dal virus stesso.

Uno dei parametri più evidenti per dire se l'infezione è cronica o meno è che se entro 6 mesi dall'infezione vera e propria non si trovano anticorpi anti HBS-ag, il soggetto andrà incontro ad infezione cronica. L'HBS-ag in eccesso infatti sequestra tutti gli anticorpi che il nostro organismo produce. Gli anticorpi anti HBS-ag bloccano la capacità infettante del virus<sup>26</sup>. Se ci fosse meno HBS-ag, avremmo più anticorpi liberi → l'infezione viene superata.

Nei soggetti vaccinati troviamo solo anticorpi anti-HBs. Un soggetto che ha superato l'infezione, oltre ad avere anticorpi anti-HBs, avrà anche anticorpi anti-HBc (anti core). La risoluzione dell'infezione, in una percentuale ridotta ma non trascurabile di soggetti, può essere parziale.

Il mezzo di trasmissione più comune è la trasmissione sessuale.

Essendo un virus molto resistente, anche siringhe, ferri chirurgici ecc sono veicolo di trasmissione, se non adeguatamente sterilizzati.

In seguito a tutti questi virus, si può verificare cirrosi, che in una parte di questi soggetti sviluppa una cicatrice di natura connettivale → carcinoma.

Il virus B è stato associato al carcinoma epato-cellulare: è uno dei tumori più diffusi e la prognosi è infausta (sopravvivenza di 5 anni nel 2.3% dei casi).

## 9.4 Virus dell'epatite D

Scoperto nel '77. Si pensava fosse una forma più grave dell'epatite B. Contiene un ssRNA a polarità negativa. Ha un capsido che contiene l'antidege  $\delta$ . All'esterno del capsido ha un involucro che contiene HBS-ag: serve al virus a trasmettersi ad altre cellule.

Non è un virus infettivo vero e proprio: per trasmettersi in altre cellule acquisisce questo involucro esterno. Infetta cellule che sono già infettate dal virus dell'epatite B.

Si può avere o una *coinfezione* (B e D insieme), che avviene per trasmissione sessuale o scambio di siringhe ecc. L'infezione è acuta e grave, ma il rischio di infezione cronica è basso.

Possiamo anche avere una *superinfezione* in soggetto che hanno contratto infezione cronica da epatite B: svilupperà anche un'infezione cronica da D.

(5.05.15)

## 9.5 Virus dell'epatite C

Non c'è un vaccino. Molte infezioni acute sono asintomatiche; le infezioni croniche si manifestano dopo molto tempo.

---

<sup>26</sup>Viene così bloccato l'ingresso del virus nelle cellule

Ha involucro esterno, 2 glicoproteine e1 ed e2, un capsidico interno a simmetria icosaedrica e ssRNA a polarità +. Appartiene alla famiglia dei Flavivirus: si chiamano infatti Flaviviridae (flavus in greco significa giallo). Sono 3 generi:

1. Flavivirus : portati da artropodi
2. Hepacivirus : di cui fa parte epatite C
3. Pestivirus

Insieme ad HIV, sono virus che hanno la tendenza a *mutare* sia in un soggetto che tra soggetti, perchè le polimerasi non sono troppo efficienti. Ce ne sono 6 genotipi, importanti per la diversa resistenza al trattamento, che a loro volta si diversificano.

Il genoma ha funzione di messaggero. La poliproteina è di circa 3000 aa. Hanno una suddivisione ordinata di geni strutturali e non strutturali (regolatori). La poliproteina viene poi tagliata da una proteasi cellulare, fino a che viene liberata una proteasi del virus (NS3) che continua a tagliare il resto della poliproteina.

L'RNA Polimerasi viene liberata dopo il taglio della poliproteina.

Per entrare negli epatociti, utilizza 5 recettori cellulari diverse. Ha una sorta di mantello esterno (che non è l'involucro) di vescicole di colesterolo: riesce quindi ad uscire schermato ed è difficilmente aggredibile dal sistema immunitario.

Oltre all'epatite può causare altre malattie. Viene trasmesso per via ematica, per via sessuale ecc. Ha un periodo di incubazione lungo (6-7 settimane). L'infezione è di solito silente; l'ittero, o infezione acuta propriamente detta, avviene nel 20% dei soggetti. Il fatto che la malattia si sviluppi con sintomi gravi non dà la certezza della risoluzione della malattia rispetto a soggetti che non manifestano sintomi (come invece era per il virus B). Non sempre l'infezione cronica porta a malattia. I soggetti che hanno epatite cronica possono sviluppare cirrosi.

Non c'è modo di sapere se il soggetto risolverà l'infezione o meno.

Le IgM, associate ad infezione primaria acuta, sono comunque manifestate durante l'infezione cronica in alcuni soggetti: ciò di norma non avviene. Questi soggetti sviluppano cirrosi e alcuni possono sviluppare *carcinoma epato-cellulare*. Non si sa ancora come questo virus induca questo tumore perchè nelle proteine regolatorie non ce ne sono ad azione oncogena. Gli stati infiammatori sono associati all'insorgenza di tumori.

Uno dei mezzi di trasmissione è stata la siringa di vetro, che si usavano dopo essere state bollite e per pazienti trattati con gli stessi farmaci venivano usate le stesse.

Lo screening classico ricerca *anticorpi*: se negativo, e non ci sono fattori di rischio particolari, la cosa finisce lì. Se invece si sospetta che l'infezione sia stata contratta recentemente, si cerca la presenza del RNA o dell'antigene. Il periodo finestra<sup>27</sup> è di solito di 2-3 settimane. Per cercare di diminuire al massimo il periodo finestra, ci sono sistemi immunoenzimatici che permettono di eliminare i falsi negativi. Estrema sensibilità però si accompagna spesso con bassa specificità: c'è il rischio di avere falsi positivi.

Si fa un *test di conferma* immunoblot: utilizziamo un saggio per cui prendiamo una striscia di nitrocellulosa, nella quale in posizioni diverse ci sono dei peptidi che costituiscono porzioni distinte delle proteine del virus dell'epatite C. Nei test immunoenzimatici classici ELISA le proteine sono tutte concentrate nei pozzetti; questo test è meno sensibile, ma più specifico —>è possibile determinare il profilo anticorpale e capire se si tratta di una vera e propria positività. Basta depositare il siero sulla striscetta e vedere se agglutina. Non basta la positività ad una singola banda per avere conferma di infezione: può anche essere stato un cross-reattivo o anticorpi naturalmente presenti; può anche essere che il soggetto è nella fase iniziale di infezione e non ha ancora sviluppato anticorpi per le altre proteine.

Se il soggetto non è né negativo né positivo, si deve andare a ricercare il virus: si va a cercare quindi l'RNA virale. Se positivo, si fanno una serie di test per stabilire il livello di viremia e lo stadio di infezione. Ciò si fa anche per definire qual è il genotipo infettante, per valutare il miglior approccio terapeutico.

Vi sono moltissimi effetti avversi dei trattamenti, che vengono fatto con gli *interferoni*.

Negli ultimi anni sono stati introdotti i DAA, che sono farmaci che però costano tantissimo.

## 10 HIV

Sono dei *Retrovirus*, suddivisi in varie famiglie: di queste, il Lentivirus non provocano tumori e sviluppano la malattia in modo lento (HIV umano).

Ci sono varie proteine regolatrici che hanno funzioni diverse: sono Retrovirus dal punto di vista strutturale, ma sono considerati complessi perchè hanno queste proteine regolatorie accanto ai classici geni GAG-POL-ENV.

I retrovirus replicano solo nelle cellule in proliferazione attiva. Devono far entrare l'acido nucleico nel nucleo per integrarlo nel genoma della cellula ospite. Gli altri retrovirus (non lentivirus) devono aspettare che la membrana

---

<sup>27</sup>Il periodo che intercorre tra il contagio e la comparsa di anticorpi

nucleare dissolva durante la fase di divisione della cellula ospite. I Lentivirus, grazie alle proteine regolatorie, ha un sistema di trasporto che consente di portare il complesso attraverso i pori della membrana nucleare. I lentivirus quindi replicano anche in cellule quiescenti.

HIV ha il recettore, detto gp120, che interagisce con 2 molecole sulla membrana: CD4 e il corecettore. Il genoma viene convertito a DNA a doppia catena, circolarizza e viene portato nel nucleo: lì viene integrato, ad opera di un enzima virale che segue l'acido nucleico, l'*integrasi*. Il genoma (2 RNA a polarità +) poi può essere tradotto nelle varie proteine o integrato nella particella virale. Il processo di maturazione è mediato da un enzima virale, *proteasi*.

Il *corecettore* dipende dalla sequenza di gp120. Se il virus ha affinità maggiore col recettore CCR5, il virus infetta monociti e macrofagi: sono virus *macofagotrofici* o ceppi R5.

I ceppi che utilizzano un corecettore che ha funzione di chemochina, CXCR4, infettano i linfociti: si chiamano ceppi *linfotrofici*, o X4. Vi sono però dei linfociti T CD4 che hanno entrambe i recettori: il virus introduce mutazioni al gp120 affinché si abbia maggior affinità per questo recettore.

Trasmissione per via ematica. Si ha anche trasmissione per via mucosale (nella maggior parte dei casi): il virus incontra più facilmente i macrofagi e quindi spesso l'infezione ha origine con varianti R5. La maggior parte degli organi linfoidi sarà infettato e, in 3-5 gg, tutti gli organi linfoidi e le cellule infoidi avranno infettate in modo perenne. In 7 gg il virus si trova anche nel SNC, perchè i macrofagi infetti riescono a passare la barriera ematoencefalica.

3 fasi di infezione:

1. Infezione acuta: il soggetto non ha sviluppato risposta immune e il virus replica senza freni. Il massimo si ha dopo 1 mese circa. In questa fase non troviamo Ab e il virus è principalmente di ceppo R5. La replicazione del virus avviene nei macrofagi o nelle cellule linfoidi CD4+ positive anche per CCR5. La replicazione si conclude con la *lisi* delle cellule linfoidi: i livelli di CD4 circolanti si abbassa. I sintomi o non ci sono, o non sono riconducibili ad HIV
2. Latenza clinica: il livello di viremia scende perchè l'organismo sviluppa una risposta. È detta fase asintomatica perchè, se c'erano dei sintomi, scompaiono. Ha durata variabile: dipende da quanto il nostro sistema immunitario riesce a controllare l'infezione. A questo punto il virus replica a spese dei CD4. Oltre un certo grado di uccisione dei CD4, il sistema immunitario cessa di funzionare e si entra nella terza fase



3. AIDS: siamo a  $<200\text{cells}/\text{mm}^3$ . Il virus riprende a replicarsi in modo velocissimo, visto che adesso non c'è più difesa immunitaria. Si sviluppano altre malattie opportunistiche, che portano alla morte dell'individuo. Il virus ha adesso un fenotipo X4

Nella prima fase, vengono prodotti tantissimi linfociti T CD8: purtroppo HIV replica parecchio e acquisisce qualche mutazione → i ceppi cambiano tantissimo.

## 10.1 Diagnosi e trattamento

Si va a cercare l'RNA o gli anticorpi. È però fondamentale il test di conferma, che è il *Western Blot*: si vede anche qual è il profilo anticorpale del soggetto infetto. Monitorando un soggetto in varie settimane (D2, D3 ecc) vediamo un aumento della quantità delle varie proteine. In particolare la p24, che è quella vista di più e prima: questa determina di solito l'indeterminatezza.

Ci sono circa 100 farmaci che sono diretti verso punti fondamentali dell'infezione: inibitori di fusione, antagonisti del CCR5, inibitori della trascrittasi inversa (terminatori di catena), inibitori dell'integrasi e inibitori delle proteasi. Si usano anche 4 farmaci insieme per colpire bersagli diversi: se ne usassimo uno solo, il ceppo svilupperebbe resistenza nel giro di pochi giorni. Si usa una terapia HAART (terapia antiretrovirale ad alta efficienza) con questi 4 farmaci, per rendere più difficile lo sviluppo di resistenza.

(12.05.15)

## 11 Vettori virali e terapia genica

La terapia genica consiste nell'introduzione di acidi nucleici in una cellula per cambiare il corso di una condizione clinica o malattia. Ripristina la funzionalità di un gene.

Ci sono 3 gruppi:

1. Ripristina la funzionalità di un gene
2. Uccidere o alterare una cellula aberrante
3. Introdurre in cellule normalmente non deputate alla produzione di un certo fattore, un gene o più geni che consentono di produrre il fattore mancante

Serve un sistema di veicolazione del fattore genetico o progene nelle cellule giuste. Volendo inoculare il veicolo, dobbiamo fare in modo che questo porti il fattore genetico nelle cellule giuste.

L'approccio *in vivo* consiste nell'*inoculazione diretta* del veicolo per via sistemica, ad esempio se vogliamo colpire un organo. L'approccio *ex-vivo* si fa mobilizzando alcune cellule, in particolare precursori ematopoietici che vengono raccolti in sacche di sangue: il sangue viene centrifugato per separare le cells che vogliamo, vengono messe in coltura, modificate geneticamente e reinfuse. Ciò si può fare solo con cells inducibili alla circolazione.

Per l'inoculazione si usano diversi vettori:

- Plasmidi : non si inoculano in vivo, sono molto poco efficienti perchè funzionano solo a livello intradermico. Sono usati dal punto di vista vaccinale
- Lipofectine : sferette di membrane sintetiche all'interno delle quali ci mettiamo quello che vogliamo. Usate in cosmesi
- Vettori virali : hanno solo l'intelaiatura virale, all'interno portano cose diverse. Sono molto usati perchè i virus, per loro natura, sono veicoli. Possiamo operare un targeting

## 11.1 Struttura di un vettore

Per costruire un vettore, la particella del vettore virale deve essere uguale alla particella virale wt. Deve essere infettante, ma non vogliamo che sia in grado di replicare. Si parla di *trasduzione* invece che di infezione.

Produrre una particella virale indistinguibile dall'esterno, ma che portano all'interno il gene terapeutico. I vettori per terapia genica sono sempre stati i *retrovirus*: la sequenza  $\Psi$  permette il riconoscimento e l'impacchettamento. Questa sequenza viene internalizzata, è una sequenza che sta a monte di gag, pol ed env.

Il vettore virale quindi ha tutte le porzioni che codificano per i geni virali che sono stati rimosse, e rimane questa sequenza  $\Psi$ . Al posto dei geni virali ci sarà il gene terapeutico. La sequenza  $\Psi$  di packaging non deve essere rimossa! Sono costruiti grazie a cellule di packaging transfettate con 3 plasmidi:

1. Vettore vero e proprio con il transgene e la sequenza  $\Psi$
2. Plasmide con env senza  $\Psi$
3. Plasmide con gag/pol senza  $\Psi$  né env

in modo tale che i geni che servono per la costruzione della particella siano dati separatamente. Ci sarà l'espressione dei vari messaggeri, i messaggeri di gag, pol ed env vengono tradotti in proteine mentre il costrutto del vettore

virale resta in RNA e si replica: otteniamo vari genomi di vettori. Alla fine otteniamo particelle virali che contengono il gene terapeutico.

A seconda del tipo di env che mettiamo, potremmo orientare il targeting del virus su cells diverse, visto che env codifica per i recettori virali.

Messo a contatto con cellule che devono essere trasdotte, entra l' RNA, che viene covertto in dsDNA e poi integrato nel genoma della cellula trasdotta. Quando la cellula si divide, abbiamo 2 cellule trasdotte.

Il vantaggio dei retrovirus è che integrano il genoma in quello della cellula ospite: uno svantaggio è che queste cellule possono diventare tumorali.

I vettori lentivirali integrano il loro genoma, ma il rischio di mutazioni<sup>28</sup> è molto molto più basso.

Inoltre, i retrovirus possono introdursi nel nucleo solo quando la membrana nucleare è dissolta: solo nelle cellule in divisione quindi i retrovirus possono integrare il loro genoma.

HIV e i lentivirus non hanno questo problema: hanno prooteine regolatorie che trasportano il genoma all'intero della cellula, facendo attraversare la membrana nucleare in prossimità dei pori, quindi anche quando è integra. Questo metodo permette di integrare stabilmente il gene.

Molti vettori vengono utilizzati per la *vaccinazione*: vettori *Adenovirali*, utili per portare un gene verso il quale deve essere indotta una risposta immune. È una trasduzione transiente.

I vettori *Adeno-associati* integrano il genoma in un punto del genoma cellulare dove non causano effetti nocivi.

I vettori *erpetici* servono per le cells nervose, perchè hanno un tropismo naturale per le cellule nervose.

Il primo esperimento di trasferimento di virus è stato fatto nel 1968. Il primo caso ad avere successo risale al 1990. In una bambina una deficienza di ADA creava un'immunodeficienza che colpisce linfociti/cellule linfoide prima del differenziamento: colpisce quindi sia risposta umorale che cellulo-mediata. È stata curata con approccio ex-vivo.

Molti vettori sono *oncolitici*: ingegnerizzati solo per replicare nelle cellule tumorali.

## 11.2 Gene editing

Tecnica con la quale possiamo alterare il genoma della cellula. Si può fare con varie tecniche, come le nucleasi zinc-finger: forbici molecolari che tagliano il genoma cellulare nel punto in cui vogliamo modificarlo, ad esempio dove c'è una mutazione che rende il gene non funzionale. Si può togliere la porzione

---

<sup>28</sup>mutagenesi inserzionale

mutata e inserire quella corretta. Si usano questi enzimi che sono come una mano: ogni apice del dito dello zinc finger (o delle altre forbici molecolari, dette mani) riconosce una base della sequenza di DNA a monte e a valle della mutazione (riconoscono almeno una ventina di basi ciascuna). I due pollici, non coinvolti nel riconoscimento, si trovano ad una distanza di 10-20 bp. Possiamo far sì che nella regione compresa fra le due mani, possiamo operare qualsiasi cosa: se c'è un promotore e un gene che esprime troppo, possiamo silenziare il promotore. Questi pollici contengono una sequenza di enzima di restrizione complementare.

Una volta tagliata la sequenza di DNA ed eliminata la parte difettosa, si innesca il meccanismo di riparazione. Abbiamo due casi:

- In natura il taglio viene richiuso, causando spesso l'alterazione della sequenza codificante → inattivazione del gene, poi vediamo cosa succede
- Nel gene editing, se ho portato dentro una sequenza wild-type, ho il riparo per ricombinazione sito-specifica: sostituisco la sequenza normale a quella inattiva eliminata

L'approccio tradizionale si usa solo per geni le cui dimensioni sono compatibili con i vettori; inoltre il gene che inseriamo è comunque regolato da un promotore che non è quello cellulare; la correzione spesso è transiente.

Nel gene editing abbiamo espressione del gene controllata dal promotore cellulare. Si usa anche per geni estremamente grandi. Il problema è che la messa a punto è complicata; se le forbici non sono specifiche si va a tagliare porzioni sbagliate.

### 11.3 Replicazione di HIV: trial clinici

Soggetti resistenti ad HIV avevano una delezione di 32 bp nel CCR5 che faceva sì che fossero soggetti normali. Questa delezione è innocua per il soggetto. Sono stati presi soggetti HIV positivi, con ceppi che utilizzano CCR5, ed hanno preso delle cellule mieloidi e linfoidi precursori dal paziente, oltre ai linfociti CCR5 positivi: su questi hanno creato la stessa mutazione nel gene che codifica per CCR5. Queste cellule sono state reinfuse nel paziente, hanno proliferato ecc.

Stiamo anche cercando di *rimuovere* HIV dall'interno delle cellule. Sono state sviluppate forbici che riconoscono tutti i ceppi di HIV e che tagliano il sito LTR, costante. Le forbici possono essere portate anche da un vettore HIV, così entra nelle stesse cells in cui è entrato il virus.

## 11.4 Riparazione di un gene

La patologia è la PCD: dissinesia ciliare ..., è una malattia rara (1:10000 bambini) e colpisce la struttura delle ciglia dell'apparato respiratorio, uditivo, negli spermatozoi o ciglia coinvolte nello sviluppo embrionale. Spesso questi soggetti hanno gli organi in posizione sbagliata (perchè le ciglia sono coinvolte nel posizionamento degli organi), sono sterili.

(19.05.15)

## 12 Influenza virus

Ci occupiamo di virus influenzali e parainfluenzali.

Appartengono alla famiglia delle *Orthomyxoviridae*, genoma a singolo filamento di RNA (-) segmentato. Hanno involucro esterno. Sono 3 tipi:

- A: dà malattie sia moderate che gravi, può infettare uomo ed animali
- B: malattie più modeste, infettano specie-specifico (il ceppo umano infetta solo l'uomo e quello animale solo gli animali)
- C: infezioni non molto gravi, specie-specifico

Ogni segmento del genoma codifica per una proteina ed è circondato da nucleoproteine a simmetria elicoidale. L'involucro esterno è abbondante, ma non essendo definita la geometria del capsido, anche quella dell'involucro è detta *pleiomorfa*, ovvero assume varie conformazioni a seconda di come si dispongono all'interno i segmenti del RNA.

Le proteine più importanti sono l'HA (emoagglutinina) e la NA (neuraminidasi): agiscono di concerto per ingresso del virus e fuoriuscita della particella virale. HA lega l'acido sialico<sup>29</sup>, poi interviene NA che taglia l'acido sialico: ciò consente al virus di dare inizio al processo di infezione. Processo di endocitosi → vescicola endocitotica. Segue un processo di fusione che libera gli RNA nel citoplasma. Gli RNA (-) entrano quindi nel nucleo, viene sintetizzato un filamento di RNA + dalla RNA pol virale che il virus porta. Il virus replica nel nucleo perchè gli RNA + non sono riconosciuti come mRNA dalla cellula, perchè mancano cap e coda: il virus ovvia questo problema portando con sé una RNasi<sup>30</sup> che stacca sistematicamente i cap dagli mRNA della cellula e li trasferisce su quelli virali.

Parte degli RNA + sono usati come stampo per gli RNA -, che vengono portati nel citoplasma ed inizia l'assemblaggio: la fuoriuscita avviene per

---

<sup>29</sup>che riveste le cellule del tratto respiratorio

<sup>30</sup>una RNA clivasi

gemmazione. Una volta che il virus si è assemblato e sta per uscire dalla cellula, l'HA si lega all'acido sialico che circonda la cellula: ciò impedisce il completo distacco. Interviene così NA che taglia l'acido sialico e stacca la particella virale dalla cellula.

Questi virus hanno una *replicazione locale*: meno tratto respiratorio è coinvolto, minori saranno i sintomi. Il decorso è però abbastanza rapido: il danno è virus-mediato, ma vi concorre una reazione immune piuttosto forte. La risposta cellulo-mediata insorge velocemente e in modo forte: è la responsabile della risposta all'infezione primaria. Parallelamente si manifesta una risposta anticorpale sia a livello sistemico che a livello mucosale: le IgA nelle mucose ci proteggeranno dalle infezioni successive.

I target immunologici più importanti per proteggerci da ulteriori infezioni sono gli anticorpi neutralizzanti che legano HA o NA. Si ha incubazione breve (3-4 gg), poi si manifestano i classici sintomi influenzali, dovuti alla reazione rapida e massiva del sistema immunitario (febbre, dovuta al rilascio di IL-1 da parte dei macrofagi, poi malessere, dolori muscolari, dovuti al rilascio di citochine che hanno effetto sistemico).

Le problematiche principali sono dovute al danneggiamento dell'epitelio respiratorio: le complicanze più comuni sono le polmoniti, che possono essere primarie (dovute all'agente patogeno) o secondarie (dovute da altri agenti opportunistici, solitamente batteri). La polmonite primaria è più grave: il virus si è esteso nelle vie aeree profonde ed ha causato un danno. Rare, ma fatali.

I virus influenzali evolvono nel tempo: per questo veniamo sempre infettati. Questa evoluzione avviene secondo due meccanismi:

- Antigenic drift - deriva antigenica. Avviene per tutti i virus influenzali ed è dovuta al fatto che le RNA pol sono meno fedeli rispetto alle DNA pol, visto che non hanno un sistema di correzione di bozze. Avviene in tutti i tipi (A, B e C)
- Antigenic shift - o riassorbimento<sup>31</sup>, deriva dal fatto che il genoma a RNA è segmentato. Il riassorbimento è rilevante per la patogenesi in particolare per i virus A, che infettano specie diverse. Se avviene nei segmenti codificanti per NA ed HA, il virus che emerge sarà sconosciuto dal punto di vista della protezione per il nostro organismo → danno infezioni più gravi perchè il loro ambiente ideale per la replicazione sono le vie profonde e perchè il nostro sistema immunitario è impreparato

---

<sup>31</sup>NON RICOMBINAZIONE

Questi virus sono molto contagiosi: si può però prevenire con il vaccino ed ha maggior impatto in ambito economico. Se guardiamo la morbilità<sup>32</sup>, vediamo che l'influenza ha un andamento ad U: le fasce d'età più estreme sviluppano un danno maggiore. La mortalità è invece alta negli anziani solamente.

## 12.1 Farmacologia e diagnostica

Sono di due classi:

- Amantadina e Rimantadina: per il gruppo A. Sono molto efficaci, ma estremamente tossici. Si usano solo se il soggetto è a rischio di vita, perchè bloccano il processo di endocitosi delle cellule
- Tamiflu e Relenza: farmaci di ultima generazione, usati nelle primissime fasi di infezione, bloccano la NA

Come fanno i virus a sviluppare resistenza a questi farmaci?

Mutando la NA.

Dal punto di vista diagnostico, non è rilevante valutare gli anticorpi. La diagnosi diretta è fondamentale per capire di che ceppo si tratta (se il virus è umano, aviario ecc). Si fa un tampone. La tipizzazione molecolare è fondamentale per la produzione di vaccini. Un vaccino è costituito da una miscela di virus che contiene anche i ceppi B e C, oltre al ceppo A. I ceppi di riferimento sono scelti verso gennaio-febbraio per essere commercializzati a ottobre. I vaccini vengono prodotti in uova embrionali: i lotti prodotti a maggio devono essere testati e sono poi confezionati ad agosto. Il virus nell'involucro esterno, oltre alle proteine virali, contiene anche proteine del substrato nel quale è cresciuto. Crescendo nelle uova, questi virus potevano contenere proteine delle uova: molti soggetti vaccinati svilupparono allergia alle uova. Alla fine degli anni 60 si è passati al *vaccino split*, trattati con detergenti per rimuovere il più possibile le proteine cellulari; dagli anni 70 invece si utilizza un *vaccino a subunità* in cui vengono purificate HA ed NA, non si utilizza tutto il virus.

Negli ultimi 3 anni viene utilizzato un vaccino attenuato, che dà una risposta immunologica migliore.

## 12.2 Paramixovirus

Virus parainfluenzali. Hanno involucro esterno dove possono essere presenti proteine ad attività emoagglutinina o neuroaminidasi, presenti o nella

---

<sup>32</sup>si vede con le ospitalizzazioni

stessa proteina o in proteine diverse. ssRNA (-) non segmentato, avvolto da nucleoproteine che danno una simmetria elicoidale. Assumono simmetria pleiomorfa.

La replicazione avviene a livello citoplasmatico; il virus entra con un processo di fusione classica ed introduce all'interno del citoplasma il proprio genoma. Viene sintetizzato un filamento RNA (+), che ha due funzioni:

- Stampo per RNA -
- Sintesi delle varie proteine

Il virus assembla a livello citoplasmatico e fuoriesce per gemmazione. Le glicoproteine si inseriscono sulla membrana cellulare.

Vengono prodotti dei *sincizi*, effetto citopatico prodotto da virus che entrano per fusione. visto che i target di replicazione sono le cellule epiteliali, queste cellule si trovano in continuità di cellule non infette che però espongono i recettori virali.

### 12.3 Classificazione

La famiglia Paramyxoviridae racchiude 2 sottofamiglie: Paramyxovirinae e le Pneumovirinae. I nomi derivano dalla spiccata capacità di dare infezioni importanti, soprattutto nei bambini, a livello polmonare.

### 12.4 Virus del morbillo

Incubazione di 1 settimana, nella quale il virus replica nel sito di ingresso (a livello respiratorio, ma non crea grossi sintomi). Viene poi trasmesso ai linfonodi locali, si ha una prima fase di viremia breve. Il rash è immuno-mediato. Se un soggetto contrae il morbillo, rimane immunodepresso per un periodo prolungato: la risposta torna a livelli normali dopo diverse settimane dalla scomparsa del rash. I linfociti rispondono a stimoli proliferativi in modo molto molto più ridotto. Il morbillo è una delle malattie con più alta mortalità nel mondo.

Le complicanze sono di natura neurologica: può manifestarsi una encefalite post-infettiva, perchè il virus persiste nel SNC. Nei soggetti immunodepressi, si può verificare l'*encefalite da corpi di inclusione*, mortale: il virus replica a livello del SNC e si osservano i rigonfiamenti di cellule multinucleate (sincizi). Decenni dopo la scomparsa dell'infezione può manifestarsi un'altra malattia, detta *paraencefalite sclerosante subacuta*. Ciò avviene se il bambino ha avuto l'infezione quando aveva meno di 2 anni.

C'è un vaccino, vivo ed attenuato, che viene somministrato nei primi due anni di vita.