

Virologia

Classificazione, Struttura e Replicazione dei VIRUS

I Virus sono agenti patogeni in grado di infettare le cellule animali, vegetali e batteriche. Le particelle virali complete, o **virioni**, sono caratterizzate da dimensioni estremamente modeste, comprese tra 10 e 300 nm. Sono definiti parassiti **endocellulari obbligati** perché possono replicarsi soltanto all'interno di cellule viventi: essi non sono in grado di produrre e di immagazzinare energia né di provvedere alla replicazione delle proprie unità costitutive. I virus rappresentano la forma vivente più semplice, non hanno una compartimentazione di tipo cellulare. Sono, a tutti gli effetti, dei semplici aggregati macromolecolari forniti di, ed in grado di trasferire, informazioni genetiche. Alcuni agenti infettanti subvirali o virioni sono costituiti da solo materiale genetico (RNA) senza guscio proteico. Altri, i prioni, sarebbero costituiti da soli frammenti glicoproteici autoreplicanti, senza acido nucleico. Alcuni di essi colpiscono il sistema nervoso, determinando malattie mortali tutt'oggi incurabili, come "kuru". Sono al limite tra forma vivente e non vivente. Date le loro caratteristiche, i virus sono assolutamente incapaci di replicarsi al di fuori delle cellule bersaglio, sopravvivono un tempo limitato nell'ambiente extracellulare, senza mai replicarsi fuori dalle cellule; come parassiti intracellulari obbligati, i virus necessitano non solo degli elementi nutritivi prodotti dalle cellule ospiti, ma soprattutto dei sistemi di trascrizione e traduzione di tali cellule; contengono enzimi indispensabili per il ciclo replicativo (polimerasi, proteasi, etc.), mentre tutti gli altri enzimi sono resi disponibili dalla cellula ospite. I virus attraversano filtri comuni creati per trattenere i batteri e quindi sono detti "agenti filtranti"; sono invisibili al microscopio ottico con eccezione di virus particolarmente grandi come i *Poxvirus*, ma si possono vedere al microscopio elettronico (meglio a trasmissione). Sono coltivabili in vitro in cellule isolate da organismi, o in batteri (a seconda del tipo virale) e alcuni, come *Orthomyxovirus* e *Paramyxovirus* possono essere coltivabili con facilità in uova embrionate. Hanno resistenze variabili al pH e questo regola la loro patogenicità: ad esempio i *Rinovirus* sono distrutti a pH3 ed il pH gastrico è circa 1 pertanto non sono patogeni per l'apparato gastrointestinale, ma altri *Picornavirus* sono resistenti al pH gastrico e pertanto patogeni, come *Enterovirus*. I virus rappresentano un sistema

altamente sofisticato di trasferimento genetico da cellula a cellula; tramite i virus è possibile modificare il corredo genetico (e quindi fenotipico) di una cellula, favorendone, quindi l'acquisizione di nuovi caratteri; data questa loro caratteristica naturale, sono usati nella manipolazione genetica come vettori finalizzati al trasferimento di nuovi caratteri a cellule infettabili da un determinato virus. Sono concentrabili in vitro solamente con l'uso delle ultracentrifughe (20000 e più giri al minuto). L'ultracentrifugazione su gradiente di densità permette di separare particelle virali della stessa specie virale, ma aventi densità leggermente diversa a causa di quantità diverse di proteine o di acido nucleico presente. A seconda del loro specifico tropismo, possono infettare cellule vegetali (come il virus del tabacco, della patata, etc..), batteri (batteriofagi, ognuno specifico per la determinata specie batterica), e cellule animali (virus di insetti, pesci, uccelli, mammiferi). I virus sono insensibili agli antibiotici.

- Costituenti Virali

Core, che è l'Acido nucleico più ogni molecola che ne determina la stabilità; il **Capside**, la struttura proteica che racchiude l'Acido nucleico o il core; il **Capsomero**, o l'unità proteica che, ripetuta, forma il capside icosaedrico; il **Nucleocapside**, che è l'Acido nucleico più il capside; **Envelope** o Pericapside, involucro lipoglicoproteico esterno; **Peplomeri**, che sono le porzioni superficiali che protrudono dall'-envelope; il **Virione**, infine, è la particella virale completa come si può osservare al di fuori della cellula.

I virus li distinguiamo in **Nudi**, quando sono formati da Acido nucleico e proteine, quindi quando è formato solo dal Nucleocapside e in **Rivestiti**, quando sono formati da Acido nucleico, proteine, lipidi e carboidrati, quindi quando il Nucleocapside è rivestito da una membrana o Envelope (lipidi e carboidrati sono contenuti nella membrana limitante esterna e sono identici a quelli della cellula ospite e non sono codificati dal virus).

Le proteine virali si distinguono in:

- 1) Proteine funzionali che permettono ad esempio all'acido nucleico virale di replicarsi (DNA- o RNA-polimerasi).
- 2) Proteine strutturali: incorporate nelle nuove particelle virali come costituenti del capside o come strutture particolari (esempio le emoagglutinine).

- 3) Proteine che alterano alcune funzioni e strutture della cellula ospite.
- 4) Proteine strettamente associate agli acidi nucleici.
- 5) Proteine di matrice o M.

- Morfologia Virale

I virus, nella loro forma extracellulare (virione), hanno una struttura cristallizzata tipica, quindi all'interno delle cellule in cui si replicano, non sono mai reperibili in forma completa, eccetto che poco prima della loro uscita dalla cellula o gemmazione; di norma all'interno delle cellule è possibile trovare materiale genetico del virus, e proteine virali più o meno assemblate.

La struttura di base dei virus consiste nell'**acido nucleico** (o RNA o DNA) e in un rivestimento proteico detto **capside**. Il **genoma** contiene tutta l'informazione genetica necessaria per la replicazione; è molto labile ad agenti denaturanti, come nucleasi, esteras, forza ionica etc.. e non può da solo penetrare nella cellula ospite.

La quantità di acido nucleico è indice della complessità strutturale del virione.

Il **capside** costituisce una struttura continua e impermeabile agli agenti esterni e protegge l'acido nucleico. Alcune proteine che lo compongono possiedono una specifica affinità per particolari recettori della membrana citoplasmatica della cellula ospite. Queste strutture permettono il legame del virus alla cellula e la penetrazione dell'acido nucleico.

Alcuni virus posseggono una membrana limitante esterna della **envelope**, o pericapside o peplos.

I virus col solo capsid sono detti nudi e con envelope, rivestiti, ed i virus più grandi possono avere una struttura più complessa.

Il Pericapside o Envelope è uno strato lipidico, in alcuni casi glicoproteico, esterno all'involucro, presente solo in alcune famiglie di virus, come gli Orthomyxovirus, Herpesvirus, Retrovirus, Poxvirus, etc.. ed è costituito da lipidi delle membrane della cellula infettata, rimasti intorno al virus vero e proprio al momento della fuoriuscita dalla cellula stessa o "budding". Contiene anche alcune glicoproteine virali, che fungono da primo recettore virale nei confronti delle cellule bersaglio. Svolge funzione di protezione, di riconoscimento antigenico (emoagglutinina del virus

influenzale) e di penetrazione nella cellula ospite tramite il meccanismo di fusione con la membrana cellulare. La presenza del pericapside rende ragione della sensibilità di alcuni virus ai disinfettanti organici, quali eteri e alcoli, in grado di sciogliere i lipidi. La base di tutti gli involucri virali è una membrana lipidica acquisita dalla cellula ospite durante l'assemblaggio; le proteine virali vengono inserite nella membrana lipidica e la grande maggioranza di queste sono glicoproteine (oligomeri). L'involucro ha varie funzioni quali l'aggancio, fusione ed entrata (HA- emoagglutinina), l'attività enzimatica (NA- neuraminidasi), di canale ionico (M2) e di antigeni principali (HA, NA).

Il Capside è proprio del virus invece. E' geneticamente determinato e costituito da subunità proteiche disposte in modo regolare, codificate dal genoma virale. Dato il limitatissimo patrimonio genetico del virus, le proteine costituenti i capsomeri (unità di base del capside) sono molto poche, specifiche del virus, e in grado di interagire con i componenti sulla superficie cellulare fungendo da recettori. Conferisce resistenza al materiale genetico virale nei confronti delle nucleasi presenti nei fluidi. Il capside è costituito da proteine codificate dal genoma virale, la cui ridotta lunghezza permette una sintesi limitata di proteine. Il capside in genere è quindi costituito da unità ripetitive di una o poche proteine. Le proteine destinate a formare il capside sono capaci di autoricombinarsi (assemblaggio) seguendo due schemi fondamentali definiti: a simmetria elicoidale e a simmetria cubica (detta anche icosaedrica). La simmetria virale, dovuta all'interazione genoma-proteine, può essere:

- a) **Elicoidale**, quando l'acido nucleico si avvolge sulla struttura proteica di base, determinando, al microscopio elettronico, una forma oblunga (virus del mosaico del tabacco, orthomyxovirus, rhabdovirus etc.). Tutte le subunità proteiche sono identiche tra loro.
- b) **Icosaedrica**, quando i capsomeri (unità di base dell'icosaedro costituente il capside) sono organizzati a costituire una struttura poliedrica regolare con 20 facce costituite da triangoli equilateri. All'interno è situato il nucleocapside, aderente in alcuni punti ai capsomeri. E' presente nella maggioranza dei virus.
- c) **Complessa**, struttura non classificabile secondo canoni ristretti, come batteriofagi, poxvirus, etc.

Tutti i virus di un determinato tipo saranno assolutamente uguali tra loro.

Nei Virus a simmetria elicoidale le subunità proteiche, dette protomeri, si dispongono lungo un asse elicoidale intorno all'acido nucleico a formare il nucleocapside che assume struttura tubulare. Nella maggior parte dei casi i virus animali con questa simmetria possiedono l'envelope. Vari nucleocapsidi si differenziano per lunghezza, diametri, passo dell'elica e numero di protomeri per spira. Gli involucri pericapsidici conferiscono ai virioni forma pleiomorfa.

Nei Virus a simmetria icosaedrica il capsido costituisce una sorta di guscio per il genoma. Le subunità proteiche costituite da una singola molecola polipeptidica o da un aggregato di molecole peptidiche si riuniscono a formare le unità morfologiche, dette **capsomeri**, del capsido. I capsomeri si combinano a formare solidi regolari. L'icosaedro è un solido costituito da 20 facce triangolari e 12 vertici. I vari virus con questa simmetria si differenziano per numero e distribuzione dei capsomeri; i capsomeri possono essere dei pentameri o degli esameri; nell'*Herpesvirus* ad esempio troviamo 162 capsomeri, 12 dei quali sono pentameri e 150 esameri, mentre nell'*Adenovirus* troviamo 252 capsomeri, con 12 pentameri e 240 esameri. Inoltre alcuni virus sono nudi, mentre altri possiedono l'envelope. Ci sono poi delle eccezioni o egli degli elementi che caratterizzano alcune famiglie di virus, come:

- a) *Rotavirus*, che presentano un doppio capsido (struttura a ruota).
- b) *Adenovirus*, che presentano delle estroflessioni dal capsido che fungono da recettore virale sulla superficie cellulare.
- c) *Arenavirus*, che hanno un aspetto sabbioso determinato dall'inglobamento di ribosomi durante il ciclo ripetitivo.

Il **Core** o Nucleocapside è un' area interna del virus, in cui si trova il materiale genetico del virus (a RNA o a DNA, a seconda del tipo virale), frammisto a proteine anch'esse proprie del virus, in parte strutturali (che impacchettano e stabilizzano il genoma) e in parte funzionali (polimerasi, proteasi, etc..). Può essere compatto (*Alfavirus*), Filamentoso (*Paramyxovirus*) e Multisegmentato (*Orthomyxovirus*).

Quando miscele di RNA di virus del mosaico del tabacco purificato TMV e proteina coat venivano incubate insieme, si formavano particelle di virus elicoidale, Questo indica che la particella di virus si ordina da sola e predispone la struttura con la minima energia libera, ad esempio la più stabile, quindi si autoassemblano.

I virus nudi di origine animale hanno una simmetria esclusivamente icosaedrica.

I virus con envelope possono avere il nucleocapside sia a simmetria elicoidale, sia a struttura icosaedrica.

I virus più grandi, come *Poxvirus*, possono avere una struttura morfologica più complessa.

Genoma Virale

Tutti i virus contengono un solo tipo di acido nucleico. Quelli a RNA, in particolare rappresentano un'eccezione in natura, in quanto la loro informazione genetica non è contenuta nel DNA. A seconda del tipo virale, il genoma codifica per un numero diverso di proteine, da un minimo di 3 a un massimo di alcune centinaia. A seconda dei vari tipi di virus, il genoma (DNA o RNA) può essere a singolo o doppio filamento, lineare o segmentato in varie porzioni (es. virus influenzale) ognuna codificante per una proteina. Tra i virus a RNA, alcuni hanno il filamento cosiddetto positivo (che funge anche da RNA messaggero), altri hanno il filamento negativo (che deve sintetizzare, sul suo stampo, un filamento complementare di RNA che fungerà da messaggero).

I Virus a RNA, o *Ribovirus*, possiedono un RNA a singola elica (tranne la famiglia dei *Reovirus* che è a doppia elica), del peso di circa $2-10 \times 10^6$ Da, a volte (*Orthomyxovirus*) diviso in frammenti. Nei *reovirus* è a doppio filamento segmentato (più resistente del singolo filamento all'RNAsi e ai disinfettanti). Si dividono in due sottoclassi:

- 1) Virus con RNA a **polarità positiva (+)** che può fungere nella cellula direttamente da RNA messaggero.
- 2) Virus con RNA a **polarità negativa (-)** che funge da stampo per la sintesi dell'RNA messaggero (hanno l'enzima RNA polimerasi RNA dipendente associato al virione).

I *Reovirus* e alcune famiglie di virus a RNA a polarità negativa hanno un genoma con sequenze indipendenti di RNA (virus influenzale con 8 frammenti, *bunyavirus* con 3, *Reovirus* con 12).

I Virus a DNA, o *Deossiribovirus*, normalmente hanno un DNA a doppia elica con filamento unico e lineare. Alcuni virus (*Papovirus* ed *Hepadnavirus*) contengono DNA circolare e altri (*Parvovirus*) hanno un DNA monocatenario. La grandezza del genoma

dà la misura della complessità del virus e della sua replicazione (più evidente nei virus a DNA rispetto ai virus a RNA).

Il DNA è una molecola unica, del peso da $1,5 \times 10^6$ Da (*parvovirus*, gran parte dei batteriofagi) a 200×10^6 Da (*poxvirus*), solitamente a doppio filamento lineare, con l'eccezione dei *parvovirus* (singolo) *papovirus* (doppio filamento circolare), *hepadnavirus* (doppio filamento incompleto, circolare).

Il contenuto in guanina-citosina nei *retrovirus* (che si integrano nel genoma delle cellule ospiti) è simile a quello riscontrato nelle cellule stesse (circa il 50% del totale), e questo probabilmente favorisce l'interazione tra i due DNA.

Le proteine non strutturali aiutano la replicazione virale ma non sono incorporate nel virione; sono enzimi necessari per la sintesi e la replicazione del DNA (es. RNR, TK, DNA polimerasi di *Herpesvirus*); sono anche proteine che influiscono sulla fisiologia della cellula (es. E6/E7 di *papillomavirus* umani); ancora, sono proteine che sopprimono le difese della cellula ospite (es. gli inibitori della presentazione di antigeni).

CLASSIFICAZIONE VIRALE

Si basa su criteri morfologici, strutturali, chimici e replicativi: forma, dimensioni, tipo e struttura del genoma, strategia replicativa. In base a queste caratteristiche i virus vengono suddivisi in: **Famiglie** (con suffisso -viridae), **Sottofamiglie** (generalmente con suffisso -virinae), **Generi** (con suffisso -virus) e **Specie**. Ulteriori suddivisioni in sottospecie, tipi, ceppi etc. vengono di volta in volta stabilite da apposite commissioni per la nomenclatura in base a criteri che risultino via via accettati. Nella pratica medica si continuano ad indicare i virus secondo la nomenclatura comune: con il nome di "virus" seguito da quello della malattia che determina nell'ospite principale (per es. virus del morbillo, dell'influenza, della poliomielite etc.) oppure con il nome che gli è stato attribuito al momento dell'isolamento (es. virus di Epstein-Barr etc.).

L'attuale classificazione si basa sul tipo di genoma (DNA o RNA) e la sua configurazione (mono o bicatenario, lineare o circolare, monofilamento o segmentato, a polarità positiva o negativa), sul tipo di simmetria, sulla presenza di involucro pericapsidico, sul meccanismo di replicazione. Molti virus non sono ancora stati classificati oppure lo sono solo provvisoriamente; per alcuni agenti non è ancora stata accertata la natura virale (per esempio gli agenti delle encefaliti spongiformi

dell'uomo e di vari animali). La classificazione basata sulla sequenza è basata sulla percentuale di identità delle sequenze genomiche, consente la costruzione di un albero filogenetico e consente una comprensione migliore della relazione filogenetica tra gli ordini inferiori. Il sistema di classificazione Baltimore si basa sulla natura e polarità dei genomi virali e descrive le relazioni obbligatorie tra il genoma virale e il suo mRNA.

REPLICAZIONE VIRALE

A causa della natura di parassita intracellulare obbligato, il virus può esprimere la sua attività biologica solo all'interno di una cellula ospite che permetta la completa espressione del suo genoma e la produzione di nuove particelle virali. Il virus si lega alla superficie della cellula ospite e vi introduce il proprio genoma; il genoma deve essere in grado di esprimersi e di utilizzare l'apparato sintetico della cellula per la sintesi dei costituenti virali; questi costituenti si combineranno in modo da formare i nuovi virioni. I virioni prodotti, liberati dalla cellula estenderanno l'infezione ad altre cellule dell'ospite; la replicazione virale può avvenire solo in cellule sensibili, capaci di far esprimere completamente il genoma virale.

La cellula ospite deve avere due caratteristiche principali:

- 1) **Sensibilità**- strettamente condizionata dalla presenza di adeguati recettori cellulari che permettono l'attacco del virus alla cellula ospite (adsorbimento).
- 2) **Permissività**- dipende da tutti quei meccanismi molecolari-cellulari che risultano adeguati alla completa trascrizione del genoma virale e alla sintesi di tutte le proteine virus-codificate.

L'infezione può essere:

- 1) **Produttiva**, quando si parla di un'infezione di una cellula permissiva da parte di un virione completo che porta alla produzione di virioni di progenie in numero variabile a seconda del tipo di virus o di cellula.
- 2) **Abortiva**, quando non si completa. Può in alcuni casi non completarsi e si verifica quando il virus infettante è difettivo (ad esempio mancheranno parti essenziali del proprio genoma) o quando la cellula consente l'espressione di solo alcuni geni virali portando all'arresto dell'infezione.

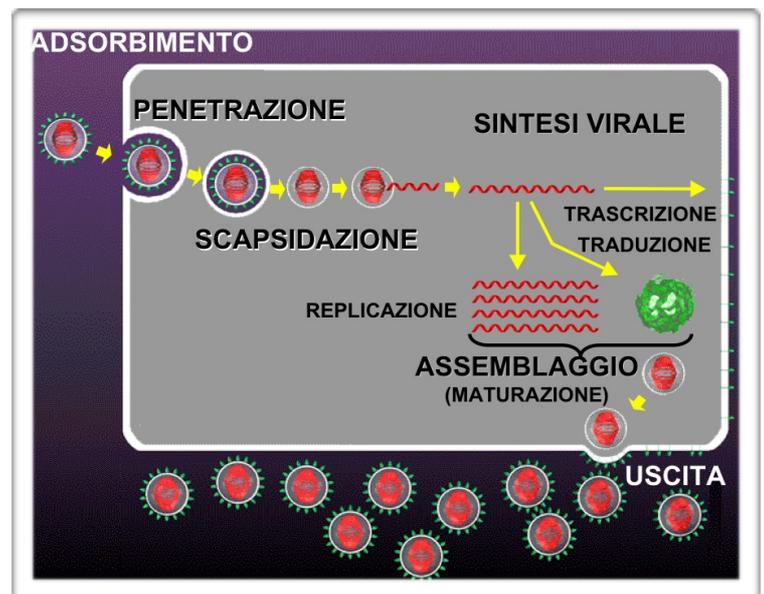
3) **Restrittiva**, quando le cellule sono permissive solo in una certa fase del loro ciclo vitale.

Le infezioni di tipo abortivo e restrittivo possono consentire la persistenza del virus all'interno della cellula ospite, e quindi un'infezione **Latente**: il DNA virale infettante può integrarsi nel genoma della cellula ospite o mantenersi all'interno di essa in forma episomale. Ad ogni ciclo cellulare, il virus viene replicato, ma solo nel momento in cui si hanno le condizioni ambientali favorevoli il genoma virale può dare inizio al processo di trascrizione.

Il ciclo replicativo virale può essere suddiviso in 6 fasi:

- 1) Adsorbimento
- 2) Penetrazione
- 3) Scapsidazione
- 4) Replicazione
- 5) Maturazione
- 6) Liberazione

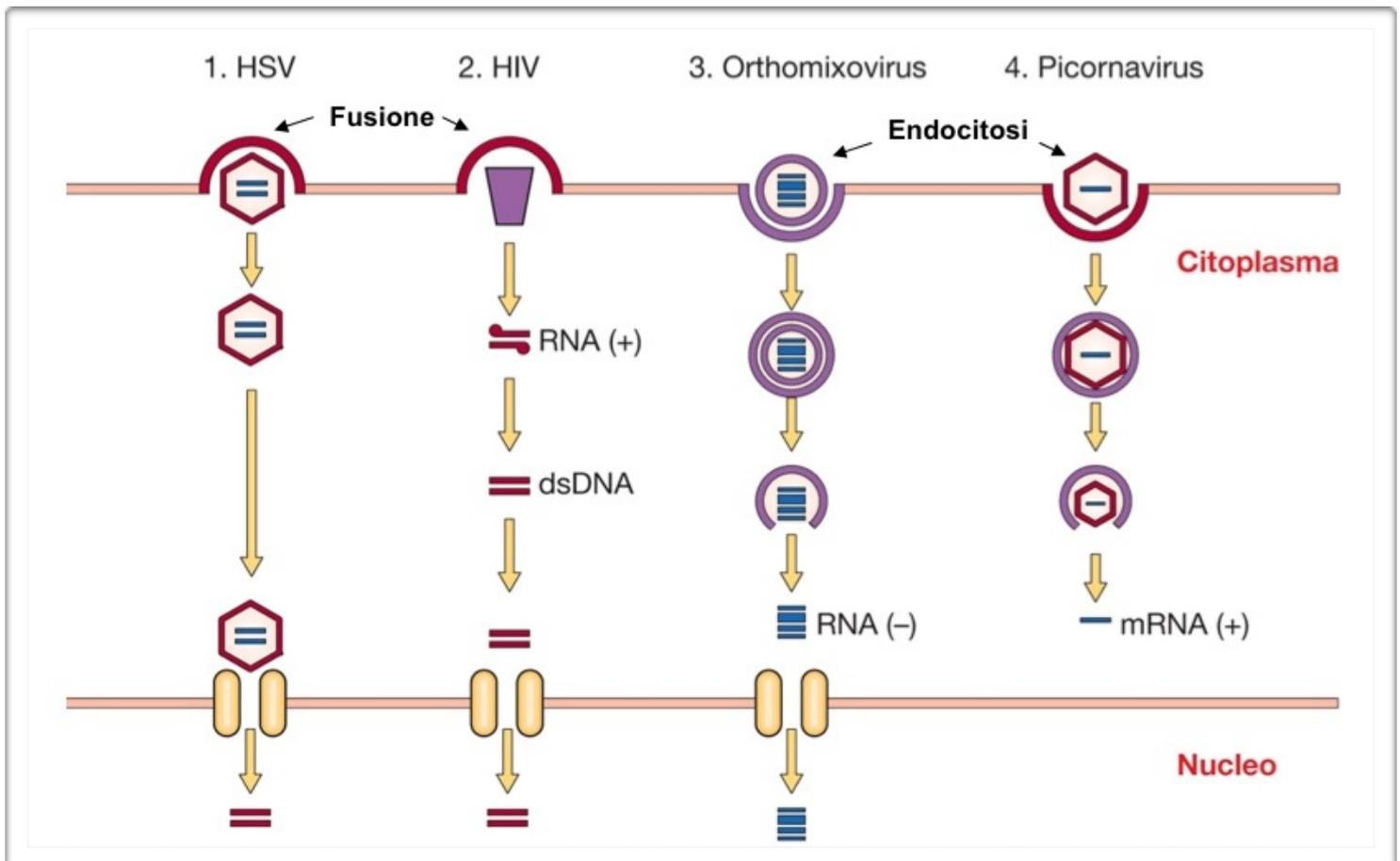
Il periodo che intercorre tra penetrazione del virus nelle cellule e la maturazione della progenie virale viene definito periodo di eclissi, non essendo più il virus reperibile come entità morfologica nella cellula.



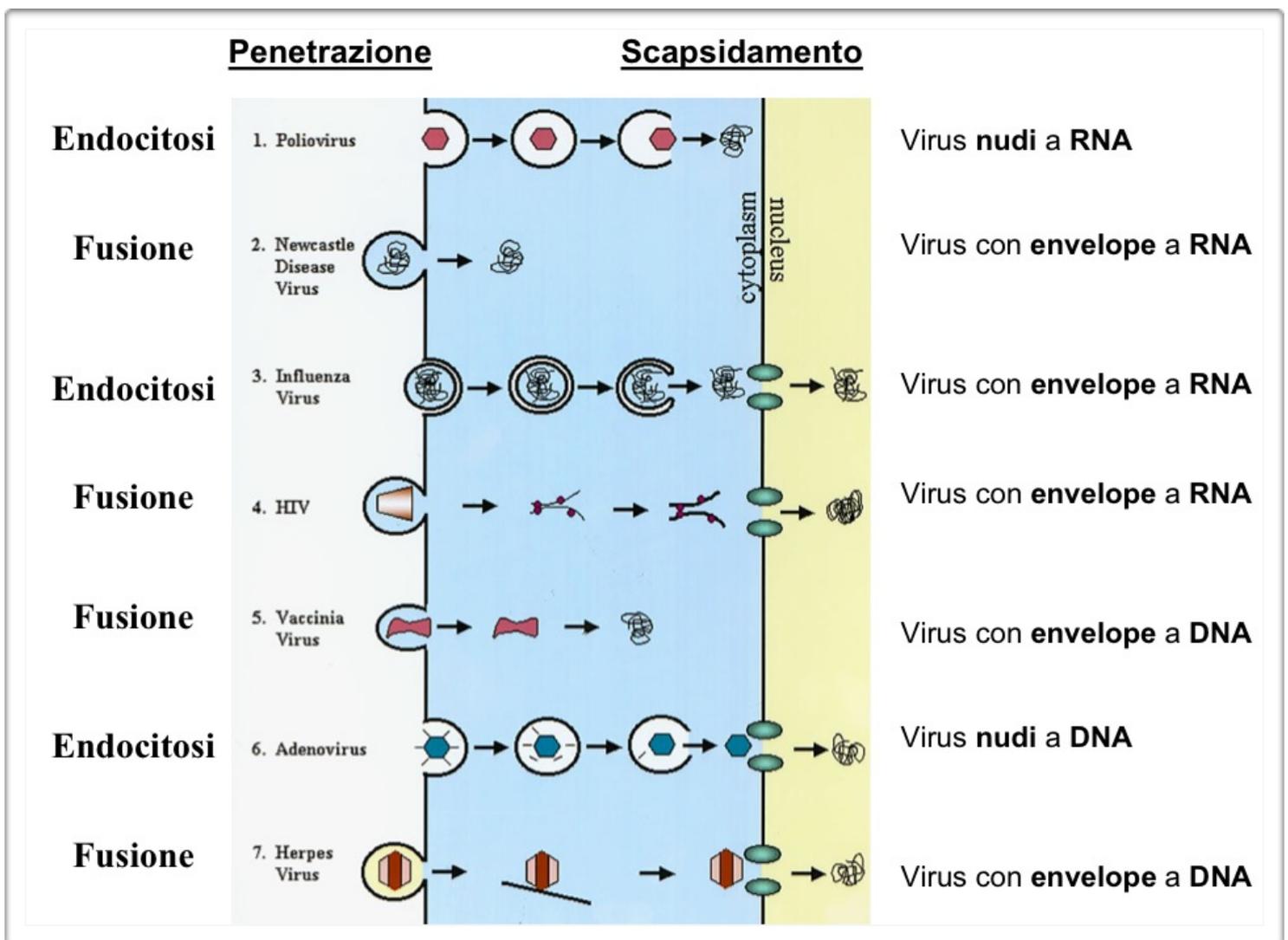
1) **ADSORIMENTO**: E' il fenomeno che richiede un'interazione tra specifiche strutture di superficie del virione (antirecettori) con recettori della membrana citoplasmatica della cellula. La specificità del legame determina il tropismo virale, cioè la proprietà dei virus di infettare prevalentemente (o addirittura esclusivamente) determinate specie animali (o tessuti e organi). Il legame può essere molto stabile (esempio tra l'emoagglutinina del virus influenzale e l'acido sialico delle glicoproteine della membrana cellulare). In altri casi (la maggior parte dei virus nudi) il legame è meno stabile e avviene attraverso una complementarietà di cariche tra molecole sulla superficie del virus e sulla membrana della cellula ospite. Molti degli antirecettori sono stati identificati e caratterizzati: in genere sono le glicoproteine nei virus con envelope e proteine semplici nei virus nudi. I recettori sono strutture che nella cellula svolgono normalmente una funzione fisiologica ben precisa (che il virus si è evolutivamente

adattato ad utilizzare ai propri fini). L'adsorbimento richiede solo una partecipazione passiva della cellula.

- 2) **PENETRAZIONE:** In questo processo è necessario un intervento attivo da parte della cellula (ad esempio è possibile solo a temperatura ottimale per la cellula) Può avvenire in diversi modi. La Traslocazione, con cui l'intero virione oltrepassa la membrana citoplasmatica ed entra come tale nel citoplasma (*virus nudi*); l'Endocitosi, l'adesione del virus sulla membrana ne provoca l'introfflessione che trasporta il virus nel citoplasma racchiuso in un vacuolo fagocitario (*virus nudi*, *virus con involucro*); Fusione, in cui l'involucro lipoproteico del virus si fonde con la membrana citoplasmatica (lipoproteica) ed il nucleocapside entra nel citoplasma; in alcuni virus (*Paramyxovirus*, *Herpesvirus*) questo processo è facilitato da proteine fusogene (*virus con involucro*).



- 3) **SCAPSIDAMENTO:** Evento che segue l'entrata del virus e precede la replicazione del genoma attraverso il quale il genoma virale si separa dalle proteine che lo rivestono. E' un meccanismo che può avvenire attraverso varie modalità; non è ben chiaro ed è possibile che lo stesso virus possa seguire vie



diverse a seconda delle situazioni e del tipo di cellula ospite. Per molti virus le proteine virali si disgregano spontaneamente o con l'intervento di proteasi cellulari o enzimi lisosomiali che si riversano all'interno di vacuoli fagocitari (fagolisosomi o virosomi). Nel virus influenzale una proteina dell'involucro M2, agisce da canale ionico e provoca l'acidificazione del virus all'interno del vacuolo fagocitario; ne consegue la fusione del pericapside con la membrana del vacuolo e la liberazione del nucleocapside nel citoplasma.

- 4) **REPLICAZIONE:** Una volta che il genoma virale si è liberato dal pericapside ed ha raggiunto la propria sede, inizia la sintesi delle macromolecole virali; ciò comporta la produzione di numerose copie di componenti strutturali e genomici necessari per la formazione della nuova progenie (i virus sfruttano l'apparato biosintetico cellulare).
- 5) e 6) **MATURAZIONE e REPLICAZIONE:** Una volta sintetizzati i genomi e le proteine, questi componenti devono associarsi in modo da costituire i nuovi virioni; le nuove particelle virali devono fuoriuscire dalle cellule che le hanno

prodotte per poter infettare altre cellule. Sono differenti tra i virus le modalità di uscita.

Tornando alla replicazione, esistono diverse strategie replicative che i virus hanno sviluppato nel corso della loro evoluzione; strategie replicative rispetto l'organizzazione ed espressione dei geni virali, alla replicazione dei genomi virali ed all'assemblaggio delle particelle virali neoformate. Un virus deve essere in grado di superare alcuni ostacoli imposti dall'organizzazione della cellula ospite.

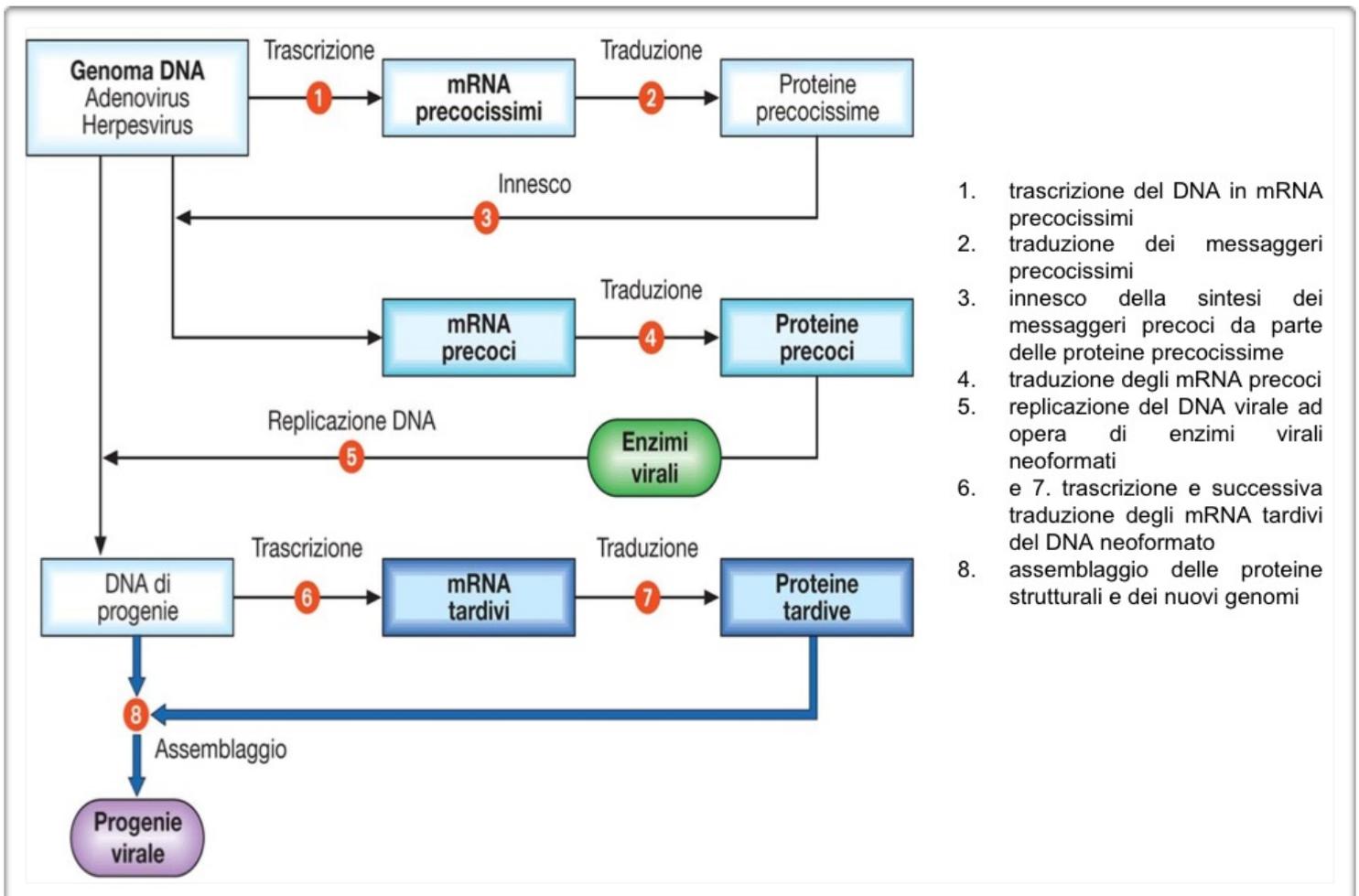
- a) Nella cellula eucariotica gli mRNA vengono sintetizzati nel nucleo per trascrizione del DNA ad opera di polimerasi cellulari e quindi trasferiti nel citoplasma dove vengono tradotti nelle rispettive proteine. La cellula non possiede enzimi in grado di sintetizzare mRNA per trascrizione di una molecole di RNA, sia nel nucleo che nel citoplasma, nonché di enzimi in grado di trascrivere il DNA nel citoplasma. Quindi solo i virus il cui genoma sia formato da DNA, siano in grado di raggiungere il nucleo della cellula, possiedano i necessari segnali per l'attacco dei vari fattori di trascrizione e polimerasi cellulari necessari, sono in grado di utilizzare il sistema di trascrizione cellulare a proprio vantaggio per sintetizzare i propri mRNA. Tutti gli altri virus devono possedere polimerasi virus-specifiche con caratteristiche di volta in volta necessarie (esempio *Poxvirus*: deossiribovirus a replicazione citoplasmatica; *Ribovirus* a genoma negativo).
- b) Il sistema della sintesi proteica della cellula eucariotica è predisposto per la traduzione di messaggi monocistronici. Quindi mRNA virali che trascrivono più di un gene, vengono tradotti in una poliproteina che viene poi tagliata nelle varie proteine funzionali.
- c) Nella cellula infetta l'espressione dei geni virali è in competizione con i geni cellulari. Per poter avere il sopravvento, i virus o producono mRNA che sono favoriti nel processo di traduzione, o hanno evoluto meccanismi in grado di bloccare o limitare le sintesi macromolecolari della cellula ospite.

- Strategie di replicazione dei virus a DNA

I virus a DNA seguono 4 diverse strategie replicative, 3 per i virus a genoma bicatenario e 1 per quelli a genoma monocatenario (*parvovirus*).

Del 1° gruppo troviamo *Herpesvirus*, *Adenovirus* e *Papovavirus*. Questi virus usano per la trascrizione le RNA polimerasi DNA-dipendenti dalla cellula e pertanto debbono iniziare la loro trascrizione nel nucleo della cellula, dove ci sono gli enzimi necessari.

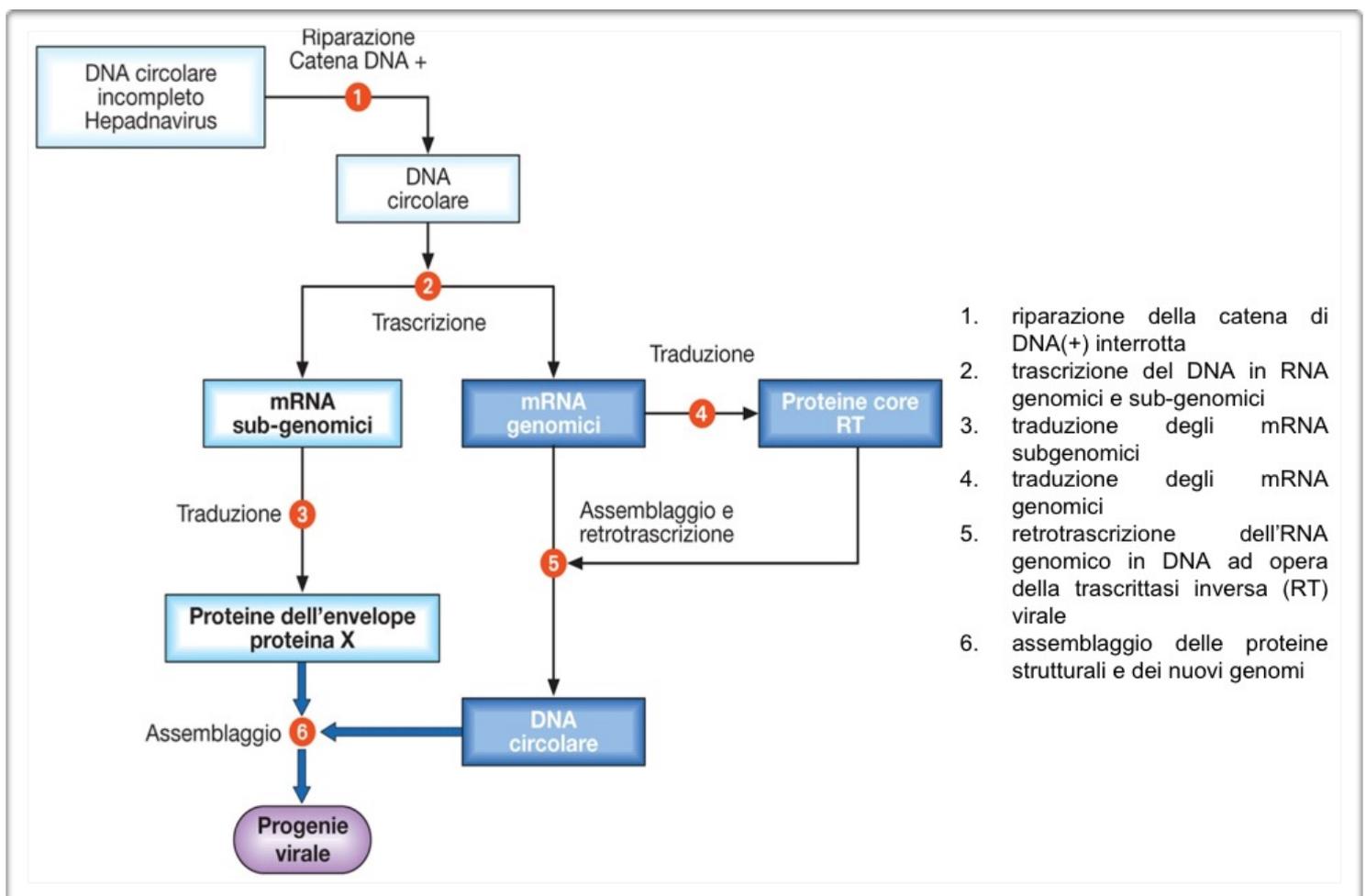
Il genoma dei *Papovavirus* viene trascritto in due tempi, quello degli *Herpesvirus* e degli *Adenovirus* in tre tempi, con produzione rispettivamente di due e tre distinti gruppi di mRNA, l'ultimo dei quali destinato alla produzione delle proteine strutturali del virione. La replicazione di alcuni virus con genoma dsDNA procede in questo modo: Si parte dal genoma DNA (Adenovirus ed Herpesvirus ad esempio) e la prima fase è la trascrizione del DNA in mRNA precocissimi, seguita dalla traduzione di questi messaggeri precocissimi, poi la terza fase è l'innescò della sintesi dei messaggeri precoci da parte delle proteine precocissime (formate dalla traduzione di mRNA precocissimi), poi segue ancora la traduzione degli mRNA precoci per formare proteine precoci e poi la replicazione del DNA virale ad opera di enzimi virali neoformati (proteine precoci), poi ancora trascrizione e successiva traduzione degli mRNA tardivi del DNA neoformato ed infine assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi.



Del 2° gruppo fanno parte i *Poxvirus* il cui intero ciclo di replicazione si compie nel citoplasma pur essendo un virus a DNA, utilizzano per la trascrizione una polimerasi veicolata dal virione.

Nel 3° gruppo troviamo i *Parvovirus*, che possiedono un DNA monocatenario che per opera di enzimi cellulari dovrà digerire la sintesi di una catena complementare di DNA e la trascrizione di mRNA. Questi eventi si verificano nel nucleo della cellula.

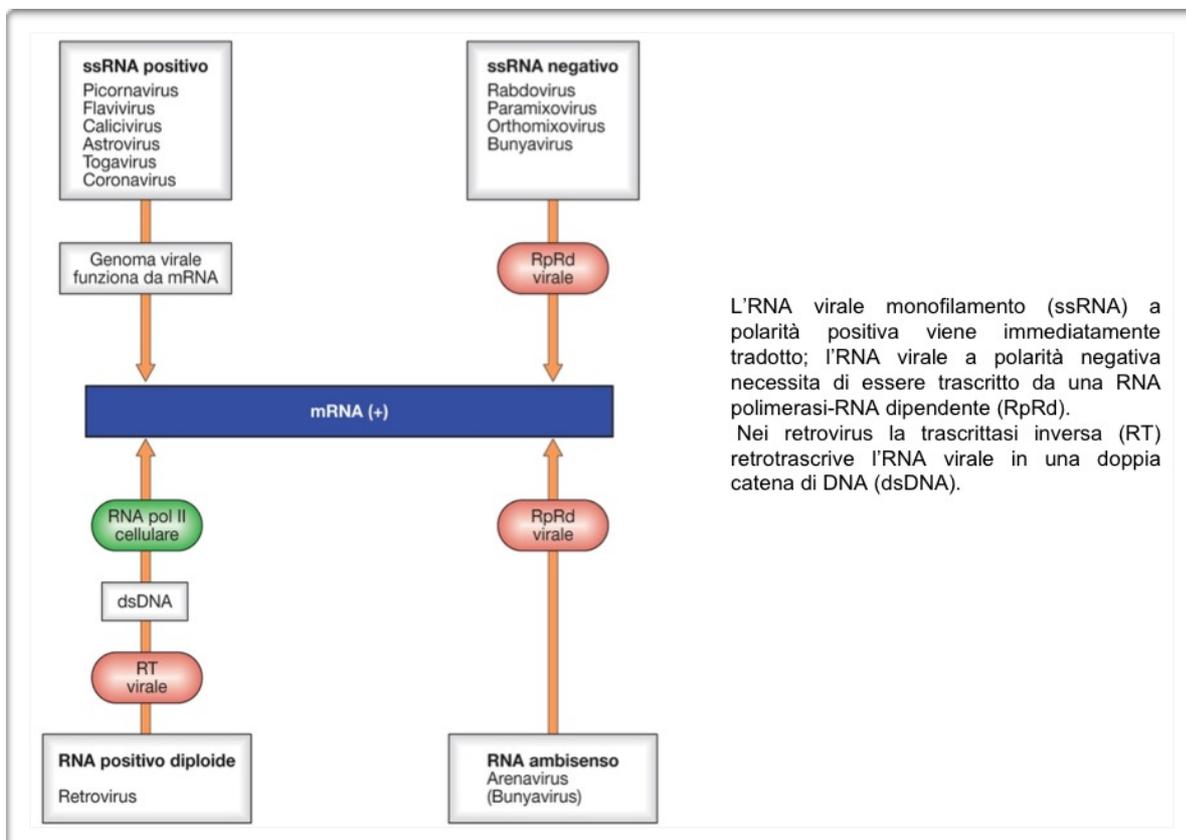
Nel 4° gruppo troviamo gli *Hepadnavirus*. L'unico patogeno per l'uomo è il **virus dell'epatite B**. Questi virus hanno un genoma circolare costituito da DNA bicatenario con un'interruzione nella catena a polarità positiva. Mediante enzimi cellulari nucleari di riparo, il tratto mancante viene sintetizzato con produzione di una molecola interamente bicatenaria che si superavvolge. Successivamente, ad opera di enzimi cellulari nucleari, vengono trascritti una serie di mRNA subgenomici che codificano per le proteine strutturali e un RNA genomico che, incorporato nel nucleocapside, verrà trascritto in DNA dalla DNA-polimerasi RNA-dipendente virale.



La replicazione per questa famiglia di virus comincia a partire dal DNA circolare incompleto degli *Hepadnavirus*; viene per prima cosa riparata la catena di DNA (+) interrotta; poi segue la trascrizione del DNA in RNA genomici e subgenomici; poi gli mRNA subgenomici vengono tradotti e successivamente sono tradotti quelli genomici; segue poi una retrotrascrizione dell'RNA genomico in DNA ad opera della trascrittasi inversa (RT) virale ed infine l'assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi, la Progenie virale.

- Strategie di replicazione dei virus a RNA

I virus a RNA seguono 4 principali strategie, due delle quali con significative variazioni a seconda dei gruppi di virus. Virus con RNA monocatenario, monofilamento, a polarità positiva, non hanno inizialmente bisogno di trascrivere il proprio genoma perché il loro RNA può essere subito tradotto dai ribosomi della cellula. Nei *Picornavirus* e nei *Flavivirus* (tra cui il **virus dell'epatite C**) il prodotto della traduzione è l'unica poliproteina che viene successivamente scissa nelle varie proteine codificate per opera di proteasi virali. Nei *Togavirus*, *Coronavirus* e *Calicivirus* (**epatite E**) viene prima tradotto un tratto del genoma all'estremità 5', che codifica per proteine funzionali, e dopo la replicazione del genoma vengono prodotti mRNA subgenomici per le proteine strutturali corrispondenti all'estremità 3'.



L'RNA monofilamento (ssRNA) a polarit  positiva viene immediatamente tradotto; l'RNA virale a polarit  negativa necessita di essere trascritto da una RNA polimerasi RNA-dipendente (RpRd). Nei retrovirus la trascrittasi inversa (RT) retrotrascrive l'RNA virale in una doppia catena di DNA (dsDNA).

Replicazione dei virus con genoma a RNA (+) - Schema di replicazione -

-RNA a singola catena con polarit  di RNA messaggero: (+) RNA.

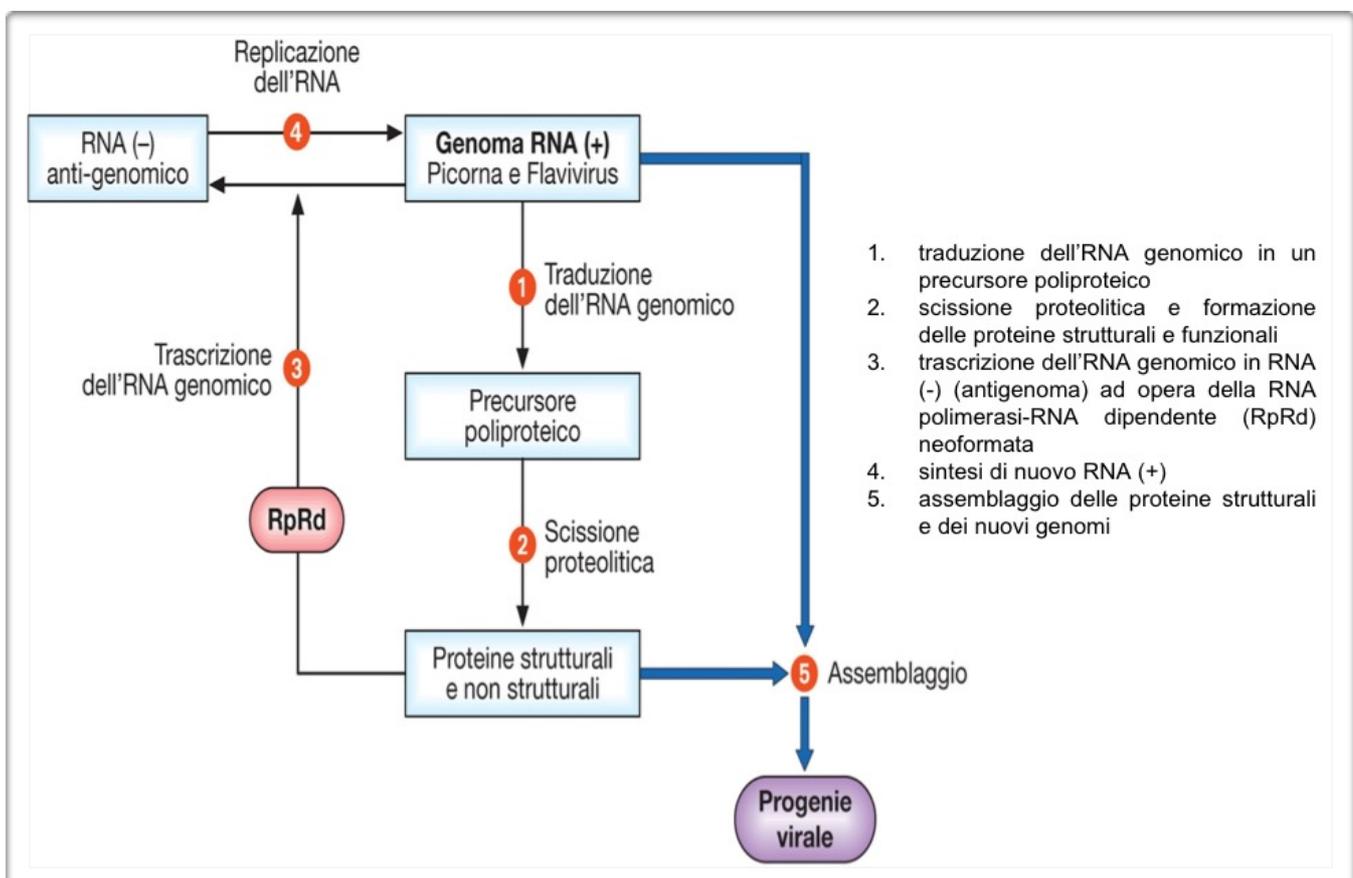
-Pu  funzionare subito come mRNA.

-Il genoma virale ha due funzioni essenziali:

1) Agisce come mRNA

2) Serve da stampo ad una molecola complementare di (-) (RNA) ad opera di una polimerasi virale

-(-) RNA a sua volta serve come stampo per la sintesi di (+) RNA identica al genoma virale



-Le nuove molecole (+)RNA possono a loro volta servire o come mRNA per altre proteine oppure come genoma per i virus neoformati.

Replicazione dei virus con genoma a RNA(-) - Schema di replicazione -

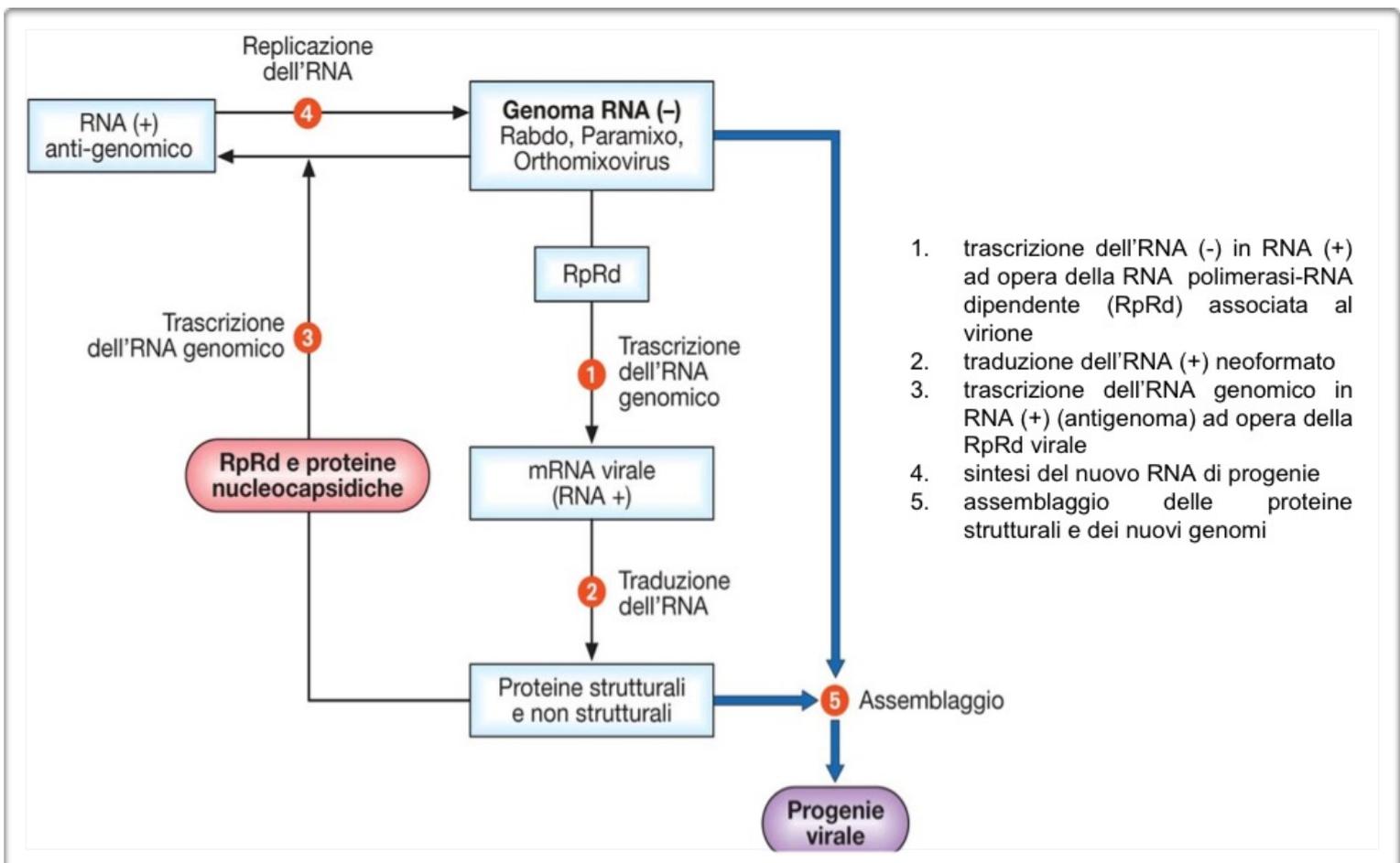
-RNA singola catena con polarità negativa, antisenso: (-) RNA

-Non può funzionare come mRNA

-Questo genoma ha una doppia funzione di stampo:1) per la trascrizione dei messaggeri; 2) per la propria replicazione (sintesi di un intermedio di (+)RNA)

-La trascrizione avviene per una trascrittasi virale presente nel virione

-La molecola di (+)RNA serve come stampo per la sintesi di (-)RNA che costituirà il genoma delle particelle virali



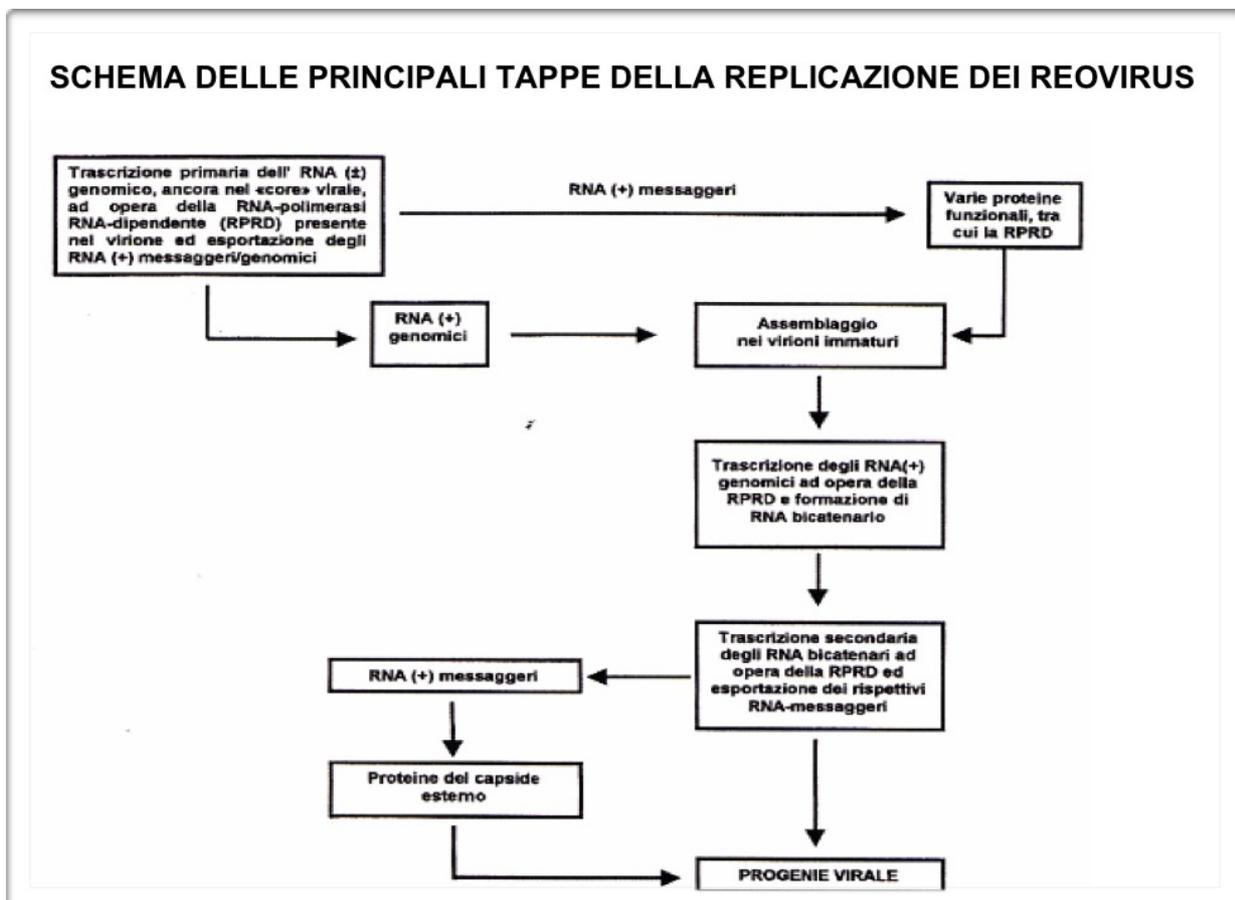
Ribovirus con RNA bicatenario: *Reovirus*

-Hanno RNA bicatenario

-E' necessaria una trascrittasi virale (RNA-polimerasi RNA-dipendente) per iniziare il ciclo replicativo

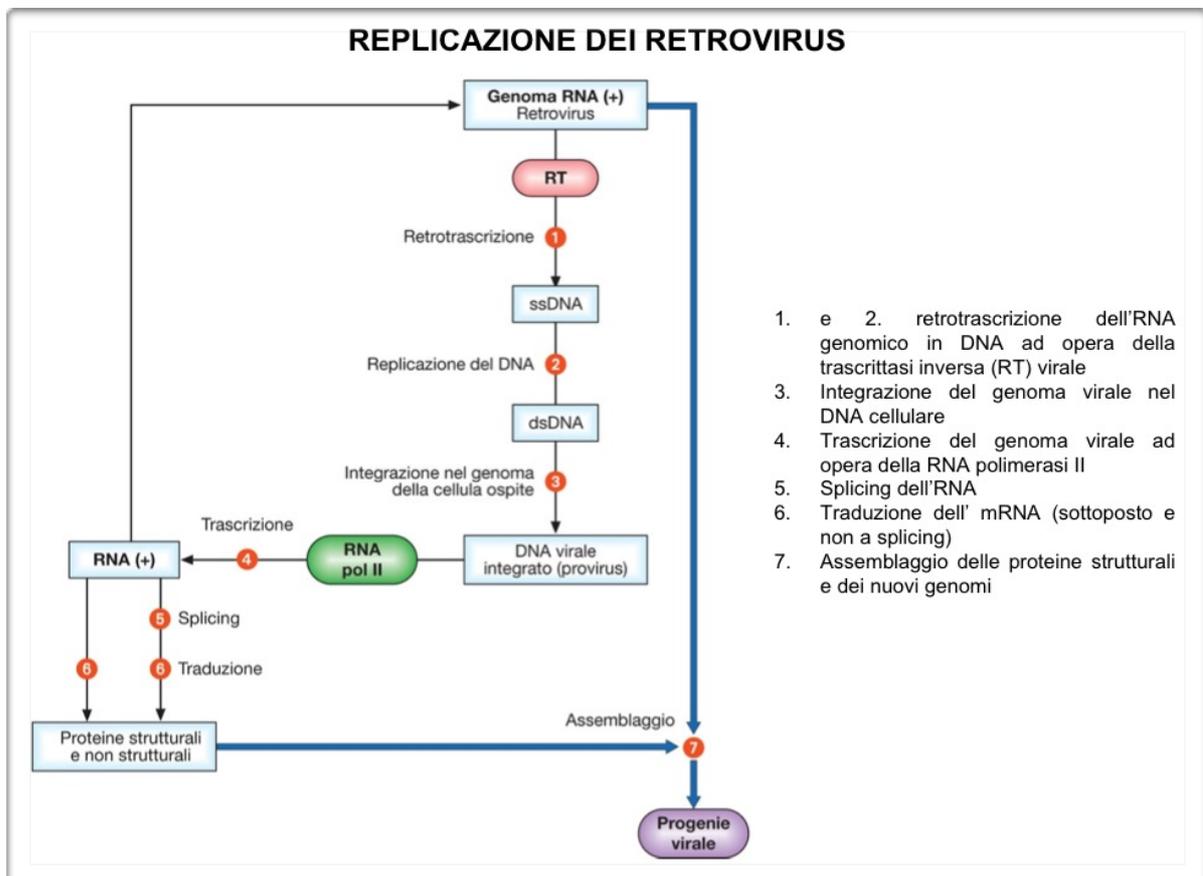
-Solo la catena (-)RNA del genoma viene trascritta per formare molecole di (+)RNA che hanno duplice funzione:1) quella di messaggero e 2) quella di stampo per la sintesi di molecole di (-)RNA complementari:

(+)RNA e (-)RNA rimangono uniti generando RNA a doppio filamento del genoma virale.



Ribovirus con genoma diploide: *Retrovirus*

- 2 molecole di RNA lineare a polarità positiva, (+) RNA, legate insieme a formare un dimero
- non funziona come mRNA
- La sola funzione dell'RNA genomico è di fungere da stampo per la sintesi di DNA bcatenario
- E' necessaria una polimerasi virale, trascrittasi inversa, per sintetizzare DNA a partire da RNA
- Il nuovo DNA migra nel nucleo e si integra nel genoma della cellula ospite (provirus), per mezzo di una integrasi virale
- Il DNA integrato può trascrivere una serie di (+)RNA: alcuni sono mRNA per la sintesi di proteine virali, altri formano il genoma della progenie virale
- Inizia il montaggio delle proteine strutturali con i genomi
- La maturazione avviene attraverso la membrana citoplasmatica
- La liberazione avviene per gemmazione



GENETICA VIRALE

I virus sono in continua evoluzione, mediante un processo in cui si alternano l'emergenza di nuove caratteristiche genetiche e la loro stabilizzazione nella popolazione. La prima parte di questo processo avviene, in maniera casuale, durante la replicazione del genoma virale, così:

- a) Le alterazioni genetiche che ledono in modo drastico la capacità replicativa del virus sono eliminate dalla popolazione virale, poiché i virus che li albergano non li possono trasmettere alla progenie.
- b) Quando il cambiamento genetico non altera la capacità riproduttiva del virus esso si trasmetterà alla progenie.
- c) Le alterazioni che causano lievi danni alla capacità replicativa tendono ad essere eliminate dalla popolazione perché il virus originario si replica con maggiore efficienza e velocità, a meno di una condizione esterna che conferisca vantaggio alla popolazione mutata.

La stabilizzazione nella popolazione virale del cambiamento genetico che non altera la capacità riproduttiva del virus potrà avvenire o per fluttuazione casuale oppure in risposta ad una pressione selettiva; alcune mutazioni infatti determinano cambiamenti delle strutture superficiali che consentono al virus di sfuggire all'azione della risposta immunitaria dell'ospite; queste popolazioni virali si espanderanno velocemente nell'ospite finché il sistema immunitario di quest'ultimo non neutralizzerà i nuovi virus, esercitando così una pressione selettiva verso l'affermazione di nuove ulteriori varianti antigeniche virali. Per alcuni virus (HIV e HCV) nasce così il concetto di **quasi-specie**, derivato dall'osservazione che, in un individuo infettato da lungo tempo, si ha continua evoluzione del virus, per effetto delle mutazioni spontanee e per la pressione selettiva esercitata dall'immunità dell'ospite, nonché dalla terapia farmacologica.

Le mutazioni puntiformi sono i più frequenti eventi genetici responsabili di alterazioni ereditarie delle caratteristiche virali, che possono essere indotte da mutageni fisici o chimici (raggi X, UV) oppure insorgono spontaneamente durante la sintesi del genoma virale. La frequenza di mutazione spontanea riflette l'accuratezza dell'enzima replicativo virale: i virus che usano DNA-polimerasi DNA-dipendenti presentano una frequenza di mutazione relativamente bassa ($10^{-8}/10^{-10}$ per nucleotide a ciclo replicativo), simile a quella che si osserva negli organismi cellulari

(DNA-polimerasi con capacità di correzione di bozze); i virus che usano RNA-polimerasi (sia DNA. che RNA-dipendenti) sono privi di attività di correzione di bozze, e pertanto sono più soggetti ad errori di copiatura; le trascrittasi inverse (DNA-polimerasi-RNA-dipendenti) di HBV e dei Retrovirus sono in natura tra gli enzimi a maggior tasso di errore spontaneo (non possiedono di norma attività di correzione di bozze). La frequenza di mutazioni spontanee raggiunge 1×10^{-4} nucleotidi per ciclo replicativo.

Le mutazioni possono essere **puntiformi**, silenti quando la sostituzione che si verifica comporta l'aggiunta dello stesso nucleotide e quindi si viene a codificare la stessa proteina e di fatto la mutazione è silente; possono essere nonsense, quando si verifica un prematuro arresto della proteina, quindi quando si forma un codone di stop; possono essere mutazioni conservative e non conservative, qualora la sostituzione del nucleotide comporti l'aggiunta di un nucleotide che codifica per un amminoacido diverso dall'originale, quindi se questo nuovo ha delle caratteristiche chimico-fisiche simili a quello originale sarà conservativa, mentre se saranno diversi allora non conservativa, quindi avremo una proteina mutata in tutti e due i casi, solo che la seconda rende più probabile una variazione nella funzionalità della proteina.

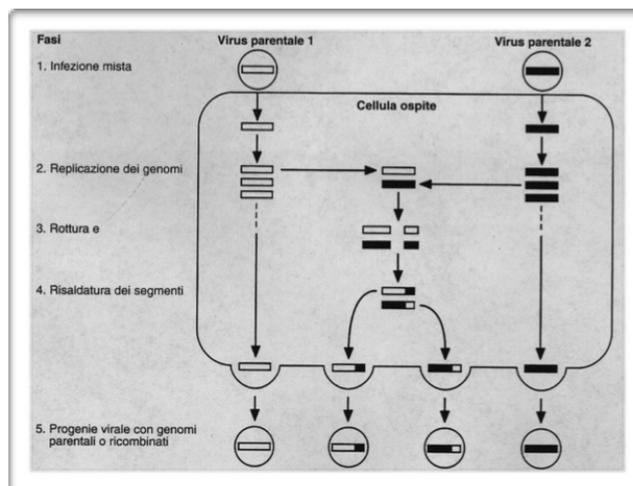
Le mutazioni possono essere anche **Frame-Shift**, in cui la delezione di un nucleotide o l'inserzione di un nucleotide altera lo schema di lettura e codifica per una proteina diversa.

Di norma un mutante virale presenta una o più mutazioni puntiformi inducenti proteine diverse rispetto allo stipite originario. Un'unica mutazione inducente modificazioni strutturali di una sola proteina può determinare il cambiamento di varie funzioni virali (variazioni fenotipiche nel mutante); ad esempio una modificazione di una proteina del capsido o del pericapsido di un virus può riflettersi in delle proprietà antigeniche, e/o emoagglutinanti e/o della capacità di infettare determinate cellule. Le mutazioni raramente sono vantaggiose, nella maggioranza dei casi sono indifferenti, parzialmente deleterie o letali. Mutazioni **indifferenti** sono quando l'amminoacido sostituito è simile all'amminoacido originale (es. mutazione conservativa); la diffusione nella popolazione virale avviene per semplice fluttuazione, o se riguardano proteine di superficie, per selezione da parte degli anticorpi neutralizzanti presenti nell'ospite. Mutazioni **letali** sono quando determinano alterazioni deleterie in geni essenziali (es. mutazione non senso o non conservativa); il virus non replica.

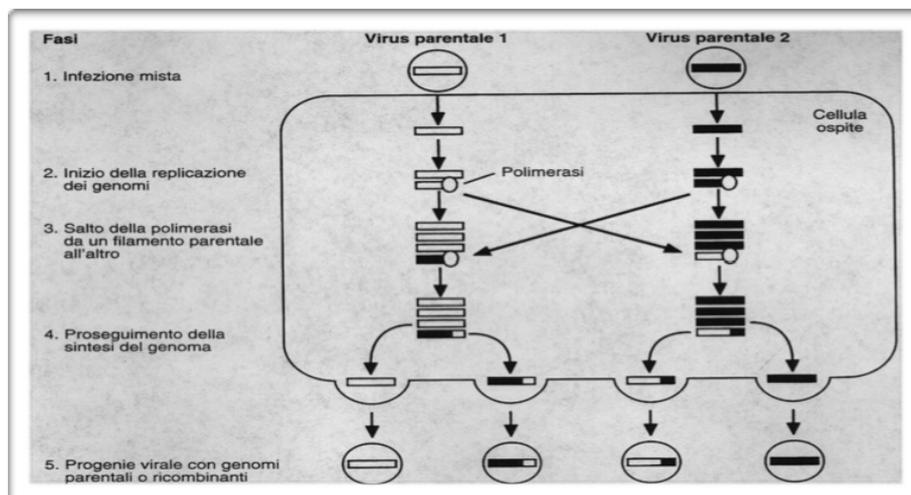
Le mutazioni possono generare: mutanti di placca con alterazione nella forma e dimensione della lisi da essi indotta in vitro; mutanti attenuati determinando infezioni meno gravi di quelle indotte dal ceppo selvaggio; mutanti di spettro d'ospite, determinando infezioni di tipi cellulari diversi da quelli originari; mutanti temperatura o pH-sensibili determinando crescita virale solo a particolari temperature o pH; mutanti farmaco resistenti con acquisizione del ceppo virale di resistenza farmacologica nei confronti di uno o più farmaci inibenti la funzione della proteina virale mutata (ad esempio Mutanti del virus erpetico resistenti all'aciclovir hanno una mutazione nella DNA polimerasi virale; mutanti di HIV resistenti ai farmaci antivirali attualmente in uso nella pratica clinica presentano una o più mutazioni nella proteina gp41 (resistenza agli inibitori della fusione), nella proteina gp120 (resistenza agli inibitori dell'entrata), nelle trascrittasi inversa (resistenza agli NRTI e NNRTI), nell'integrasi (resistenza agli EI), e/o nella proteasi (resistenza ai PI -); deriva antigenica: progressivo e continuo cambiamento delle caratteristiche antigeniche virali. In caso di mutazioni conservative, dove la proteina codificata dal gene non viene alterata dal punto di vista funzionale, queste si diffondono nella popolazione virale per fluttuazione, o grazie alla pressione selettiva indotta dal sistema immunitario dell'ospite (proteine di superficie); la variazione antigenica continua, spontanea o indotta dal sistema immunitario dell'ospite, viene indicata come deriva antigenica e si contrappone al fenomeno di shift antigenico, scambio di un tratto di un genoma tra i virus geneticamente diversi che determina l'emergenza di progenie virale con caratteristiche antigeniche drasticamente alterate rispetto ai virus parentali, risultato di variazioni genetiche più radicali. I virus influenzali sono un classico esempio di virus che rappresentano deriva antigenica; in questi virus si osserva una continua, lieve variazione stagionale delle glicoproteine esterne, emoagglutinina e neuraminidasi, che permettono al virus di restare nella popolazione umana nonostante la presenza di anticorpi neutralizzanti. Anche per HIV è importante il fenomeno della deriva genetica; nello stesso individuo si possono sviluppare varianti virali con mutazioni puntiformi a carico della glicoproteina esterna gp120; ciò permette la presenza contemporanea di varianti virali non neutralizzabili, che contribuiscono alla progressione dell'infezione. Un fenomeno simile si verifica nell'infezione da HCV.

La **ricombinazione** virale è un evento frequente che consiste nello scambio di tratti più o meno ampi di materiale genetico tra genomi virali diversi che si trovano nella medesima cellula. Per i virus a **DNA** si attua mediante la rottura e risaldatura di

filamenti di acido nucleico omologhi già sintetizzati. Per i virus ad **RNA** la ricombinazione avviene durante la replicazione, per salto dell'enzima replicativo da un filamento stampo ad un altro (scelta di copia), e può avvenire durante la sintesi sia di RNA (*mixovirus*, *coronavirus*, etc.) sia di DNA (*retrovirus*); per i virus che possiedono un **genoma organizzato in segmenti** distinti (*orthomyxovirus*, *reovirus*), la ricombinazione può avvenire per riassortimento di segmenti genomici nelle progenie.

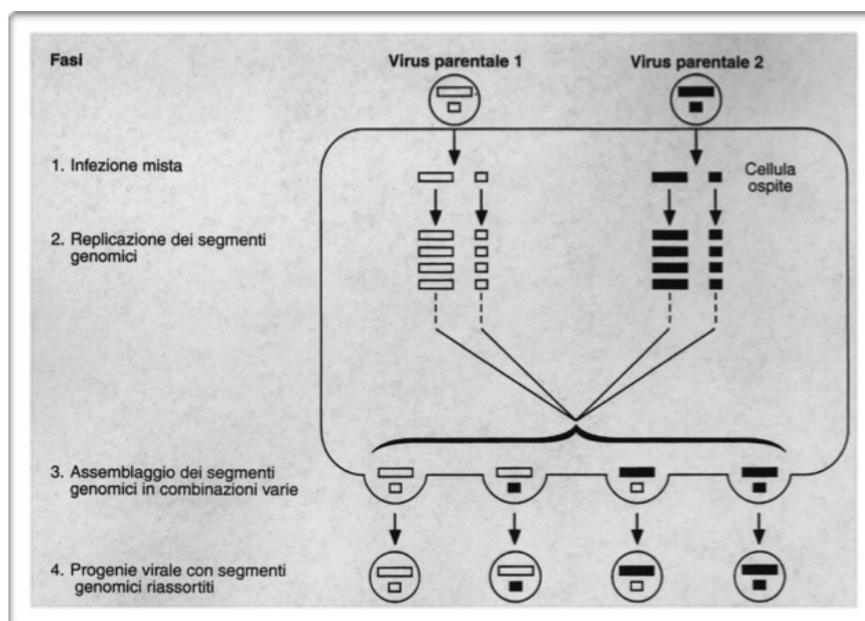


La ricombinazione nei virus a DNA avviene per rottura e ricongiungimento di filamenti genomici neosintetizzati; la frequenza degli eventi di ricombinazione è tanto più alta quanto maggiore è la distanza tra i geni interessati.



La ricombinazione nei virus ad RNA avviene per scelta di copia durante la sintesi del genoma dei virus a RNA; la polimerasi virale durante la sintesi del genoma si sposta da uno stampo di RNA parentale all'altro, con il risultato che la progenie contiene sequenze copiate in parte da un virus ed in parte dall'altro.

Riassortimento nei virus a genoma segmentato. Per i virus che hanno il genoma segmentato, durante un'infezione mista la cellula ospite contiene i segmenti genomici neoformati a partire da entrambi i virus parentali.



Lo **Shift Antigenico** comporta delle alterazioni estese dove i virus che ne derivano possono infettare anche ospiti precedentemente infettati dai virus parentali; i virus ricombinati possono acquisire la capacità di infettare cellule diverse, allargando così il loro spettro d'ospite e conquistando nuove nicchie replicative. Lo Shift Antigenico

assume importanza per

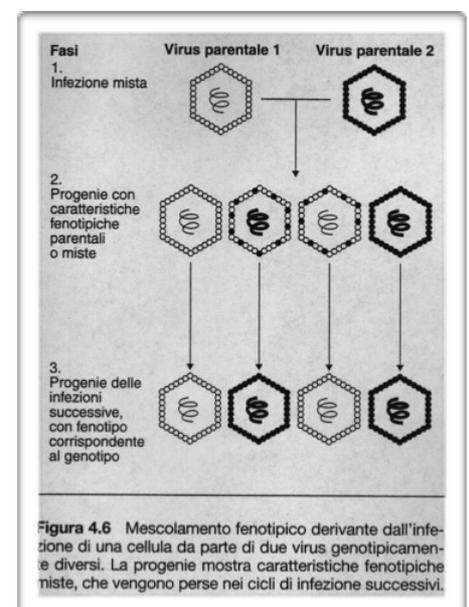
l'epidemiologia dei virus influenzali che possono infettare sia ospiti umani che ospiti animali; quando si verifica una infezione mista -virus umano e virus animale- la progenie derivata dal riassortimento può presentare caratteristiche replicative compatibili con la specie umana e caratteristiche antigeniche a carico di HA e NA del tutto diverse dal virus umano parentale; può comportare infezioni ad andamento pandemico.

Shift antigenico del virus influenzale derivato dal riassortimento dei segmenti genomici per l'emagglutinina (H) e la neuraminidasi (N)

Anno	Ceppo	Denominazione comune
1890	H2N8	
1900	H3N8	
1918	H1N1	Spagnola
1957	H2N2	Asiatica
1968	H3N3	Hong Kong
1977	H1N1	

Tra i sottotipi maggiori di HIV, la **ricombinazione** è un fenomeno frequente, a causa della sovrapposizione geografica, un tempo nettamente separata, che sta favorendo la coinfezione di singoli individui con più di un sottotipo. Una stima attuale indica che il 10% degli isolati di HIV rappresentino ricombinanti tra sottotipi diversi (**CRF: Recombinant Circulating Form**), e in alcune zone le CRF stanno divenendo le forme prevalenti nella popolazione. L'HIV mostra una notevole variabilità genetica e fenotipica; l'HIV-1 è stato suddiviso in due gruppi: gruppo M, diviso in diversi sottotipi (A-H), e gruppo O. Esiste una elevata variabilità anche nei singoli individui infettati, tra isolati virali ottenuti dallo stesso paziente in **differenti fasi della malattia** ad esempio o anche tra isolati virali ottenuti dallo stesso paziente nello stesso momento ma da **diversi distretti dell'organismo**. Il gene **env** è la porzione di genoma HIV più soggetta a variazione: influenzando la cinetica di replicazione, la neutralizzazione da parte degli anticorpi, la capacità sinciziogenica, e soprattutto il tropismo del virus.

Quando più virus infettano la stessa cellula, oltre che a livello di genoma, essi possono interagire anche a livello di funzioni geniche. Alcuni virus possono utilizzare funzioni di altri virus della stessa specie o di specie affini quando presenti contemporaneamente nella stessa cellula ospite; questo fenomeno viene chiamato **COMPLEMENTAZIONE**, e può riattivare infezioni sostenute da virus difettivi, ma non è stabile, in quanto la progenie a sua volta mancherà della funzione genetica mutuata dal virus complementare. I **Virus Satelliti** sono alcuni virus che stabiliscono un rapporto di parassitismo stabile con altri virus, non necessariamente affini, derivando da questi di alcune funzioni di cui mancano. Il virus dell'epatite delta (virus a RNA), mancante del gene della glicoproteina dell'involucro, si serve della glicoproteina HBs del virus dell'epatite B (virus a DNA). In assenza di HBV, HDV non replica; l'infezione da HDV si instaura solo in concomitanza di coinfezione o superinfezione (infezione cronica) con HBV. Alcuni parvovirus, adeno-associati o adeno satelliti, sono virus molto capaci di moltiplicazione solo in presenza di adenovirus. Il **Mescolamento Fenotipico** è un fenomeno **transiente** derivante dal mescolamento di prodotti virali, durante l'infezione di una cellula da parte di due virus genotipicamente diversi, con la formazione di progenie con caratteristiche fenotipiche



di entrambi i virus parentali: incorporazione del genoma nel capsido dell'altro virus della stessa specie (**transcapsidazione**) oppure quando il nucleo-capsido di un virus provvisto di pericapside venga incorporato nell'involucro lipoproteico di un altro virus correlato, Le caratteristiche fenotipiche miste vengono perse nei cicli di infezione successivi. L'**Interferenza** è uno degli aspetti più interessanti della interazione tra diversi virus. Infatti la presenza di un virus in una cellula impedisce, del tutto o in parte, la replicazione di un altro virus (simile o anche totalmente diverso) che superinfetta la cellula stessa. La ragione di tale comportamento sono in parte legate alla produzione di interferone, o al blocco di fattori cellulari necessari alla replicazione dell'altro virus. Questi esempi di interazioni genetiche e non genetiche indicano la straordinaria capacità dei virus di sopravvivere in ambienti ostili e di dar luogo a virus profondamente diversi da quelli originari in un breve lasso di tempo.

Mutazioni e ricombinazioni possono produrre alterazioni della virulenza e delle caratteristiche biologiche e antigeniche virali; ceppi virali alterati geneticamente, ottenuti mediante propagazione in cellule diverse dalle cellule ospiti naturali, sono ampiamente utilizzati a scopo vaccinale, come nel caso dei *poliovirus*, del virus della rosolia, etc. .

Patogenesi virale

La patogenesi delle infezioni è la risultante di una sorta di conflitti tra la capacità di invadere dell'agente infettivo e le difese dell'ospite. I virus causano malattia dopo aver superato i meccanismi di difesa dell'ospite ed aver scatenato una risposta immunitaria; la risposta immunitaria rappresenta la migliore terapia, anche se è uno dei maggiori fattori responsabili della patogenesi di un'infezione virale. Una certa malattia può essere causata da molti virus che hanno in comune un tropismo tissutale, oppure un certo virus può causare diversi episodi morbosi oppure nessuno. I virus codificano per dei fattori di virulenza, che promuovono l'efficienza dell'infezione virale, la cui perdita, causa l'attenuazione del virus.

La malattia virale evolve attraverso stadi ben definiti:

- 1) **Acquisizione** (entrata nell'organismo)
- 2) **Promozione dell'infezione a livello del sito primario**

- 3) Attivazione delle protezioni innate
- 4) Un periodo di **incubazione**, quando il virus si moltiplica e può diffondere a un sito secondario
- 5) Replicazione nel **tessuto bersaglio**, che causa la sintomatologia caratteristica della malattia
- 6) **Risposte del sistema immunitario** che limitano e contribuiscono alla patologia
- 7) Produzione virale in un tessuto che rilascia il virus ad altre persone, provocando il contagio
- 8) **Risoluzione** o infezione persistente/patologia cronica

Il periodo di incubazione può procedere in assenza di sintomi (asintomatico), oppure può essere caratterizzato da sintomi aspecifici, come febbre, cefalea, dolori addominali o brividi, definiti **prodromi**. I sintomi della malattia sono provocati dalla lesione tissutale e dagli effetti sistemici; tali sintomi possono persistere nel corso della convalescenza, mentre l'organismo ripara il danno. Di solito l'individuo sviluppa una risposta caratterizzata dalla memoria immunitaria.

Il virus utilizzano la via inalatoria come mezzo più comune per la via dell'infezione, ma sono importanti anche traumi lesivi della cute. Una volta entrato, il virus si replica nelle cellule che esprimono i recettori virali e che hanno un adeguato sistema biosintetico (sono intracellulari obbligati). La replicazione può associarsi a sintomatologia a livello primario, può rimanere in questo sito, oppure può diffondere per via ad altri tessuti. Il circolo ematico e linfatico sono le vie di diffusione principali. Il trasporto del virus in circolo viene detto **viremia**. Il virus può essere sia libero nel plasma o in forma cellulo-associata in linfociti o macrofagi. I virus possono replicarsi all'interno di questi, o anche all'interno di cellule endoteliali, per dare così via alla viremia secondaria, fase che precede il trasporto del virus all'organo bersaglio (fegato, cervello, cute, etc.) e l'esordio della sintomatologia. I virus possono raggiungere il SNC attraverso circolo ematico, meningi o liquor infetti, macrofagi infetti e neuroni infetti.

L'infezione virale ha tre possibili esiti: può infatti essere un'infezione fallita (**abortiva**), può portare a morte cellulare (**litica**) e può essere un'infezione senza morte cellulare (**persistente**). I mutanti virali che causano infezioni abortive non si replicano e quindi scompaiono. Le persistenti possono essere **croniche** (non litiche,

produttive), latenti (sintesi limitata di macromolecole virali ma senza produzione di virus), ricorrenti e trasformanti (immortalizzazione). Le caratteristiche della cellula sono fondamentali per determinare l'esito di un'infezione. Una **cellula non permissiva** può non presentare un recettore, una via enzimatica, un fattore trascrizionale o un meccanismo antivirale che non consente la replicazione. I neuroni e le cellule quiescenti sono privi di strumenti e dei substrati necessari per la replicazione di un virus a DNA; queste possono limitare la sintesi proteica nelle cellule, evitando l'assemblaggio dei ribosomi sull'mRNA. Una cellula **permissiva** fornisce il macchinario biosintetico per la replicazione del virus. Una cellula **semipermissiva** è inefficiente. La replicazione del virus porta a modificazioni nella cellula che portano a citolisi o ad alterazioni funzionali e morfologiche.

Si ha un'infezione **litica** quando la replicazione virale uccide la cellula bersaglio. Alcuni virus impediscono la crescita o la riparazione cellulare, inibendo la sintesi di macromolecole cellulari, oppure producendo enzimi litici e proteine tossiche. La replicazione del virus e l'accumulo di componenti virali e delle progenie all'interno della cellula possono distruggere la struttura e la funzionalità cellulare o danneggiare i lisosomi, causando autolisi. L'espressione di antigeni virali sulla superficie cellulare e la distruzione del citoscheletro possono causare variazioni dell'aspetto cellulare e delle interazioni fra cellule e rendere la cellula un bersaglio della citolisi immuno-mediata. L'infezione virale o la risposta citolitica immuno-mediata può indurre apoptosi. Questo processo può facilitare il rilascio del virus, ma va anche a limitare la quantità di virus prodotta, in quanto provoca la distruzione della "fabbrica" di virus. Di conseguenza molti virus (*herpesvirus*, *adenovirus* e *virus dell'epatite C*) codificano sistemi per l'inibizione dell'apoptosi. L'espressione sulla superficie cellulare di glicoproteine di alcuni virus induce la fusione di cellule adiacenti, per formare sincizi multinucleati. La fusione può verificarsi senza nuova sintesi proteica (dall'esterno) oppure con nuova sintesi (dall'interno). I sincizi permettono al virus di diffondersi da cellula a cellula e di sfuggire così al riconoscimento da parte di anticorpi (virus HIV), ed è anche causa di morte cellulare. Alcune infezioni virali determinano la comparsa di caratteristiche variazioni nella morfologia e nelle funzioni delle cellule bersaglio. Si possono verificare aberrazioni e degradazione cromosomiche. A livello del nucleo e del citoplasma possono formarsi nuove strutture dette corpi inclusi, risultati delle modificazioni virus-indotte a livello di membrana o a livello della struttura cromosomica o possono rappresentare il sito di replicazione virale o di accumulo di

capsidi virali. La natura e la collocazione dei corpi inclusi è caratteristica di certe infezioni virali e rendono agevole la diagnosi di laboratorio.

Un'infezione **persistente** si verifica quando la cellula viene infettata dal virus, ma non uccisa. Alcuni virus causano tali infezioni perché sono rilasciati dalle cellule in modo non traumatico, attraverso esocitosi o per gemmazione della membrana citoplasmatica. Un'infezione latente può derivare da un'infezione da virus a DNA nella quale la cellula limita o non possiede il macchinario per la trascrizione di tutti i geni virali. I fattori di trascrizione specifici possono essere espressi solo in particolari tessuti, in cellule replicanti ma non quiescenti, o dopo induzione a opera di ormoni o citochine.

Alcuni virus a DNA e alcuni retrovirus formano infezioni persistenti che stimolano una replicazione incontrollata della cellula, causando trasformazione o immortalizzazione delle cellule, i virus **oncogeni**. Questi virus possiedono diversi meccanismi per immortalizzare le cellule, come attivazione dei geni per la crescita, rimozione dei meccanismi di inibizione che limitano la sintesi del DNA, l'inibizione dell'apoptosi. La sintesi del DNA virale, mRNA tardivo, proteine tardive o virus, causa la morte della cellula. Numerosi virus oncogeni a DNA si integrano nei cromosomi della cellula ospite. I *papillomavirus*, *SV40* e *adenovirus*, codificano proteine che legano e inattivano proteine regolatrici della crescita cellulare, quali la p53 o il prodotto del gene del retinoblastoma (**RB**), alterando i freni sulla crescita cellulare. L'oncogenesi da retrovirus (virus a RNA) si può realizzare attraverso due modalità. Alcuni codificano proteine oncogene, quasi identiche alle proteine cellulari coinvolte nel controllo della crescita cellulare, stimolando così la crescita cellulare (non è stato comunque individuato nessun retrovirus umano di questo tipo). Il secondo meccanismo di oncogenesi è quello attuato dal virus linfotropo T-cellulare umano di tipo 1 (HTLV-1), il solo retrovirus oncogeno per l'uomo finora identificato, che induce la leucemia. Codifica una proteina (Tax), che transattiva l'espressione genica, compresi i geni per le citochine stimolanti la crescita (IL-2). L'integrazione della copia di DNA avviene in prossimità di un gene cellulare stimolante la crescita, che può causare l'attivazione di questo gene ad opera dell'attività delle sequenze enhancer e promoter virali codificate da ciascuna delle estremità del genoma virale, le sequenze LTR.

L'obiettivo finale della risposta dell'ospite è quello di impedire l'entrata e la diffusione, ma anche di eliminare (risoluzione) il virus. La risposta rappresenta la

migliore arma, e nella maggior parte dei casi è anche l'unica. La cute è la barriera più importante per le infezioni. Gli orifizi del corpo sono protetti dal muco, dall'epitelio ciliato, lacrime, acido gastrico e bile. Superate queste barriere, il virus attacca le difese immunitarie non antigene-specifiche (innate) dell'ospite che tentano di limitare il virus. Le risposte specifiche impiegano molto tempo per attivarsi e diventare efficaci. Gli anticorpi sono efficaci sui virus extracellulari e possono essere sufficienti per il controllo dei virus citolitici, dal momento che la fabbrica dei virioni, all'interno della cellula infettata, viene eliminata con la replicazione virale. Gli anticorpi sono fondamentali per il controllo della diffusione virale ai tessuti bersaglio, in seguito a viremia. La cellulo-mediata è necessaria per la lisi delle cellule infettate da un virus non-citolitico e per le infezioni causate da virus con pericapside. Per le difese da infezioni pregresse abbiamo poi i linfociti di memoria, che sono fondamentali per dare inizio ad una risposta secondaria, più veloce ed efficiente. Molti virus possiedono gli strumenti per eludere uno o più aspetti del controllo immunitario, come l'ostacolo all'azione dell'interferone, modificazione degli antigeni virali, diffusione con trasmissione da cellula a cellula per sfuggire agli anticorpi, soppressione della presentazione antigenica e della funzione linfocitaria.

Le reazioni infiammatorie e di ipersensibilità possono essere la principale causa della patologia e della sintomatologia. L'interferone e le citochine stimolano la sintomatologia sistemica simil-influenzale, che di solito si associa alle infezioni virali respiratorie e alle viremie. Questi prodromi precedono i sintomi caratteristici. Successivamente l'attivazione della via classica del complemento e l'ipersensibilità ritardata dei CD4+ e l'azione dei CD8+ possono indurre danno tissutale. Queste azioni promuovono infiltrazione dei neutrofili con danno tissutale. La risposta infiammatoria iniziata dall'immunità cellulo-mediata risulta difficile da controllare e provoca danno tissutale. La presenza di grandi quantità di antigene in circolo durante la fase viremica o nel corso delle infezioni croniche può dare l'avvio alla classica reazione di ipersensibilità da immunocomplessi di tipo III. Gli immunocomplessi contenenti virus attivano il complemento, scatenando infiammazione e danno tissutale.

La suscettibilità relativa dell'individuo e la gravità della malattia dipendono dalla carica virale, dalla genetica del virus e dell'ospite, dallo stato immunitario dell'individuo e dal meccanismo di esposizione e sito di infezione. Una volta avvenuta l'infezione, lo stato immunitario dell'ospite e la sua immunocompetenza risultano essere probabilmente i fattori che determinano maggiormente la gravità

dell'infezione. Durante l'incubazione, il virus si replica, ma non ha ancora raggiunto il tessuto bersaglio o indotto un danno importante. Il periodo di incubazione è breve se il sito primario di infezione è il tessuto bersaglio stesso, producendo sintomi della patologia. Se il tessuto bersaglio deve essere raggiunto l'incubazione sarà più lunga e la sintomatologia può essere causata dalla risposta immunitaria. La natura e la gravità dei sintomi sono correlate alla funzione degli organi bersaglio e al grado della risposta immunopatologica scatenata dall'infezione. Un'infezione inapparente si verifica se il tessuto infettato non viene danneggiato, se l'infezione viene controllata prima che il virus raggiunga il bersaglio, se il tessuto bersaglio è sacrificabile, se viene rapidamente riparato o se l'entità del danno è al di sotto della soglia di disfunzione per quel tessuto. Le infezioni virali possono causare patologia acuta o cronica. I virus lenti e i prioni presentano un lungo periodo di incubazione, durante il quale si accumula una sufficiente quantità di virus o di distruzione tissutale prima di una rapida progressione dei sintomi.

L'epidemiologia studia la diffusione di una patologia nella popolazione. Per sopravvivere, i virus devono continuare ad infettare nuovi ospiti, immunologicamente vergini e quindi suscettibili. Le persone sono esposte ai virus durante tutta la loro vita. Alcune situazioni aumentano il rischio di entrare in contatto con un determinato virus e molti virus sono ubiquitari. Una scarsa igiene, condizioni di affollamento favoriscono virus respiratori ed enterici, viaggi, campeggi ed occupazioni specifiche mettono a rischio di contrarre infezioni da arbovirus ed altre zoonosi. I virus sono trasmessi per contatto diretto, per inoculazione di sangue o altri liquidi, oppure attraverso trapianti. La trasmissione dipende dalla sorgente del virus e dalla capacità del virus di resistere agli ostacoli e alle barriere dell'ambiente dell'organismo umano, che si oppongono al raggiungimento del tessuto bersaglio. La presenza o meno di pericapside è il principale fattore strutturale che influenza la modalità della trasmissione virale. I virus sprovvisti di pericapside (nudi) possono resistere all'essiccamento, all'azione di detergenti, a condizioni estreme di pH e temperatura, mentre i virus che ne sono dotati non resistono. La maggior parte dei virus nudi può resistere a stomaco e all'ambiente intestinale. Quelli provvisti di pericapside sono piuttosto fragili. Richiedono integrità del pericapside per infettare, devono stare in ambiente umido e sono trasmessi attraverso goccioline respiratorie, sangue, muco e saliva, o ancora inoculazione o trapianto. Anche gli animali sono vettori e serbatoi per la diffusione del virus nell'ambiente, le zoonosi. Molti virus inoltre vengono rilasciati prima che compaiano i sintomi della patologia, così rendendone difficile la

limitazione. I virus con molti sierotipi trovano soggetti immunologicamente naive. La persistenza di un virus in una comunità dipende dalla disponibilità di individui naive, suscettibili all'infezione. L'età di un individuo è un fattore importante, infatti bambini e anziani sono più a rischio di contrarre virus. L'immunocompetenza è un altro fattore determinante. Il patrimonio genetico è un altro fattore, infatti differenze nei geni deputati alla risposta influenzano la suscettibilità. I focolai di un'infezione virale spesso risultano dall'introduzione di un virus in un sito nuovo. Il focolaio origina da una fonte comune (alimenti) e spesso l'epidemia può essere bloccata una volta che la fonte è stata individuata. L'epidemia si verifica in un'area geografica maggiore e le pandemie sono epidemie a diffusione mondiale, che risultano generalmente dalla comparsa di un virus nuovo. La diffusione di un virus può essere controllata attraverso la quarantena, che un tempo era il solo mezzo per limitare le epidemie virali. Il miglior sistema per limitare la diffusione dei virus è la vaccinazione.

Diagnostica virologica

Arte e tecnica di formulare la diagnosi. Una rapida diagnosi della malattia e del suo agente eziologico è alla base di un efficace trattamento e cura di una patologia in atto. Una rapida e precisa diagnosi di un'infezione virale si fonda sull'analisi dei dati clinici e degli esami di laboratorio. La determinazione diretta ricerca ed identifica il virus ed i suoi componenti nel campione ottenuto dal paziente, che può essere sangue, liquor, biopsia o espettorato). La determinazione indiretta ricerca gli anticorpi specifici contro antigeni virali nell'organismo potenzialmente infetto. L'indagine virologica è la ricerca dei materiali biologici del virione o dei componenti di esso (proteine o acidi nucleici). Per l'indagine sierologica, oggi si preferiscono usare saggi di tipo EIA, ELISA e RIA, basati sulla reazione antigene-anticorpo, che permettono di misurare l'aumento del titolo anticorpale durante l'infezione (indice di infezione in atto), poi sono processi automatizzati, altamente sensibili e specifici; ove possibile si valutano la presenza di IgM che indicano solitamente un'infezione recente o in atto, mentre in alternativa IgA, che offrono il vantaggio di non ricomparire nel siero durante le reinfezioni; la presenza di IgG segnalano un'infezione pregressa, immunizzazione, ma anche infezione in atto. Un problema può essere rappresentato dalla difficoltà di individuare il sierotipo coinvolto nell'infezione in famiglie di virus composite.

Nel saggio di fissazione del complemento, il campione di siero viene fatto reagire con quantità nota di virus e complemento. L'anticorpo specifico, se presente, forma un complesso con il virus o l'antigene virale e fissa il complemento. Successivamente alla miscela viene aggiunto un sistema di rilevazione di emazie ed anticorpi anti-emazie. Se l'anticorpo è presente non ci sarà la lisi delle emazie, nessun rilascio di emoglobina. Se l'anticorpo è assente, il complemento libero fisserà l'immunocomplesso di emazie-anticorpi antiemazie, causando la lisi delle emazie con rilascio di emoglobina, che verrà misurata allo spettrofotometro. Il titolo di anticorpi fissanti il complemento è l'ultima diluizione alla quale si osserva inibizione della lisi delle emazie.

L'isolamento virale con crescita su colture cellulari e successiva tipizzazione (giorni) è un altro meccanismo, come anche l'identificazione diretta (ore) (secrezioni, sangue, biopsia), una ricerca di antigeni virali tramite saggi immunoenzimatici (EIA) o radiometrici (RIA), ricerca di acidi nucleici virali tramite Southern blot, Northern blot e PCR, identificazione diretta del virus con tecniche di microscopia elettronica, immunofluorescenza.

La scelta del campione è in relazione alla sede dell'infezione, ad esempio per HIV, il campione è il plasma.

Il riconoscimento della moltiplicazione virale in colture cellulari viene effettuato:

- Attraverso l'effetto citopatico (evidenza diretta): comparsa di alterazioni cellulari (necrosi, apoptosi, citofagia, agglutinazione cellulare, formazione di sincizi). Osservabile al microscopio a piccolo ingrandimento. Molto frequente.
- Attraverso evidenza indiretta (non apprezzabile all'osservazione microscopica delle cellule): saggiando la presenza di potere agglutinante nel liquido di coltura, la presenza di antigeni virali (mediante immunofluorescenza), emoadsorbimento, interferenza, etc.

L'esame al microscopio elettronico permette sia la conta delle particelle virali, sia la loro caratterizzazione morfologica.

Essendo i virus parassiti intracellulari obbligati, per poterne ottenere la moltiplicazione in laboratorio è necessario disporre di cellule viventi (animali da laboratorio o colture cellulari) sensibili (deve far entrare il virus) e permissive (deve far replicare il virus). I primi isolamenti di virus furono fatti coltivandoli in topini neonati (mancanti ancora di difese immunitarie) o in embrioni di pollo.

Nell'embrione di pollo i virus vengono inoculati attraverso appositi fori praticati nel guscio, nei liquidi contenuti in una delle cavità (allantoidea o amniotica) o sulla membrana corion-allantoidea. I virus crescono nelle cellule delimitanti le cavità. La moltiplicazione virale si osserva in seguito alla morte dell'embrione, o alla comparsa di potere agglutinante nei liquidi embrionali o di lesioni sulla membrana (virus dell'influenza, poxvirus, virus erpetici). Il topino neonato viene ancora usato per l'isolamento di alcuni virus (coxsackievirus, togavirus) e viene inoculato per via intracerebrale o intraperitoneale. La moltiplicazione virale si palesa con segni morbosi (tremori, paralisi, rigidità) o morte dell'animale.

Titolazione: per stabilire la quantità di virus (titolo virale) in un materiale, il metodo più usato consiste nella determinazione del titolo infettante del materiale in esame (che è direttamente proporzionale al numero di virioni completi presenti). Metodo diretto: attraverso la conta in un monostrato di cellule delle placche di citolisi o delle lesioni provocate sulla membrana corioallantoidea (poxvirus ed herpesvirus) prodotte da una sospensione virale diluita (in serie logaritmica). Titolazione con metodo indiretto: attraverso il calcolo con semplici metodi statistici del numero di dosi infettanti il 50% degli ospiti inoculati presenti per unità di volume, attraverso l'individuazione della diluizione massima del materiale (diluito in serie progressiva) capace di provocare un effetto virus-specifico (distruzione cellulare, o morte o comparsa di lesioni negli animali) in almeno uno degli ospiti impiegati.

Emoagglutinazione: molti virus sono provvisti di proteine di superficie in grado di legarsi alla membrana di eritrociti di diverse specie animali formando dei ponti tra gli eritrociti (agglutinazione). Eritrociti agglutinati sedimentano al fondo di provette in modo irregolare, occupando tutto il pozzetto rispetto agli eritrociti non agglutinati, che formano sul fondo del pozzetto un dischetto compatto. Il titolo emoagglutinante è anch'esso proporzionale alla concentrazione di virioni nel campione in esame. Tuttavia, mentre un solo virione infettante può essere evidenziato mediante la titolazione del potere infettante, nei test di emoagglutinazione è necessario un alto numero di particelle virali (es. 10 milioni nel caso di virus influenzale) per avere l'agglutinazione evidente di un adeguato numero di eritrociti (in genere 0,25 ml di una sospensione del 1%). Le colture cellulari servono sia ad isolare e moltiplicare i virus, sia ad osservare le alterazioni cellulari dovute all'infezione virale e a studiare i meccanismi di replicazione e danno cellulare a livello bimolecolare. Oggi si usano soprattutto colture di cellule cresciute in terreni di coltura arricchiti di aminoacidi, vitamine, siero di sangue ed antibiotici (che consentono la riduzione della distruzione

delle colture stesse ad opera di contaminazioni microbiche). Per l'allestimento di colture cellulari primarie, frammenti di tessuto vengono dissociati mediante trattamento con enzimi proteolitici (tripsina, collagenasi, DNAsi) e messi in piastra. Le cellule di coltura primaria hanno le stesse caratteristiche delle cellule presenti nell'organo di origine, sono diploidi, e possono essere mantenute in vitro mediante passaggi seriali (staccate con tripsina) per una decina di generazioni al massimo, andando poi incontro a senescenza cellulare e morte. Alcune cellule, in genere di origine tumorale o prodotte per mutazione di uno stivite diploide, diventano capaci di riprodursi illimitatamente in vitro (immortalizzazione), dando origine a una linea cellulare, con corredo aneuploide. Alcune linee cellulari (HeLa, Kb, Hep2) allestite da carcinomi umani sono molto usate nello studio dei virus umani. Le cellule in coltura sono in genere o sottili e allungate dette simifibroblastiche, o poligonali dette similepiteliali. Le cellule possono essere conservate per anni mediante congelamento. Sospensioni di cellule vengono mescolate con glicerolo o dimetilsolfossido e portate gradualmente a temperature molto basse (-80°C o in azoto liquido, -196°C).

Diagnostica molecolare: analisi qualitativa e quantitativa degli acidi nucleici virali: viremia per HIV, HBV, HCV, metodiche PCR, RT-PCR, NASBA; analisi genotipica delle resistenze ai farmaci, in particolare HIV, HBV, HCV, metodiche di sequenziamento DNA, interpretazione algoritmica. La rivelazione degli acidi nucleici virali è un altro saggio che può essere utilizzato sia per verificare la presenza di un virus in un determinato campione biologico, sia per studiare in maniera dettagliata le fasi del suo ciclo di replicazione. È possibile eseguire la ricerca diretta degli acidi nucleici virali se l'acido nucleico virale può essere estratto dai campioni e se è disponibile una sonda di acido nucleico per l'identificazione del virus. L'ibridazione I è un saggio che prevede di trattare il materiale estratto dal campione con una sonda oligonucleotidica con una sequenza complementare alla regione virale specifica che si vuole identificare. La sonda è sempre marcata o con un isotopo radioattivo, o con un marcatore enzimatico, fluorescente o chemiluminescente. L'ibridazione II comprende Northern (RNA) e Southern blot (DNA); in entrambi i casi il saggio prevede estrazione, purificazione e denaturazione del DNA o RNA e una corsa elettroforetica che comporta la separazione degli acidi nucleici virali in base alla loro lunghezza, seguita da un trasferimento su filtri idonei a far avvenire la successiva fase di ibridazione.

Saggi di amplificazione degli acidi nucleici: PCR che permette di amplificare (DNA-polimerasi) un determinato frammento di acido nucleico; cicli ripetuti di

denaturazione, ibridazione e polimerizzazione fanno sì che la sequenza virale, se presente, venga amplificata in maniera esponenziale; trattando il materiale estratto con trascrittasi inversa per trascrivere l'RNA in DNA, la PCR può essere usata anche con virus a RNA (RT-PCR). La PCR è realizzata ripetendo più cicli (20-40) e prevede denaturazione (30 secondi a 95°C) con separazione delle due eliche di DNA da amplificare, ibridazione (30 secondi a 55-60°C) dove i primers si ibridano con le sequenze complementari del DNA "target", ed estensione (tempo variabile, a 70°C) sintesi dei due nuovi filamenti di DNA complementari alla sequenza bersaglio mediante la DNA polimerasi. L'uso della PCR nella routine richiede cura particolare nell'evitare contaminazioni da amplificati di DNA, attraverso l'adozione di pratiche laboratoristiche rigorose. L'approccio migliore all'uso della PCR nella routine è quello di adottare pratiche di laboratorio adeguate: separazione rigorosa dei reagenti pre e post amplificazione; linee guida specifiche per il campione manipolato; il personale laboratoristico dovrebbe essere costantemente cosciente delle fonti di contaminazione possibili; l'approccio migliore in assoluto è quello di includere reazioni di controllo negative per ognuno dei passaggi principali nel trattamento dei campioni. Una PCR quantitativa permette di determinare in un campione la quantità di DNA presente per unità di volume. La PCR real-time utilizza un sistema che permette l'amplificazione e la quantificazione on-line con rilevazione in fluorescenza dei prodotti di PCR; l'amplificazione e la rilevazione fluorescente avvengono all'interno dello stesso capillare (vetro borosilicato) eliminando il problema della contaminazione. È in grado di analizzare diversi tipi di fluorescenza emessa da fluorofori intercalanti il DNA (syber green), sonde di ibridazione (fret) e sonde di idrolisi (taqman) con una rapidità di esecuzione di 20' per 30 cicli.. I vantaggi della PCR real-time sono la flessibilità, la semplicità di automazione, la rapidità di esecuzione, l'elevata sensibilità e specificità e l'elevata riproducibilità.

Analisi quantitativa:

- **NASBA**: Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. Utilizzando 3 enzimi (RNA polimerasi T7, RT, RNAsi H) e 2 primer specifici si consente l'amplificazione sia di RNA sia di DNA in maniera esponenziale. Si basa sullo schema di trasferimento dell'informazione genica caratteristico del meccanismo di replicazione dei genomi dei retrovirus: da RNA a DNA e, di nuovo, RNA. Si usa contemporaneamente la miscela di enzimi che funzioneranno a temperatura costante per ottenere la replicazione dell'acido nucleico. Il prodotto di una reazione NASBA è un RNA a

singolo filamento, che rappresenta $10^{6/9}$ volte la sequenza bersaglio, e sembra fornire maggiori garanzie di specificità.

- **branched DNA:** Utilizza speciali sonde chemiluminescenti ibridazione sensibile che amplificano il segnale di rivelazione in maniera lineare. Questa tecnica offre la possibilità di quantificare gli acidi nucleici virali riducendo i rischi di contaminazioni. Vengono utilizzati per studiare pazienti in corso di infezione HIV ed epatite B e C. E' un metodo quantitativo che utilizza speciali sonde chemiluminescenti che si legano specificatamente alla sequenza di acido nucleico da identificare, creando una struttura ramificata "branched DNA" (bDNA). Il segnale ottenuto alla fine della reazione è proporzionale alla quantità di bersaglio presente nel campione. Quantifica sia DNA e RNA: l'acido nucleico legato ad un set di sonde specifiche (ibridazione) sul pozzetto di una micropiastra; un altro set di sonde, con una sequenza complementare ad un'altra porzione del target, viene utilizzato per la rivelazione. A queste sonde vengono successivamente legate le molecole di DNA "ramificate", che amplificano il segnale generato da ciascuna molecola target. L'aggiunta di sonde marcate con fosfatasi alcalina, complementari a tre diversi siti di legame su ciascun ramo della molecola, e di un substrato chemiluminescente genera emissione di luce.

Il sequenziamento dei prodotti amplificati può fornire una valida informazione sia sull'identità di un virus il cui acido nucleico è stato amplificato, sia sulla presenza di mutanti virali associati a resistenza ai farmaci antivirali. La sua principale applicazione nella diagnostica virale è il rilevamento del sottotipo virale (HBV, HCV, HPV, HIV) e della resistenza ai farmaci anti-HIV e anti-HBV da campioni di plasma da pazienti trattati in fallimento terapeutico.

Farmaci antivirali

La maggior parte dei farmaci antivirali ha come bersaglio enzimi codificati dal virus, o strutture virali importanti per la replicazione, altri sono stimolatori della risposta protettiva dell'immunità innata dell'ospite. L'attività dei farmaci antivirali è generalmente limitata a specifiche famiglie di virus.

Bersagli dei farmaci antivirali:

- 1) **Inattivazione del virus:** molecole lipidiche e simil-detergenti distruggono il pericapside del virus. Il nonoxinolo-9 (componente simil-detergente presente nelle pillole anticoncezionali) inattiva HSV e HIV. L'acido citrico può essere usato contro i rhinovirus nei tessuti facciali.

- 2) **Adsorbimento:** anticorpi neutralizzanti o antagonisti dei recettori bloccano l'interazione tra una proteina virale e il recettore. Gli antagonisti dei recettori sono analoghi peptidici o polisaccaridici del recettore cellulare o della proteina virale deputati all'adsorbimento, che bloccano in modo competitivo l'interazione del virus con la cellula. I polisaccaridi acidi interferiscono col legame virus-cellula e possono essere usati contro HSV e HIV.
- 3) **Penetrazione e Scapsidazione:** Arrildone, disossarile, pleconaril e altri composti metilsossazolic bloccano la scapsidazione dei picornavirus inserendosi in una fenditura del sito causidico coinvolto nel legame del recettore. Amantadina, rimantadina e altre ammine idrofobiche possono neutralizzare il pH delle vescicole e inibire la scapsidazione del virione; hanno un'attività specifica contro il virus dell'influenza A, bloccando il canale protonico che fa dissociare le proteine M1 dalla matrice dal nucleocapside.
- 4) **Sintesi dell'RNA:** Non è un buon bersaglio, perché è difficile inibire la sintesi di mRNA virale senza alterare quella dell'mRNA cellulare. Guanidina e 2-idrossibenzil-bendimidina bloccano la sintesi dell'RNA dei picornavirus legando la proteina 2C. La ribavirina inibisce la biosintesi nucleosidica, il capping dell'mRNA e altri processi cellulari e virali. L'isatin- β -tiosemicarbazone induce la degradazione dell'mRNA nelle cellule infettate da poxvirus.
- 5) **Replicazione del genoma:** La DNA polimerasi virale degli HSV e la trascrittasi inversa dell'HIV sono bersagli di elezione, perché sono essenziali per la replicazione virale e sono diversi dagli enzimi dell'ospite. La maggior parte dei farmaci antivirali sono analoghi nucleosidici, nucleosidi con alcune modificazioni. Vengono fosforilati nella forma trifosfata da enzimi virali e/o cellulari, poi inibiscono in modo selettivo le polimerasi virali perché sono meno precise di quelle cellulari e legano l'anticorpo. Questi farmaci impediscono l'elongazione della catena come risultato dell'assenza di un 3'-idrossile nello zucchero o alterano il riconoscimento e l'appaiamento delle basi. L'elevato tasso e il grande numero di nucleotidi incorporati rendono la replicazione virale sensibile. Gli analoghi del pirofosfato sono classici inibitori della polimerasi degli herpesvirus.
- 6) **Sintesi proteica:** La sintesi delle proteine virali non è un bersaglio appropriato per i farmaci antivirali: il virus usa i ribosomi e i meccanismi biosintetici della cellula ospite, non è possibile una inibizione selettiva. IFN- α e β bloccano il virus inibendo la sintesi della maggior parte delle proteine nella cellula infetta.

- 7) **Assemblaggio e rilascio del virione:** Saquinavir, ritonavir e indinavir sono degli inibitori della proteasi di HIV, essenziale per l'assemblaggio dei virioni. Zanamivir e oseltamivir inibiscono la neuraminidasi dell'influenza A e B.
- 8) **Sostanze stimolanti la risposta immunitaria innata dell'ospite:** Imiquimod, resiquimod e CpG oligodeossinucleotide stimolano la risposta innata delle cellule dendritiche, dei macrofagi e di altre cellule, legandosi ai TLR. L'interferon e i suoi induttori facilitano il trattamento dell'epatite C e di patologie croniche da poliomavirus.

Analoghi nucleosidici

L'inibizione selettiva della replicazione virale deriva dal legame preferenziale del farmaco alla polimerasi virale, piuttosto che a quella cellulare, o dall'uso maggiore rispetto a quello delle cellule non infettate per una sintesi più rapida.

- **Aciclovir:** o ACV, differisce dal suo derivato valaciclovir solo dal punto di vista farmacologico. ACV a differenza della guanosina, ha una catena laterale aciclica al posto di ribosio o desossiribosio. Ha un'azione selettiva contro HSV e VZV, herpesvirus che codificano una timidina chinasi che attiva il farmaco mediante fosforilazione, mentre gli enzimi cellulari aggiungono altri 2 fosfati. L'ACV trifosfato compete con la guanosina trifosfato inibendo l'enzima e causando la terminazione della catena nascente di DNA virale perché non c'è il gruppo 3'-idrossilico nella molecola di ACV. Resistenza all'aciclovir si sviluppa dopo mutazioni della timidina chinasi (non si attiva l'ACV) o della DNA polimerasi (si previene il legame di ACV). L'ACV può essere usato contro le infezioni da VZV, ma servono dosi più alte perché ACV è meno fosforilato.
- **Valaciclovir:** E' un estere dell'ACV, assorbito con maggior efficienza dopo somministrazione per via orale e viene convertito rapidamente in ACV, aumentandone la biodisponibilità.
- **Penciclovir:** Inibisce VZV e HSV con lo stesso meccanismo di ACV, ma si concentra e persiste per più tempo. Ha anche una certa attività contro il virus dell'Epstein-Barr e contro citomegalovirus (CMV).
- **Farmaciclovir:** Profarmaco derivato dal penciclovir, ben assorbito oralmente, viene convertito nel fegato.

- **Ganciclovir:** o GCV, Diidrossipropossimetil guanosina, struttura simile a quella dell'ACV ma con un ossidrile in più nella catena laterale aciclica. Attivo contro il CMV, il cui genoma non codifica una timidina chinasi ma una protein-chinasi che fosforila il GCV, che una volta attivato da fosforilazione inibisce le DNA polimerasi di tutti gli herpesvirus. Il **valganciclovir** è l'estere del GCV, che ne migliora le proprietà farmacologiche.
- **Cidofovir e Adefovir:** Sono analoghi nucleosidici contenenti un fosfato attaccato all'analogo dello zucchero (in pratica è la struttura del ganciclovir con un ossidrile attaccato all'inizio della catena laterale aciclica e un fosfato alla fine). Non devono essere fosforilati per diventare nucleotidi, sono substrati per le DNA-polimerasi o per le trascrittasi inverse e hanno un più ampio spettro di virus sensibili. Il cidofovir (analogo della citidina) è attivo contro herpesvirus, poliomavirus, papillomavirus, adenovirus e poxvirus, l'adefovir è analogo dell'adenosina ed è attivo contro il virus dell'epatite B.
- **Azidotimina (AZT):** Analogo nucleosidico della timidina, inibisce la trascrittasi inversa dell'HIV. Deve essere fosforilata dagli enzimi della cellula ospite, non ha l'OH al 3' e previene la sintesi della catena complementare di DNA. Negli individui sieropositivi con ridotto numero di CD4 viene adottato un trattamento continuativo di AZT per via orale per prevenire la progressione della malattia. L'alta probabilità di errori della polimerasi di HIV promuove lo sviluppo di ceppi resistenti, ma il problema è stato superato con una terapia che prevede la somministrazione di molteplici farmaci in associazione.
- **Dideossinosina, dideossicitidina, stavudina e lamivudina:** La dideossinosina, dideossicitidina e stavudina sono prive dell'idrossile in 3'; attaccati alla lamivudina inibiscono anche la trascrittasi inversa di HIV prevenendo l'allungamento della catena di DNA. La lamivudina è anche attiva sulla polimerasi del virus dell'epatite B.
- **Ribavirina:** Analogo della guanosina, ma con l'anello della base incompleto e aperto, deve essere fosforilata per attivarsi. Inibisce la biosintesi dei nucleosidi, il capping dell'mRNA e altri processi importanti nella replicazione virale. Riduce le scorte cellulari di guanina inibendo l'inosina monofosfato deidrogenasi. La ribavirina trifosfato inibisce l'RNA polimerasi e promuove l'ipermutazione del genoma virale. È attiva contro virus respiratori e contro il virus dell'epatite C, soprattutto combinata con IFN- α .

- Altri analoghi nucleosidici sono Idossiurigena, trifluorotimidina e fluorouracile, analoghi della timidina che ne inibiscono la biosintesi o la sostituiscono nel DNA, inibendone la sintesi virali o inattivando il virus. l'adenina arabinoside è un analogo delle purine con arabinosio al posto del ribosio, viene fosforilato da enzimi cellulari anche in cellule non infette (potenzialità maggiore nell'indurre tossicità rispetto all'ACV).

Inibitori non nucleosidici della polimerasi. Il foscarnet (PFA) e acido fosfonoacetico (PAA) sono composti semplici simili al pirofosfato che inibiscono la replicazione virale legandosi al sito di legame del pirofosfato della DNA polimerasi, bloccano il legame del nucleotide. A concentrazioni farmacologiche non inibiscono le polimerasi cellulari, ma possono causare danni renali perché chelano ioni metallici bivalenti e vengono incorporati nell'osso. Neviranina, delavirdina ed efavirenz si legano alla trascrittasi inversa in siti diversi rispetto a quelli del substrato. Vengono usati in combinazione con gli analoghi nucleosidici, perché hanno un meccanismo d'azione diverso.

Inibitori della proteasi. Saquinabir, indinavir, ritonavir, nelfinavir e amprenavir, sono inibitori della proteasi che agiscono inserendosi nella tasca idrofobica del sito attivo dell'enzima per inibirne la funzione.

Farmaci anti-influenzali. Amantadina e rimantadina sono composti anfipatici, efficaci contro il virus dell'influenza A (si concentrano all'interno delle vescicole endosomiche coinvolte nell'adsorbimento del virus, tamponandone il contenuto; bloccano il canale protonico della matrice). Zanamivir e oseltamivir inibiscono il virus dell'influenza A e B, fungendo da inibitori enzimatici della neuraminidasi (senza la neuraminidasi, l'emoagglutinina si lega all'acido sialico su altre cellule prevenendo il rilascio del virus).

Immunomodulatori. L'imiquimod (ligando dei TLR) stimola la risposta innata a contrastare l'infezione virale.

Papillomavirus e poliomavirus

La famiglia dei *Papoviridae* è stata suddivisa in due famiglie, i *Papillomaviridae* e i *Polyomaviridae*.

Papillomavirus umani

Sono stati individuati almeno 100 tipi e classificati in 16 gruppi (A-P). Possono essere distinti in cutanei ed in mucosi. Il capsidico icosaedrico ha un diametro di 55nm ed è costituito da due proteine virali che formano 72 capsomeri. Il genoma è costituito da circa 8mila paia di basi. Questo genoma circolare codifica 7/8 geni precoci (E1/E8) e due geni strutturali o tardivi (L1 e L2), è presente inoltre a monte, una regione di regolamentazione che controlla la trascrizione e l'inizio della replicazione. Tutti questi geni sono localizzati sul filamento positivo. La replicazione di HPV dipende esclusivamente dall'apparato trascrizionale della cellula ospite. I geni precoci del virus stimolano la crescita cellulare e ciò facilita la replicazione del genoma virale da parte della DNA polimerasi della cellula ospite, quando le cellule si dividono. L'aumento del numero delle cellule indotto dal virus, causa l'ispessimento dello strato basale e dello strato spinoso, con formazione della verruca, o papilloma. Mentre le cellule dello strato basale si differenziano, i fattori nucleari specifici espressi nei diversi strati e nei diversi tipi di cute e di mucosa favoriscono la trascrizione di geni virali, la cui espressione è correlata con l'espressione di specifiche cheratine. I geni tardivi, che codificano per le proteine strutturali, vengono espressi soltanto nello strato superiore, già differenziato in senso terminale, e il virus si assembla nel nucleo. Mentre la cellula cutanea infettata matura e arriva alla superficie, anche il virus matura, per poi essere liberato con le cellule morte dello strato corneo (nello strato basale e spinoso si ritrova solo DNA virale nel nucleo, nello strato corneo e granuloso si riscontrano i virioni).

I papillomavirus infettano e si replicano nelle cellule dell'epitelio squamoso della cute (verruche) e delle membrane mucose (papillomi genitali, orali e congiuntivali), inducendo proliferazione epiteliale. I tipi HPV sono strettamente tessuto-specifici e causano così diverse presentazioni cliniche. La verruca si sviluppa in seguito alla stimolazione della crescita cellulare del virus, come detto, e all'ispessimento degli strati basale, spinoso e granuloso. HPV può sopprimere o eludere la risposta protettiva, tuttavia, la risposta infiammatoria è necessaria per la risoluzione delle verruche, che generalmente regrediscono spontaneamente (anche se in molto tempo). Il DNA virale è stato ritrovato sia in tumori benigni, che maligni. HPV-16, -18,

causano papillomi cervicali e displasia, e circa l'85% dei carcinomi cervicali contiene DNA integrato dal genoma di HPV. Le proteine E6, E7 di HPV-16 e -18 sono oncogeni, perché legano ed inattivano le proteine che sopprimono la crescita cellulare, p53 e p105RB (E6 lega la proteina p53 e la dirige verso la degradazione, mentre E7 lega e inattiva p105RB. In assenza di questo controllo di crescita cellulare, la cellula è più sensibile a mutazioni e subisce la trasformazione oncogena. Nelle cellule quiescenti, pRB è in forma fosforilata e viene fosforilata in G1, p53 arresta il ciclo cellulare in G1. Rb controlla il fattore di trascrizione E2F-1, lo lega solo in forma defosforilata. Il gene E2 (che controlla la produzione di E6-E7) viene perso durante l'integrazione del genoma di HPV. Nelle verruche e nei condilomi il genoma virale è in forma episomiale, nel carcinoma è integrato.

HPV è resistente all'inattivazione e può essere trasmesso attraverso il *contatto con oggetti contaminati* (asciugamani), *contatto sessuale*, *contatto tramite lacerazioni della cute* e durante il *passaggio attraverso il canale del parto*. L'HPV è presente nel 99,7% di tutti i cancri della cervice uterina. L'eliminazione asintomatica del virus può promuoverne così la trasmissione.

Sindromi cliniche:

• Verruche

È una proliferazione benigna autolimitante della cute, che regredisce col tempo. Infetta le superfici cheratinizzate, di solito mani e piedi. Il periodo di incubazione varia dai 3 ai 4 mesi e la comparsa della verruca dipende dal tipo di HPV e dal sito di infezione.

• Tumori benigni della testa e del collo

I papillomi orali sono tumori epiteliali benigni, pedunculati per la presenza di un peduncolo fibrovascolare e la loro superficie, in genere, ha un aspetto papillare rugoso. Possono osservarsi a qualsiasi età. I papillomi laringei sono più rischiosi perché possono occludere le vie aeree ed occasionalmente estendersi alla trachea e ai bronchi. Causati da HPV-6 e -11.

• Verruche anogenitali

Si riscontrano quasi esclusivamente nell'epitelio squamoso dei genitali esterni e delle aree perianali. Causati da HPV-6 e -11.

• Displasie e neoplasie cervicali

L'infezione del tratto genitale è spesso asintomatica, ma pruriginosa e le verruche possono comparire entro settimane o mesi dal contatto sessuale, con aspetto molle e color carne. Queste alterazioni si riscontrano nel Pap test, negli strisci cervicali colorati col metodo di Papanicolau. L'infezione del tratto genitale femminile da parte di HPV-16, -18, -31, e -45 è associata a cancro della cervice. La prima alterazione che si osserva è una displasia e circa il 40-70% di queste regredisce spontaneamente. I Pap test sono eseguiti continuamente e possono così prevenire il carcinoma cervicale, favorendone il trattamento.

Diagnosi:

La verruca viene confermata al microscopio per via dell'aspetto istologico caratteristico, un'iperplasia delle cellule spinose e un eccesso di produzione di cheratina. I metodi di elezione per la diagnosi dell'infezione da HPV consistono nell'utilizzo di sonde molecolari di DNA e nella PCR su tamponi cervicali e in campioni istologici.

Trattamento:

Le verruche regrediscono spontaneamente, ma il tempo è variabile, da mesi ad anni. Sono rimosse perché contagiose e perché creano disagio estetico e dolore. Vengono rimosse con crioterapia, chirurgia e metodi chimici. Gli stimolatori della risposta innata e infiammatoria (IFN, imiquimod) possono rendere più rapida la guarigione. La somministrazione topica o intralesionale di cidofovir può eliminare le verruche uccidendo selettivamente le cellule infettate da HPV.

Poliomavirus

Sono ubiquitari ed in genere non causano malattie. Sono JC, BK nell'uomo. Sono più piccoli dei *papillomavirus*, con un diametro di 45nm e contengono meno acido nucleico, con 5mila coppie di basi. Il genoma è suddivisibile in una regione tardiva, precoce e non codificante. La regione precoce codifica per le proteine non strutturali T (compresi antigene T grande e t piccolo); la regione tardiva, sull'altro filamento codifica per tre proteine del capsido virale CP1,2,3; la regione non codificante codifica per l'origine di replicazione del DNA e le sequenze di controllo della trascrizione, sia dei geni precoci, che tardivi. Dopo l'ingresso, segue lo scapsidamento del DNA e raggiunge il nucleo. I geni precoci così codificano per gli antigeni T e t,

che promuovono al crescita cellulare. La replicazione richiede l'apparato biosintetico dell'ospite. Gli antigeni T si lega al DNA, controllando la trascrizione dei geni precoci e tardivi, della replicazione del DNA virale. Inoltre si lega a p53 e p105RB, inattivandole e promuovendo la crescita cellulare. La replicazione dipende dai fattori di crescita; le cellule permissive consentono la trascrizione dell'mRNA virale tardivo e la replicazione virale, che portano a morte cellulare. Alcune non permissive consentono solo l'espressione dei geni precoci, promuovendo crescita cellulare, che causano la trasformazione oncogena della cellula; la regione non codificante contiene i siti di inizio per gli mRNA precoci e tardivi e anche l'origine della replicazione del DNA. Le tre proteine tardive vengono prodotte da mRNA che possiedono lo stesso sito di inizio, ma che vengono processati per dare origine a tre mRNA distinti. La replicazione del DNA precede la trascrizione dell'mRNA tardivo e la sintesi proteica: Il virus si assembla e viene rilasciato per lisi cellulare.

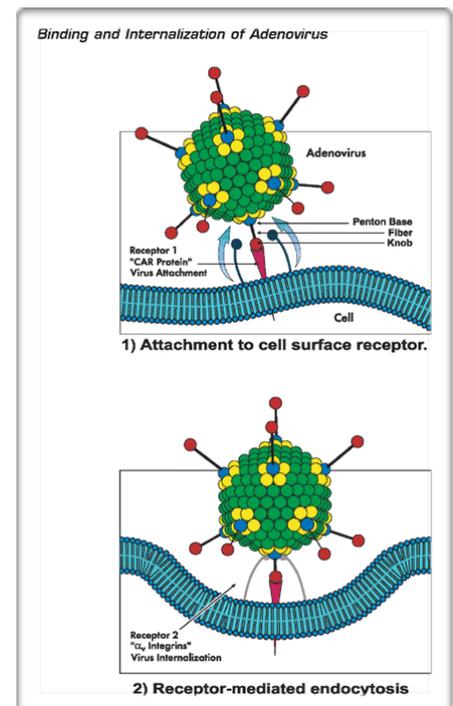
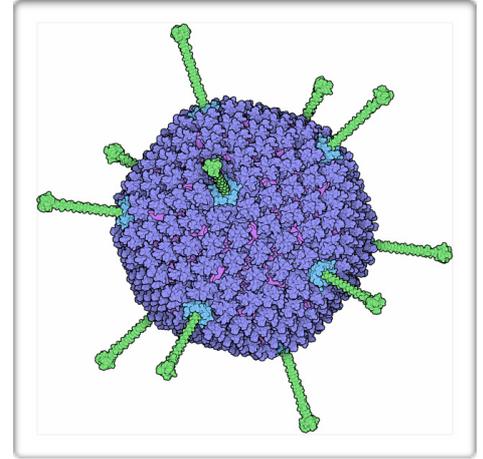
Ciascun *poliomavirus* è limitato a tessuti specifici di ospiti specifici. JC, BK penetrano attraverso il tratto respiratorio, dove il primo, JC, infetta le cellule renali, i monociti e le cellule B, mentre BK provoca un'infezione latente nel rene. La replicazione virale nei pazienti immunocompetenti viene soppressa, mentre nei pazienti immunocompromessi può portare la liberazione del virus nelle urine, con infezione del tratto urinario (BK) o viremia con interessamento del SNC (JC); in tal caso JJ attraversa la barriera emato-encefalica, si replica nelle cellule endoteliali e l'infezione abortiva degli astrociti porta il paziente ad avere cellule abnormi con nuclei evidenti. L'infezione produttiva litica degli oligodendrociti provoca demielinizzazione.

Le infezioni sono ubiquitarie e la maggior parte della popolazione è infettata entro i primi 15 anni di età. La trasmissione avviene per via respiratoria e le infezioni latenti possono essere riattivate in caso di immunodeficienza. L'infezione primaria è asintomatica. Sembra che BK si associato a stenosi uretrale nei trapianti di rene, così come alle cisti emorragiche nei trapianti di midollo osseo. JC causa leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), rara, associata a immunocompromissione, con sintomi neurologici fino a paralisi degli arti e morte entro 1-4 mesi dalla diagnosi. La PML viene diagnosticata mediante presenza di DNA virale amplificato mediante PCR nel liquor e dalla tomografia computerizzata per dimostrare le lesioni. L'esame istologico del tessuto cerebrale mostra demielinizzazione circondate da oligodendrociti. Esami delle urine dimostrano la presenza di JC e BK. Non esiste terapia specifica, se non limitare l'immunosoppressione indotta dal virus. E' ubiquitario, quindi difficile da debellare.

Adenovirus

La famiglia *Adenoviridae* comprende numerosissimi virus animali. Due sono i generi, *Mastadenovirus* (47 virus umani) e *Aviandenvirus*. Le infezioni da *adenovirus* sono molto diffuse nel mondo intero.

Gli *Adenovirus* sono virus nudi a DNA a doppio filamento con simmetria icosaedrica (75nm), con 252 capsomeri (20 facce e 12 vertici) caratterizzati da fibre che si diramano dai 12 vertici dell'icosaedro. Devono il loro nome al fatto che sono stati isolati (nel 1953) da adenoidi rimosse chirurgicamente. Comprendono numerosissimi virus, con più di 100 diversi tipi, di cui 47 infettano l'uomo. Sono agenti eziologici di infezioni dell'apparato respiratorio, di congiuntivite, cistiti emorragiche e gastroenterite. Il genoma è di 36mila coppie di basi, costituito da DNA lineare a doppio filamento con una proteina terminale di 55kDa legata ad ogni estremità 5'. Il capside comprende 252 capsomeri, 240 esoni e 12 pentoni. I 12 pentoni che sono localizzati a ciascuno dei vertici, sono collegati ad una fibra. Questa **fibra** contiene le **proteine virali di attacco** e può agire da emoagglutinina; la base del pentone e la fibra sono tossiche per le cellule. Le fibre fungono da antirecettore e ad esse è legata una caratteristica attività biologica degli *Adenovirus* e cioè la capacità emoagglutinante. Gli *Adenovirus* emoagglutinanti possono esprimere questa attività nei confronti di emazie di specie diverse; possono essere distinti in base ai tipi di emazie che agglutinano. Il complesso del core all'interno del capside è costituito da DNA virale e da almeno due proteine maggiori. Il virione dell'*adenovirus* contiene 11 polipeptidi, di cui 9 hanno una funzione strutturale. I geni sono trascritti da entrambi i filamenti di DNA in tutte e due le direzioni e in diversi momenti. Le proteine precoci promuovono la crescita cellulare e comprendono una DNA polimerasi per la replicazione del genoma, poi proteine che sopprimono la risposta immunitaria e infiammatoria. Le proteine tardive sono sintetizzate dopo la replicazione e sono componenti del capside. Un ciclo virale dura dalle 32 alle 36 ore e



produce 10mila virioni. L'adesione dell'*adenovirus* avviene in due fasi. Le proteine delle fibre virali interagiscono con delle glicoproteine della superfamiglia delle Ig o con MHC I, mentre la base del pentone interagisce con una integrina per promuovere l'internalizzazione mediata da recettore in vescicola di latrina. Il virus lisa le vescicole endosmiali e il capsido, rilasciando così il DNA nel nucleo. Le proteine del pentone e della fibra del capsido sono tossiche e inibiscono la sintesi delle macromolecole cellulari. La trascrizione dei geni precoci porta alla formazione dei prodotti genici che stimolano crescita cellulare e replicazione virale. La trascrizione del gene precoce E1, il processamento e la traduzione della proteina transattivante precocissima E1A sono richieste per la trascrizione delle altre proteine precoci, che sono proteine che legano il DNA, DNA polimerasi e proteine di elusione delle difese dell'ospite. E1A è oncogena e lega p105RB, E1B lega p53, quindi stimolano la crescita inibendo questi due soppressori della crescita cellulare. Nelle cellule permissive, la stimolazione della divisione cellulare facilita la trascrizione e la replicazione del genoma, causando la morte delle cellule. Nelle non permissive, il virus instaura un'infezione latente e il genoma rimane nel nucleo. La replicazione del DNA virale avviene nel nucleo ad opera di una DNA polimerasi codificata dal virus. La polimerasi utilizza come primer una proteina di 55 kDa, quella proteina terminale alle estremità 5', e una citosina monofosfato per replicare entrambi i filamenti di DNA. La trascrizione dei geni tardivi inizia dopo la replicazione del DNA. Le proteine del capsido vengono prodotte nel citoplasma e poi trasportate nel nucleo, per l'assemblaggio virale. Prima si formano i capsidi vuoti, poi il DNA virale e le proteine del core entrano nel capsido mediante un'apertura a uno dei vertici. DNA, proteine e molte particelle difettive (perché i processi di replicazione sono soggetti a molti errori) si accumulano sotto forma di corpi inclusi. Il virus rimane nella cellula e viene liberato quando la cellula degenera e si lisa.

Gli *adenovirus* sono in grado di instaurare infezioni litiche, latenti e trasformanti (non nell'uomo). Infettano le cellule epiteliali che rivestono l'orofaringe, gli organi respiratori ed enterici. Le proprietà tossiche della proteina del pentone possono inibire il trasporto di mRNA cellulari e della sintesi proteica, arrotondamento delle cellule, danneggiamento dei tessuti, ma non ingrossamento cellulare. Il segno istologico caratteristico è una grossa inclusione centrale intranucleare di una cellula epiteliale infettata (DNA e proteine virali). La viremia può verificarsi dopo la replicazione in loco del virus, con disseminazione negli organi interni; questa si realizza più frequentemente in immunocompromessi. Il virus diventa latente e

persistente nei tessuti linfoidi. Gli anticorpi sono importanti nella risoluzione dell'infezione litica e proteggono l'individuo dalla reinfezione con lo stesso sierotipo, ma non con sierotipi diversi. L'immunità cellulo-mediata è importante per contenere lo sviluppo del virus. Possiedono numerosi meccanismi per eludere le difese immunitarie, come la codifica di piccoli RNA associati a virus (RNA VA) che prevengono l'inibizione della sintesi proteica virale indotta da IFN, oppure bloccano l'apoptosi indotta dai linfociti T grazie alle proteine virali E3 ed E1A. Alcuni ceppi inibiscono l'attività citotossica dei CD8+.

Sono resistenti ai detergenti, all'essiccamento, alle secrezioni del tratto GI, ed al cloro. Si diffondono tramite circuito oro-fecale tramite mani, oggetti e piscine poco clorate. Possono diffondere solo da uomo a uomo, per contatto respiratorio o oro-fecale, e le infezioni sono prevalentemente asintomatiche, il che facilita la trasmissione. Infettano soprattutto bambini e adulti immunodepressi.

Sindromi Cliniche:

- **Faringite febbrile acuta e febbre faringo-congiuntivale:**

Causano faringite, accompagnata da congiuntivite (occhio rosa) e febbre faringo-congiuntivale. La sola faringite si manifesta nei bambini, in particolare in quelli di età inferiore ai 3 anni, e può somigliare all'infezione da streptococco, con sintomi simil-influenzali per 3-5 giorni.

- **Malattia acuta del tratto respiratorio:**

E' una sindrome caratterizzata da febbre, tosse, faringite e adenite cervicale, causata dai sierotipi 4 e 7.

- **Altre malattie del tratto respiratorio:**

Causano raffreddore, laringite, bronchioliti e malattia simile alla pertosse.

- **Congiuntivite e cheratocongiuntivite:**

Causano congiuntivite follicolare dove la mucosa della congiuntiva palpebrale diventa granulosa o nodulosa e sia congiuntiva palpebrale che bulbare si infiammano. Può manifestarsi sporadicamente o come epidemia, a causa di una fonte comune. L'irritazione dell'occhio da parte di un corpo estraneo o della polvere può essere un rischio.

- **Gastroenterite e diarrea:**

E' la principale causa di gastroenterite virale acuta. I sierotipi 40,41 e 42 sono classificati come *adenovirus* enterici e causano diarrea nei neonati.

- **Infezione sistemica in pazienti immunocompromessi:**

Gli individui immunocompromessi sono a rischio di gravi infezioni da *adenovirus*, anche se sono più esposti ad *herpesvirus*; possono causare polmonite ed epatite.

Diagnosi:

L'isolamento del virus è significativo quando proviene da secrezioni o tessuti clinicamente rilevanti. L'analisi diretta del campione clinico senza l'identificazione può essere utilizzata. Si possono utilizzare saggi immunologici, come anticorpi fluorescenti, reazioni immunoenzimatiche e analisi con sonde di DNA. L'isolamento si ottiene con colture cellulari epiteliali; il virus causa un'infezione litica con comparsa di corpi inclusi in 2-20 giorni; il virus si riscontra dopo 6 giorni.

Trattamento:

L'accurato lavaggio delle mani e la clorazione delle piscine può ridurre la trasmissione degli *adenovirus*. Non è disponibile una terapia per l'infezione da *adenovirus*.

Terapia genica:

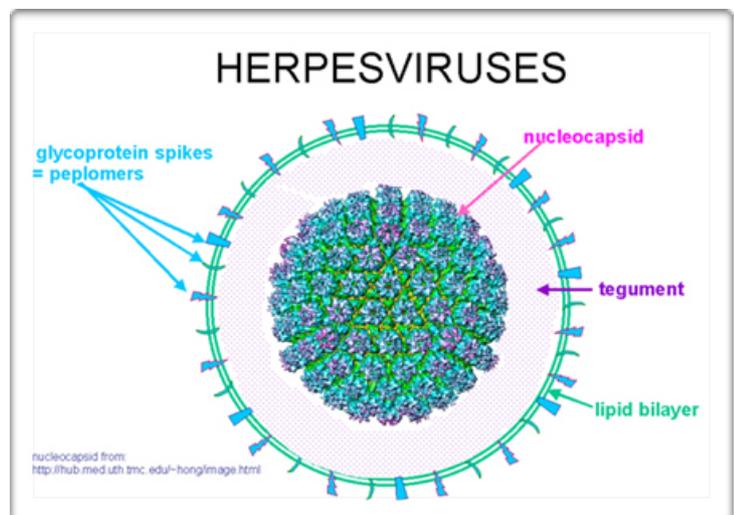
Gli *adenovirus* sono utilizzati per varie applicazioni di terapia genica, per la correzione di numerose malattie umane, come immunodeficienze (immunodeficienza da adenosina deaminasi), la fibrosi cistica, e persino il cancro (ricerca). Il virus viene inattivato con delezione o mutazione del gene E1 e altri geni virali. Il gene appropriato viene inserito nel genoma, al posto del DNA deletato e viene posto sotto il controllo di un promotore adeguato. Il vettore virale che ne risulta viene fatto crescere in una cellula che esprime le funzioni virali mancanti (E1) e che possa essere complementare per la funzione mancante, così da produrre la progenie virale.

Herpesvirus umani

Dal greco strisciare, insinuarsi, sono dei virus ubiquitari, con infezioni molto diffuse. Sono stati isolati circa 100 *Herpesvirus*, almeno uno per ogni specie animale per la quale si è fatta una ricerca specifica. Al momento attuale sono stati descritti 8 *Herpesvirus umani*.

È un virus a DNA lineare a doppio filamento, con dimensioni ampie, che variano tra 180 ed i 200 nm; il core di DNA è circondato da un capside icosadeltaedrico di 162 capsomeri, a sua volta racchiuso da un pericapside glicoproteico. Tra il capside e il pericapside è situato uno strato amorfo detto tegumento, costituito da proteine ed enzimi virali che favoriscono l'inizio della replicazione.

Sono una famiglia diversificata e complessa di virus a DNA a grosse dimensioni. Sono caratterizzati da una comune morfologia del virione, da strategia replicativa (replicazione del DNA e assemblaggio nucleare) e dal fatto che codificano molte proteine di controllo della sintesi di DNA e mRNA virali e la regolazione della sintesi di DNA, RNA e proteine cellulari. Possono causare



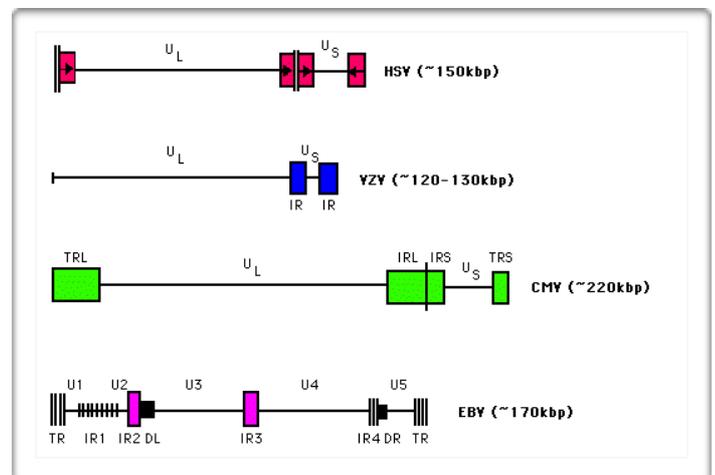
infezioni litiche, persistenti, latenti/ricorrenti, e immortalizzanti (EBV).

La caratteristica peculiare di questa famiglia è la possibilità di latentizzare, in seguito all'infezione primaria. A distanza di poco tempo l'infezione si può riattivare (infezione ricorrente) con patologie che possono essere anche differenti dall'infezione primaria. Le infezioni sono spesso asintomatiche, ma possono assumere decorso molto sfavorevole in individui immunocompromessi. I virus erpetici inducono o possono indurre infezioni latenti così come i *Papovirus*, *Hepadnavirus* e naturalmente i *Retrovirus*. Esempio tipico di latenza è l'herpesvirus di tipo 1 che, a seguito dell'infezione primaria, va a localizzarsi trasportato lungo l'assone del nervo sensitivo al ganglio sensorio regionale, soprattutto nei gangli del trigemino. Il virus infetta in neuroni e persiste in essi nel nucleo in più copie e in forma episomiale stabilendo una infezione latente che dura tutta la vita. Stimoli poco conosciuti, clinicamente

legati ad eventi patogeni e di stress, attivano il virus latente che si moltiplica nei neuroni e viene trasmesso attraverso il plasmalemma della fibra nervosa sensitiva fino alle giunzioni neuroepiteliali con conseguente infezione delle cellule sovrastanti epiteliali e produzione della lesione erpetica. Durante la latenza del virus non sono state messe in evidenza proteine virali nei neuroni. Un tipico esempio di infezione latente che esprime antigeni virali è il virus di Epstein-Barr (EBV), un altro virus erpetico, agente della mononucleosi infettiva. Esso si moltiplica nelle cellule epiteliali naso-faringee e infetta i linfociti B stabilendo in essi un'infezione latente in forma episomiale (più copie di DNA circolarizzato nel nucleo). Nelle cellule tumorali del linfoma di Burkitt è stato individuato genoma integrato. La latenza di EBV nei linfociti B non è completamente silente. Il genoma virale esprime alcune proteine, i cosiddetti antigeni nucleari (EBNA) dei quali è stato particolarmente studiato EBNA-1 che induce la DNA polimerasi cellulare a produrre più copie di DNA episomiale virale. Altri EBNA inducono immortalizzazione dei linfociti B mentre altri antigeni virali prodotti, i cosiddetti antigeni di membrana che compaiono sulla superficie della cellula infetta, stimolano una risposta cellulo-mediata nei confronti del linfocita B infetto (quindi un aumento dei linfociti T nel corso della mononucleosi infettiva).

Sono state trovate 3 sottofamiglie diversificate in base a struttura del genoma, tropismo tissutale e citoplatologia e sede d'infezione. Gli 8 virus sono classificati nelle tre sottofamiglie α , β , γ :

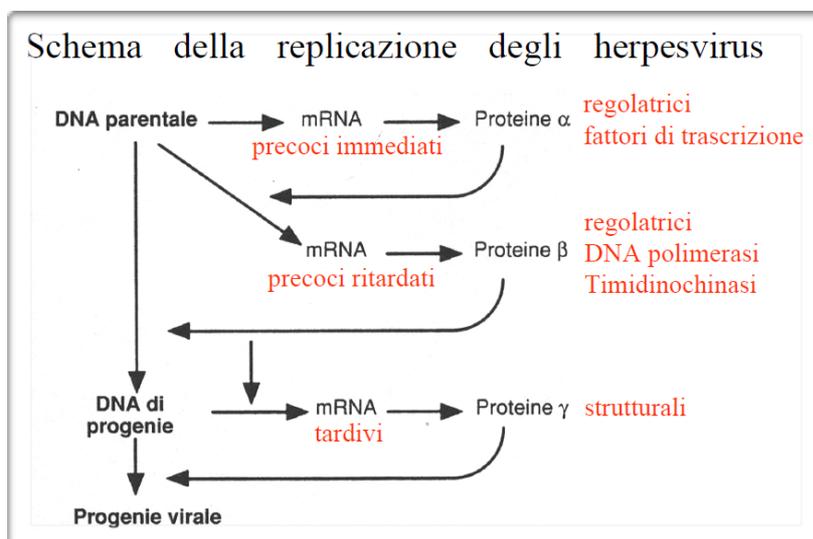
- Nella famiglia α -herpesvirus riscontriamo HSV1, HSV2 e Virus della Varicella Zoster (VZV/HHV3)
- Nella famiglia β -herpesvirus riscontriamo Citomegalovirus (CMV/HHV5) e Virus erpetici umani 6 e 7 (HHV-6 e 7)
- Nella famiglia γ -herpesvirus troviamo Epstein-Barr (EBV/HHV4) e il Virus erpetico umano 8 (HHV8).



Il genoma è lineare, a DNA a doppio filamento, ed è del peso molecolare di 100 milioni di dalton. Il genoma è avvolto intorno ad una struttura proteica a forma di toroide (nucleosoma) e può codificare per almeno 81 polipeptidi diversi. Il DNA è lineare della fase di quiescenza, poi circolarizza durante la moltiplicazione. L'acido

nucleico a DNA a doppia elica è formato da due sequenze geniche, una lunga (UL) e una successiva corta (US), affiancate da due sequenze terminali ripetute. Queste sequenze possono essere invertite, e nell'una e nell'altra elica, dando origine a quattro popolazioni molecolari di DNA che differiscono per il differente orientamento di UL e US.

Gli α -herpesvirus hanno un ciclo replicativo abbastanza breve, un marcato effetto citopatico e un tropismo tissutale ampio. La sede preferenziale di latenza sono le cellule dei gangli nervosi. I β -herpesvirus hanno un ciclo replicativo piuttosto lungo, un ristretto tropismo tissutale e capacità di indurre sincizi. La sede di latenza è nelle ghiandole salivari, nei tubuli renali, nelle linfoghiandole (cellule epiteliali, monociti). I γ -herpesvirus hanno un tropismo tissutale limitato a cellule linfoidi, che sono pure la sede di latenza.



La replicazione del DNA nel nucleo avviene tramite una DNA polimerasi virale, il DNA virale circolarizza e replica mediante il meccanismo del circolo rotante. Il filamento interno usato come stampo.

Il ciclo replicativo degli *herpesvirus* comincia con l'interazione tra le glicoproteine virali e recettori presenti sulla superficie della cellula bersaglio. Il pericapside si fonde con la membrana citoplasmatica e il nucleocapside viene rilasciato nel citoplasma; in questo processo il tegumento ha portato enzimi e fattori trascrizionali nella cellula. Il nucleocapside raggiunge la membrana nucleare e rilascia il genoma nel nucleo (dove verrà trascritto e replicato). Il genoma viene trascritto e sintetizzato con un ordine preciso: vengono trascritte prima le proteine precocissime (regolazione della trascrizione genica), poi le proteine precoci (fattori trascrizionali ed enzimi, compresa la DNA polimerasi) ed infine le proteine tardive (strutturali).

Il genoma virale viene trascritto da una RNA-polimerasi DNA dipendente della cellula, sotto il controllo di fattori virali e di fattori nucleari cellulari. La replicazione del genoma virale avviene ad opera di una DNA-polimerasi virale (bersaglio di farmaci antivirali). Gli enzimi di recupero dei nucleotidi forniscono i substrati alla polimerasi, facilitando la replicazione del virus in quelle cellule che non si trovano in fase replicativa, quindi dove non ci sono i substrati necessari alla sintesi di DNA. I procapsidi vuoti si assemblano nel nucleo e sono riempiti di DNA, acquisiscono poi un pericapside a livello della membrana nucleare o del Golgi e poi fuoriescono dalla cellula per esocitosi.

Virus Herpes Simplex HSV

Il primo *herpesvirus* umano ad essere identificato, è presente in due varianti HSV-1 e HSV-2, che hanno in comune l'omologia del DNA, determinanti antigenici, tropismo tissutale e sintomi della malattia.

Struttura: Il genoma codifica per almeno 80 proteine, la metà delle quali sono necessarie alla replicazione virale, mentre le altre intervengono nell'interazione tra il virus e i diversi tipi di cellula ospite e nella risposta immunitaria. Il genoma di HSV codifica numerosi enzimi, tra cui DNA-polimerasi DNA-dipendente ed enzimi di recupero di nucleotidi, quali timidina chinasi (fosforila i deossiribonucleotidi per fornire substrati per la replicazione del genoma virale) e ribonucleotide reductasi (converte i ribonucleotidi in deossiribonucleotidi). Il genoma di HSV codifica per almeno 11 glicoproteine che vengono utilizzate come proteine virali di attacco (gB, gC, gD, gH), proteine di fusione (gB), proteine strutturali, proteine per l'elusione del sistema immunitario (gC, gE, gI).

Replicazione: HSV instaura infezioni litiche in fibroblasti e cellule epiteliali, e infezioni latenti nei neuroni. Si adsorbe rapidamente ed efficacemente alle cellule attraverso un'interazione con l'eparansolfato all'esterno di molti tipi cellulari, e poi interagisce più strettamente con recettori proteici come la nectina-1 (HveC o mediatore C di entrata degli *Herpesvirus*) e HveA (famiglia dei recettori per TNF espresso sulle cellule T attivate, neuroni e altre cellule). HSV penetra mediante fusione del pericapside con la membrana cellulare ed in seguito a fusione, il virione lascia il capsido nel citoplasma, con una proteina che promuove l'inizio della trascrizione del genoma virale, una proteina chinasi virus-specifica; il capsido si attacca ad un poro nucleare e rilascia il genoma nel nucleo.

Le proteine precocissime comprendono proteine che legano e stimolano la sintesi di DNA; durante un'infezione latente nei neuroni viene trascritta una regione specifica del genoma, da cui si originano i **trascritti associati alla latenza**, o **LAT**, ma questi RNA non vengono mai tradotti in proteine.

Le proteine precoci sono DNA-polimerasi DNA-dipendente e una timidina chinasi. Non appena viene sintetizzata la polimerasi inizia la replicazione del genoma, dove inizialmente assume forme circolari, mentre più tardi si replica formando un filamento di genoma lineare.

I geni tardivi vengono trascritti successivamente e sono proteine strutturali. Le proteine del capsido vengono trasportate nel nucleo, dove sono assemblate assieme per formare i procapsidi, che sono vuoti, al cui interno poi è inserito il DNA; questi, dopo l'inserimento del DNA, si associano alle membrane nucleari, contenenti proteine virali, e dopo aver attraversato il RE, gemmano verso il citoplasma; le proteine del tegumento si associano con il capsido virale e successivamente gemma nell'apparato di Golgi per acquisire il pericapsido glicoproteico. Il virus a questo punto può essere esocitato o espulso per lisi cellulare, oppure può eludere le difese anticorpali, passando attraverso ponti intercellulari.

L'infezione dei neuroni può comportare la replicazione virale, oppure la latenza, a seconda di quali geni virali il neurone è in grado di trascrivere. Se viene trascritto LAT e nessun altro gene, si arriva a latenza, mentre se il neurone trascrive i geni precocissimi virali, si replicherà.

Patogenesi: HSV-1 e -2 inizialmente infettano e replicano in cellule muco-epiteliali, provocando malattia nel sito di infezione e stabilendo un'infezione latente nei neuroni che innervano queste cellule. HSV-1 è associato ad infezioni che interessano la parte superiore del corpo, mentre HSV-2 alla parte inferiore del corpo.

HSV può causare delle infezioni litiche, persistenti in linfociti e macrofagi, e latenti nei neuroni. La citolisi è indotta dalla degradazione del DNA, dalla sintesi di macromolecole cellulari, dalla permeabilizzazione della membrana e dalla distruzione del citoscheletro, poi cambia il nucleo nella localizzazione della cromatina e si formano dei caratteristici corpi inclusi acidofili di Cowdry di tipo A. HSV può penetrare anche attraverso lesioni della cute, dove si riproduce e infetta i neuroni innervanti raggiungendo a ritroso il ganglio nervoso, dove è il ganglio del trigemino per HSV orale, e gangli sacrali per HSV genitale.

L'immunità innata, incluso interferone e NK, può essere sufficiente per il controllo della progressione iniziale dell'infezione. Sono necessarie le risposte cellulari Th1 e TCD8 per la distruzione delle cellule infettate e per la risoluzione della patologia in atto. HSV possiede vari metodi per eludere la sorveglianza, quale inibire la presentazione dell'antigene da parte delle MHC I, oppure diffondendo da cellula a cellula, eludendo così gli anticorpi.

La riattivazione di un'infezione latente può essere indotta da stimoli come stress emozionale e fisico, cibo, febbre e radiazioni. Questi innescano la replicazione virale in una singola cellula nervosa e permettono al virus di migrare a ritroso lungo il nervo, causando lesioni sempre nello stesso sito, tutto ciò nonostante la presenza di anticorpi. Le infezioni ricorrenti sono meno gravi e di minor durata.

Epidemiologia: La persona infettata è una sorgente di contagio per tutta la vita. Il virus viene trasmesso con il liquido delle vescicole, la saliva e le secrezioni vaginali. Entrambi i tipi di HSV possono causare lesioni orali o genitali.

HSV-1 diffonde per contatto orale (bacio) o uso comune di oggetti contaminati da saliva (bicchieri o spazzolini da denti). L'infezione delle dita e del corpo può essere causata da contatto tra bocca e cute, con il virus che entra attraverso una lesione cutanea. Anche l'autoinoculazione può provocare infezione. E' diffusa.

HSV-2 è trasmesso principalmente per contatto sessuale, per autoinoculazione, oppure da madre infetta durante il parto. Questa infezione ha un'incidenza in età maggiori rispetto ad HSV-1 per via dell'aumento dell'attività sessuale.

Sindromi cliniche: Nella manifestazione classica, si presenta una lesione o vescicola trasparente su una base eritematosa (una goccia di rugiada su un petalo di rosa) che si trasforma in pustole e poi ulcera che si ricopre di una crosta. Entrambi possono essere causa di malattie più gravi e di morte se arrivano ad infettare encefalo e occhio. L'herpes orale può essere causato da HSV-1 e HSV-2. L'herpes labiale nei bambini è sempre causata dalla -1, mentre i giovani adulti possono essere infettati da HSV-1 e -2. Un individuo può essere soggetto a manifestazioni mucocutanee ricorrenti (febbre al labbro, herpes) senza mai aver subito un'infezione primaria clinicamente evidente. Le lesioni sono all'angolo della bocca o vicino le labbra, generalmente attivate a partire dai gangli del trigemino. Possiamo trovare **faringite erpetica** con ulcere alla gola nei giovani adulti, poi **cheratite erpetica**, **patereccio erpetico** (infezione delle dita), l'**herpes dei gladiatori** (infezione del corpo, dove si

contrae durante la lotta), **eczema** erpetico, **herpes genitale** (causato da HSV-2, negli organi genitali esterni ed interni, con lesioni dolorose, accompagnate anche da febbre e malessere), **encefalite** erpetica (causata da HSV-1, limitata al lobo temporale, di cui ne causa la distruzione, con eritrociti nel liquor e attacchi epilettici e anomalie neurologiche, con elevata mortalità, causa anche di meningite), **infezione da HSV nei neonati** (malattia devastante spesso fatale e generata da HSV-2; durante il passaggio nel canale del parto, oppure contratto dopo la nascita; visto che l'immunità cellulo-mediata non è sviluppata, si diffonde agli organi ed al SNC portando a morte o a gravi disturbi neurologici).

Diagnosi: Gli effetti citopatici o CPE si identificano con strisci di Tzanck. Una diagnosi definitiva può essere ottenuta trovando antigeni virali o DNA virale con la PCR nel tessuto o liquido vescicolare. L'analisi del liquor mediante PCR è utile. L'isolamento del virus è la prova definitiva e si ottiene dalle vescicole ma non dalle lesioni. HPV produce CPR in 1-3 giorni nelle cellule HeLa. I test sierologici sono utili per la diagnosi di un'infezione primaria e per studi epidemiologici, ma non utili per le ricorrenti, perché le ricorrenti non sono accompagnate da un aumento del titolo anticorpale.

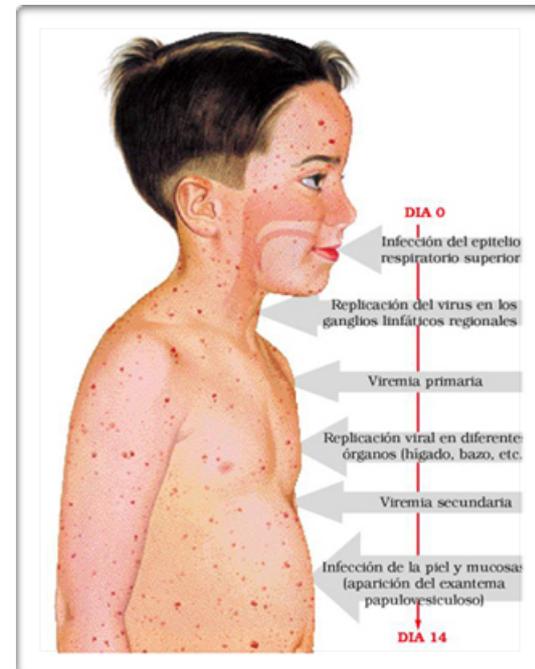
Trattamento: HSV possiede numerosi bersagli per i farmaci antivirali. Contro queste infezioni è usato con notevole efficacia l'**aciclovir (ACV)**, un nucleoside analogo della guanina, fosforilato dalla timidina.chinasi virale: risulta quindi selettivo nell'agire nella cellula infetta, risultando meno tossico di altri farmaci. Viene usato in applicazione topica per le affezioni cutanee e sistemica per le rare affezioni disseminate. Non è disponibile alcun vaccino per HSV.

Virus della Varicella Zoster

VZV causala **varicella** e la ricorrenza produce l'**herpes zoster** o **fuoco di Sant'Antonio**. Stabilisce infezioni latenti nei neuroni, presenta lesioni vescicolari e l'immunità cellulo-mediata è importante per il controllo di questo virus, queste sono le caratteristiche in comune con HSV.

VZV ha il genoma più piccolo fra gli herpes e replica similmente, ma più lentamente di HSV.

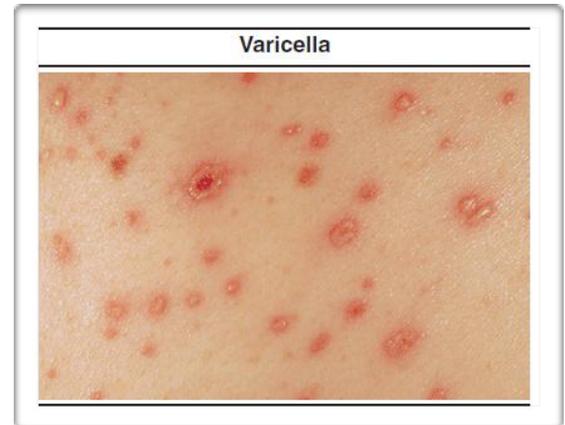
La principale modalità di disseminazione è la **via respiratoria**, ma anche mediante contatto con i fluidi vescicolari. Nelle vie respiratorie superiori il virus si replica e si diffonde ai linfonodi regionali, dove c'è un'ulteriore amplificazione virale; segue una fase viremica con trasferimento dell'infezione agli organi interni (fegato, milza e reni) e quindi all'epidermide che porta alla formazione di lesioni cutanee diffuse su tutto il corpo, delle macule, che evolvono prima in papule, vescicole e pustole. Il virus migra nei gangli sensoriali (dorsali) e rimane in uno stato di latenza che può durare tutta la vita. La riattivazione determina il trasferimento del virus, lungo l'assone, alle terminazioni nervose periferiche epidermali, dove provoca un'eruzione vescicolare dolorosa, o herpes zoster, generalmente localizzata nella regione toracica. Si ritiene che durante la latenza, la replicazione virale possa occasionalmente riprendere. Se l'immunità cellulare è efficiente, la manifestazione clinica è inibita. Questi episodi abortivi contribuiscono forse a mantenere elevato il livello di immunità cellulare. Se l'immunità decade sotto un livello soglia, la riattivazione si manifesta clinicamente. L'IFN- α limita la diffusione del virus nei tessuti e gli anticorpi sono importanti per limitare la diffusione viremica. L'immunizzazione passiva con immunoglobuline contro VZV, entro 4 giorni dall'infezione, conferisce protezione; l'immunità cellulo-mediata è fondamentale per la risoluzione della malattia, per la quale assenza, il virus scatena una patologia più severa e diffusa. Negli adulti una risposta troppo energica all'infezione primaria determina manifestazioni più gravi, soprattutto a livello polmonare, rispetto ai bambini.



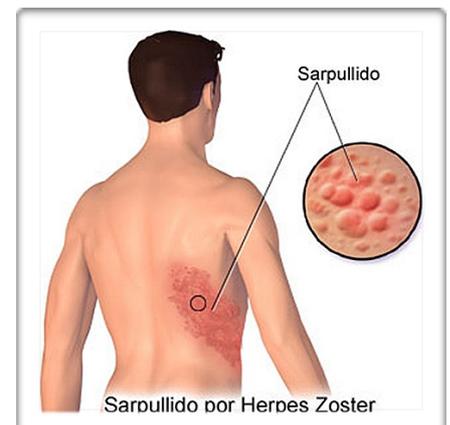
Epidemiologia: VZV viene trasmesso con molta facilità. Le vescicole presenti in un adulto in fase zoster sono la sergente che comunemente dà avvio ad un'epidemia varicellosa in una comunità di bambini suscettibili. L'immunità conferita dall'infezione primaria è duratura e protegge dalla reinfezione ma non dalle riattivazioni.

Sindromi cliniche: La **varicella** è uno dei 5 classici esantemi dell'infanzia. E' causata da un'infezione primaria da VZV, una malattia non grave e sintomatica. E' caratterizzata da febbre e da eritema maculo-papillare, che appare dopo 14 giorni di incubazione. In poche ore, alla base di ogni lesione, si forma una vescicola con pareti

sottili su una base eritematosa (goccia di rugiada sul petalo) del diametro di 2-4 mm. E' caratteristica della varicella e dopo 12 ore, la vescicola si trasforma in una pustola, che si incrosta. Per 3-5 giorni appaiono gruppi di lesioni, che possono indicare tutti gli stadi delle lesioni. L'eritema è generalizzato a tutto il corpo, ma è più diffuso al tronco che non alle estremità, e si può notare la sua presenza a livello del cuoio capelluto (differenza tra questa e le altre patologie). Le lesioni sono pruriginose e inducono il paziente a grattarsi, con possibile formazione di cicatrici o superinfezione batterica. Lesioni della mucosa si verificano in gola, bocca e vagina. Negli adulti l'infezione primaria è più grave, infatti nel 25% dei pazienti si verifica polmonite intersiziale, che può essere fatale, derivante dalle reazioni infiammatorie a livello del sito primario dell'infezione.



L'**herpes zoster** è la ricorrenza di un'infezione latente acquisita in precedenza dal paziente. Un dolore acuto precede la lesione, simile alla varicella; eritema limitato ad un dermatomero. La nevralgia postherpetica, può accompagnare la zoster frequentemente, ed è una sindrome a dolore cronico, che può persistere per mesi o anni, e si verifica nei pazienti maggiori di 65 anni nei quali si è già sviluppato lo zoster.



L'infezione da VZV in pazienti immunocompromessi o neonati può portare a malattia grave, progressiva e anche letale.

La diagnosi si effettua principalmente in base al quadro clinico. Per conferma si possono evidenziare antigeni virali nelle cellule raschiate alla base delle vescicole (ad es. immunofluorescenza) o isolando il virus in colture cellulari (fibroblasti umani, cellule di scimmia); bisogna tener presente la labilità del virus: i campioni vanno messi a 4°C e trasportati subito al laboratorio.

L'**aciclovir ACV** è il farmaco di scelta sia nelle infezioni primarie, che nello zoster (anche se qui è difficile intervenire sui sintomi della nevrite che accompagna spesso la riattivazione). La somministrazione di immunoglobuline anti-zoster possono alleviare o prevenire la zoster (ottenuta con plasma di sieropositivi).

Citomegalovirus

È un comune virus patogeno per l'uomo, che provoca normalmente lievi sintomatologie o è asintomatico, sia nell'infezione primaria sia nelle ricorrenti, tuttavia è opportunistica e può essere pericoloso per i pazienti immunocompromessi.

È un membro della sottofamiglia β ed è considerato linfotropico. Ha il genoma più grande di tutti gli *herpesvirus*. Trasporta nel virione mRNA specifici per facilitare l'infezione della cellula. Replica in fibroblasti, cellule epiteliali, macrofagi, permissive nei suoi confronti, e può stabilire infezione latente in linfociti mononucleati e cellule stromali del midollo osseo.

La patogenesi è simile a quella degli altri *herpesvirus*. È un eccellente parassita, fortemente associato alle cellule e diffonde nell'organismo all'interno delle cellule infettate, linfociti e leucociti. Si riattiva dopo immunosoppressione e stimolazione allogenica (dopo trapianto o trasfusione). L'immunità cellulo-mediata è fondamentale per il controllo e la risoluzione. CMV possiede molti mezzi per eludere il sistema immunitario, alterando l'espressione di MHC I e II, in modo da prevenire la presentazione dell'antigene, e una proteina virale blocca l'aggressione da parte delle NK.

La sede cellulare dell'infezione primaria è multipla, interessando cellule epiteliali sia di mucose che di ghiandole, oppure cellule linfoidi. La sede di latenza non è ancora accertata, ma nelle fasi non attive il DNA virale è dimostrabile nei monociti e nelle cellule endoteliali. La maggior parte dei CMV non provoca sintomatologie, tuttavia può essere trasmesso principalmente attraverso via congenita, orale, sessuale, trasfusioni o trapianti; tramite secrezioni contaminate. Quando la malattia si manifesta si possono avere sintomi aspecifici, come febbre, linfadenopatia, faringite accompagnati da linfocitosi (sindromi simil-mononucleosica). Ci può essere anche un coinvolgimento epatico. L'infezione può manifestarsi con elevata gravità negli individui immunocompromessi, sia nell'infezione primaria, che nell'attivazione. In queste situazioni possono essere coinvolti molti organi con conseguenze anche molto gravi, come polmonite, epatite, nefrite, esofagite, colite, retinite ed encefalite. Alcune localizzazioni sono tipiche di determinate patologie, come la localizzazione oculare osservata in malati AIDS (retinite da CMV).

CMV è estremamente diffuso nella popolazione e l'infezione viene contratta in genere in età precoce e si può riattivare in epoca successiva. Una notevole importanza riveste la trasmissione verticale, soprattutto nel primo trimestre di gravidanza: il virus

può causare aborto o gravi alterazioni patologiche (splenomegalia, cecità, sordità e microcefalia).

Sindromi cliniche: CMV è la causa più frequente di malattia virale **congenita**. Un'alta percentuale di tutti i neonati USA è infettata da CMV prima di nascere e un'ampia percentuale entro il primo mese di vita. I segni clinici di malattia sono basso peso, trombocitopenia, microcefalia, calcificazione intracerebrale, ittero, epatosplenomegalia e rash. Il rischio di gravi deficit è estremamente elevato per neonati la cui madre ha contratto infezione primaria durante la gravidanza. I feti vengono infettati dal virus presente nel sangue materno, o dall'ascensione del virus dalla cervice uterina.

Infezione perinatale: Negli USA il 20% delle donne gravide alberga CMV nella cervice a termine della gravidanza e può avere riattivazione durante la gravidanza. La maggior parte dei neonati elimina il virus alla 3-4a settimana di vita, ma possono anche assumere infezione da colostro o latte materno, o tramite trasfusioni.

Bambini e Adulti: CMV è frequente nelle classi economiche più basse, che vivono in ambienti sovraffollati e paesi in via di sviluppo. È un'infezione a trasmissione sessuale. La maggior parte delle infezioni è asintomatica, ma alcuni pazienti possono presentare sindrome mononucleosica negativa ad anticorpi eterofili, con sintomi simili a EBV, ma con faringite e linfadenopatia meno gravi. L'infezione da CMV dovrebbe essere sospettata in pazienti con mononucleosi eterofilo-negativa o con segnali di epatite, ma con sierologia negativa per i virus epatitici A, B e C.

Trasmissione mediante trapianto o trasfusione: Mediante sangue trasfuso spesso non causa sintomatologia evidente, ma se sono presenti, è simile a mononucleosi. Febbre splenomegalia e linfocitosi atipica dopo 3-5 settimane. Mediante trapianto si riattiva dopo immunosoppressione.

Immunocompromessi: È un agente importante per questa categoria di pazienti. Provoca malattia primaria o ricorrente di tipo sintomatico. Possono provocare polmonite (fatale se non trattata), retinite (nei pazienti con AIDS nel 15%), può causare colite, esofagite, infezioni gastrointestinali, diarrea, anoressia e febbre.

L'infezione primaria può essere diagnosticata su base sierologica, accertando una sieroconversione. È possibile isolare il virus in colture di fibroblasti umani da vari materiali biologici, come urine, saliva, sangue e broncolavaggio. La comparsa dell'effetto citopatico è molto lenta, quindi è indispensabile usare sistemi che

mettano in evidenza antigeni precoci nelle colture infettate già dopo un giorno. Un altro approccio sensibile è quello di ricercare gli antigeni virali direttamente nel materiale dei prelievi (nei linfomonociti). Il **Ganciclovir** e il **Foscarnet** sono i due farmaci usati per il CMV e sono inibitori della sintesi di DNA virale (dipendenti da Timidina chinasi). Se somministrati tempestivamente, consentono il controllo dell'infezione (soprattutto in pazienti immunocompromessi).

Virus di Epstein-Barr

È l'agente eziologico della mononucleosi infettiva, una malattia tipica dei giovani adulti, che di solito nell'infanzia è asintomatica.

Fa parte della sottofamiglia γ -herpesvirus, con un tropismo tissutale definito dalla limitata espressione del suo recettore. Infatti il recettore principale di EBV è CD21 o CR2, il recettore per la componente C3d del sistema del complemento, che viene espresso sui linfociti B e sulle cellule epiteliali dell'oro-faringe e del rino-faringe.

L'infezione presenta tre decorsi: può replicare nei linfociti B o cellule epiteliali permissive; può immortalizzare e stimolare i linfociti B; può determinare un'infezione latente nei linfociti B in presenza di linfociti T competenti (di cui ne sono il controllo maggiore).

Le cellule epiteliali e i linfociti B permissivi, consentono la trascrizione della proteina ZEBRA (regione Z), che attiva i geni precocissimi del virus e il ciclo litico. Dopo la sintesi della DNA-polimerasi e la replicazione del DNA vengono sintetizzate le proteine strutturali e le proteine tardive. Di queste fa parte gp 350/220 che è una proteina dell'assorbimento virale, più altre glicoproteine che legano CD21, MHC II e recettori sulle cellule B, quindi fondamentali per le prime fasi. Le proteine virali prodotte durante un'infezione produttiva, sono raggruppate in antigene precoce (EA), antigene del capsido virale (VCA) e glicoproteine dell'antigene di membrana (MA).

Nel corso di un'infezione non permissiva dei linfociti B, le cellule contengono un piccolo numero di geni di EBV, che si replicano solo durante la replicazione cellulare. Vengono espressi selettivamente alcuni geni a seconda dello stato delle cellule B; questi geni comprendono (EBNA) o **antigeni nucleari di Epstein-Barr**, **proteine latenti (LP)** e **proteine di membrana latenti (LMP)**. EBNA e LP sono proteine di

legame al DNA, dove EBNA è fondamentale per determinare e mantenere l'infezione (EBNA-1), e per l'immortalizzazione (EBNA-2), mentre LP hanno attività simil-oncogenica.

EBV stabilisce latenza nelle cellule di memoria, durante il quale sono espressi solo EBNA-1 e LMP-2 per conservare il genoma ed allo stesso tempo avere meno probabilità di essere riconosciuto.

EBV è in grado di utilizzare diverse fasi dello sviluppo delle cellule B. Le malattie da EBV derivano da una risposta immune iperattiva (mononucleosi infettiva), oppure da mancanza di un controllo immunitario efficace. L'infezione produttiva dei linfociti B e cellule epiteliali dell'oro-faringe, permettono la trasmissione ad altri ospiti, perché il virus viene liberato nella **saliva**.

Le proteine di EBV attivano la crescita delle cellule B e ne impediscono l'apoptosi. I linfociti T solitamente controllano la proliferazione dei linfociti B, ed in assenza quindi il virus immortalizza e promuove lo sviluppo delle cellule B, causando linfomi.

Nel corso di un'infezione produttiva, gli anticorpi sono prodotti in prima battuta verso le componenti del virione, quindi VCA e MA, e successivamente verso EA. Dopo la risoluzione dell'infezione, sono prodotti anticorpi contro EBNA. Durante la produttiva, EBV produce un analogo dell'IL-10 o BCRF-1, che inibisce le risposte protettive dei linfociti Th1 e stimola così la crescita delle B.

La mononucleosi infettiva deriva da una guerra tra linfociti T e B infetti. I linfociti T vengono attivati, ed appaiono come linfociti atipici; questi aumentano numericamente nel sangue periferico durante la seconda settimana di infezione, raggiungendo il 10-80% del numero totale dei leucociti, da cui prende il nome di mononucleosi.

La malattia si manifesta con febbre, faringite, ingrossamento dei linfonodi, splenomegalia, alterazioni delle funzioni epatiche. L'EBV viene trasmesso attraverso secrezioni faringee, spesso tramite **scambio di saliva**. I bambini possono acquisire l'infezione precocemente condividendo i bicchieri contaminati, e presentano generalmente un'infezione subclinica; la trasmissione della saliva tra adolescenti e giovani adulti avviene spesso durante il bacio, infatti è detta anche "malattia del bacio". Il 70% della popolazione degli USA viene infettata entro i 30 anni di vita. I pazienti trapiantati, immunocompromessi o con deficit genetici nell'immunità cellulo-mediata sono ad alto rischio per lo sviluppo di disordini da EBV.

La sede del primo impianto sono le cellule epiteliali della faringe, dove si instaura un'infezione produttiva. Da qui il virus viene trasmesso ai linfociti B, dove instaura un'infezione non produttiva (latenza). Nell'epitelio oro-faringeo il virus, dopo l'infezione primaria può dar luogo a un'infezione litica persistente, che può durare alcuni anni. Il soggetto infetto anche se asintomatico funziona da sorgente di infezione. Il genoma virale è presente in forma circolare all'interno del nucleo.

Sindromi cliniche:

- **Mononucleosi infettiva positiva ad anticorpi eterofili**

La triade sintomatologica è linfadenopatia (tumefazione ghiandolare), **splenomegalia** (milza ingrossata) e **faringe essudativa**, ma possono verificarsi rash (soprattutto in seguito a trattamento con ampicillina), astenia; è raramente letale nei soggetti sani, ma può presentare gravi complicanze neurologiche, ostruzione laringea o rottura della milza. I bambini presentano un quadro benigno.

- **Disordini linfoproliferativi indotti da EBV**

Nei soggetti privi di immunità mediata da linfociti T, può causare una pericolosa proliferazione dei linfociti B, col rischio di causare linfomi invece che mononucleosi. Questo è il caso dei individui con deficit nella funzione delle cellule T, o malattia linfoproliferativa legata al cromosoma X (difetto genetico legato al gene SAP, che impedisce l'attivazione dei linfociti T), così i linfociti B proliferano senza freni; oppure ancora pazienti trapiantati o immunodepressi, o ancora AIDS. La presenza del genoma virale nei linfociti B trasforma queste cellule immortalizzandole. EBV è associato con **Linfoma di Burkitt** (un linfoma monoclonale di cellule B della mandibola e del viso in bambini dell'Africa centrale e Nuova Guinea) e **carcinoma nasofaringeo**.

- **Leucoplachia orale a cellule capellute**

Nei pazienti con AIDS si ritiene associato alla leucoplachia orale. E' una presentazione poco frequente dell'infezione produttiva da EBV delle cellule epiteliali. Lesioni della lingua e della bocca.

La diagnosi si basa sulla sintomatologia, sulla dimostrazione di anticorpi contro le proteine virali precoci, nucleari o del capsido virale, sulla presenza di linfocitosi. I linfociti atipici sono il segno più precoce dell'infezione da EBV. Gli anticorpi "eterofili" sono un ottimo marker; questi derivano dall'azione simil-mitogena

aspecifica dei linfociti B da parte di EBV, con ampia produzione di anticorpi. Questi anticorpi comprendono eterofili IgM che riconoscono l'antigene di Paul Bunnell negli eritrociti, e sono evidenziabili fin dalla prima settimana e permangono per mesi.

Si prevede che a breve si potranno rendere disponibili metodi per la misura della carica virale mediante ricerca del genoma con PCR.

Non è disponibile un vaccino, ma la distribuzione ubiquitaria e la distribuzione asintomatica ne rendono l'eliminazione difficile. L'infezione però determina immunità per tutta la vita, quindi una buona profilassi risulta quella di esporre il bambino nei primi anni di vita, poiché presenta un andamento benigno.

HHV6-HHV7-HHV8

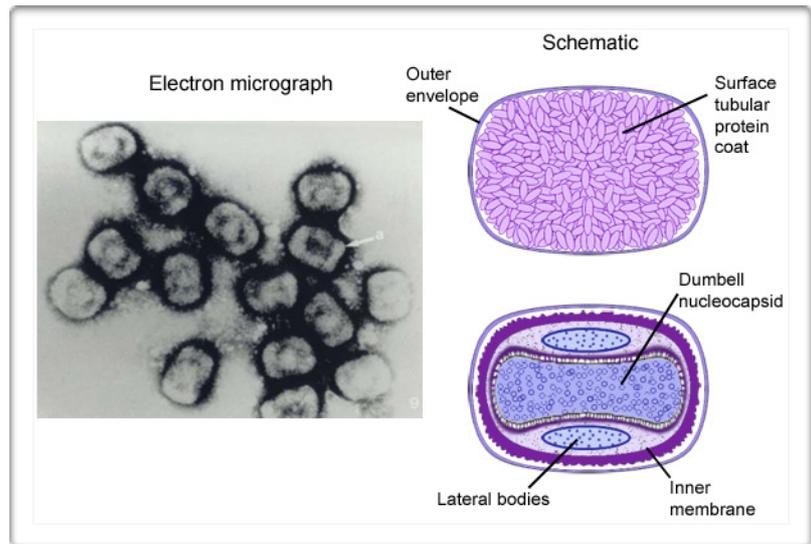
Il virus HHV6 è associato ad una patologia primaria nota, roseola, (**VI malattia**: una malattia esantemica con febbre, tipica dell'età infantile). L'HHV6 infetta e replica nei linfociti T. Recenti dati sembrano indicare un ruolo di HHV6 alla patogenesi di neoplasie linfoidi; la sua presenza è associata alla sclerosi multipla. L'HHV7 per ora non è associato a nessuna patologia nota, infetta in vivo linfociti T helper CD4+, ed in vitro anche i macrofagi in modo non produttivo. HHV6 e HHV7 sono ampiamente diffusi nella popolazione umana. L'HHV8 è associato con neoplasia frequente nell'AIDS (sarcoma di Kaposi). L'HHV8 sembra avere una distribuzione molto più limitata e trasmissione prevalentemente sessuale. E' un virus non coltivabile. Il genoma è trovato nel 100% dei pazienti in AIDS con sarcoma di Kaposi e nel 15% dei pazienti con AIDS senza sarcoma di Kaposi. Il virus viene isolato da PBMC e da cellule tumorali (KS). Il gene vGPCR (viral G-protein coupled receptor) di HHV8 provoca la sintesi di un fattore angiogenico (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) che è implicato nello sviluppo del KS. Inoltre HHV8 contiene molti altri geni correlati all'oncogenesi (come il gene K1). HHV8 causa anche linfomi; presenta delle caratteristiche in comune con EBV, come il tropismo per cellule epiteliali e linfociti B e lo stretto controllo immunologico, con problemi durante l'immunosoppressione.

Poxvirus

I *Poxvirus* comprendono i virus umani del vaiolo, del mollusco contagioso e alcuni virus animali che occasionalmente causano zoonosi. Molti di questi condividono determinanti antigenici con il virus del vaiolo e ciò ha reso possibile l'utilizzo dei *poxvirus* come vaccino per l'uomo.

Struttura e Replicazione: Sono i più grandi virus animali, con dimensioni di

230x300 nm, con una forma variabile da ovoidale a mattone. Hanno una membrana lipoproteica che riveste un core biconcavo fiancheggiato da due corpi laterali proteici. Le forme extracellulari hanno un'altra membrana lipoproteica; sia le forme extracellulari che intracellulari sono infettanti. Il genoma virale è composto da DNA lineare a doppio filamento di dimensioni notevoli, di 189mila paia di basi, con le estremità terminali che contengono sequenze palindromiche unite (legate covalentemente). Possiede più di 100 polipeptidi, alcuni dei quali sono glicosilati, come emoagglutinina. La replicazione dei *poxvirus* è peculiare tra i virus a DNA, in quanto si svolge interamente nel citoplasma della cellula ospite, quindi i *poxvirus* devono codificare gli enzimi necessari alla sintesi dell'RNA messaggero e del DNA e tutte le funzioni, che gli altri virus ottengono dalla cellula ospite. Sono gli unici virus a DNA che trasportano nei virioni il sistema enzimatico completo per la sintesi di RNA, capping e la metilazione degli RNA: RNA-polimerasi DNA-dipendente, una DNA-topoisomerasi e altri enzimi che catalizzano la sintesi di mRNA virali perfettamente funzionanti nel citoplasma cellulare. Dopo il legame (adsorbimento) a un recettore sulla superficie cellulare (EGF possibile recettore), osserviamo la penetrazione, mediata dalla fusione tra pericapside e membrana cellulare, poi un denudamento, con il core che viene liberato nel citoplasma e la liberazione del genoma ad opera di una proteasi virale. Dopo comincia la sintesi degli RNA e delle proteine precoci (RNA-polimerasi virale), segue poi la replicazione del DNA genomico, nel citoplasma e all'interno di inclusioni citoplasmatiche o corpi del Guernieri (visibili al m.o.), e l'inizio della sintesi può avvenire in qualsiasi punto del DNA. Ancora vediamo la sintesi degli RNA e delle proteine tardive (strutturali).



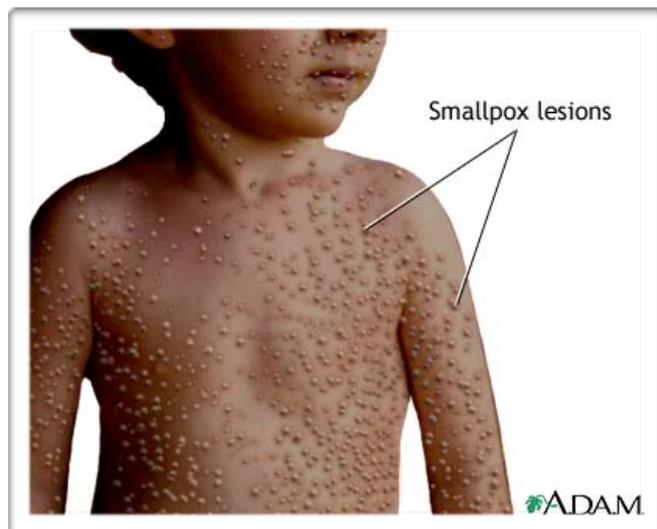
Ora viene la fase di Assemblaggio (nel citoplasma), le membrane si assemblano attorno alle inclusioni, maturazione da forme sferiche indifferenziate a forme mature con core e corpi laterali ed infine il virus viene liberato per escitosi o lisi cellulare. La replicazione dei *poxxvirus* determina un marcato effetto citopatico nella cellula ospite, accompagnato da alterazioni della permeabilità della membrana citoplasmatica e dall'inibizione delle sintesi macromolecolari cellulari. Viene sintetizzata una proteina, la cui attività mima l'azione dell'EGF, che stimola la proliferazione di cellule circostanti, aumentando il numero di cellule ricettive all'infezione. Inoltre sono ben visibili le inclusioni citoplasmatiche.

Patogenesi: Dopo essere stato inalato, il virus del vaiolo si replica nelle vie respiratorie superiori. Il virus è resistente all'ambiente esterno, viene trasmesso per aerosol o per contatto; si moltiplica nella mucosa del tratto respiratorio superiore e viene trasmesso dai macrofagi infettati nei linfonodi regionali, in fase viremica raggiunge gli organi interni, fegato, milza e polmoni, dove si moltiplica; alla fine di questo periodo di incubazione si ha una seconda viremia: il virus veicolato dai macrofagi infetta lo strato basale dell'epidermide con comparsa di eruzione cutanea con necrosi, ed edema a livello delle vescicole. L'alta mortalità è dovuta alla tossicità generale causata dall'invasione massiva anche degli organi interni. Il mollusco contagioso e gli altri *poxxvirus* vengono assunti per contatto e non diffondono. L'immunità cellulo-mediata è fondamentale per risolvere l'infezione da *poxxvirus*, ma questi codificano proteine che eludono il sistema immunitario, ostacolando le risposte protettive dell'IFN, del complemento, degli anticorpi e della risposta infiammatoria, oltre a diffondere da cellula a cellula per eludere gli anticorpi.

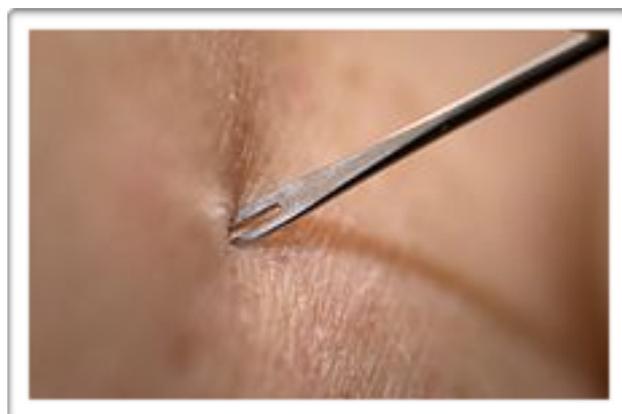
Epidemiologia: il vaiolo e mollusco contagioso sono strettamente umani. Il vaiolo era estremamente contagioso, caratterizzata da manifestazione esantematica, e nel passato era uno dei più importanti patogeni umani. Verso la fine del 1700 Jenner dimostrò che soggetti immunizzati con virus del vaiolo bovino (vaccino) erano resistenti al vaiolo umano. Nel 1958 l'OMS lancia la campagna di eradicazione globale e l'ultimo caso endemico fu nel 1977 in Somalia, mentre gli ultimi due casi in assoluto furono per colpa di un incidente di laboratorio in Inghilterra nel 1978. Il vaiolo umano è stato completamente debellato dopo l'intensa campagna di vaccinazione e grazie alla presenza di **un solo sierotipo**, al **tropismo esclusivamente umano** e alla **mancanza di portatori sani** (in caso di guarigione il virus viene espulso dall'organismo).

Sindromi cliniche:

- **Virus del vaiolo:** Esistevano due varianti del vaiolo: il vaiolo maggiore o **variola major** con una mortalità pari al 15-30%, e il vaiolo minore o **variola minor**, con una mortalità dell'1%. Il vaiolo iniziava con un'infezione delle vie respiratorie, cui seguiva il coinvolgimento dei linfonodi locali, che portava a viremia. Il periodo di incubazione era di 5-17 giorni, dopo il quale la persona contagiata presentava febbre alta, forte cefalea, mal di schiena e malessere, seguiti da un'eruzione vescicolare in bocca e poi su tutto il corpo, associato anche a vomito, diarrea e sanguinamento. La diagnosi del vaiolo era clinica, ma la conferma si otteneva mediante crescita del virus in uova embrionate, con classica lesione sulla membrana corion-allantoidea. E' stata la prima malattia controllata mediante immunizzazione e la sua eradicazione è uno dei maggiori successi dell'epidemiologia medica. Quando il programma di immunizzazione si avvicinò al suo obiettivo, fu chiaro che era più grande il rischio di reazioni al vaccino, rispetto il pericolo del vaiolo stesso, quindi nel 1980 venne praticato l'uso di questo vaccino. Il **cidofovir** è capace di inibire la DNA polimerasi del virus, ed è efficace e approvato per il trattamento delle infezioni da *poxvirus*.



- **Vaccino e malattia vaccino-correlata:** Il virus vaccinico è quello che veniva utilizzato per la vaccinazione antivaiolosa. Era un derivato del vaiolo bovino. Veniva inoculato il virus vivo nel paziente, mediante scarificazione della cute con ago biforcuto, per poi osservare, a conferma dell'immunizzazione avvenuta, la comparsa di vescicole e pustole. Però si verificavano più reazioni al vaccino nelle fasi finali dell'eradicazione del vaiolo, quali encefaliti e necrosi vaccinica (pazienti immunocompromessi), che fecero pensare ad un'interruzione di tale pratica.



- **Orf, virus del vaiolo bovino e virus del vaiolo della scimmia:**

L'infezione da *poxvirus orf* (pecora e capra) o *poxvirus* dei bovini (virus vaccinico), deriva dal contatto lavorativo diretto con le lesioni dell'animale. Compare una singola lesione nodulare sul punto di contatto, che può essere granulomatosa (capra e pecora) o emorragica (mucca). Queste lesioni regrediscono in 25-35 giorni, senza formazioni di croste, e la diagnosi si basa sulla manifestazione clinica e la storia del paziente. Per quanto riguarda il virus del vaiolo della scimmia, tranne che per un focolaio nell'Illinois, Indiana e Wisconsin nel 2003, tutti i casi si manifestano in Africa occidentale e centrale, ma soprattutto nello Zaire. Il virus della scimmia provoca una versione più blanda, con esantema simil-pustoloso.



Figure 11: Umbilicated lesion and presence of inflammation in the unguis folds.

- **Virus del mollusco contagioso:** E' un'infezione benigna localizzata e superficiale che si manifesta come tumoretti della pelle localizzati in varie parti del corpo (piedi, mani, regione anale e genitale). Hanno un'evoluzione in 6-9 mesi con risoluzione spontanea. Si contrae per contatto diretto o tramite le secrezioni. La trasmissione è anche sessuale. Le lesioni provocate dal mollusco contagioso differiscono notevolmente da quelle del vaiolo, in quanto sono nodulari, simili a verruche. Inizialmente hanno l'aspetto di papule, poi diventano noduli perlacei, ombelicati, con un diametro di 2-10 mm e presentano un tappo centrale caseoso, che può essere eliminato schiacciandolo. Si trovano su busto, tronco e genitali, in gruppi di 5-20 noduli. La patologia è più frequente nei bambini che negli adulti, ma la sua incidenza aumenta negli individui sessualmente attivi. La diagnosi è sintomatica, ma può essere confermata in laboratorio grazie alle caratteristiche estese inclusioni citoplasmatiche eosinofile (corpi del mollusco) nelle cellule epiteliali. Le lesioni vengono rimosse mediante crioterapia o raschiamento (scraping).



Parvovirus

La famiglia dei *Parvoviridae* comprende 3 generi: i *Parvovirus* (virus B19), *Densovirus* (insetti) e i *Dependovirus* (virus satelliti, adeno/herpes-associati).

Il virus B19 è un eritrovirus ed è l'unico che infetta la specie umana. Tutti i *parvovirus* sono specie-specifici.

I *parvovirus* sono estremamente piccoli (18-26 nm di diametro) e possiedono un capsido icosaedrico, privo di pericapside. Sono virus nudi, con un genoma a DNA a singola elica, che è bicatenario solo alle estremità per la presenza di sequenze palindromiche. Il genoma a DNA è lineare a singolo filamento ed è caratteristica la forma a forcina per ripiegamento di sequenze complementari alle estremità. Ci sono conoscenze limitate per il ciclo replicativo di questo virus, comunque si lega all'eritrocita tramite il recettore Ag P (globoside) che riconosce la parte glucidica dell'antirecettore virale, poi penetra, trasloca nel nucleo, dove viene trascritto e vengono tradotte le proteine, poi viene montato nel nucleo. La sintesi di DNA avviene solo nella fase S del ciclo cellulare e prevede una fase a DNA a doppio filamento. I virioni di progenie possono quindi possedere DNA a polarità positiva e a polarità negativa. Successivamente segue lisi cellulare e liberazione dei virioni maturi.

Il genoma codifica per NPS o proteine non strutturali, che inducono l'apoptosi legandosi al DNA della cellula infetta, poi codifica per VP1 e VP2, proteine strutturali del capsido (codificate da orf), che migrano nel nucleo dove avviene l'assemblaggio del virione ed infine VP3 una proteina strutturale.

La trasmissione di questo virus avviene attraverso le secrezioni respiratorie e per via parenterale (trasfusioni di sangue). I bersagli di questo virus sono i precursori eritroidi, quindi la malattia da B19 è dovuta a morte di queste cellule causata dal virus e alla conseguente risposta immunitaria contro l'infezione (esantema e artralgia). Dopo la trasmissione segue la fase viremica al midollo osseo e ad altri siti, dove si replica uccidendo i precursori delle cellule eritroidi, con sintomi modesti (febbre, mialgia, malessere e prurito), con la scomparsa degli elementi eritroidi dal midollo osseo. Dopo circa 17 giorni si verifica l'esantema (con andamento bifasico, prima la faccia e poi il corpo), con direzione centripeta. Si osserva anemia lieve, asintomatica e autolimitante. L'infezione può assumere notevole rilevanza clinica nei soggetti immunocompromessi. **Crisi aplastiche** transitorie sono frequenti nei soggetti con anemia falciforme, risultato della combinazione tra deplezione dei precursori

eritroidi e la diminuzione della vita media degli eritrociti causata dall'anemia cronica. Anemia eritrocitica nei soggetti con AIDS.

Alcuni studi recenti hanno dimostrato che B19 può scatenare fenomeni autoimmunitari, con coinvolgimento (forse) nell'artrite reumatoide. L'infezione fetale compromette la funzionalità cardiaca, vasculite dei villi della placenta e idrope fetale. Rischio di trasmissione verticale è del 33% ed il rischio di morte nel feto è del 10%.

B19 è l'agente eziologico dell'**eritema infettivo**, o quinta malattia. Comincia con un periodo prodromico di 7-10 giorni, in cui l'individuo è contagioso. L'infezione in un soggetto sano è inapparente, o causa febbre e sintomi aspecifici; successivamente compare una caratteristica eruzione sulle guance, che sembrano essere state schiaffeggiate. L'esantema diffonde soprattutto alle zone di cute esposta, come braccia e gambe, e scompare in 1 o 2 settimane.



B19 negli adulti causa poliartrite, per settimane o mesi, con artrite a mani, polsi, ginocchia e caviglie; l'esantema può esserci o non esserci e può precedere l'artrite, ma spesso non c'è.

Diagnosi: in genere per l'eritema infettivo è clinica, ma possono essere individuate IgM specifiche, oppure DNA virale. Non è utilizzabile l'isolamento del virus.

Trattamento: Non esiste un trattamento antivirale specifico, non esiste un vaccino. Fortunatamente nella stragrande maggioranza dei casi l'infezione è assolutamente benigna.

Picornavirus

I *Picornaviridae* comprendono 5 generi, che sono:

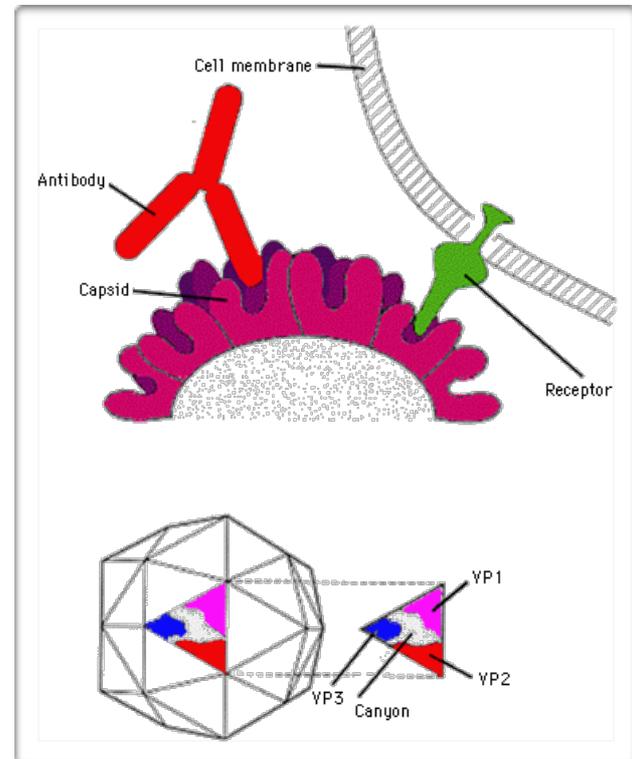
- 1) **Enterovirus:** *Poliovirus*, *Coxsackievirus* ed *Echovirus*
- 2) **Cardiovirus:** *Mengovirus*
- 3) **Rhinovirus:** *Rhinovirus*
- 4) **Aphovirus:** FMDV-C
- 5) **Hepatovirus:** Virus dell'epatite A (capitolo a parte)

I *Picornavirus* sono virus nudi con capside icosaedrico di 22-30 nm con RNA a singolo filamento a polarità positiva. Il capside icosaedrico è formato da 60 capsomeri identici, dove ognuno è costituito da 3 polipeptidi, VP1, VP2 e VP3, che in gruppi di 5 capsomeri costituiscono i 12 vertici. All'interno del capside è associata un'altra proteina, VP4. I capsidi resistono bene a condizioni ambientali difficili (sistemi fognari) e a quelle del tratto gastrointestinale, caratteristiche che facilitano la loro trasmissione per via feco-orale, stabili a calore e detergenti, e anche agli ambienti acidi eccezion per i *rhinovirus*.

Il genoma dei *picornavirus* è simile ad un mRNA; è un singolo filamento di RNA a polarità positiva, che presenta una sequenza poli A all'estremità 3' e una proteina VPg (proteina associata al genoma) legata all'estremità 5'. La poli A aumenta l'infettività dell'RNA, mentre la proteina associata al genoma è importante per l'incorporazione del genoma nel capside e per l'inizio della sintesi di RNA virale, più in generale nella replicazione. Il genoma codifica inoltre una RNA polimerasi RNA-dipendente ed una proteasi. Il poliovirus produce una proteasi che taglia proteine di 200mila Dalton che si trovano sui ribosomi eucariotici, bloccando così la traduzione della maggior parte degli mRNA cellulari.

L'mRNA virale ha alta affinità per l'apparato di sintesi proteica. Spiazza rapidamente gli mRNA cellulari dai siti di sintesi proteica, causando una drastica interruzione (shut-off) delle biosintesi cellulari, seguito da un vigoroso effetto citopatico. Il montaggio delle particelle virali ha luogo nel citoplasma. La liberazione delle particelle neoformate avviene per lisi delle cellule. Non tutte le particelle neoformate sono infettive, spesso sono presenti particelle difettive interferenti.

Le proteine VP1 ai vertici del virione formano una struttura a "canyon", alla quale si lega il recettore (il canyon è un bersaglio di farmaci antivirali che alterano la sua conformazione). I recettori sono differenti per le varie classi di *picornavirus*, infatti vediamo che per l'80% dei *rhinovirus* e per una parte dei *coxsackie*, il recettore è la molecola di adesione intercellulare 1 o ICAM1; per alcuni *coxsackie*, per *echovirus* e altri *enterovirus* il recettore è il fattore di accelerazione della degradazione CD55; il *poliovirus* si lega alla molecola PVR/CD155



presente su molte cellule umane di vario tipo. Col legame al recettore, la proteina VP4 viene rilasciata e il genoma viene introdotto attraverso un canale di membrana creato ad uno dei vertici del virione dalla proteina VP1. Il genoma si lega direttamente ai ribosomi, che riconoscono una particolare ansa di RNA nel genoma. Dopo 10-15 minuti dall'infezione viene sintetizzata una poliproteina contenente sequenze virali, che viene tagliata da una proteasi virale codificata nella stessa proteina (autoclivaggio), in tre regioni P1, P2 e P3. P3 genera due proteine, l'RNA polimerasi RNA-dipendente e la proteasi. Le proteasi virali a loro volta scindono la P1, con formazione delle proteine strutturali. Nelle vescicole citoplasmatiche avviene la sintesi di RNA. L'RNA polimerasi forma eliche complementari, produce uno stampo RNA a polarità negativa dal quale può essere generato il nuovo mRNA/genoma. Quando il genoma viene replicato e tradotto, le proteine strutturali VP0, VP1, e VP3 sono tagliate e assemblate in subunità. 5 subunità si associano in pentameri e 12 di questi aggregati di 5 subunità formano un pro-capside. Dopo l'acquisizione del genoma, VP0 è tagliata in VP2 e VP4 per completare il capside. In 3-4 ore si compie l'intero processo moltiplicativo, dove 1000-10000 particelle virali si liberano insieme per lisi o scoppio cellulare.

Enterovirus

Normalmente questi non causano malattie enteriche, ma si moltiplicano nel tratto intestinale e sono trasmessi per via feco-orale. La parte superiore del tratto respiratorio, l'orofaringe ed il tratto intestinale costituiscono le vie di ingresso degli enterovirus. I virioni sono resistenti all'acidità di stomaco, alle proteasi e alla bile. La

replicazione virale comincia nella mucosa e nel tessuto linfoide delle tonsille e della faringe, e successivamente il virus infetta le cellule linfoide delle placche di Peyer. La viremia primaria diffonde il virus ai tessuti bersaglio, che esprimono i recettori, comprese le cellule reticolo endoteliali di linfonodi, milza, fegato, dove può verificarsi una seconda fase dell'infezione virale, che porta a viremia secondaria e comparsa dei sintomi. Finora sono stati isolati circa 70 sierotipi che vengono classificati secondo il vecchio criterio tradizionale in **Poliovirus**, virus della polmonite, con 3 sierotipi, poi **Coxsackievirus**, di tipo A con 23 sierotipi e di tipo B con 6, ed infine **Echovirus** con 32 sierotipi.

Nel caso del *poliovirus*, questo accede all'encefalo infettando il muscolo scheletrico, e viaggiando lungo i nervi afferenti all'encefalo. E' un virus citolitico per i motoneuroni delle corna anteriori e del tronco encefalico. La localizzazione e il numero dei neuroni distrutti dal virus determinano l'estensione della paralisi. La perdita combinata di neuroni a causa di poliomielite ed età avanzata può causare sindrome post-poliomielitica, una paralisi tardiva.

Gli anticorpi rappresentano la risposta protettiva principale nei confronti degli *enterovirus*. Quelli secretori prevengono l'infezione nell'orofaringe e nel tratto GI, mentre gli anticorpi sierici prevengono la diffusione viremica, la malattia. L'immunità cellulo-mediata non è coinvolta normalmente nella protezione.

Gli *enterovirus* sono patogeni esclusivamente per l'uomo. Si diffondono per via feco-orale. L'eliminazione asintomatica dura più di un mese e introduce il virus nell'ambiente. Scarsa igiene e sovraffollamento facilitano la trasmissione, quindi scuole e asili sono a rischio.

- **Poliovirus:** è altamente infettante e patogeno, tropismo selettivo del SNC e meningi. I *poliovirus* sono 3, distinti antigenicamente. L'uomo è il solo ospite naturale di questi virus. La trasmissione avviene per via feco-orale, e questo si moltiplica nelle linfoghiandole della mucosa faringea e dell'intestino, e soprattutto a livello delle placche di Peyer. Intorno all'1% degli individui può aversi una viremia. In 5-6 giorni può portare all'infezione del SNC con lesioni nelle corna anteriori del midollo spinale, bulbo (esito infausto) e corteccia. Il virus, nella fase viremica, infetta neuroni motori, si moltiplica in essi e li distrugge. Può esitare in una patologia più complessa che coinvolge il bulbo. Per via del successo dei vaccini antipolio, le infezioni da *poliovirus* selvaggio sono rare. Il *poliovirus* può causare 4 diversi esiti:

- 1) **Malattia asintomatica** se limitata a orofaringe e intestino (90%)
- 2) **Poliomielite abortiva**, malattia **minore**, febbrile, non specifica (febbre, cefalea, malessere, mal di gola e vomito), nel 5%
- 3) **Poliomielite non paralitica**, o **meningite asettica**, nell' 1-2% dei pazienti infettati da *poliovirus*, raggiunge meningi e SNC, con spasmi e dolori muscolari
- 4) **Poliomielite paralitica**, o malattia **maggiore**, nello 0,1% degli infetti, compare dopo che la malattia minore è cessata, diffondendosi dal sangue alle cellule delle corna anteriori del midollo spinale e della corteccia motoria dell'encefalo, ed in queste sedi infetta i neuroni motori, moltiplicandosi in essi e distruggendoli; la gravità della paralisi è determinata dall'estensione. La paralisi bulbare può coinvolgere una combinazione di nervi cranici e anche i centri respiratori midollari. E' caratterizzata da una paralisi flaccida, dei vari distretti del corpo senza perdita delle capacità sensoriali.

La sindrome post-poliomielitica è un postumo della poliomielite, come già detto, che può verificarsi durante la vita, tardivamente, 30-40 anni dopo; il *poliovirus* non è presente, ma la sindrome è dovuta a perdita dei neuroni nei nervi originariamente affetti.

Esistono due tipi di vaccino per il *poliovirus*, un **vaccino antipolio inattivato (IPV)**, sviluppato da Jonas Salk, ed un **vaccino orale vivo attenuato (OPV)**, da Albert Sabin. Entrambi proteggono contro i tre tipi di *poliovirus*, sono stabili, economici e inducono una risposta protettiva. Salk dimostrò che tutti e tre i tipi di *poliovirus* prodotti in colture di cellule e purificati, possono essere inattivati trattandoli con formalina al 0,4%, a pH 7 e a 37°C per una settimana, senza che essi perdano la loro antigenicità. E' virus inattivato, somministrato per via intramuscolare, con 5 richiami, ma è un'immunità non permanente IgG, IgM; quindi è stato sostituito dall'OPV. Per il vaccino di Sabin, i tre virus sono stati coltivati in colture cellulari attraverso molteplici e successivi passaggi, tali ceppi hanno perduto il loro neurotropismo (non provocano paralisi) quando inoculati in scimmie suscettibili per via parenterale e per via intracerebrale. E' un virus attenuato, somministrazione orale e da un'immunità permanente, IgM, IgG ed IgA, ma esiste una remota possibilità che il vaccino possa ritornare alla sua forma virulenta.

- **Coxsackievirus:** sono così chiamati perché il primo della serie è stato isolato in topino neonato, da feci di bambini provenienti dalla omonima cittadina nel New Jersey. In base all'antigenicità e alla sintomatologia in topino neonato, si distinguono 23 sierotipi di virus di gruppo A e 6 di gruppo B.

I virus di gruppo **A** sono collegati alle seguenti malattie:

- 1) Erpangina, caratterizzata da febbre, mal di gola, difficoltà nella deglutizione e vomito, con lesioni ulcerate attorno a palato molle. La malattia è autolimitante.
- 2) Malattia mani-piedi-bocca, un esantema vescicolare, con lesioni vescicolari a mani, piedi, bocca e lingua, regredisce in alcuni giorni.
- 3) Angina erpetiforme
- 4) Meningite asettica benigna

I virus di gruppo **B** sono gli agenti di:

- 1) Pleurodinia o mialgia epidemica, patologia acuta con improvviso attacco febbrile, dolore toracico di tipo pleuritico e dolori a basso ventre. Persiste per 4 giorni.
- 2) Miocardite nel neonato
- 3) Pericardite

Per la diagnosi, in sierologia, si nota un aumento di 4 volte il titolo anticorpale di anticorpi neutralizzanti. Non esistono vaccini per *Coxsackievirus*.

- **Echovirus:** I virus echo, isolati dalle feci, in colture di cellule e all'atto dell'isolamento non chiaramente associati a malattie (echo= enteric cytopathic human orphan) sono 32 sierotipi e sono associati a diverse malattie: localizzate (congiuntivite) e sistemiche.

Possono causare:

- 1) Congiuntivite emorragica
- 2) Meningite asettica benigna
- 3) Malattie respiratorie acute minori
- 4) Febbre estiva infantile
- 5) Miocardite

Non sono presenti vaccini.

Rhinovirus

Sono gli agenti delle malattie acute afebrili delle vie aeree superiori (raffreddori comuni). Caratteristiche di questi sono, la moltiplicazione a livello del tratto respiratorio superiore, molto sensibili a pH acido, temperatura ottimale a 33°C e quindi la crescita è inibita a 37°C corporea. Sono stati isolati finora 115 sierotipi, per cui uno stesso individuo può essere soggetto a più raffreddori l'anno.

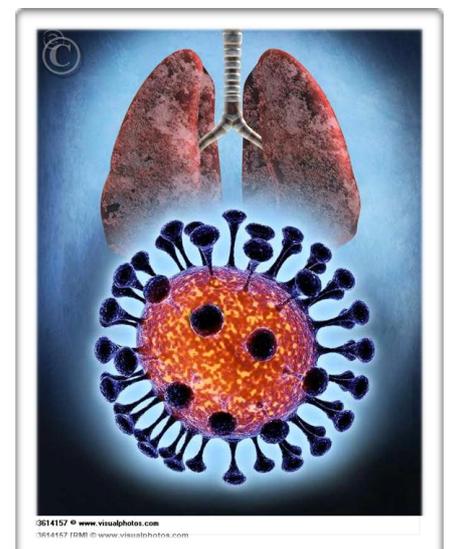
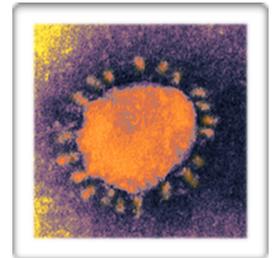
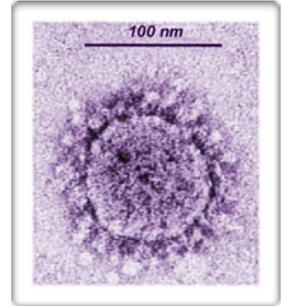
I recettori sono ICAM-1. Il virus entra dal naso, bocca e occhi e inizia ad infettare il tratto respiratorio superiore, compresa gola. La replicazione avviene principalmente nel naso. Le cellule infettate secernono bradichina e istamina, con naso che cola. L'IFN contribuisce alla sintomatologia. La malattia raggiunge il picco in 3-4 giorni, ma la tosse e i sintomi nasali possono persistere per 7-10 giorni o più. La sindrome è caratteristica, quindi la diagnosi di laboratorio non è necessaria. Esistono molti rimedi per il raffreddore, e l'uso di vasocostrittori può essere di sollievo. L'inalazione di aria calda e umidificata, e persino il vapore della minestra di pollo calda possono realmente essere d'aiuto, aumentando il drenaggio nasale. Nessun farmaco antivirale è utile.

Coronavirus

Così chiamati perché al m.e. i loro virioni assumono l'aspetto di una corona solare. Sono la seconda principale causa dei raffreddori, secondi ai *rhinovirus*. Nel 2002 hanno causato un'epidemia nel Sud della Cina, la SARS.

Sono dei virus provvisti di pericapside con il più lungo genoma a RNA a polarità positiva. Le glicoproteine presenti sulla superficie del pericapside appaiono come proiezioni che sembrano una corona intorno al virus. Questa corona permette a questi virus, a differenza di altri virus con pericapside, di resistere al tratto GI e di diffondersi per via fecale-orale. Il genoma RNA (+) si associa alla proteina N per formare un nucleocapside elicoidale. I virioni contengono le glicoproteine E1, E2 ed N. E2 favorisce l'attacco del virus e la fusione con la membrana cellulare, ed è il bersaglio degli anticorpi, mentre E1 è una proteina transmembrana. Quindi il virus aderisce alla cellula bersaglio tramite E2, ed il genoma è riversato nel citoplasma. La sintesi proteica avviene in due fasi, precoce e tardiva, come per i *togavirus*. Il genoma si lega ai ribosomi e viene tradotta una RNA polimerasi RNA-dipendente o L. Questa usa lo stampo di RNA per replicare nuovi genomi e produrre 5/7 mRNA per le singole proteine virali. La produzione dei singoli mRNA promuove la diversità genetica. Il genoma si associa alle membrane del reticolo endoplasmatico rugoso, modificate dalle proteine del virione (che sono state appena tradotte, e che si sono associate al REG) e gemma nel lume del REG. Le vescicole che contengono il virus migrano verso il Golgi prima, e verso la membrana cellulare poi, ed il virus viene rilasciato per esocitosi.

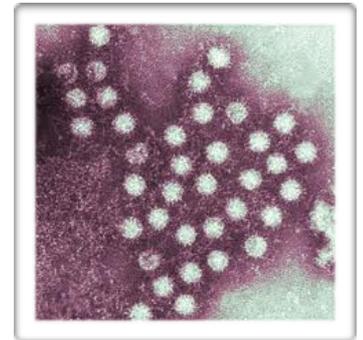
Infettano le cellule epiteliali, e l'infezione rimane localizzata nelle vie respiratorie superiori, perché c'è una temperatura ottimale per la loro crescita, 33-35°C; il virus viene trasmesso tramite aerosol e starnuti, causando raffreddori simili ai *rhinovirus*. L'infezione può però degenerare, causando patologia polmonare cronica, con asma e bronchite, e raramente polmonite. La SARS, o **grave sindrome respiratoria acuta**, è una forma di polmonite atipica, con febbre >38°C, brividi, cefalea, capogiri, malessere, mialgia, tosse o difficoltà respiratorie. Il



20% sviluppa diarrea e la mortalità arriva nel 10% dei casi. Viene trasmesso tramite goccioline respiratorie, presente però anche nel sudore, urine e feci. L'epidemia SARS cominciata nel Novembre 2002 nella Provincia del Guangong, nel Sud della Cina, fu portata fino ad Hong Kong da un medico che lavorava all'epidemia, e fu portata in Vietnam, a Toronto e altri luoghi. Il virus era un *coronavirus* identificato grazie a RT-PCR. L'OMS lanciò un allarme globale, sollecitando misure di contenimento per limitare la diffusione del virus. Non vengono normalmente effettuati test di laboratorio per le infezioni da SARS. L'indagine per i *coronavirus* è la rilevazione dell'RNA del genoma virale nei campioni fecali e respiratori attraverso RT-PCR, o reazione di retrotrascrizione seguita da reazione polimerasica a catena. Il controllo della trasmissione del raffreddore non è necessario, ma per limitare la diffusione del virus è necessaria la quarantena. Non sono disponibili vaccini.

Norovirus

Membri della famiglia dei *calcivirus* responsabili di gastroenteriti. Furono messi in evidenza al m.e. in feci di un'epidemia di gastroenterite a Norwalk, in Ohio. Somigliano ai *picornavirus*, il loro genoma a RNA (+) presenta VPg (proteina virale legata al genoma) e una sequenza poli A al 3'. Il genoma è in un capside nudo di 27 nm. I virioni sono piccoli e rotondi, con un contorno frastagliato. Questi virus si legano all'antigene del gruppo A,B e 0 presente sulla membrana cellulare. Si replicano come i *picornavirus*, eccetto che per un mRNA precoce ed uno tardivo; l'mRNA precoce codifica una poliproteina che contiene l'RNA polimerasi e altri enzimi, mentre quello tardivo codifica le proteine capsidiche. 10 virioni sono sufficienti per causare patologia. Causano un danno all'orletto a spazzola dell'intestino e causa diarrea acquosa. L'agente di Norwalk causa epidemie di gastroenterite come risultato di una comune fonte di contagio, come acqua, molluschi e alimenti in generali, e si trasmettono per via feco-orale. La febbre può verificarsi o meno ed il periodo di incubazione è di 24-48h e la malattia si risolve in 12-60 ore senza problemi. Il genoma può essere identificato con RT-PCR. Non sono disponibili terapie specifiche, anche se il subsalicilato di bismuto può alleviare i sintomi gastrointestinali. Il virus di Norwalk è resistente al calore (60°C), al pH 3, a detergenti e cloro.



Paramyxovirus

La famiglia *Paramyxoviridae* comprende diversi generi, come *Morbillivirus*, *Paramyxovirus* e *Pneumovirus*, poi di minore importanza il recentemente scoperto

Metapneumovirus, il virus *Nipah* e virus *Hendra*. I

Paramyxovirus sono i virus parainfluenzali (1-4), il virus della malattia di Newcastle (aviaria) e il virus della parotite epidemica; i *Morbillivirus* sono il virus del morbillo ed alcuni virus animali (cimurro del cane, peste bovina); gli

Pneumovirus sono il virus respiratorio sinciziale umano ed alcuni virus animali

(bovino e topo). Questi virus differiscono tra loro ampiamente per quanto riguarda le patologie che determinano; in tutti i casi, le infezioni si acquisiscono per via respiratoria o per contatto diretto (saliva) e sono ampiamente diffuse in particolare nella prima infanzia.

I *Paramyxovirus* sono costituiti da RNA

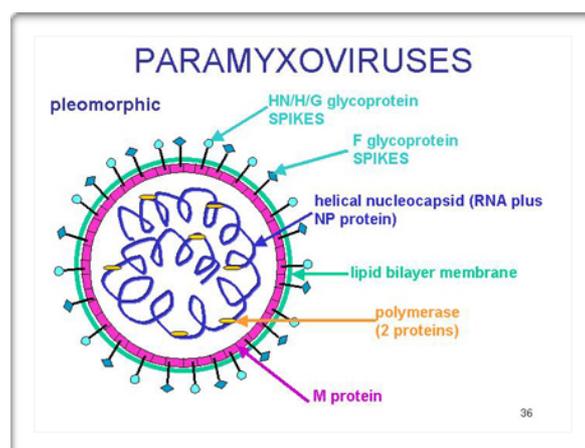
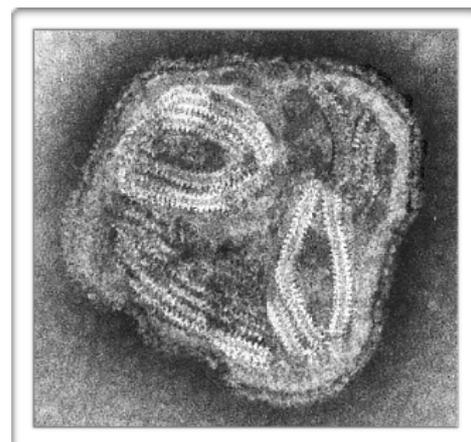
monocatenario a polarità negativa, racchiuso in un nucleocapside elicoidale, dotato di pericapside di 156-300 nm. Il nucleocapside è associato alla

nucleoproteina NP, alla fosfoproteina polimerasi P ed alla proteina grande L. La L è una RNA polimerasi, la P coopera alla sintesi dell'RNA e la proteina NP aiuta il mantenimento della struttura del genoma. Il nucleocapside è associato alla

proteina della matrice M, che riveste internamente

il pericapside. Il pericapside contiene due glicoproteine, una proteina di fusione F, che promuove la fusione tra le membrane del virus e la cellula ospite, ed una proteina di attacco (emoagglutinina-neuramminidasi HN, emoagglutinina H o proteina G). La F deve subire un taglio proteolitico prima di diventare attiva nel promuovere la fusione.

Il ciclo replicativo comincia con il legame di HN, H o G ai residui di acido sialico sui glicolipidi della cellula ospite. Il virus del morbillo può legarsi a CD64 (maggior parte delle cellule) e a CD150 SLAM, su linfociti T e B attivati. La prima protegge la cellula dal complemento, mentre la seconda regola le risposte Th1 e Th2. Successivamente F



promuove la fusione tra il pericapside e la membrana citoplasmatica. I *Paramyxovirus* possono indurre la fusione intercellulare, formando sincizi, cellule giganti multinucleate, mediante la quale azione possono eludere la risposta anticorpale. La RNA polimerasi viene portata all'interno della cellula come parte del nucleocapside. Dal genoma vengono così trascritti i singoli mRNA per ciascuna proteina e uno stampo di intera lunghezza a RNA positivo. La replicazione avviene nel citoplasma. I genomi neoformati si associano con le proteine L, N e NP per formare i nucleocapsidi, che, a loro volta, si associano alle proteine M inserite sulle membrane citoplasmatiche modificate dalle proteine virali. I virioni maturi lasciano la cellula per gemmazione.

Morbillivirus

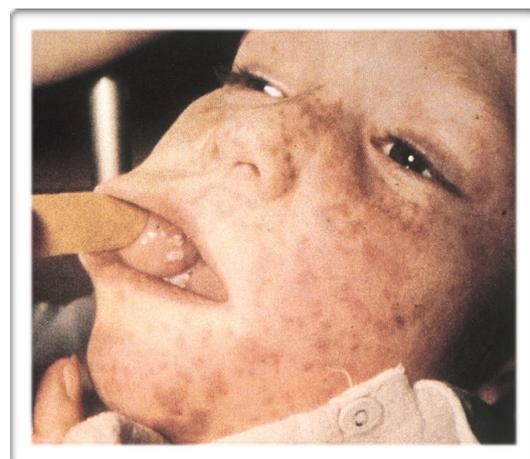
E' dotato di tutte le proteine ad attività enzimatica caratteristiche dei *Paramyxovirus* tranne quella neuramminidasi (N) e l'agglutinina ha una specificità di azione piuttosto ristretta. E' un virus patogeno solo per l'uomo. Il **morbillo** è uno dei cinque esantemi tipici dell'infanzia. E' nota la capacità di questo virus di indurre fusione cellulare, formando cellule giganti, passando da cellula a cellula, ed eludendo gli anticorpi. L'infezione causa lisi cellulare, causata dalle inclusioni citoplasmatiche di particelle virali, ma in cellule cerebrali umane possono instaurarsi infezioni persistenti senza lisi. Il morbillo è altamente contagioso, infatti quasi la totalità della popolazione tra gli 8 e i 12 anni possiede anticorpi contro questo virus. Il virus è trasmesso attraverso le vie respiratorie, per via linfatica raggiunge poi il sangue (viremia primaria) dove infetta le cellule del sistema reticolo endoteliale. Qui si replica efficacemente (viremia secondaria) e l'infezione si estende a tutta la mucosa respiratoria, inoltre arriva alla cute con comparsa delle tipiche eruzioni maculopapulari. L'ampia disseminazione del virus causa infezione di congiuntiva, vie respiratorie, vie urinarie, capillari sanguigni, sistema linfatico e SNC. Il caratteristico esantema maculopapulare del morbillo è dovuto ai linfociti T immuni che hanno come bersaglio le cellule endoteliali, infettate dal virus, che delimitano i piccoli vasi sanguigni. Nella maggior parte dei pazienti, all'esantema segue la guarigione e un'immunità che persiste per tutta la vita. Il virus può causare **encefalite** in tre modi differenti:



- 1) Infezione diretta dei neuroni
- 2) Encefalite post-infettiva
- 3) Panencefalite subacuta sclerosante SSPE

L'immunità cellulo-mediata è responsabile della maggior parte dei sintomi, ed è fondamentale nel controllare l'infezione. I bambini carenti di linfociti T, presentano una manifestazione atipica, caratterizzata da polmonite a cellule giganti in assenza di esantema. Il virus causa una riduzione degli eosinofili, dei linfociti B e T, attraverso infezione diretta di queste cellule, o favorendo uno scambio (switch) dalla risposta Th1 a Th2; vengono prodotte non più IFN- γ e IL-12, ma IL-4, 5, 10 e 13, che stimolano la differenziazione degli Th0 in Th2 (invece che Th1). Queste citochine riducono la capacità dell'ospite di produrre risposte cellulo-mediate e di tipo DTH; questo stato di immunosoppressione dura per una settimana, ma garantisce una protezione ad una nuova infezione per tutta la vita.

Il morbillo è una malattia febbrile grave, con un periodo di incubazione che dura da 10 a 14 giorni, seguito da una fase sintomatica in cui si può verificare febbre, congiuntivite, sindrome respiratoria, che rappresenta la fase più contagiosa, per finire con la formazione delle macchie di Koplic e l'eruzione maculo-papulare. Le macchie sono sulla mucosa buccale, attorno ai molari, ma anche in altre mucose, quali la vagina; queste permangono per uno o due giorni e sono in genere piccole, somiglianti a grani di sale circondati da un alone rosso. La comparsa di questi segni assieme agli altri sintomi possono far diagnosticare con certezza il morbillo. Dopo un giorno compare l'esantema, molto esteso e le lesioni spesso diventano confluenti, che ricopre tutto il corpo in due giorni. Le più comuni complicanze si riscontrano a livello dell'apparato respiratorio (polmoniti) e del SNC (encefalite acuta), ma tra le più gravi complicanze del morbillo si riscontra la panencefalite subacuta sclerosante SSPE, che colpisce soggetti (verso il settimo anno d'età) che avevano contratto il virus in passato, entro pochi anni la malattia porta inevitabilmente al decesso; questa complicanza si verifica perché il virus persiste nel cervello e si comporta come un virus lento, che può replicarsi e diffondersi, ma non viene rilasciato.



Nei casi normali l'analisi di laboratorio non è necessaria al fine della diagnosi, mentre lo è nel caso di infezioni atipiche e nei soggetti immunocompromessi. L'antigene virale può essere rivelato tramite immunofluorescenza e il genoma grazie a RT-PCR.

Il vaccino è costituito da virus vivente attenuato (77 passaggi seriali, a 32°C, in colture di fibroblasti di embrione di pollo). Unica dose parenterale (protezione almeno per 15 anni). Prima esisteva un vaccino con virus inattivato, che induceva anticorpi solo anti HN e non anti F. Ancora non esiste una terapia specifica.

Virus Parainfluenzali

Sono virus respiratori che causano solitamente sintomi lievi, simili al raffreddore, ma che possono essere responsabili di malattie a carico delle prime vie respiratorie, con un breve periodo di incubazione. Sono soprattutto malattie dell'infanzia.

Comprendono 4 sierotipi patogeni per l'uomo. I virus del tipo 1, 2 e 3 provocano nella gran parte dei casi una laringo-tracheo-bronchite (croup) e sono gli agenti che danno le forme più gravi, soprattutto nei bambini che si infettano per la prima volta; la forma 4 provoca una lieve infezione respiratoria. Non provocano mai estese manifestazioni epidemiche. Nei neonati possono causare bronchiolite, polmonite più facilmente. Il "croup" provoca ingrossamento della parte inferiore della glottide, che può ostruire le vie respiratorie. Sono dotati di attività emoagglutinante, possiedono neuramminidasi e hanno attività emolitica. Possono essere isolati dal gargarizzato o dal tampone faringeo, mediante colture in cavità amniotica di embrioni di pollo; possono essere coltivati in membrana allantoidea di embrione di pollo. Crescono bene su linee cellulari umane e le aree citopatiche possono essere messe in evidenza con l'adsorbimento delle emazie o con immunofluorescenza. L'identificazione si può fare mediante inibizione dell'adsorbimento con sieri standard, oppure con l'immunofluorescenza. Sono distribuiti in tutto il mondo, frequentemente danno epidemie, per trasmissione interpersonale; si ripetono tutta la vita. Esistono vaccini preparati con virus inattivati con formalina, che però non hanno ancora completato la sperimentazione clinica.

Virus della Parotite

È l'agente eziologico della **parotite** epidemica, una malattia caratteristica dell'infanzia che si presenta clinicamente con l'ingrossamento molto evidente delle ghiandole parotidi che conferiscono al malato un aspetto caratteristico (orecchioni). È una patologia molto contagiosa, che infetta solamente l'uomo. È presente un solo

sierotipo, che causa un'infezione litica delle cellule. Il virus penetra nel naso e nella bocca con aerosol salivare e si moltiplica nelle prime vie respiratorie. Inizialmente infetta l'epitelio delle vie respiratorie superiori e infetta poi la parotide. Il virus si diffonde per viremia nell'organismo, a testicoli, ovaie, pancreas, tiroide e altri organi. L'affezione si presenta con febbre e va a guarigione spontaneamente. La malattia si manifesta dopo 16-18 giorni dall'esposizione. La complicanza più comune è l'orchite che può verificarsi 4-5 giorni dopo la manifestazione della malattia, con una più alta incidenza negli adulti. Altra complicanza può essere la meningite con prognosi benigna e, in rari casi, una meningoencefalite. C'è variabilità nelle sue manifestazioni cliniche, infatti il 50% degli infetti non sviluppa una malattia. Il virus cresce bene in embrioni di pollo. La diagnosi clinica è in genere assai facile e la ricerca del virus può avere significato solo per chiarire eventuali complicazioni. Il virus può essere isolato dalla saliva nella cavità amniotica di embrioni di pollo; oppure in colture cellulari di mammifero. Nelle colture infette la comparsa del virus può essere dimostrata mediante emoadsorbimento. Si riscontra raramente nei paesi in cui è in uso il vaccino a virus vivo, somministrato insieme ai vaccini vivi per morbillo e rosolia. Esiste infatti un vaccino con ceppo virale attenuato isolato in embrione di pollo. Consigliato per adolescenti o adulti.



Virus respiratorio Sinciziale (RSV)

Manca dell'attività neuraminidasica ed emoagglutinante caratteristica del *paramyxovirus*. Tutti gli isolati possono essere divisi in due gruppi fondamentali in base al genotipo: A e B che differiscono tra loro per la proteina G. Solo l'uomo e lo scimpanzé vengono infettati naturalmente. L'effetto citopatico indotto nelle colture sensibili è piuttosto caratteristico e vede la formazione di sincizi. Viene trasmesso attraverso le secrezioni respiratorie, infetta l'epitelio dell'apparato respiratorio (dove si replica abbondantemente) e di solito rimane localizzato. Le principali vie d'ingresso sono il naso e gli occhi e anche per questo sono particolarmente colpiti i bambini molto piccoli che ancora utilizzano l'immunità materna, le IgG sieriche non sembrano raggiungere adeguatamente questi tratti. Il meccanismo patogenetico sembra essere dovuto alla distruzione delle cellule epiteliali a causa della replicazione

virale con conseguente edema, afflusso di linfociti e macrofagi, e secrezione di muco, nonché dalla risposta del sistema immunitario. Si può quindi concludere che il danno causato dall'infezione da RSV possa essere di natura immunopatologica. Le sintomatologie associate possono variare da polmoniti e bronchioliti a semplici affezioni respiratorie. Negli adulti l'infezione può essere totalmente asintomatica, mentre può essere anche fatale nei neonati; è la principale causa di infezioni acute fatali delle vie respiratorie nei neonati e nei bambini piccoli. L'immunità non è duratura. L'infezione è abbastanza contagiosa (avviene nei primi anni di vita), il periodo di incubazione è di circa 4 giorni e la contagiosità può durare dai 5 ai 21 giorni. Gli episodi epidemici interessano soprattutto i lattanti e i bambini. L'analisi può essere confermata con l'isolamento virale. Vaccini costituiti da proteine virali modificate sono in via di sperimentazione.

Metapneumovirus dell'uomo

Recentemente scoperto del genere *Pneumovirus*, viene utilizzata RT-PCR per individuarne il genoma e distinguerlo dagli altri virus. E' ubiquitario e causa infezioni asintomatiche, ma anche raffreddore comune, bronchiolite e polmonite nei casi più gravi. Possono essere associate tosse, rinorrea e febbre alta. Le cure sono supportive.

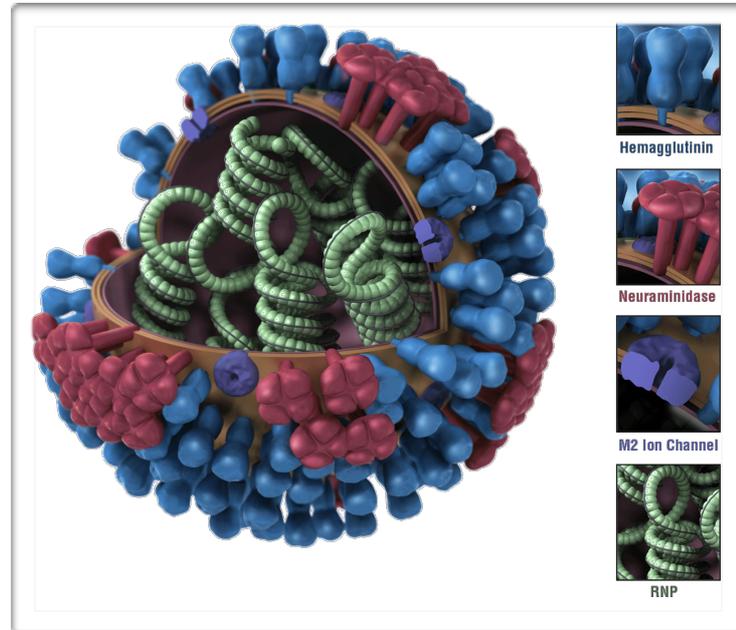
Virus Nipah e Virus Hendra

Nel 1998 un'epidemia del virus *Nipah* colpì Malaysia e Singapore; correlato al virus *Hendra*, in Australia. Hanno un ampio spettro di ospiti, di cui l'uomo è accidentale. Il serbatoio del *Nipah* è un pipistrello o volpe volante. Le manifestazioni sono gravi, con shock e coma ed un tasso di mortalità elevato.

Orthomyxovirus

Gli unici membri di questa famiglia sono i **virus dell'influenza A, B e C**, ma solamente A e B causano malattie rilevanti. Il genoma è costituito da RNA segmentato a polarità negativa.

I virioni dell'influenza sono di forma sferica o tubulare e con un diametro tra 80 e 120 nm. Il pericapside contiene due glicoproteine molto importanti, l'**emoagglutinina HA** e la **neuraminidasi NA**, poi la proteina di membrana M2 ed è delimitato internamente dalla proteina della matrice M1. Il genoma dell'influenza A e B è formato da 8 diversi segmenti nucleocapsidici elicoidali, ognuno contenente RNA a polarità negativa associato con la nucleoproteina NP e la trascrittasi (componenti della RNA polimerasi: PB1, PB2 e PA). Il virus dell'influenza C ne possiede 7. L'RNA genomico del virus influenzale è a polarità negativa e pertanto non infettante. Una RNA polimerasi RNA-dipendente, strettamente associata alla nucleoproteina traduce dal genoma virale un RNA complementare che funge da messaggero. Tutte le proteine sono codificate su segmenti separati, ad eccezione delle proteine non strutturali NS1 e NS2, e delle proteine M1 e M2, trascritte da un singolo segmento.



L'**Emoagglutinina (HA)** comprende due catene proteiche distinte, HA1 e HA2. Ogni spicola è costituita da un trimero composto da tre molecole di HA1 e 3 molecole di HA2 ed appare all'osservazione ultramicroscopica come un segmento a sezione triangolare. Possiede molte funzioni, infatti si lega all'acido sialico sui recettori delle cellule epiteliali, e promuove la fusione tra pericapside e membrana cellulare, lega e agglutina quindi emazie; si lega anche ai mucopolisaccaridi degli essudati e dei liquidi biologici. E' fortemente antigenica, stimola una risposta anticorpale protettiva (anticorpi neutralizzanti). In condizioni lievemente acide, l'emoagglutinina cambia conformazione per esporre una sequenza idrofobica. Cambiamenti di questa glicoproteina, dovuti a mutazioni, sono responsabili di cambiamenti antigenici minori

(drift) e cambiamenti antigenici maggiori (shift). Lo shift si verifica solo per il virus influenzale A e le diverse emoagglutinine sono definite H1, H2 e così via.

La **Neuraminidasi (NA)** forma un tetramero. Le spicole di NA sono meno numerose di quelle di HA (5 a 1). Sono costituite da tetrameri composti da 4 molecole di NA. Ha attività enzimatica che interviene nella rimozione dell'acido sialico (o neuraminico), uno zucchero terminale degli oligosaccaridi delle glicoproteine (recettori emazie, recettori cellulari). La sua funzione non è molto chiara, ma sembra intervenire nella rimozione di questo acido sialico nel muco e nelle secrezioni respiratorie, facilitando l'infezione delle cellule sottostanti o staccando il virus eventualmente intrappolato nel muco. Sembra facilitare il distacco delle particelle neoformate dalla superficie della cellula ospite. E' un bersaglio per due farmaci. Anche queste subiscono cambiamenti antigenici e le diverse NA vengono designate come N1, N2 e così via.

Le proteine **M1** avvolgono l'intero virione e ne promuovono l'assemblaggio.

Le proteine **M2** invece formano un canale protonico nella membrana e promuove lo scapsidamento e il rilascio del virus. E' anch'essa bersaglio di due farmaci.

E' stato dimostrato che la polimerasi virale utilizza come innesco per la trascrizione degli RNA messaggeri virali, il cappuccio degli RNA messaggeri della cellula. Di conseguenza l'inibizione della sintesi dell'RNA messaggero cellulare inibisce la trascrizione dei messaggeri virali. La trascrizione del genoma avviene nel nucleo. L'involucro di rivestimento della nucleoproteina del virus influenzale, ha origine dalla membrana plasmatica della cellula infettata, almeno nella sua struttura lipidica, mentre le proteine della membrana (la matrice, l'HA e la NA) sono codificate dal genoma virale.

La **replicazione** virale comincia col legame di HA all'acido sialico sulle proteine della superficie cellulare bersaglio (**Adsorbimento**). La seconda fase è la **penetrazione**, che avviene mediante endocitosi mediata da recettore. L'ambiente acido dell'endosoma causa la fusione dell'involucro virale con la membrana dell'endosoma e viene liberato il nucleocapside nel citoplasma. All'abbassamento di pH partecipa la proteina M2 che permette l'ingresso di protoni; segue l'attivazione di proteasi cellulare e la conseguente proteolisi dell'emoagglutinina. Il cambio di conformazione di HA attiva la componente fusogena di HA2 (HA possiede una porzione che + una regione di attacco e poi una regione di fusione). Segue la fusione dell'envelope con la

membrana dell'endosoma e la liberazione del nucleocapside nel citoplasma. La **trascrizione** dell'RNA è la fase seguente, dove enzimi virali, quali RNA-polimerasi RNA-dipendenti sintetizzano mRNA a polarità positiva da ciascuno dei segmenti di RNA genomico. La polimerasi virale utilizza come innesco il cappuccio degli mRNA della cellula ospite. Quindi la sintesi degli RNA-messaggeri avviene nel nucleo. Gli RNA virali nascenti sfruttano le sequenze cap degli RNA messaggeri cellulari per potersi trasferire nel citoplasma per la traduzione. L'inibizione farmacologica della sintesi dell'RNA messaggero cellulare (Actinomomicina D) inibisce la trascrizione dei messaggeri virali. **Traduzione.** Gli RNA messaggeri sono trasferiti nel citoplasma e tradotti nelle varie proteine che intervengono attivamente nelle fasi successive della replicazione virale. La RNA-polimerasi RNA-dipendente virus-specifica provvede a questo punto alla sintesi di una serie di copie complementari di RNA a polarità positiva dei vari segmenti del genoma ed alla loro ritrascrizione in altrettante copie di RNA genomico a polarità negativa. Seguono le fasi di montaggio e maturazione. Gli eventi di traduzione avvengono nel citoplasma ma si ritiene che il materiale prodotto ritorni nel nucleo dove avviene il montaggio del nucleocapside. La maturazione vera e propria avviene invece a livello della membrana cellulare. Le glicoproteine virali HA e NA, opportunamente glicosilate durante il trasporto nel reticolo endoplasmatico, sostituiscono le proteine cellulari. La proteina M1 si aggrega a formare uno strato sottile sulla superficie interna di porzioni di membrana cellulare modificata. Gli eventi che portano alla combinazione del nucleocapside con gli altri componenti virali sono del tutto sconosciuti. La liberazione del virione maturo avviene per gemmazione.

L'influenza è una malattia epidemica a rapida diffusione. La ricerca scientifica dell'agente eziologico della malattia fu avviata da Pfeiffer durante la pandemia del 1890, quando isolò da soggetti ammalati, un batterio, che classificò come *Haemophilus influenzae* erroneamente. Tra il 1918 e 1919 causò 20-40 milioni di vittime, più di quelle della prima guerra mondiale, durante la grande pandemia influenzale, la "spagnola".

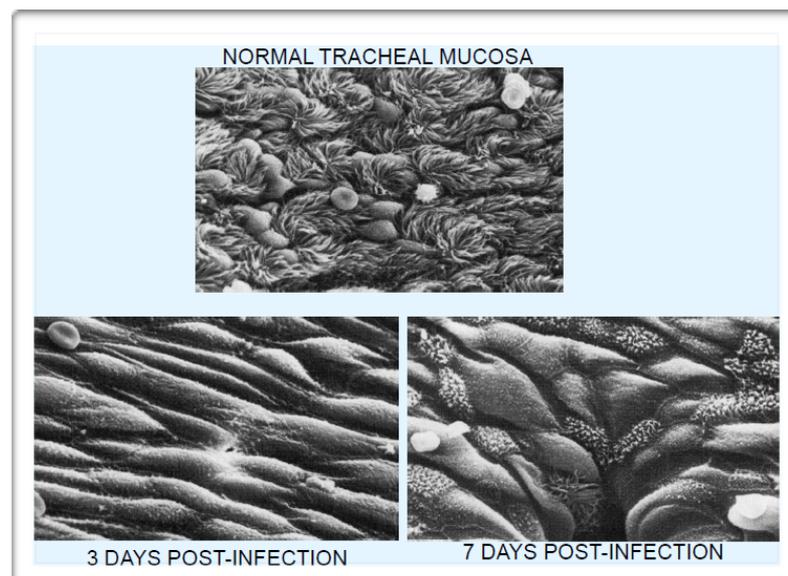
L'infezione con virus influenzale può essere associata a sindromi cliniche molto simili a quelle di altri virus respiratori o agenti infettanti. Causa l'influenza vera, influenza A, B e C, e patologie respiratorie caratterizzate da febbre e sintomatologia sistemica.

L'infezione si trasmette per contagio interumano attraverso secrezioni respiratorie di individui infetti. Il virus viene trasmesso facilmente per aerosol (è relativamente stabile) e bastano poche particelle virali per iniziare l'infezione.

Si ritiene che il virus riesca a superare il muco delle secrezioni respiratorie ad opera della proteina NA, in grado di rimuovere l'acido sialico presente sulle glicoproteine del muco. Il virus replica nella mucosa respiratoria, causando rapida necrosi delle cellule delle vie respiratorie superiori, della trachea e dei bronchi. Il periodo di incubazione è piuttosto breve (1-3 giorni) e normalmente la sintomatologia scompare dopo 1-7 giorni anche se il virus può essere rilasciato anche più a lungo.

Clinicamente si manifesta a carico delle prime vie respiratorie con una tracheite acuta, con lesioni e distruzione dell'epitelio ciliato da parte del virus. La sintomatologia legata alla sindrome influenzale è caratterizzata da febbre (38-40°C), brividi, dolori generalizzati, cefalea, tosse, fotofobia, prostrazione e anoressia. La sintomatologia è sistemica nonostante l'infezione sia localizzata solo all'apparato respiratorio, a causa del rilascio in circolo di importanti mediatori dell'infiammazione (pirogeni endogeni come IL-1, IL-6 e TNF- α). L'influenza presenta comunque un ampio spettro nelle manifestazioni cliniche, come per molte altre malattie. La sindrome è solitamente autolimitante e benigna. La più importante complicanza è la broncopolmonite batterica mentre è più rara la polmonite primaria da virus influenzale.

La malattia negli adulti è generalmente autolimitante, ma può causare gravi infezioni dell'apparato respiratorio con importanti complicazioni. Gravità in particolari condizioni o particolari categorie di soggetti, quali bambini, anziani, immunocompromessi, patologie cardiocircolatorie e polmonari preesistenti e donne gravide. Le complicanze polmonari possono essere una laringite difterica (nei bambini), una polmonite virale e infezioni batteriche da *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus Aureus* ed *Haemophilus influenzae*. Questo succede perché l'infezione influenzale, compromettendo le difese naturali del tratto respiratorio (desquamazioni dell'epitelio



bronchiale e alveolare che può ridursi a uno strato basale monocellulare o alla membrana basale; NA che taglia l'acido sialico del muco, permettendo l'accesso ai tessuti), facilita l'adesione di batteri alle cellule epiteliali, quindi la polmonite, ad esempio, può essere una conseguenza diretta del danno indotto dal virus o di un'infezione batterica secondaria. E' la principale causa di decesso correlato all'infezione da virus influenzale, e può derivare da polmonite batterica. Il 90% dei casi mortali si verifica in pazienti con più di 65 anni. Le complicanze extra-polmonari dell'influenza sono una miosite (rara, nei bambini, di tipo B), complicanze cardiache (miocarditi), insufficienza renale e sindromi neurologiche varie (encefalite, sindrome di Reye, etc.). I meccanismi che portano alla scomparsa del virus non sono noti in dettaglio. L'**interferon**, presente in concentrazioni elevate nella sede dell'infezione, sembra essere coinvolto nel meccanismo di guarigione. Gli anticorpi specifici non sembrano avere un ruolo predominante nella guarigione, perché non vengono rilevati prima della fine della fase acuta. Gli anticorpi neutralizzanti prodotti, soprattutto verso HA, permangono per anni ad alti titoli per poi diminuire gradualmente nel corso della vita. Alti titoli di questi anticorpi sembrano essere protettivi per le successive infezioni, ma solo verso il ceppo che ne ha indotto la produzione. I sintomi e la durata della malattia dipendono dall'azione dell'interferone, dalla risposta cellulo-mediata e dall'entità del danno del tessuto epiteliale. L'influenza è in genere una malattia autolimitante, che difficilmente coinvolge altri organi oltre il polmone. Molti dei classici sintomi influenzali sono causati all'induzione di interferone. La riparazione del tessuto danneggiato inizia entro 3-5 giorni dalla comparsa dei sintomi, ma può richiedere mesi o anche più, in particolare negli anziani.

Per la diagnosi, generalmente si basa sui sintomi caratteristici, la stagionalità e la presenza all'interno di una comunità. Le indagini di laboratorio stabiliscono il tipo di virus e ne confermano la diagnosi. L'isolamento del virus può essere ottenuto in secrezioni nasali, escreato. La sierologia può essere utile attraverso anticorpi fissanti il complemento e anticorpi inibenti l'emoagglutinazione. Sono disponibili test-rapidi come QuikVue influenza test, poi il test di ELISA, immunofluorescenza e PCR.

Il virus di tipo A infetta gli uomini e altri animali, causa una patologia più severa, causa regolarmente epidemie e può causare pandemie. Il virus di tipo B infetta solamente gli uomini e può causare epidemie, ma la malattia è meno severa, e non può causare pandemie.

Epidemiologia: Le infezioni da virus influenzale sono diffuse in tutto il mondo e rappresentano una delle cause maggiori delle affezioni delle vie respiratorie. Uno degli aspetti più importanti di questa infezione è l'estrema variabilità antigenica del virus. La variabilità riguarda soprattutto le proteine HA e NA. Relativamente alla presenza di differenti HA e NA, i virus influenzali di tipo A sono suddivisi in sottotipi sierologicamente distinti, con 15 differenti tipi di HA e 9 differenti tipi di NA. I ceppi dei virus possono essere classificati in base a più caratteristiche. Il virus A può essere classificato in tipo (A, B e C), in luogo di isolamento, in anno di isolamento e sugli antigeni HA e NA; un virus può essere A/Bangkok/1/79 (H3N2), che significa che è un virus influenzale di tipo A, isolato a Bangkok nel 1979, che contiene gli antigeni HA (H3) e gli antigeni NA (N2). I ceppi B possono essere classificati su tipo, geografia e anno di isolamento, ma senza riferimenti agli antigeni, perché i virus di tipo B non subiscono uno "shift" antigenico e non determinano pandemie. Nuovi ceppi influenzali si generano per mutazione e riassortimento. La diversità genetica dei virus influenzali di tipo A è favorita dalla struttura genomica segmentata che li caratterizza e dalla capacità di infettare e replicarsi sia in esseri umani che in animali; le combinazioni possono essere quindi il risultato di specie miste. L'Antigen **Drift**, o deriva antigenica, è l'accumulo di mutazioni puntiformi in HA e NA; causa una leggera alterazione della struttura primaria e quindi c'è una possibile alterazione della struttura terziaria e dell'antigenicità. Gli anticorpi potrebbero non essere efficienti a lungo; possono causare epidemie limitate. L'Antigen **Shift**, o spostamento antigenico, forma nuove HA e NA. È una variazione antigenica drastica dovuta a riassortimento, sostituzione di segmenti di RNA di diversi virus di tipo A; gli anticorpi pre-esistenti non proteggono e possono causare pandemie. È, come detto, favorito dalla presenza di un genoma segmentato. In presenza di una infezione ad opera di due diversi virus influenzali è possibile che durante l'assemblaggio delle rispettive progenie si verifichi un riassortimento genomico, con lo scambio ad esempio di HA e NA. Si ha comparsa di un nuovo virus circolante se il nuovo virus ha capacità infettante e se ha un vantaggio selettivo. La popolazione risulta sprovvista di anticorpi ed è facile la trasmissione. Tutte queste caratteristiche favoriscono la formazione di pandemie. Nel 1918 la "Spanish Flu" causò tra 20 e 40 milioni di morti (H1N1), nel 1957 l'"Asian Flu" causò 1 milione di morti (H2N2) e nel 1968 l'"Hong Kong Flu" causò 1 milione di morti (H3N2).

I virus influenzali si legano con l'emoagglutinina all'acido sialico (NANA o acido 5-N-acetilneuraminico), terminale degli oligosaccaridi delle glicoproteine e dei glicolipidi

presenti sulla membrana cellulare. I virus influenzali A umani si legano potenzialmente all'acido sialico che presenta un legame $\alpha 2,6$ con la molecola oligosaccaridica (acido 5-N-acetilneuraminico- $\alpha 2,6$ -galattoso). I virus influenzali A aviari si legano preferenzialmente all'acido sialico che presenta un legame $\alpha 2,3$ (acido 5-N-acetilneuraminico- $\alpha 2,3$ -galattoso). Sulla superficie delle cellule mucose respiratorie umane c'è la presenza quasi esclusiva di acido sialico con legame $\alpha 2,6$. Sulla superficie delle cellule mucose degli uccelli i residui terminali di acido sialico presentano nella maggioranza dei casi, un legame $\alpha 2,3$. Quindi c'è difficoltà da parte dei virus aviari ad infettare direttamente l'uomo.

Virus ibridi si creano per coinfezione di una cellula con ceppi diversi di virus influenzale A, permettendo ai segmenti genomici di associarsi casualmente nei virioni della progenie. Uno scambio della glicoproteina HA può generare un nuovo virus che può infettare una popolazione immunologicamente naive. Il maiale possiede i recettori sia per l'influenza aviaria, che per quella umana: può rappresentare la specie in cui può avvenire il riassortimento genomico. Ad esempio un virus dell'anatra H5N1 e un virus umano H3N2 hanno infettato i maiali: dei riassortanti sono stati isolati dal maiale e il virus risultante era in grado di infettare l'uomo. Questo tipo di riassortimento potrebbe essere la fonte di ceppi patogeni per l'uomo. Ma la diretta infezione da parte di virus aviari (H5N1 ad esempio) indica che il maiale non sia sempre coinvolto nella trasmissione interspecie. A causa dell'elevata densità di popolazione e dello stretto contatto tra uomini, maiali, polli e anatre, si ritiene che la Cina possa rappresentare una sorgente di nuovi virus riassortanti e la fonte di molti ceppi pandemici dell'influenza.

Nuovo virus di Influenza A (H1N1) di origine suina (S-OIV): infezione nell'uomo. La corrente epidemia da virus influenzale è iniziata a Città del Messico a metà Marzo del 2009. Il 21 Aprile del 2009 il CDC ha confermato un novo virus influenzale. Il 25 Aprile il WHO ha dichiarato l'emergenza di salute pubblica a livello internazionale. Il 26 Aprile WHO stabilisce id passare dalla fase 4 alla fase 5 (su 6 punti della scala). Alla fase 5 una possibile pandemia è considerata imminente e vanno intensificati gli sforzi finalizzati ad ottenere misure di controllo e di contenimento dell'infezione. Il nuovo virus identificato deriva da un riassortimento di 4 ceppi: uno endemico negli uomini, uno endemico tra gli uccelli e due nei maiali. Poiché i maiali possono essere infettati sia come virus che infettano uomini che con quelli che infettano uccelli, essi vengono considerati come "mixing vessel" per il riassortimento di virus influenzali di specie multiple. Alla data 6-5-2009 l'infezione si + diffusa in 21 paesi nel mondo, con

1516 casi confermati in laboratorio presentando 30 morti (29 in Messico e 1 in USA). L'ampia variazione della mortalità nei vari paesi ancora non è chiara, sebbene ciò sia stato osservato anche nelle precedenti pandemie. Si è stimato che l'influenza stagionale H1N1 infetta in media 50 milioni di persone l'anno, con 36mila morti annui (0,07%). Al 15 Maggio 2009, con un secondo aggiornamento dell'OMS, i casi al mondo erano diventati 7520 (con 1000 nuovi contagi rispetto al giorno precedente), in 34 paesi nel mondo e 65 decessi, di cui più di 4 mila negli USA, con 3 decessi, poi Messico con 2mila e mezzo e 60 decessi. La situazione negli altri paesi è decisamente confortante, con un unico picco in Spagna di 100 persone, in Italia 9. Ad oggi l'OMS conferma che l'allerta globale legata al rischio di una pandemia resta al livello 5 su una scala di 6 punti, nonostante il quadro parzialmente confortante. Il periodo di incubazione di questo virus oscilla tra i 2 e i 7 giorni. La maggior parte dei pazienti sembra eliminare i virus da 1 giorno prima della manifestazione clinica, fino ad almeno 5-7 giorni dopo. La malattia si è dimostrata autolimitante con una sintomatologia del tratto respiratorio simile a quella dell'influenza stagionale nella maggior parte dei casi, oppure ha presentato sintomi clinici gravi, compresi difficoltà respiratorie e morte. Il 38% dei casi hanno mostrato vomito e diarrea, sintomi non tipici dell'influenza stagionale. Il 60% dei pazienti era più giovane dei 18 anni suggerendo che i bambini e giovani adulti possono essere più suscettibili all'infezione. E' possibile che nelle persone anziane sia presente una cross-protezione da parte di anticorpi verso precedenti infezioni con S-OIV. I virus isolati da infezioni umane hanno mostrato la sensibilità agli inibitori della Neuraminidasi (Oseltamivir e Zanamivir), mentre sono resistenti all'amantadina e alla rimantadina. Il CDC ha raccomandato l'uso di questi farmaci per il trattamento e la prevenzione dell'infezione con il nuovo virus.

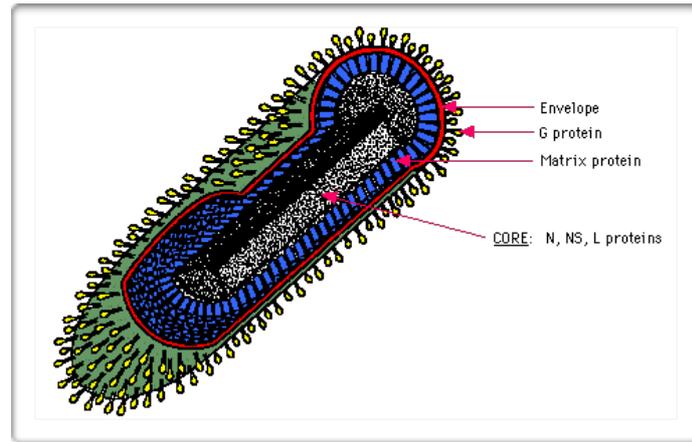
Trattamento: Il farmaco antivirale **amantadina** e il suo analogo **rimantadina** inibiscono la fase dello scapsidamento del virus influenzale A, ma non del B e del C. Il loro bersaglio è la proteina M2. **Zanamivir** e **Oseltamivir** inibiscono sia A che B inibendo la NA, senza la quale, HA si lega all'acido sialico sulle particelle virali formando degli agglomerati, impedendo il rilascio del virus. Lo zanamivir viene inalato, mentre Oseltamivir viene assunto per via orale, come pillola. Gli inibitori di NA sono più efficaci che gli inibitori di M2 perché i vecchi farmaci antivirali hanno limiti, amantadina e analogo sono efficaci solo contro l'influenza A, e sono associati ad alte incidenze di resistenza, inoltre hanno più effetti collaterali, soprattutto a livello del SNC, nervosismo, ansia, e difficoltà di concentrazione.

Rhabdovirus

Dal greco rhabdos= bastone, sono dei virus che codificano solo per cinque proteine; sono dei virioni a forma di proiettile, bastoncellare, 60x180 nm. Comprende *Vesiculovirus* (VSV, o virus della Stomatite nei bovini) e *Lissavirus* (virus della rabbia). La superficie è coperta da trimeri di una glicoproteina G, che è la proteina di attacco del virus e che induce anticorpi. All'interno del pericapside

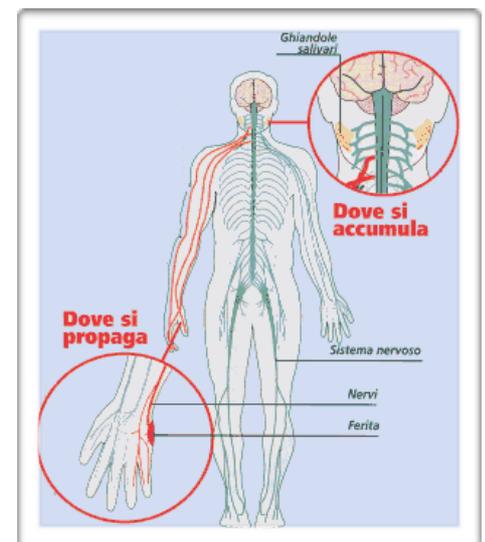
troviamo un nucleocapside elicoidale, che è avvolto da una struttura cilindrica che gli conferisce un aspetto striato. Il nucleocapside è costituito da una molecola di RNA monocatenario a polarità negativa, con capacità di codificare per 5 proteine, poi dalla nucleoproteina N (che protegge l'RNA dalla distruzione da parte delle ribonucleasi e ne mantiene la conformazione adatta alla trascrizione), dalla proteina grande L e dalle proteine non strutturali NS che insieme costituiscono la RNA polimerasi RNA-dipendente. Tra il pericapside e il nucleocapside si trova la proteina della matrice M.

La replicazione comincia col legame della proteina virale G alla cellula ospite tramite il **recettore acetilcolinico AChR**, oppure alla molecola di adesione della cellula nervosa **NCAM**, e poi segue l'internalizzazione per endocitosi. L'endosoma viene acidificato ed il pericapside si fonde con la membrana di questo, col conseguente rilascio del nucleocapside all'interno del citoplasma, dove avrà luogo la replicazione. La RNA polimerasi RNA-dipendente associata al nucleocapside trascrive l'RNA genomico in 5 singoli mRNA che sono poi tradotti in 5 proteine virali. Inoltre l'RNA genomico viene anche trascritto in una molecola di RNA a polarità positiva, di lunghezza completa, che servirà da stampo per il nuovo RNA genomico. La proteina G viene sintetizzata sui ribosomi associati alla membrana, processata nel Golgi e trasportata sulla superficie cellulare in vescicole che incorporano la proteina G. L'assemblaggio dei virioni si svolge in due fasi, la prima nel citoplasma dove avviene l'assemblaggio del nucleocapside e la seconda a livello della membrana citoplasmatica, dove il nucleocapside in questione viene avvolto dal pericapside e rilasciato. Nella prima fase il genoma si associa ad N, L e NS formando il nucleocapside. Nella seconda fase l'associazione del nucleocapside a livello della membrana con la proteina M induce l'avvolgimento a spirale in forma condensata del



nucleocapside e conferisce la caratteristica struttura. I nucleocapsidi formano delle inclusioni chiamate Corpi del Negri. Il virus quindi fuoriesce mediante gemmazione e rilasciato quando l'intero nucleocapside è rivestito dal pericapside. Il virus della rabbia porta a un lieve danno cellulare.

La **rabbia** si trasmette tramite la saliva di un animale infetto. E' una tipica zoonosi. E' endemica a livello mondiale, ma da quando è stato introdotto il vaccino, è stata limitata la diffusione, rimane negli animali selvatici, come tassi, procioni, volpi, moffette. Nell'America Latina, i casi di rabbia sono maggiori per la grande presenza di cani randagi. I cani sono mondialmente i serbatoio principali di questo virus. Negli USA oramai si conta un caso all'anno. Il virus però può essere anche trasmesso tramite aerosol (pipistrelli nelle grotte). Può infettare direttamente le terminazioni nervose, oppure il muscolo nel sito di inoculazione. Il virus rimane a livello del sito di inoculazione per giorni o mesi prima di diffondersi al SNC. Il periodo di incubazione è infatti molto variabile, da 3 a 8 settimane circa, ma anche da 1 a 2 anni. E' importante il punto di inoculo, quindi la distanza dal SNC. Il virus raggiunge per **trasporto assonico retrogrado** le radici dei gangli dorsali e il midollo spinale. Una volta avuto l'accesso al MS, il cervello viene rapidamente infettato. Il virus attraverso i neuroni afferenti, si dirige poi in direzione centrifuga verso cute, testa collo, ghiandole salivari, retina, mucosa nasale, midollare del surrene, parenchima renale e pancreas. Invaso il cervello, si sviluppa un'encefalite acuta, con degenerazione dei neuroni di MS e cervello. Nonostante il danneggiamento delle funzioni sia esteso, a livello istologico non si osservano degenerazioni evidenti delle cellule, ma solo le inclusioni del Negri.



La rabbia consta di 2 fasi principali prima di degenerare inevitabilmente a coma e morte. La prima fase è un periodo prodromico e poi segue una fase neurologica acuta. In assenza di una vaccinazione è sempre letale. La fase prodromica dura circa 2-10 giorni, e in questo periodo troviamo sintomi aspecifici, quali, febbre, malessere, cefalea, dolore e parestesia (pizzicore) nella sede del morso, poi sintomi gastrointestinali, affaticamento ed anoressia. Dopo questa fase vediamo una fase neurologica acuta, che dura sempre 2-10 giorni e che è caratterizzata da un aumento del tono muscolare, rigidità nucale, difficoltà della respirazione, difficoltà della deglutizione, che conduce il paziente ad **idrofobia** (20% pazienti ha paura dell'acqua

derivante dalla difficoltà a deglutire acqua), poi vediamo attacchi convulsivi, allucinazioni e poi paralisi. Dopo questa fase vediamo che il paziente entra in uno stato comatoso, per morire poi per complicazioni neurologiche e soprattutto respiratorie.

La diagnosi si basa principalmente sull' anamnesi. Sfortunatamente le prove dell'infezione, compresi i sintomi e rivelazione degli anticorpi, si ottengono solamente quando è troppo tardi per intervenire. I test vengono usati per confermare la diagnosi e per stabilire se un individuo sospetto sia affetto dal virus. Di fondamentale importanza dal punto di vista diagnostico, è stata la scoperta nei neuroni infetti delle inclusioni eosinofile, dei nucleocapsidi virali o "**corpi del Negri**", che si riscontrano nel 70-90% dei pazienti affetti dal virus. Immunofluorescenza per riscontrare la presenza di antigeni virali e poi la PCR per gli acidi nucleici.

Per il controllo, è bene limitare la diffusione tra gli animali suscettibili e quindi l'esposizione. La rabbia è quasi sempre fatale in assenza di trattamento, e dopo la comparsa dei sintomi è possibile solo il supporto. La prima misura preventiva comunque consiste nel lavaggio della ferita con acqua e sapone, o con detergenti che possano inattivare il virus, oppure la somministrazione del siero antirabbico attorno alla ferita. Si raccomanda poi l'immunizzazione con vaccino, associata alla somministrazione di siero equino antirabbico o di Ig umane antirabbia (HRIG); questa immunizzazione passiva consente la risposta alla vaccinazione. Il vaccino è un vaccino a virus inattivato, che viene preparato in colture di fibroblasti.

Filovirus

Il virus *Marbora* ed *Ebola* sono parte dei *Filovirus*. Sono filamentosi, con pericapside, con RNA a polarità negativa, che causano febbri emorragiche gravi o fatali e sono endemici in Africa. Il genoma è a singolo filamento, ed il nucleocapside è racchiuso da un pericapside contenente un'unica glicoproteina, e si replica similmente ai *rhabdovirus*. Si replicano producendo virus in monociti, macrofagi, cellule dendritiche, e la replicazione nei monociti scatena una "tempesta citochinica", come la sepsi. Causa estesa necrosi del parenchima di fegato, milza, dei linfonodi e dei polmoni. L'emorragia provoca edema e shock ipovolemico. Il virus elude le risposte immunitarie rilasciando una glicoproteina solubile, che inibisce i neutrofili e blocca gli anticorpi, mentre le proteine virali possono anche inibire sia la produzione, che l'attività dell'IFN. L'infezione da parte di *Marburg* è comparsa in Germania nell'omonima cittadina, esposti a scimmie africane verdi provenienti dal Kenya.

Il virus *Ebola*, chiamato così perché scoperto sul fiume dell'omonima cittadina del Congo, ha causato epidemie in queste zone; è talmente letale che elimina gli ospiti prima che questi possano diffondere il virus ampiamente. Può essere endemico nei pipistrelli o scimmie selvatiche e si può diffondere da uomo a uomo.

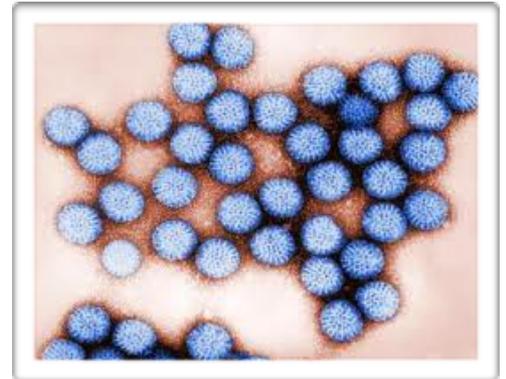
Questi due virus causano inizialmente sintomi aspecifici, ma successivamente si verificano emorragie in siti multipli, soprattutto nel GI, che causano morte. La manipolazione di questi virus in laboratorio richiede delle misure di isolamento di livello 4. L'identificazione del genoma può essere fatta grazie a RT-PCR e possono essere trovati gli antigeni virali mediante immunofluorescenza diretta e test di ELISA. Non esistono trattamenti specifici, ed i pazienti dovrebbero essere messi in quarantena, mentre gli animali sacrificati.

Bornavirus

È un virus con pericapside, con RNA a polarità negativa. Il suo genoma codifica 5 proteine, polimerasi L, nucleoproteina N, proteina della matrice M e una glicoproteina del pericapside G. Diversamente dai virus a polarità negativa, questo replica nel nucleo e differisce dagli *Orthomyxovirus*, nonostante la somiglianza, per il fatto che il proprio genoma non è segmentato. Un'altra particolarità consiste nel fatto che in questo virus uno degli RNA (+) viene trascritto dal genoma e processato in modo da rimuovere gli introni e produrre tre diversi mRNA per tre proteine differenti. Le conoscenze sono limitate nell'uomo, mentre negli animali causano perdite della memoria, e meningoencefalite immunomediata fatale. Nell'uomo forse sono associati a delle malattie neuropsichiatriche, come depressione, disturbo bipolare, schizofrenia e autismo. È una zoonosi, ma non si conosce né il serbatoio, né la modalità di trasmissione di questo virus. L'infezione viene rilevata tramite analisi diretta del genoma e mediante RT-PCR. È sensibile al trattamento con ribavirina.

Reovirus

Questa famiglia comprende gli *Orthoreovirus* (*reovirus* che causano infezioni lievi o asintomatiche), i *Rotavirus* (causano gastroenteriti nei bambini), *Orbivirus* e *Coltivirus* (sono arbovirus). Chiamato così questo genere per definire un gruppo di virus respiratori ed enterici non associati a patologie note (respiratorio, enterico, orfano). I *rotavirus* ed i *reovirus* possiedono caratteristiche strutturali, replicative e patogeniche in comune. Hanno una morfologia icosaedrica con doppio involucro capsidico (da 60 a 80 nm di diametro) e un genoma ad RNA segmentato a doppio filamento. Sono sprovvisti di pericapside. Il termine rotavirus deriva da ruota, in quanto al microscopio assumono tale forma (immagine). La scissione proteolitica del capsido più esterno, che avviene nel tratto GI, rende il virus infettivo e stimola la produzione di particelle subvirali intermedie/infettive (ISPV). Il capsido esterno è formato da proteine strutturali, che circondano il core del nucleocapsido, che comprende enzimi per la sintesi dell'RNA e diversi segmenti genomici a RNA a doppio filamento (10 per reo e 11 per rota). Questi segmenti genomici codificano per proteine strutturali e non strutturali. Le proteine sicuramente più importanti sono $\sigma 1$ per i reovirus, e VP4 per i *rotavirus*; queste due proteine sono localizzate ai vertici del capsido e si prolungano alla superficie, ed hanno molte funzioni, come emoagglutinazione, attacco virale e stimolano la produzione di anticorpi neutralizzanti. In particolare VP4 viene scissa proteoliticamente in VP5 e VP8, azione che favorisce l'entrata produttiva del virus nella cellula. La replicazione comincia con l'endocitosi del virus. Le proteine VP4 e $\sigma 1$ si legano ai residui di acido sialico delle glicoproteine delle cellule; anche il recettore β -adrenergico per i *reovirus* e le integrine per i *rotavirus* rappresentano dei recettori che favoriscono la penetrazione all'interno delle cellule. Quindi dopo l'endocitosi mediata dal recettore, queste particelle infettive attivate ISVP rilasciano il core nel citoplasma e gli enzimi contenuti all'interno di questo cominciano a produrre RNA. L'RNA a doppio filamento rimane sempre nel core. Ogni filamento di RNA a polarità negativa viene usato come stampo dagli enzimi virali per formare i singoli mRNA (+). Gli enzimi codificati aggiungono il cap al 5' e la coda poli A al 3', così che gli mRNA possono lasciare il core ed essere tradotti. Le proteine virali e i segmenti di RNA a polarità positiva si associano per dare origine inclusioni citoplasmatiche. I segmenti (+) sono



copiati in (-) nei nuovi core, che replicano così il genoma a doppio filamento. L'assemblaggio differisce tra *reovirus* e *rotavirus*. Nei *reovirus* le proteine del capsido più esterno si associano col core e il virione è rilasciato in seguito a lisi cellulare. Per i *rotavirus* il core si associa con la proteina virale NSP4 all'esterno del RE e acquisisce la proteina del capsido esterno V7 gemmando nel RE, poi la membrana viene persa nel RE e il virus lascia la cellula in seguito a lisi.

Orthoreovirus

Sono virus ubiquitari, individuabili in acque di scarico e fiumi. Non causano malattie importanti nell'uomo. Questi virus si legano alle cellule M dell'intestino tenue, da queste poi viene trasferito nelle placche di Peyer che rivestono l'intestino. Il virus quindi si replica e si evidenzia viremia. Il 75% degli adulti presenta anticorpi contro questi virus. Infettano tutte le età, ma in maniera asintomatica, o provocando infezioni lievi del tratto respiratorio superiori, come il raffreddore, e patologie lievi del tratto GI. Può essere rilevato l'antigene virale nel materiale clinico mediante isolamento virale. Non c'è un trattamento, è autolimitante.

Rotavirus

Causano diarrea infantile in tutto il mondo. Sono stabili e resistenti a temperatura ambiente e valori di pH estremi. La loro attività è rafforzata dalla tripsina. La replicazione virale avviene nei villi intestinali dell'intestino tenue e causano inclusioni citoplasmatiche con proteine e RNA. Si può notare accorciamento e appiattimento dei microvilli. L'infezione ostacola l'assorbimento di acqua, causando secrezione netta di acqua con perdita di ioni e **diarrea** acquosa. La NSP4 agisce come una tossina favorendo l'afflusso di calcio negli enterociti. Il 95% dei bambini viene infettato entro 5 anni, e si pensa siano trasmessi per via oro-fecale. Sono una delle cause più comuni di diarrea nei bambini in tutto il mondo. Il periodo di incubazione è di 48h, con febbre, vomito, diarrea e disidratazione. La malattia è autolimitante e priva di sequele, ma può essere fatale nei paesi in via di sviluppo, denutriti e disidratati prima dell'infezione. Il rilevamento diretto nelle feci è la tecnica di scelta. E' ubiquitario, non c'è terapia antivirale, non ci sono vaccini.

Coltivirus e Orbivirus: i primi causano la febbre delle zecche del Colorado, i secondi malattie negli animali. Sono causate da zecche, che causano viremia per mesi anche dopo scomparsa dei sintomi, con febbre artralgia, fotofobia, mialgia, "rash". Non esiste una terapia specifica, è autolimitante, è sufficiente una terapia di supporto.

Togavirus e Flavivirus

I membri di questa famiglia comprendono dei virus dotati di pericapside, con genoma costituito da RNA a singolo filamento a polarità positiva.

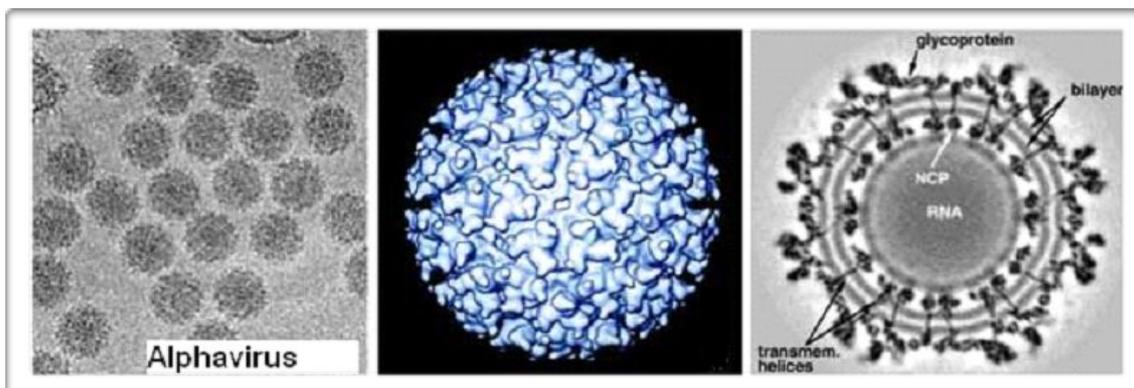
I *Togavirus* possono essere classificati in tre generi:

- 1) *Alphavirus* (*arbovirus*)
- 2) *Arterivirus* (non ci sono patogeni per l'uomo)
- 3) *Rubivirus* (unico membro il virus della rosolia).

Dei *Flavivirus* invece fanno parte i *Flavivirus*, i *Pestivirus* e gli *Hepacivirus* (virus epatite C e G).

I *Flavivirus* e gli *Alphavirus* sono *arbovirus*, che causano patologie trasmesse da artropodi, quindi delle tipiche zoonosi.

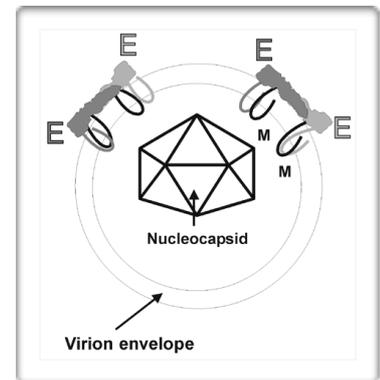
Struttura e Replicazione:



Gli *Alphavirus* sono dotati di capside icosaedrico, con un RNA a singolo filamento (+), di 45-75 nm di diametro, avvolti da pericapside (toga, dal latino mantello). Il genoma codifica proteine precoci e tardive. Sono dotati di due o tre glicoproteine che si uniscono a formare un'unica spicola. L'estremità carbossi-terminale delle glicoproteine è ancorata al capside e permette al pericapside di avvolgere strettamente il capside e di mantenerne la struttura. Questi virus si legano a recettori differenti di specie differenti, quali vertebrati ed invertebrati, quindi lo spettro è ampio. Il virus penetra nella cellula attraverso endocitosi mediata da recettore. Il pericapside si fonde dopo acidificazione delle vescicole e il capside col genoma sono rilasciati nel citoplasma. Qui si lega ai ribosomi e funge da mRNA, viene tradotto in una fase precoce ed in una fase tardiva. Vengono sintetizzate le

poliproteine precoci a piena lunghezza. Le poliproteine sono poi processate per generare le proteine non strutturali indicate con i numeri da 1 a 4 (NSP1-4), che comprendono una polimerasi che trascrive il genoma producendo un RNA stampo a polarità negativa. Lo stampo viene utilizzato per produrre un mRNA genomico 42S, a piena lunghezza, a polarità positiva e un mRNA tardivo, 26S, per le proteine strutturali. La proteina C (del capsid) è tradotta ed espone prima un sito di taglio per la proteasi, poi il peptide di segnale che consente l'associazione col RE. In seguito vengono sintetizzate le glicoproteine E del pericapside (1, 2, 3), che vengono indirizzate alla membrana citoplasmatica dopo essere state glicosilate e processate nell'apparato di Golgi. Le proteine del capsid si assemblano attorno all'RNA genomico 42S e quindi si associano a regioni del citoplasma e della membrana citoplasmatica contenenti le piccole proteiche E1, E2 ed E3. Il rilascio del virus avviene per gemmazione attraverso la membrana citoplasmatica.

I *Flavivirus* anche possiedono RNA a polarità positiva, un capsid icosaedrico ed un pericapsid, ma sono leggermente più piccoli, con diametro 40-65 nm. La glicoproteina E si associa con un'altra E, giacendo appiattita lungo la superficie del virione a formare uno strato proteico esterno. Per questi non esiste distinzione temporale nella sintesi delle proteine virali. Negli *alphavirus* le proteine enzimatiche sono codificate dall'estremità 5' del genoma infettante, cosa che permette una rapida traduzione delle proteine precoci. Le proteine strutturali vengono tradotte più tardi, da un mRNA di dimensioni minori, trascritto usando come stampo l'RNA genomico. Nei *flavivirus* invece i geni che codificano le proteine strutturali si trovano all'estremità 5' del genoma dell'mRNA e viene sintetizzata un'unica poliproteina, che rappresenta l'intero genoma.



Patogenesi: gli *arbovirus* sono trasmessi dalla puntura di un artropode, come una zanzara ad esempio, che possono causare infezioni sia nei vertebrati che nei invertebrati. Il virus può causare infezioni litiche, dovute alla grande quantità di RNA virale prodotto, o l'aumentata permeabilità della membrana ed i cambiamenti nelle concentrazioni ioniche. Le zanzare acquisiscono il virus cibandosi del sangue di un ospite vertebrato in fase viremica. Affinché il virus sia acquisito dalla zanzara, nell'ospite vertebrato deve essere mantenuta una viremia sufficiente. Il virus poi infetta la zanzara, si diffonde nel circolo sanguigno e alle ghiandole salivari, che liberano quindi il virus nella saliva. Quando poi punge l'ospite, rigurgita la saliva

contenente il virus nel circolo sanguigno della vittima. Questi virus sono associati a malattia lieve, encefalite, malattia artrogenica o malattia emorragica. La fase viremica iniziale è associata a sintomi sistemici, quali febbre, brividi, mal di testa, mal di schiena e simil-influenzali per 3-7 giorni. Alcuni di questi sintomi sono causati dall'IFN. Una viremia secondaria può produrre virus sufficienti ad infettare organi bersaglio come cervello, fegato, cute e vasi. Le principali cellule bersaglio dei questo virus sono quelle della linea monocito-macrofagica.

Risposta immunitaria: sia l'immunità umorale che cellulo-mediata sono stimulate e sono entrambe importanti. L'IFN circola nel sangue e limita la replicazione del virus, ma stimola la comparsa dei sintomi simil-influenzali. Le IgM circolanti sono prodotte entro 6 giorni dall'infezione e poi sono prodotte le IgG, che bloccano la viremia e l'infezione agli altri tessuti.

Epidemiologia: un *arbovirus* deve essere in grado di infettare sia vertebrati che invertebrati, instaurare una viremia in un invertebrato che duri fino a che venga infettato un invertebrato, e infettare persistentemente le ghiandole salivari di quest'ultimo. Gli uomini solo gli ospiti finali, perché non mantengono una viremia persistente, infatti se il virus non è nel sangue, la zanzara non può infettarsi. Il vettore più comune è la zanzara, ma anche zecche; gli uccelli e piccoli mammiferi sono ospiti di riserva per questi virus, ma anche rettili e anfibi, ed è per questo che il ciclo del virus è favorito. Quando gli uomini si trovano nella nicchia ecologica della zanzara vettore, possono essere infettati. Specchi di acqua stagnante, canali di drenaggio e rifiuti urbani possono rappresentare l'ambiente adatto per le zanzare come *Aedes aegypti*, vettore di febbre gialla, dengue e chikungunya. Questi virus sono mantenuti dalla zanzara *Aedes* mediante ciclo selvatico, nella giungla, dove l'ospite naturale è la scimmia, e mediante un ciclo urbano, nel quale l'ospite è l'uomo.



Sindromi cliniche: le infezioni da *Alphavirus* sono asintomatiche o causano malattia lieve, come sintomi simil-influenzali, tipici della fase viremica. La maggior parte delle infezioni da *Flavivirus* sono relativamente benigne, ma si possono verificare anche gravi meningiti asettiche ed encefaliti o malattie emorragiche. I virus che provocano emorragie sono virus dengue e della febbre gialla. Il virus **dengue** rappresenta il

maggiore problema, con 50 milioni di casi l'anno, e 300mila casi di febbre dengue emorragica. Non è endemico negli USA, ma in Sud America settentrionale e centrale sono presenti molti vettori. Viene chiamata anche febbre delle ossa rotte, con sintomi quali febbre alta, mal di testa, eruzioni cutanee e dolori alla schiena e alle ossa, per 6-7 giorni. Attraverso la reinfezione con un altro dei quattro ceppi correlati, il dengue può causare la sindrome da shock da dengue. Le infezioni da **febbre gialla** sono rappresentate da gravi malattie sistemiche caratterizzate da degenerazione di fegato, reni, cuore ed emorragie. Il coinvolgimento del fegato provoca l'ittero che dà il nome alla malattia, ma possono anche verificarsi massive emorragie gastrointestinali, con una mortalità che supera il 50%.

Diagnosi: questi virus possono crescere sia nelle linee cellulari che nelle zanzare, ma sono difficili da isolare. L'infezione viene rilevata con studi citopatologici, immunofluorescenza e la rilevazione e caratterizzazione mediante RT-PCR.

Trattamento, prevenzione e controllo: per le malattie da *arbovirus*, non esiste alcun trattamento specifico oltre alle terapie di supporto. Il modo più facile per prevenire la diffusione è l'eliminazione del suo vettore e dei focolai di riproduzione. E' disponibile un vaccino a virus vivo contro la febbre gialla, utile per le persone che lavorano col virus e rischiano il contagio. Non è disponibile un vaccino contro la febbre dengue.

Virus della Rosolia:

Condivide con i *Togavirus* le proprietà strutturali e le modalità di replicazione, ma questo è un virus **respiratorio** e non causa immediatamente citopatologie evidenziabili. La rosolia è uno dei cinque esantemi dell'infanzia. Dal latino "piccolo rosso", fu distinta per la prima volta dal morbillo e da altri esantemi da un medico tedesco, così venne inizialmente chiamato morbillo tedesco. Un oftalmologo notò che questo virus nella donna gravida, provocava malattie congenite, ed infatti può causare gravi infezioni congenite. Per questo motivo è stata incentivata la vaccinazione.

Patogenesi: non è un virus citolitico. Questo virus infetta le vie respiratorie superiori e poi diffonde ai linfonodi locali, provocando linfoadenopatia. La successiva fase viremica dissemina il virus in tutto il corpo. Ciò causa l'infezione degli altri tessuti e il caratteristico esantema lieve. Il periodo prodromico dura circa 2 settimane. La

persona può diffondere il virus attraverso goccioline respiratorie durante il periodo prodromico e per 2 settimane dopo la comparsa dell'esantema.

Risposta immunitaria: gli anticorpi vengono prodotti dopo la fase viremica e la loro presenza è correlata alla comparsa dell'esantema. Questi limitano la diffusione viremica, ma è importante anche l'immunità cellulo-mediata per risolvere l'infezione.

Esiste un unico sierotipo di questo virus. Gli anticorpi della gestante impediscono al trasmissione del virus al feto. Gli immunocomplessi possono causare l'eruzione cutanea e l'artralgia tipiche della rosolia.

Infezioni congenite: la rosolia in una gestante può provocare **infezioni congenite**. Se la madre non possiede anticorpi, il virus si può replicare nella placenta, diffondendosi al sangue fetale, replicandosi nei tessuti fetali. La crescita, la struttura dei cromosomi e la mitosi possono essere alterate. Alla nascita il feto può presentare dimensioni ridotte ed effetti teratogeni (che provocano malformazioni).

Epidemiologia: gli uomini sono gli unici ospiti di questo virus, che si diffonde attraverso le secrezioni respiratorie e, generalmente, viene acquisito durante l'infanzia. La diffusione del virus, prima o in assenza di sintomi, e i luoghi affollati, quali asili, favoriscono il contagio.

Sindromi cliniche: la rosolia nei bambini è di solito benigna, con esantema maculare o maculo-papulare di 3 giorni e ingrossamento delle ghiandole. Negli adulti può essere più grave e portare a dolori ossei e articolari, e raramente encefalite. I danni congeniti sono la più grave espressione della patologia, con ritardo mentale e sordità.

Diagnosi: l'isolamento del virus è difficile, ma la sua presenza può essere rilevata attraverso RT-PCR, e la diagnosi viene confermata dalla presenza di IgM antirosolia.

Trattamento, prevenzione e controllo: non è stata trovata alcuna terapia per la rosolia. Il modo migliore è la vaccinazione, attraverso il vaccino con ceppo di virus RA27/3 vivo adattato al freddo. Il vaccino viene somministrato con quello contro il morbillo e la parotite, o vaccino MMR, all'età di 2 anni, che promuove sia l'immunità umorale che cellulo-mediata.



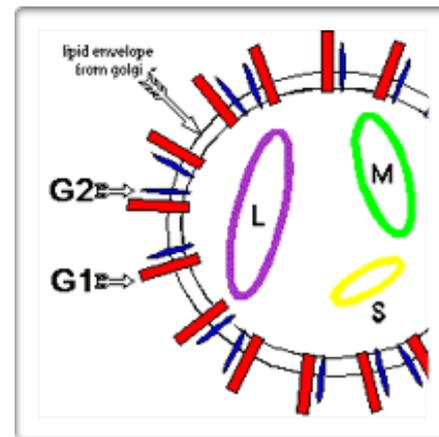
Bunyaviridae e Arenaviridae

Sono virus con pericapside, RNA a singolo filamento a polarità negativa e causano zoonosi.

Bunyaviridae

E' un gruppo enorme, con 200 sottotipi, con pericapside, RNA segmentato a singolo filamento (-). E' suddiviso in 4 generi, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e i decisamente più importanti *Bunyavirus* e *Hantavirus*.

Sono particelle sferiche, con diametro tra 90-120 nm. Il pericapside contiene due glicoproteine G1 e G2 e avvolge tre singoli RNA (-), il maggiore L, il medio M e il piccolo S, associati con la proteina a formare il nucleocapside. I nucleocapsidi includono l'RNA polimerasi RNA-dipendente, o proteina L, e due proteine non strutturali NS. Non hanno una proteina della matrice. La replicazione comincia con G1 che lega β -integrine e il virus viene endocitato, cui segue



l'acidificazione e la fusione del pericapside con l'endosoma, che provoca il rilascio del genoma nel citoplasma e l'inizio della sintesi dell'mRNA e delle proteine. Il filamento M codifica per G1, G2 ed una NS, il filamento L codifica per la proteina L (polimerasi) e il tratto S codifica per due proteine non strutturali NS. Tutti ad eccezione degli *Hantavirus* sono arbovirus. Si diffondono tramite un artropode vettore che li inietta in circolo ed inizia la viremia, e attraverso la viremia secondaria raggiunge i siti bersaglio. I *Bunyavirus* sono trasmessi da zanzare, zecche e mosche, che infettano uccelli e roditori, che diventano il serbatoio del virus continuando così il ciclo dell'infezione. L'uomo si infetta mediante contatto con l'insetto vettore. Molti membri di questa famiglia sono presenti in Sud America, Europa sud-orientale e Asia sud-orientale. Gli *Hantavirus* vengono trasmessi dai roditori e gli uomini li acquisiscono respirando aerosol contaminato da urina infetta, quindi si localizza nei polmoni causando patologia polmonare letale. Nel 1993 si è verificata un'epidemia nell'area "Four Corners" nel New Mexico. I *Bunyavirus* causano una sindrome simil-influenzale, con un periodo di incubazione di 3 giorni. Alcuni ceppi possono insorgere encefaliti (California) e febbre emorragiche (Rift Valley) molto raramente. Gli *Hantavirus* causano sindromi polmonari, con edema interstiziale polmonare, difficoltà respiratoria e morte. La rilevazione dell'RNA tramite RT-PCR è la metodica

di rilievo per l'identificazione di questi virus. Non esiste una terapia specifica per queste infezioni, la malattia può solamente essere prevenuta.

Arenavirus

Appartengono a questa classe i virus della corionmeningite linfocitaria (LCM) e della febbre emorragica come il virus di Lassa. Sono virus che derivano dai roditori. Al microscopio sono pleomorfi (120 nm di diametro), provvisti di pericapside, con RNA a singolo filamento circolare. Hanno un aspetto sabbioso, per via dei ribosomi adesi sul pericapside. Instaurano infezioni persistenti. Sono in grado di infettare macrofagi, che determinano rilascio di citochine che inducono danno cellulare e vascolare. Si riscontrano nelle zone tropicali dell'Africa e del Sud America. Infettano roditori e causano un'infezione asintomatica cronica in questi animali, che rilasciano il virus attraverso la saliva, urine e feci. Gli uomini assumono cibo contaminato o toccano oggetti contaminati. Causano come detto, **Corionmeningite linfocitaria**, ma a dispetto del nome, causa una malattia febbrile simil-influenzale con mialgie, piuttosto che meningite. La meningite, si potrebbe presentare, ma insorge 10 giorni dopo la fase iniziale e conduce ad una "restitutio ad integrum". La **febbre di Lassa** è ben più grave, endemica nell'Africa occidentale. E' una patologia caratterizzata da febbre, coagulopatia, petecchie e occasionalmente, emorragia viscerale, ma anche danni a cuore e fegato. La morte sopraggiunge nel 50% dei casi. Un'infezione da parte di *arenavirus* viene diagnosticata sui dati sierologici e molecolari grazie a RT-PCR. Non vengono effettuati di routine e il personale deve fare attenzione, perché è molto pericoloso, quindi i campioni sono processati in strutture specializzate nell'isolamento dei patogeni contagiosi. Il farmaco ribavirina ha attività limitata contro gli *arenavirus*, le infezioni si possono solamente prevenire evitando il contatto col vettore.

Retrovirus

La famiglia *Retroviridae* viene tradizionalmente suddivisa in 3 sottofamiglie, sulla base della patogenicità:

- 1) **Oncovirus**, che causano trasformazioni cellulari in vitro e in vivo. Il virus del sarcoma di Rous, il primo ad essere identificato, generava tumori solidi nei polli, e in seguito vennero isolati retrovirus associati a tumori, così vennero classificati come virus oncogeni a RNA, o **oncornavirus**, che alterano la crescita cellulare. Questi comprendono solo i retrovirus in grado di rendere immortali o trasformare le cellule bersaglio.
- 2) **Spumavirus**, che causano effetti citopatici in vitro, ma non ancora associati a patologia alcuna
- 3) **Lentivirus**, che inducono lentamente progressive compromissioni del sistema immunitario e neurologiche

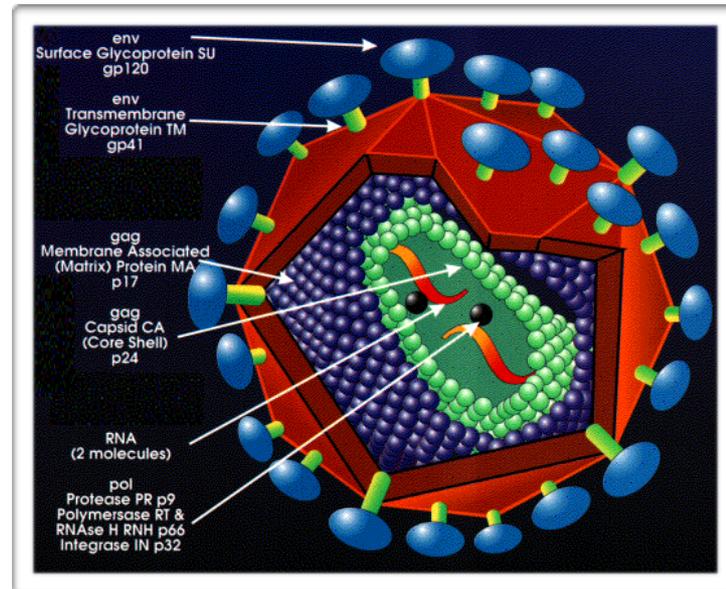
Recentemente sottodivisi in 7 generi, molto diffusi nel regno animale, con tropismo per diversi tessuti e associati a patologie talvolta molto diverse. L'ultima classificazione taxonomica della famiglia dei *Retrovirus* comprende *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus* (tra cui HTLV), *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus*.

Sono stati isolati e caratterizzati due retrovirus patogeni per l'uomo, **HIV** della famiglia *Lentivirus* (*human immunodeficiency virus*, con due sierotipi HIV-1 e HIV-2), e **HTLV** degli *Oncovirus* (*human T Lymphotropic virus*, con due sierotipi HTLV-1 e HTLV-2).

Struttura:

Hanno una membrana lipidica, un involucro glicoproteico Envelope, un Core virale interno costituito da diverse proteine che costituiscono un virione grossolanamente sferico, con diametro di 100-120 nm. Questo che contiene due catene identiche di **RNA genomico a singolo filamento a polarità positiva**, un enzima **DNA polimerasi RNA-dipendente**, da 10 a 50 copie di **trascrittasi inversa** che retrotrascrive l'RNA virale in DNA, che viene poi integrato nel genoma della cellula ospite a opera dell'**integrasi virale**. Due RNA di trasferimento cellulari, tRNA, che si associano a ciascuna copia del genoma mediante appaiamento di vasi e vengono utilizzati come

"primer" della trascrittasi inversa. Il genoma presenta un "cap" al 5' ed una coda poli A al 3'. Tutti quanti presentano 3 geni, *gag, pol env*. Questi geni codificano per poliproteine per i seguenti enzimi e proteine strutturali: *gag* (antigene gruppo-specifico, proteine del capsid, della matrice e che legano l'acido nucleico), *pol* (polimerasi, proteasi e integrasi), *env* (envelope, glicoproteine). A ciascuna estremità del genoma sono presenti le sequenze terminali lunghe e ripetute **LTR**, che contengono promotori, "enhancer" e sequenze geniche per legare diversi fattori trascrizionali cellulari. I virus oncogeni possono avere un oncogene che regola la crescita cellulare. I retrovirus come HTLV e HIV codificano per numerose proteine che accrescono la virulenza e che richiedono splicing. Le glicoproteine virali sono prodotte in seguito al taglio proteolitico della poliproteina codificata dal gene *env*. In HTLV-1 la glicoproteina gp62 dà origine a gp46 e gp21, in HIV la gp160 genera gp41 e gp120. Queste formano delle protuberanze sulla superficie, come dei lecca-lecca. L'antigenicità di gp120 e specificità del recettore possono variare nel corso dell'infezione.



La **trascrittasi inversa** è essenziale per la replicazione e possiede tre funzioni, DNA-polimerasi RNA-dipendente, poi DNA-polimerasi DNA-dipendente (simile alle DNA polimerasi cellulari) e RNasi H (ribonucleasi H, simile alle RNasi cellulari). Sono presenti circa 30 molecole per virione. Le DNA-polimerasi hanno un'*alta percentuale di errore* (circa mille 10mila volte superiore a quelle cellulari) e questo spiega almeno in parte, la frequente insorgenza di mutanti, responsabile della generazione di nuovi ceppi virali, promuovendo l'elusione del sistema immunitario. Leggendo il filamento di RNA-transfer (primer) costruisce un filamento di DNA virale (intermedio) utilizzando le basi puriniche e pirimidiniche trifosforilate dagli enzimi cellulari. Per la sue peculiarità è il principale bersaglio dei farmaci anti-HIV. L'alta percentuale di errori rende le particelle virali disomogenee, e ciò rende conto della difficoltà di identificare vaccini efficaci contro i diversi ceppi virali.

Replicazione:

La replicazione inizia col legame delle glicoproteine virali (gp120 e gp41 per HIV) al recettore primario, che nell'HIV è CD4 e ad un secondo recettore, un recettore per le chemochine a sette domini transmembrana associato a proteine G, o co-recettore, **CCR5** (virus monocitotropi; espresso da macrofagi, linfociti periferici, linfociti T) oppure **CXCR4** (virus linfocitotropi; viene espresso principalmente sui linfociti). Il legame al recettore per chemochine porta il pericapside virale e la membrana citoplasmatica ad unirsi, permettendo a gp41 di interagire e promuoverne la fusione. Questa fase è un bersaglio per farmaci antivirali (fusione dell'envelope virale gp41 con la membrana cellulare). HIV può anche legarsi all'integrina $\alpha 4\text{-}\beta 7$, sul tessuto linfoide associato all'intestino. Segue lo scapsidamento (uncoating) dell'RNA virale tramite la fusione con i lisosomi. Quando il genoma viene rilasciato nel citoplasma, inizia la fase precoce della replicazione. La **trascrittasi inversa** costruisce il provirus, DNA bicatenario del corredo genetico virale. Segue poi la retrotrascrizione di DNA con formazione di un ibrido RNA-DNA. L'RNA viene degradato sempre dalla trascrittasi grazie alla sua funzione di RNasi H. Segue poi la sintesi di un secondo filamento di DNA. Il DNA virale entra nel nucleo e si integra nel cromosoma della cellula ospite, durante la duplicazione della cellula, grazie all'**integrasi** virale. Segue la fase di quiescenza, o **LATENZA**. Infatti il DNA dell'HIV, e degli altri *Lentivirus*, può rimanere nel nucleo e nel citoplasma in forma a DNA circolare non integrato, finché la cellula non viene attivata. Una volta integrato, comincia la fase tardiva e il DNA virale (**provirus**) viene trascritto come un gene cellulare ad opera dell'RNA polimerasi II della cellula ospite, per formare un mRNA dal DNA virale. Il virus si comporta come un gene cellulare, la replicazione dipende dal grado di metilazione del DNA virale e dal ritmo di crescita cellulare, ma soprattutto dalla capacità della cellula di riconoscere gli "enhancer" e "promoter" codificate dalle LTR. Il gene viene trascritto quando la cellula viene attivata, e saranno dei segnali citochinici o mitogeni ad attivarla, e a risvegliare, dei segnali che arrivano in risposta ad altre infezioni, che produrranno così fattori di trascrizione che si legano a LTR, attivando la trascrizione del virus. Dopo la trascrizione del DNA in un mRNA segue la traduzione e poi la fase di scissione enzimatica (via proteasi virali) delle poliproteine in proteine mature.

La replicazione di HIV è regolata dai prodotti dei sei geni "accessori", *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu*, *vpr* (o *vpx*). Questi sono espressi diversamente nella fase precoce e nella fase tardiva.

I geni *tat* e *rev* sono codificanti per le proteine regolatrici:

- 1) **TAT**: Proteina essenziale RNA-binding che incrementa la trascrizione e la produzione di mRNA virale e quindi la sintesi delle proteine virali.
- 2) **REV**: Proteina essenziale RNA-binding che incrementa la stabilità e la fuoriuscita nucleare dell'RNA virale contenente introni, favorendo la produzione delle proteine virali tardive.

I geni *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* sono geni codificanti per le proteine accessorie:

- 1) **NEF**: Proteina che regola l'infettività virale. Ceppi virali privi di *nef* non sono infettanti. Aumenta la replicazione virale; è coinvolta nella diminuzione di espressione di CD4 e MHC I sulla superficie delle cellule infette. Ruolo nella patogenesi.
- 2) **VIF**: Proteina che incrementa l'infettività virale (APOBEC).
- 3) **VPR**: Proteina che incrementa l'infezione virale e/o la replicazione (entrata nucleare del PIC, attivazione della trascrizione virale, blocco del ciclo cellulare G2, induzione di apoptosi) ruolo nell'infezione dei macrofagi.
- 4) **VPU**: Proteina che incrementa la produzione di particelle virali e degradazione del CD4.

Le proteine tradotte dagli mRNA dei geni *gag*, *gag-pol* ed *env* vengono sintetizzate come delle poliproteine, e successivamente vengono tagliate nelle proteine funzionali. Le glicoproteine virali (*env*) vengono sintetizzate, glicosilate e processate nel RE e nell'apparato di Golgi. Queste glicoproteine vengono poi tagliate in subunità transmembrana ed extracellulari della proteina di adesione virale, tali proteine poi si associano a formare trimeri e si spostano verso la membrana citoplasmatica. Le poliproteine *gag* e *gag-pol* vengono acetilate e successivamente si legano alla membrana citoplasmatica che contiene la glicoproteina del pericapside. L'associazione di due copie del genoma virale e molecole di tRNA cellulare promuove la gemmazione del virione. Dopo l'incorporazione del pericapside e il rilascio del virus dalla cellula, la proteasi virale determina il taglio proteolitico delle

poliproteine *gag* e *gag-pol* in modo da rilasciare la trascrittasi inversa e formare il core virionico, assicurando così l'inclusione di tali componenti nel virione.

L'acquisizione del pericapside e il rilascio dei retrovirus avviene a livello della superficie cellulare. Il pericapside dell'HIV nella fase di gemmazione recupera delle proteine cellulari, tra cui le molecole MHC. La replicazione e la gemmazione dei retrovirus non uccidono sempre la cellula. L'HIV può diffondere da cellula a cellula mediante la produzione di cellule giganti multinucleate, i sincizi.

Vif è una proteina chiave per l'infettività di HIV-1 e una nuova speranza per lo sviluppo di innovativi farmaci antiretrovirali. È una proteina di HIV-1 la cui funzione recentemente compresa è fondamentale per la produzione di progenie virale infettante. Lega una proteina cellulare coinvolta nell'immunità innata contro i virus, o APOBEC3G, una citidina deaminasi che introduce mutazioni all'interno di DNA a singola elica esogeno (Virus). *Vif* induce la poliubiquitinazione di APOBEC3G e la conseguente degradazione. La degradazione di APOBEC3G consente l'efficiente produzione di progenie virale al virus HIV-1. La sua funzione è quella di legare ed inattivare APOBEC3G. I virus che non possiedono questo gene non riescono ad indurre la degradazione di APOBEC3G che viene incorporata nei virioni prodotti. APOBEC3G induce mutazioni nel DNA (-) prodotto durante la retrotrascrizione, compromettendo il ciclo replicativo del virus (tasso di mutazione superiore al limite di distruzione). La presenza di *vif* permette il legame con APOBEC3G e la sua conseguente degradazione; la progenie virale non incorpora APOBEC3G e la replicazione del genoma avviene in modo inefficiente (tasso di mutazione entro il limite di distruzione). Impedire il legame *Vif*-APOBEC3G o la degradazione di APOBEC3G sono nuove promettenti strategie per lo sviluppo di antiretrovirali di nuova generazione.

Schema riassuntivo della replicazione:

- 1) **Legame** gp120 a CD4 in congiunzione col co-recettore per le chemochine CXCR4 o CCR5.
- 2) **Fusione** dell'envelope gp41 con la membrana
- 3) **Entrata** del virus nella cellula. Qui finisce la fase a livello della superficie cellulare e comincia quella nel citoplasma.
- 4) **Scapsidamento** dell'RNA virale.

- 5) Costituzione del **Provirus** da parte della trascrittasi inversa virale.
- 6) **Retrotrascrizione** di DNA con formazione dell'**ibrido RNA-DNA**.
- 7) **Degradazione** dell'RNA grazie alla trascrittasi inversa (RNAsi H).
- 8) **Sintesi** del **secondo** filamento di DNA.
- 9) **Entra** il DNA nel **nucleo**. Qui finisce la fase nel citoplasma.
- 10) **Integrazione** nel DNA cellulare durante la replicazione della cellula mediata dall'integrasi virale.
- 11) **LATENZA**.

HIV o Virus dell'Immunodeficienza Umana

Patogenesi:

HIV è l'agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita AIDS, descritto inizialmente come sindrome in uomini omosessuali ad Haiti, ma anche negli USA; questi morivano a causa di infezioni opportunistiche normalmente benigne. Sono presenti due diversi sierotipi di questo virus HIV-1 e HIV-2. La principale caratteristica di questo virus è il tropismo virale per i linfociti T che esprimono CD4 e i macrofagi. L'immunosoppressione indotta da HIV è determinata dalla riduzione netta del numero dei linfociti T CD4, che così riduce le funzioni helper e quelle di ipersensibilità ritardato. HIV infetta soprattutto le cellule del sistema immunitario (cellule dendritiche, macrofagi e linfociti T) e cellule endoteliali. Causa effetti citopatici nelle cellule permissive, come sincizi, morte cellulare per apoptosi o necrosi. I macrofagi e i linfociti T CD4 sono i principali bersagli dell'HIV in vivo, e la loro infezione è in grado di spiegare tutte le alterazioni causate dal virus nei pazienti. Altre potenzialmente infettabili da HIV sono le cellule umane aventi il recettore virale CD4 sulla propria membrana, ma anche altre cellule che invece non lo possiedono come astrociti e oligodendrociti. Causa una deplezione lenta e progressiva dei linfociti TCD4 per uccisione diretta, formazione di sincizi, mediata da cellule killer e apoptosi; provoca la produzione elevata di Ig non specifiche per nessun agente patogeno (risposta immune inefficace); altera la funzione dei linfociti

killer, causa la disfunzione dei macrofagi, con mancato inizio della risposta immune per alterata presentazione dell'antigene, ridotta fagocitosi dei microrganismi (ad esempio a livello polmonare). Può causare delle alterazioni neurologiche come disfunzione e morte neuronale per produzione e rilascio da parte dei macrofagi cerebrali infettati di sostanze tossiche cellulari e virali.

Risposta immunitaria:

La risposta immunitaria ad HIV limita l'infezione virale, ma contribuisce alla patogenesi. Vengono prodotti anticorpi anti-gp120, tuttavia il virus opsonizzato è ancora infettivo e può entrare nei macrofagi per endocitosi. Le T CD8 sono importanti per il controllo della progressione della malattia, perché possono uccidere le cellule infettate, ma i linfociti T CD8 necessitano dell'attivazione mediante i linfociti T CD4, quindi il numero dei T CD8 diminuisce assieme a quello dei T CD4, correlato alla progressione della malattia. HIV può eludere il sistema immunitario in vari modi, ma il più significativo è la capacità di subire delle mutazioni che alterano l'antigenicità ed eludere gli anticorpi. HIV compromette l'intero sistema immunitario per via della distruzione dei T CD4. Il decorso della malattia da HIV va di pari passo con la riduzione del numero di linfociti T CD4 e con la carica virale nel sangue.

Dopo la trasmissione sessuale, HIV infetta linfociti T CD4 del GALT, tessuto linfoide associato all'intestino. Durante la fase acuta c'è un incremento enorme della produzione del virus. Durante il periodo di latenza la viremia cala, ma la replicazione continua a livello dei linfonodi. Il virus rimane latente nei macrofagi e nei linfociti T quiescenti. Nella fase tardiva della malattia, la carica virale nel sangue aumenta e i T CD4 diminuiscono in maniera significativa, così come anche i T CD8, la struttura dei linfonodi viene compromessa e si va incontro ad immunosoppressione. La perdita dei linfociti T CD4 causa anche la non attivazione dei macrofagi, linfociti T stessi e B, che necessitano dei segnali citochinici per attivarsi; in questo quadro, l'individuo può contrarre infezioni intracellulari caratteristiche dell' AIDS, come funghi e batteri intracellulari ad esempio. Oltre immunodepressione, HIV può causare disturbi neurologici, perché microglia e macrofagi sono cellule infettate dal virus, che possono rilasciare, dopo l'infezione, delle sostanze neurotossiche e fattori chemiotattici, che richiamano la risposta infiammatoria a livello cerebrale, causando la morte di neuroni.

Epidemiologia:

L'AIDS è stato individuato inizialmente nei maschi omosessuali, ma poi si è propagato anche agli eterosessuali. La prima infezione che l'uomo ha contratto, è avvenuta probabilmente nell'Africa, durante gli anni 30' e poi si è diffuso a tutto il mondo.

I casi di HIV-1 si stanno diffondendo in tutto il mondo, con più elevato numero in Africa, Asia e USA. Hiv-2 è principalmente presente in Africa. La trasmissione eterosessuale è la principale modalità di diffusione di entrambi i sierotipi. HIV-2 provoca una malattia simile all'AIDS, ma con minore gravità.

Il virus è presente nel sangue, nel liquido seminale e nelle secrezioni vaginali delle persone infettate. Questi fattori ed il lungo periodo asintomatico di infezione hanno favorito la diffusione della malattia, mediante contatto sessuale ed esposizione a sangue ed emoderivati contaminati. Il virus può essere trasmesso anche al feto e ai neonati di madri infetti (trasmissione verticale). Non può essere trasmesso con contatto causale, baci, tosse o starnuti, né punture di insetti, acqua, cibi, utensili etc.

Le persone più a rischio sono le persone sessualmente attive, che non usano precauzioni, tossicodipendenti e loro partner sessuali, i neonati da madri HIV-sieropositive. Gli aghi utilizzati per i tatuaggi e gli inchiostri contaminati sono altri potenziali strumenti di trasmissione HIV. Prima del 1985 le persone che subivano trasfusioni di sangue o che ricevevano trapianti d'organo, e gli emofiliaci che ricevevano fattori di coagulazione erano ad alto rischio di contrarre HIV. Attualmente lo screening delle banche del sangue e dei trapianti ha eliminato questo problema. Gli operatori sanitari sono però a rischio di contrarre accidentalmente questa infezione.

Sindromi cliniche:

L'AIDS è una patologia che progredisce da infezione aspecifica asintomatica a grave immunocompromissione, o AIDS conclamato.

La prima fase segue l'entrata del virus nell'organismo. Vengono così infettate le cellule locoregionali, macrofagi, cellule dendritiche e linfociti T CD4 helper. La fase clinicamente latente può durare da un minimo di 4-6 settimane a solitamente non più di sei mesi. Vediamo una rapida e abbondante replicazione virale, con assenza di produzione anticorpale contro HIV (soggetto infettato, ma sieronegativo, o periodo finestra).

La seconda fase è una fase acuta o infezione primaria. Ci sono sintomi aspecifici (simil-mononucleosici o simil-influenzali). Compaiono gli anticorpi anti-HIV (sieropositività). La carica virale è elevatissima (oltre un milione di copie di RNA virale/ml), cui segue una deplezione massiva di linfociti T CD4. Il controllo avviene attraverso immunità umorale e cellulare.

La terza fase è un periodo asintomatico, una latenza clinica, che va da pochi mesi a 15 anni, dove non si manifestano i segni clinici della malattia. La replicazione virale continua e abbonda nei linfonodi, con circa 10 miliardi di particelle/die prodotte ed eliminate ogni giorno. La carica virale è di 10-100mila copie di RNA/ml. Un miliardo di linfociti T CD4 vengono uccisi ogni giorno, controbilanciati dalla neoproduzione di linfociti da parte del timo.

La quarta fase è la fase sintomatica, dove vediamo una carica virale ancora più elevata, con oltre 100mila copie di RNA/ml, fino ad un milione di diverse varianti genetiche virali. Un danno al sistema immunitario viene indicato da un'aumentata suscettibilità a patogeni opportunisti. I linfociti T CD4 calano e quando scendono sotto la soglia dei 300/mm³ compaiono i primi sintomi, come candida, herpes, deperimento organico, primi segni di alterazioni neurologiche; quando scendono al di sotto dei 200/mm³ compaiono infezioni da germi opportunisti (*pneumocystis carinii*, cytomegalovirus, micobatteri atipici, toxoplasma, etc), possono comparire tumori rapidamente fatali (linfomi e carcinomi), sarcoma di Kaposi e demenza AIDS-associata.

L'AIDS può esordire con varie manifestazioni, fra le quali linfadenopatia e febbre, infezioni opportunistiche, neoplasie e demenza AIDS-associata.

- 1) **Linfadenopatia e febbre:** la combinazione di questi sintomi viene detta complesso AIDS-correlato (ARC). Insorge in modo insidioso, accompagnata da malessere e perdita di peso. Si osservano infezioni opportunistiche, diarrea, sudorazione notturna e affaticamento.
- 2) **Infezioni opportunistiche:** le infezioni benigne causate da *Candida albicans* e altri batteri, in individui con AIDS possono causare patologie gravi. Una delle principali patologie è la polmonite, causata da *Pneumocystis jirovecii*. Si riscontrano toxoplasmosi cerebrale, meningite criptococcica, infezioni virali come il mollusco contagioso, *pervovirus*, *herpesvirus* e *cytomegalovirus* (che causa retinite specialmente).

3) **Tumori maligni:** una delle neoplasie caratteristiche dei pazienti affetti da AIDS è sicuramente quella del **sarcoma di Kaposi**, associato all'*herpesvirus* umano di tipo 8, rara neoplasia della cute che in pazienti immunodeficienti si dissemina fino a coinvolgere organi interni.



4) **Demenza associata all'AIDS:** la demenza associata all'AIDS può derivare da un'infezione da HIV nei macrofagi e nella microglia cerebrale; così si va incontro a deterioramento delle capacità intellettive e manifestare segni di disturbi neurologici, come Alzheimer.

I fattori che possono influenzare l'evoluzione della malattia, accelerandone il decorso, sono immunocompromissione, inoculo ripetuto nel tempo di HIV e attivazione linfocitaria per via dei patogeni opportunisti.

Diagnosi:

I test sierologici possono documentare l'infezione da HIV, ma non possono rivelare le persone infettate da poco. La presenza di RNA virale nei campioni di sangue, dell'antigene virale p24 o della trascrittasi inversa indicano infezione recente o stadio tardivo. L'RNA virale nel sangue può essere individuato mediante retrotrascrizione seguita da PRC, o RT-PCR.

Gli anticorpi sono rilevabili dalle 6-12 settimane dall'infezione e presenti in tutti i pazienti entro i 6 mesi. Per lo screening di routine viene utilizzato il test di ELISA, reazioni immunoenzimatiche, ma non individua infezioni recenti. Vengono sempre fatti dei test di conferma, ad esempio col Western Blot, che determina la presenza di anticorpi che riconoscono p24 e glicoproteine virali gp120/160. I campioni positivi vengono rivalutati con test di conferma. Gli anticorpi contro p17, p24, p55 sono precoci e diminuiscono, mentre anticorpi contro gp160 e gp120 sono più tardivi e sono persistenti. ELISA e Western Blot hanno una specificità intorno al 100%.

Anche la concentrazione dei linfociti T è un parametro importante e indicativo.

Trattamento, prevenzione e controllo:

Le potenziali terapie antivirali nell'infezione da HIV possono essere raggruppate in inibitori della fusione/penetrazione, analoghi nucleosidici/inibitori della trascrittasi inversa, inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, inibitori delle proteasi o

dell'integrasi. La maggior parte dei farmaci in questi gruppi provocano dei danni collaterali.

Gli inibitori della fusione-penetrazione, inibiscono il legame al co-recettore CCR5, con un recettore antagonista, inibendo l'infezione iniziale. Di questa categoria fanno parte Maraviroc (inibitore del CCR5).

L'inibizione dell'integrasi impedisce gli eventi successivi alla replicazione del virus, e di questa fa parte Raltegravir.

Per gli analoghi nucleosidici inibitori della trascrittasi inversa vediamo Azidotimidina (AZT), la prima terapia efficace anti HIV. Questi farmaci ostacolano la replicazione virale, bloccando la sintesi del cDNA. Questi farmaci vengono fosforilati da enzimi cellulari ed incorporati in cDNA mediante la trascrittasi inversa, determinando la terminazione della catena.

Gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, come Nevirapina, inibiscono l'enzima.

Gli inibitori della proteasi bloccano la morfogenesi del virione, inibendo il taglio delle poliproteine *gag* e *gag-pol*, così il virione derivato è inattivo.

La terapia attualmente prevede la somministrazione di un cocktail di diversi farmaci antivirali chiamati trattamento antiretrovirale altamente attivo o HAART. La miscela di farmaci, con diversi meccanismi d'azione, presenta minore probabilità di resistenze. La terapia con più farmaci è in grado di abbassare il livello del virus nel sangue e valori vicini allo zero, riducendo sia morbilità che mortalità. La scelta del programma dipende comunque dalla risposta del paziente, dal costo e da altri parametri. La terapia dovrebbe essere somministrata anche in individui che mostrino sintomi AIDS, o se i linfociti T siano al di sotto dei 200 per microlitro. Viene consigliata anche come profilassi da post-esposizione con un soggetto HIV-positivo. E' costosa e può essere necessario assumere più pillole giornalmente, in più ogni farmaco ha i suoi effetti collaterali.

Il modo più semplice per limitare la diffusione è l'educazione sanitaria. Non è disponibile attualmente un vaccino anti-HIV, ma sono in fase di studio.

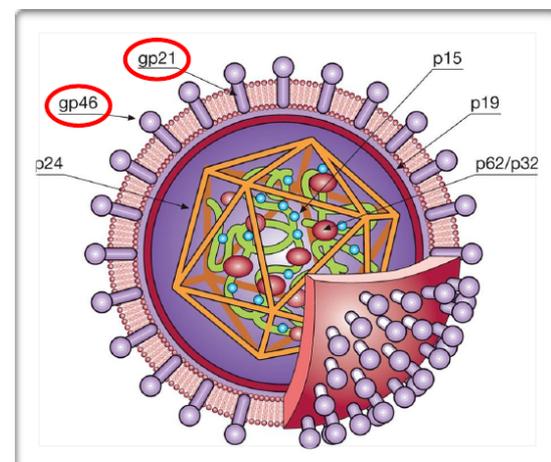
Virus umano T-linfotropico

I retrovirus trasformanti agiscono con diversi meccanismi, a volte legati all'attivazione di oncogeni (sequenze geniche di origine cellulare spesso in gioco nella trasformazione tumorale) o ai protooncogeni (sequenze geniche cellulari normali, la cui iperattivazione, dovuta per esempio a retrovirus, può portare a trasformazione tumorale). Durante la replicazione i retrovirus possono:

- 1) Inserire nel proprio genoma uno o più geni cellulari (oncogeni) senza perdere alcun gene virale (es. virus del sarcoma di Rous). In questo caso i virioni sono replicazione-competenti, e la amplificazione dell'oncogene causa tumori a rapida crescita (sarcomi).
- 2) Inserire nel proprio genoma uno o più oncogeni, perdendo un gene virale. Tali virus sono difettivi (necessitano per la replicazione un virus helper che presti le sue funzioni) ma replicano rapidamente il proprio oncogene causando tumori a rapida crescita (sarcomi).
- 3) Mantenere intatto il proprio genoma inserendosi nel genoma cellulare in prossimità di protooncogeni. Tali virus sono replicazione-competenti, e, attivando il proto-oncogene cellulare determinano la trasformazione cellulare (leucemie).
- 4) Integrarsi a Random nel genoma cellulare, mantenere intatto il proprio patrimonio genetico, non inserire alcun oncogene nel proprio genoma, essi invece producono proteine virali regolatrici, che da un lato attivano la replicazione virale, e dall'altro attivano alcuni "promoter" cellulari posti anche lontano dal sito di integrazione del virus. Tali promoter cellulari, a loro volta, innescano la trasformazione cellulare. Questi virus (HTLV-1 e HTLV-2) sono replicazione-competenti e inducono leucemie nell'uomo.

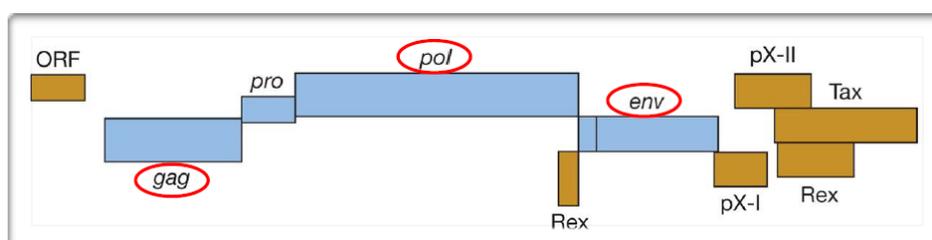
Struttura di HTLV-1:

Il diametro del virione è di 100 nm. Ha un nucleocapside icosaedrico centrale, un Envelope con glicoproteine gp46 (di superficie) e gp21 (transmembrana). Possiede due copie identiche di RNA a singolo filamento di polarità positiva. La proteina p24 è quella del capsid, p15 del nucleocapside, p62/p32 è la trascrittasi inversa e p19 la proteina della matrice.



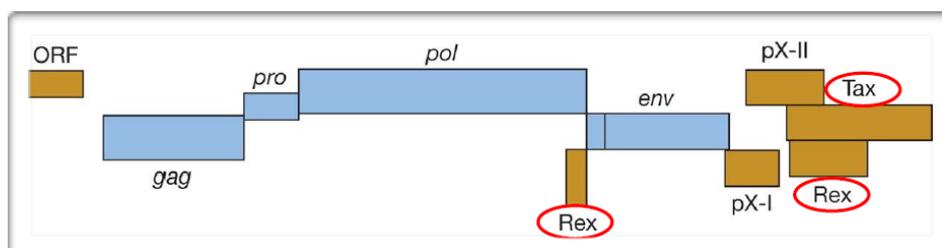
Il genoma di HTLV-1 possiede dei geni codificanti per proteine strutturali, che sono il gene *gag*, *pol* ed *env*.

- 1) Gag codifica per la proteina p19 della matrice, per la proteina p24 del capside e per la proteina p15 del nucleocapside.
- 2) Pol codifica per la trascrittasi inversa, per RNAsi e per l'itegrasi.
- 3) Env codifica per gp46 e gp21, la cui funzione è quella di legarsi al recettore cellulare, innescando l'infezione della cellula bersaglio e il ciclo di replicazione virale.



Il genoma possiede anche altri geni, che codificano per proteine regolatorie/ accessorie, che sono *orf I* e *orf II*.

- 1) Orf I codifica per una piccola proteina di 12Kd (p12) in grado di alterare il rilascio di calcio dalle cellule infette, di attivare la trascrizione di fattori nucleari e il recettore per IL-2. E' localizzata a livello del RE e del Golgi. Non è necessaria per la replicazione virale, ma attiva la proliferazione cellulare e contribuisce all'infettività virale.
- 2) Orf II codifica per una proteina di 30Kd (p30), che si localizza nel nucleo e nel nucleolo e sembra avere una funzione di regolazione negativa della replicazione virale, riducendo il livello di p40 (tax) e p27 (rex) nelle cellule infette, agendo a livello post trascrizionale. Queste due proteine regolano la replicazione virale. Tax è un attivatore trascrizionale e aumenta la trascrizione del genoma virale. Ha la capacità di trans-attivare i geni cellulari che codificano fattori di crescita: IL-2 (e IL-Recettore), GM-CSF, e protooncogeni, come C-fos e C-jun.



Avvenuto l'assemblaggio del virione, la progenie virale fuoriesce dalla cellula mediante gemmazione. La diffusione successiva dei virioni liberi (scarsamente infettanti) sembra avvenire efficacemente solo attraverso un complesso processo di adesione cellulare. Gli HTLV sono dei virus scarsamente replicativi e in vivo l'amplificazione dell'infezione sembra fondamentalmente avvenire mediante espansione policlonale delle cellule infette (sinapsi virale).

Il virus è presente sotto forma di provirus nelle cellule tumorali dell'ospite, ma non nelle cellule non trasformate. La trasmissione può avvenire da madre a figlio, tramite contatto sessuale e per via parenterale. I virus leucemici sono in grado di replicarsi, ma non sono in grado di trasformare le cellule in vitro. Inducono la formazione di tumori dopo un lungo periodo di incubazione che è di almeno 30 anni. HTLV-1 causa la leucemia acuta a cellule T dell'adulto ATLL e una mielopatia associata.

Patogenesi:

HTLV-1 è un virus associato alle cellule e si trasmette come l'HIV. Entra in circolo ed infetta T CD4 e cellule di tipo DTH. Queste hanno la tendenza a rimanere a livello cutaneo, contribuendo ai sintomi dell'ATLL. La leucemia delle cellule T dell'adulto è solitamente monoclonale. Nelle cellule infettate e stimolate alla crescita, si possono accumulare mutazioni e riarrangiamenti che possono causare la leucemia. Sono prodotti anticorpi che riconoscono la gp46 e altre proteine di HTLV-1.

Epidemiologia:

HTLV-1 è trasmesso e acquisito attraverso le stesse vie di HIV. Le zone endemiche sono quelle a basso livello socio-economico come il Sud del Giappone, Caraibi, Africa centrale e tra gli Americani Africani nel Sud-Est degli USA. Sono 10-20 milioni le persone infette in tutto il mondo di cui più di un milione solamente in Giappone. Si sta osservando un incremento delle infezioni in Europa e America. La maggiore incidenza ricade tra le persone anziane. HTLV-2 sebbene molto raro si riscontra nei nativi americani. L'iniezione endovenosa di droghe e la trasfusione di sangue stanno diventando le vie più importanti di trasmissione del virus.

Sindromi cliniche:

La **leucemia acuta a cellule T dell'adulto ATLL** è stata individuata agli inizi degli anni '70 del secolo scorso. Insorge dopo un periodo estremamente lungo di latenza e può presentarsi in due forme, una fulminante, che porta a morte in breve tempo, ed una più lieve, con tempo di sopravvivenza di anni. In entrambi i casi possono riscontrarsi paraparesi spastica cronica, debolezza degli arti inferiori con iperflessia, segno di Babinski positivo, linfadenopatia, epatosplenomegalia, ipercalcemia, lesioni cutanee, diffusa linfadenopatia, infezioni opportunistiche e manifestazioni del SNC. La patogenesi è da ricondursi fondamentalmente alla proteina codificata *Tax*.

La **mielopatia HTLV** associata a paraparesi spastica tropicale (HAM/TPS) è stata identificata per la prima volta nel 1985 ed è caratterizzata da: sindrome demielinizzante progressiva, astenia, rigidità, ottundimento, parestesie degli arti inferiori, poliuria, incontinenza e danno cellulare a livello del SNC causato da linfociti T citotossici HTLV-specifici e dall'attivazione di numerose citochine e da p40Tax.

Diagnosi di laboratorio:

La ricerca degli anticorpi viene effettuata mediante reazioni immuno-enzimatiche (ELISA e IB-immunoblotting). La sieropositività viene stabilita quando sono presenti anticorpi nei confronti di proteine codificate da *gag* (p19, p24) e da *env* (gp46 e gp21). Vengono effettuati Test di biologia molecolare (PCR) che permettono l'amplificazione di specifiche e peculiari sequenze nucleotidiche nelle cellule mononucleate del sangue periferico. La PCR viene anche utilizzata per evidenziare la presenza del genoma virale (DNA provirale) nel liquor e/o nei tessuti tumorali provenienti da pazienti con ATLL.

Terapia:

E' stata utilizzata, ma senza successo, la combinazione di AZT e IFN- α . AZT causa la terminazione della catena, mentre IFN- α , ha effetto anti-proliferativo sulle cellule ed è utilizzato per la cura di altre leucemie. Dal momento che nessun trattamento farmacologico è risultato al momento efficace per le forme aggressive di ATLL, lo sviluppo di un vaccino risulterebbe cruciale, ma nonostante la stabilità del genoma e la presenza accertata di anticorpi neutralizzanti nei soggetti sieropositivi, la mancanza di un appropriato modello animale rappresenta un ostacolo per lo sviluppo di un vaccino efficace. Al momento si studiano vaccini con gp46 e p40tax sulle scimmie.

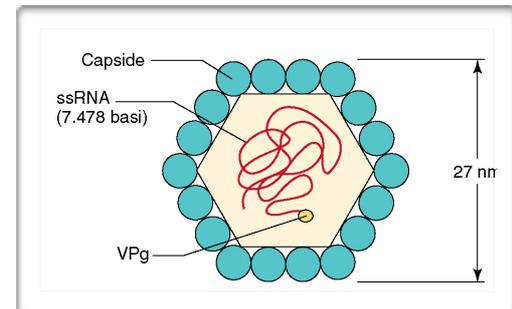
Virus dell'Epatite

Comprendono almeno 6 virus, indicati con le lettere da A ad E, oltre al virus G. Tutti questi virus infettano elettivamente l'epatocita causando nel fegato alterazioni necrotiche e infiammatorie, con classico sintomo di ittero e aumento degli enzimi epatici. Tutti possono causare delle epatiti acute, ma HBV, HCV e HDV possono essere seguiti da un'epatite cronica. Si trasmettono principalmente per il circuito oro-fecale.

Virus dell'Epatite A (HAV)

E' un *Picornavirus* ed è stato chiamato *enterovirus 72*, ma è stato classificato nel nuovo genere *Heparnavirus* in base al proprio genoma.

E' costituito da un **capside icosaedrico nudo** di 27 nm, che circonda un genoma a **RNA a singolo** filamento a polarità **positiva** di circa 7.470 nucleotidi. Presenta una proteina VPg attaccata all'estremità 5' e una coda poli A all'estremità 3'. Il capsid è resistente ad acidi. E' presente un solo sierotipo. La replicazione è simile agli altri *picornavirus*. HAV interagisce specificamente con un recettore espresso sugli **epatociti**, non è citolitico e viene rilasciato per esocitosi. Dopo l'ingestione HAV entra in circolo attraverso l'orofaringe o attraverso l'epitelio intestinale, andando così a raggiungere il fegato, dove si replica negli epatociti e nelle cellule di Kupffer. I virioni prodotti sono rilasciati nella bile ed eliminati nelle feci, dove si può riscontrare circa 10 giorni prima della comparsa dei sintomi. Si replica senza effetti citopatici, anche se le natural killer, IFN e linfociti T CD8 siano necessari per la lisi delle cellule infettate. Gli anticorpi prodotti poi favoriscono il danno. La risposta umorale e cellulo-mediata è responsabile dei sintomi, come l'ittero, conseguente al danno epatico. La protezione anticorpale permane per tutta la vita. HAV non cronicizza e non è associato all'epatocarcinoma. Il 40% dei casi di epatite è causato da HAV. Il virus diffonde velocemente nelle comunità, perché questo infetta prima della comparsa dei sintomi. Il virus viene rilasciato nelle feci e si trasmette per via oro-fecale, tramite acqua e alimenti contaminati e mediante mani sporche. HAV è resistente a detersivi, acidi (pH 1), a una temperatura di 60°C e sopravvive in acqua dolce e salata. Le acque contaminate possono infettare i molluschi, che sono importanti serbatoi virali. Le epidemie da HAV hanno origine da una sorgente



comune, come gli asili, o un ristorante. La diffusione è prevalentemente asintomatica ed il periodo di incubazione è lungo, caratteristiche che favoriscono la diffusione del virus e rendono difficile identificarne la fonte. I sintomi causati sono attribuibili al danno immuno-mediato epatico. I sintomi compaiono improvvisamente, dopo 15-20 giorni dopo l'esposizione e si intensificano 4-6 giorni prima dell'ittero. I sintomi iniziali prevedono febbre, astenia, nausea, anoressia e dolori addominali, così come urina scura, feci ipocoliche e prurito. L'ittero si osserva nell'80% degli adulti, ma solo nel 10% dei bambini, che generalmente hanno una patologia più lieve. Durante l'ittero i sintomi diminuiscono. Nel 99% dei casi si verifica una completa guarigione dopo 2-4 settimane dall'esordio. L'epatite fulminante, invece, è associata ad una mortalità dell'80%. Non sono associati disturbi da immunocomplessi. La diagnosi è prevalentemente determinata dal decorso clinico, ma l'approccio diagnostico di scelta per determinare l'infezione da HAV è il rilevamento delle IgM anti-HAV, mediante ELISA. E' possibile ridurre la diffusione del virus interrompendo la trasmissione oro-fecale del virus, come l'eliminazione di acqua o cibo potenzialmente contaminati, come i molluschi non cotti. Le condizioni igieniche sono fondamentali. Nella maggior parte dei casi la profilassi con Ig a meno di due settimane dall'esposizione è positiva nel prevenire la patologia. E' disponibile un vaccino da HAV ucciso, favorito dal fatto che il virus ha un solo sierotipo e che infetta solo l'uomo.

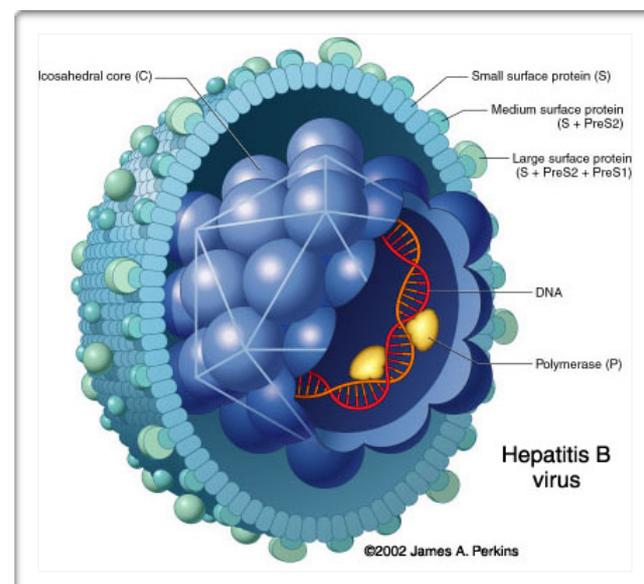
Virus dell'Epatite B (HBV)

E' il principale membra degli *Hepadnavirus*. Ha un tropismo tissutale molto limitato, infetta il fegato, ed in maniera minore pancreas e reni dell'uomo e dello scimpanzé.

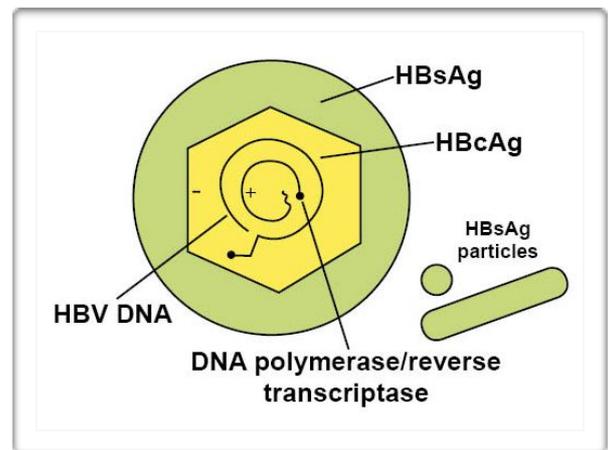
E' un piccolo virus dotato di **pericapside** e con un

DNA circolare, parzialmente a doppio filamento, costituito da 3.200 paia di basi.

Codifica una retrotrascrittasi, che formerà un intermedio a RNA per la replicazione, caratteristica unica di questo virus. Il virione, chiamato particella di Dane, ha un diametro di 42 nm. Questi, a dispetto dei virus provvisti di pericapside, sono stabili, perché resistono a trattamento con etere, ad un basso pH, al congelamento e riscaldamento moderato, cosa che favorisce la propria trasmissione.



Il virione contiene una protein-chinasi, una polimerasi con attività retrotrascrittasi e una ribonucleasi H. Il capside icosaedrico è formato dall'antigene del core dell'epatite B, proteina C o **HBcAg**, e il pericapside contiene tre forme dell'antigene glicoproteico di superficie dell'epatite B o **HBsAg**, poi troviamo l'antigene proteico dell'epatite B o **HBeAg**, intimamente associato al nucleocapside ed il suo ruolo non è chiaro, ma è indicatore di replicazione virale; **HBx** è una proteina di regolazione con proprietà trans-attivanti, fungendo da promotore della replicazione virale; al DNA è associato il prodotto del gene **P**, una DNA polimerasi RNA-dipendente e RNasi (trascrittasi inversa). Le particelle che contengono HBsAg sono rilasciate nel siero delle persone infette e sono in soprannumero rispetto ai virioni totali. Queste particelle possono essere sferiche (22 nm) o filamentose (spesse 22 nm e lunghe da 100 a 700 nm). HBsAg comprende 3 glicoproteine, codificate dallo stesso gene e da un unico trascritto, ma sono tradotte in proteine a partire da diversi codoni di inizio AUG:



- 1) La proteina **S**, o gp27 di 27kDa, completamente contenuta nella M. E' il maggiore componente delle particelle di HBsAg, associandosi in particelle sferiche di 22 nm che sono rilasciate dalla cellula. Le filamentose sono formate sempre maggiormente dalla S, ma anche da M e L, insieme ad altre proteine e lipidi
- 2) La proteina **M**, o gp36 di 36kDa, che comprende la S e che è compresa nella glicoproteina L
- 3) La proteina **L**, o gp 42 di 44kDa. Questa lega il virus ai recettori sulle cellule epatiche da un lato, e dall'altro lega il pericapside al capside assemblando così il virione.

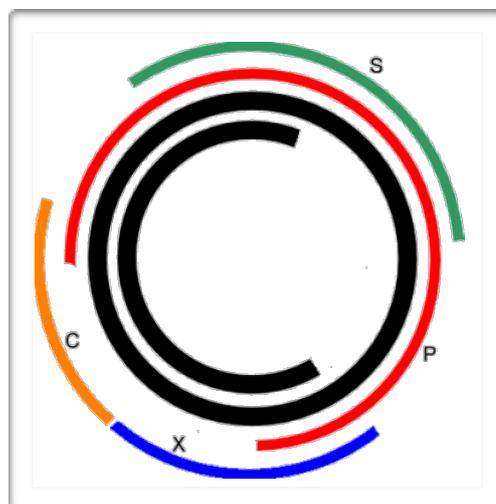
Sono noti almeno 10 sottotipi sierologici di HBV. L'HBsAg ha un epitopo gruppo specifico **a**, e almeno 2 epitopi alternativi tra loro: **d** o **y**, **e**, **w** o **r**. Pertanto si hanno 4 fenotipi principali adw-adr-ayw-ayr. I mutanti di evasione hanno mutazioni nel gene S e non sono neutralizzati dagli anticorpi di HBsAg. I mutanti HBe-negativi sono comparsi recentemente ed hanno rapida diffusione nei paesi mediterranei, hanno una mutazione nella regione pre-core che non fa esprimere l'antigene HBe.

Replicazione:

La replicazione di HBV è unica, come detto, ha un elevato tropismo per il fegato e si replica mediante un RNA intermedio e produce e rilascia particelle antigeniche HBsAg assieme ai virioni, che sono immunogene.

L'adesione non è ben chiara, ma è mediata dalla glicoproteina HBsAg, e sono stati solamente ipotizzati coinvolgimenti di alcuni recettori, come il recettore per la transferrina, comunque si lega all'albumina umana polimerizzata, che può facilitare il legame e l'assorbimento del virus da parte del fegato. Dopo la penetrazione, il DNA parzialmente a doppio filamento del virus viene completato con la formazione di un DNA circolare a doppio filamento completo ad opera di enzimi presenti nel core, e così il genoma viene rilasciato nel nucleo. A

questo punto comincia la trascrizione del genoma nell'intermedio a RNA. Il DNA viene trascritto da punti di partenza diversi sul genoma circolare, ma con la stessa estremità 3'. Esistono tre classi maggiori e due classi minori di RNA messaggeri sovrapposti. L' mRNA di 3.500 basi è quello maggiore ed è più lungo del genoma; questo codifica per gli antigeni HBc e HBe, per la polimerasi e per un innesco proteico per la replicazione del DNA (poi questo mRNA fungerà



anche da stampo per la replicazione del genoma). L'mRNA di 2.100 basi codifica per le glicoproteine S e M. L'mRNA di 2.400 basi codifica per la proteina L. L' mRNA di 900 basi codifica per la proteina X. Dopo la trascrizione nel nucleo, l'mRNA migra nel citoplasma e viene tradotto in proteine. Le proteine del core si assemblano attorno all'mRNA di 3.500 basi, viene impacchettato nel nucleocapside del core, che contiene la DNA-polimerasi RNA-dipendente, la proteina P. Questa proteina ha attività di retrotrascrittasi e di ribonucleasi H, ma manca l'attività di integrasi dei retrovirus. L'RNA di 3.500 basi agisce da stampo e viene sintetizzato il DNA a polarità negativa, a partire dall'innesco proteico della proteina P, che rimane legato covalentemente all'estremità 5'. L'RNA viene poi degradato dalla ribonucleasi H mentre viene sintetizzato il DNA a polarità positiva, a partire dal filamento di DNA negativo che funge così da stampo grazie all'attività di una retrotrascrittasi presente nel core. Questo processo viene interrotto dal processo di rivestimento del

nucleocapside, prima che quindi il DNA a polarità positiva sia completato ed il virione viene rilasciato dall'epatocita per esocitosi.

Può essere integrato nell'epatocita anche l'intero genoma, tuttavia non si conosce il valore di questa caratteristica, anche se è evidenziabile in casi di epatocarcinoma.

Patogenesi:

Può causare epatopatia cronica o acuta, sintomatica o asintomatica. L'identificazione di HBsAg e HBeAg nel sangue indicano la presenza di infezione attiva. La maggiore fonte infettante è il **sangue**, anche se HBV può essere presente nella saliva, nel liquido seminale, nel latte, nelle secrezioni vaginali e mestruali e nel liquido amniotico. La via di contagio più efficiente è l'immissione in circolo, ma le vie più frequenti sono il contatto sessuale ed il parto. Il virus si replica nel fegato entro 3 giorni dall'infezione e i sintomi possono risultare inosservati per 45 giorni. Si replica con danni citopatologici minimi. L'immunità è responsabile della sintomatologia e della risoluzione dell'infezione, con l'eliminazione dell'epatocita infettato. L'antigene HBc è un epitopo rilevante per il linfocito T, in assenza del quale l'individuo ha un'epatite cronica, o una sintomatologia lieve o mancata risoluzione dell'infezione. Gli anticorpi possono proteggere dall'infezione iniziale impedendo l'arrivo del virus al fegato, anche se una quantità in eccesso di HBsAg va a bloccare l'attività neutralizzante degli anticorpi fisicamente. Gli immunocomplessi formati contribuiscono alle patologie classiche da immunocomplessi, quindi vasculite, glomerulonefrite e artrite. Durante la fase acuta dell'infezione il parenchima epatico presenta delle degenerazioni, che consistono in rigonfiamento cellulare e necrosi, maggiormente in quegli epatociti che circondano la vena centrolobulare. La risoluzione dell'infezione permette al rigenerazione del parenchima, ma infezioni fulminanti, croniche attive o la coinfezione con l'agente δ possono portare a danno epatico permanente e cirrosi.

Epidemiologia:

L'esistenza di numerosi portatori cronici asintomatici, che eliminano il virus nel sangue e in altre secrezioni corporee favoriscono la diffusione di questo virus. Si trasmette principalmente per via perinatale, parenterale e sessuale. Avviene tramite sangue o componenti ematici in corso di trasfusione, scambio di siringhe, agopuntura, piercing o tatuaggi, contatti sessuali e parto. Anche il personale sanitario è a rischio di infezioni accidentali con materiali da lavoro appuntiti. Nel mondo una persona su tre viene infettata da HBV, con circa un milione di morti l'anno. Nel Sud-

Africa e nel Sud-est asiatico il grado di sieroconversione è del 50% ed è endemico il PHC, o carcinoma epatocellulare primario.

Sindromi cliniche:

- **Infezione acuta**

HBV nei bambini è meno grave e può essere asintomatico, ma la malattia clinicamente evidente si manifesta nel 25% dei casi. Incomincia con un lungo periodo di incubazione e poi ha un esordio insidioso, con sintomi durante il periodo prodromico come febbre, malessere, nausea, vomito, che precedono i classici sintomi, ossia **ittero, urina scura e feci ipocoliche**. La guarigione si manifesta con diminuzione della febbre e ricomparsa dell'appetito. Nell'1% dei pazienti itterici si manifesta epatite fulminante, con gravi danni epatici come ascite ed emorragia, anche fatale. L'infezione può causare reazioni da immunocomplessi.

- **Infezione cronica**

Si verifica nel 5-10% degli infetti, con un esordio lieve e asintomatico della malattia. Un terzo presenta epatite cronica **attiva**, con un danno epatico continuo che modifica la struttura epatica, può insorgere cirrosi o PHC. Gli altri due terzi presentano epatite cronica **non attiva**. L'epatite cronica può essere diagnosticata mediante un aumento degli enzimi epatici. Le persone con questa patologia sono la principale fonte di diffusione di questo virus e se coinfectati da HDV possono subire epatite fulminante.

- **PTH**

L'80% dei carcinomi epatocellulari primari sono dovuti ad HBV. Il genoma di HBV è integrato nelle cellule neoplastiche, che esprimono antigeni HBV. E' solitamente fatale. A Taiwan il 15% della popolazione è un portatore di HBV e la metà muore di PTH o cirrosi. HBV promuove un processo di riparazione e crescita epatocellulare continuo. La presenza del genoma di HBV causa mutazioni, che promuovono così la carcinogenesi. Il periodo di latenza può variare da 10 a 35 anni.

- Conclusioni:

L'epatite B acuta nel 90% dei casi va incontro a guarigione, nell'1% ad epatite fulminante e nel restante 9% presenta HBsAg per più di 6 mesi in circolo. Di questo 9% il 50% guarisce, mentre il resto può entrare in stato di portatore asintomatico, di epatite cronica persistente, o epatite cronica attiva. Quelli con epatite cronica

persistente, possono contrarre patologie extra-epatiche, come glomerulonefrite o poliartrite nodosa. Quelli con la cronica attiva possono contrarre patologie extra-epatiche (come i precedenti), o cirrosi o PTH.

Diagnosi:

Viene effettuata sulla base del decorso clinico e dall'aumento degli enzimi epatici. HBsAg e HBeAg vengono rilasciati in circolo durante la replicazione del virus, quindi il loro rilevamento indica infezione. Durante la fase sintomatica, però, non è possibile rilevare anticorpi contro questi antigeni, perché sono complessati con essi nel siero.

Trattamento, prevenzione e controllo:

Non esiste una terapia specifica per le infezioni acute. Possono essere somministrate Ig dell'epatite B ad una settimana dall'esposizione ed ai bambini nati da madri sieropositive per migliorare il decorso clinico o la prevenzione.

L'infezione cronica può essere trattata con dei farmaci antivirali, come **lamivudina** (inibitore della trascrittasi inversa dell'HIV e della polimerasi di HBV), **adefovir dipivoxil** e **fanciclovir**, somministrati per un anno. Anche l'IFN- α può essere efficace con un trattamento di 4 mesi.

La trasmissione di HBV è diminuita grazie allo screening effettuato per donatori del sangue. La **vaccinazione** è raccomandata ai neonati, ai bambini e alle persone ad alto rischio, come persone provenienti da aree endemiche, bambini di madri affette, tossici, persone sessualmente attive, emofiliaci, personale sanitario e pazienti in dialisi. L'immunizzazione delle madri dovrebbe ridurre l'incidenza di trasmissione a neonati e bambini, riducendo il numero di portatori cronici di HBV. I vaccini sono costituiti da subunità virali; sono stati ottenuti con tecniche di ingegneria genetica, inserendo nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, un plasmide contenente il gene S per HBsAg. La proteina si autoassembla in particelle con aumento dell'immunogenicità. Il ciclo di vaccinazione prevede un ciclo 3 iniezioni con seconda e terza a distanza di 1 e 6 mesi dalla prima. Il 95% svilupperà anticorpi protettivi. Il fatto che ci sia un unico sierotipo e che l'uomo sia l'unico ospite facilita. L'impiego di sangue universale (0-Rh negativo) e l'adozione di precauzioni nella manipolazione dei liquidi corporei limitano l'esposizione ad HBV. Si deve agire pensando tutti i pazienti infetti.

Virus dell'Epatite C (HCV)

È stato il principale agente di epatite post-trasfusionale prima dell'uso dello screening. Ci sono 170 milioni di portatori di HCV nel mondo. Il virus viene trasmesso con le stesse modalità di HBV. Ha una maggiore potenzialità di stabilire epatite cronica persistente, che evolve frequentemente in cirrosi o a carcinoma. È l'unico membro del genere *Hepacivirus* della famiglia dei *Flaviviridae*. Ha un diametro di 30-60 nm e un genoma a **RNA positivo** e provvisto di **pericapside**. Il genoma, di 9.100 nucleotidi codifica per 10 proteine, tra cui due glicoproteine E1 ed E2. Le regioni ipervariabili all'interno dei geni per le glicoproteine causano estese mutazioni e variabilità antigenica, che non facilita trovare un vaccino. Infetta solo uomini e scimpanzé. Si lega a recettori di superficie come CD81 (tetraspanina), espressi su epatociti e linfociti B, e può utilizzare un rivestimento di lipoproteine a bassa densità, utilizzando i recettori di queste ultime per penetrare all'interno degli epatociti. Il virus si replica come i *flavivirus*, il virione si assembla al livello del RE. Le proteine di HCV inibiscono l'apoptosi e l'IFN, non lisando la cellula e promuovendo un'infezione persistente. Rimane associato alla cellula ospite e evita la morte promuovendo un'infezione persistente, ma è causa di epatopatia. La risposta cellulomediata è responsabile del danno tissutale e della risoluzione dell'infezione. I processi di riparazione e la crescita cellulare possono portare a PTH. Gli anticorpi anti-HCV non sono protettivi e l'immunità non dura tutta la vita. HCV si trasmette per il sangue infetto e per via sessuale, quindi tossici, tatuati, trapiantati o trasfusi ed emofiliaci sono a rischio. È presente soprattutto in Italia meridionale, Spagna, Giappone e Medio Oriente. Il fatto che ci siano molti portatori asintomatici favorisce la diffusione del virus. Causa 3 tipi di **patologie**:

- 1) Epatite **acuta**, con risoluzione e guarigione nel 15% dei pazienti
- 2) Epatite **cronica persistente**, con possibile progressione in malattie più gravi nel 70% dei pazienti
- 3) **Cirrosi**, nel 15% dei pazienti

Si osserva viremia dopo 1-3 settimane dalla trasfusione con sangue contaminato da HCV, che dura 4-6 mesi nell'infezione acuta e anche 10 anni nella persistente. Nella forma acuta è simile ad HBV e HAV, ma la risposta è meno intensa ed i sintomi più lievi. Più comunemente (70%), la malattia comincia in maniera asintomatica, ma evolve nella forma cronica. HCV promuove lo sviluppo di carcinoma nel 5% dei

pazienti con infezione cronica. La diagnosi si basa sulla ricerca degli anticorpi anti-HCV con ELISA. La sierconversione si verifica in 7-31 settimane dall'infezione. La RT-PCR può rilevare l' RNA dell' HCV nei sieronegativi, perché gli anticorpi non sono sempre presenti, quindi dei test fondamentali. L'IFN- α da solo o in combinazione con la **Ribavirina** sono le uniche terapie, che possono determinare guarigione nel 50% dei pazienti

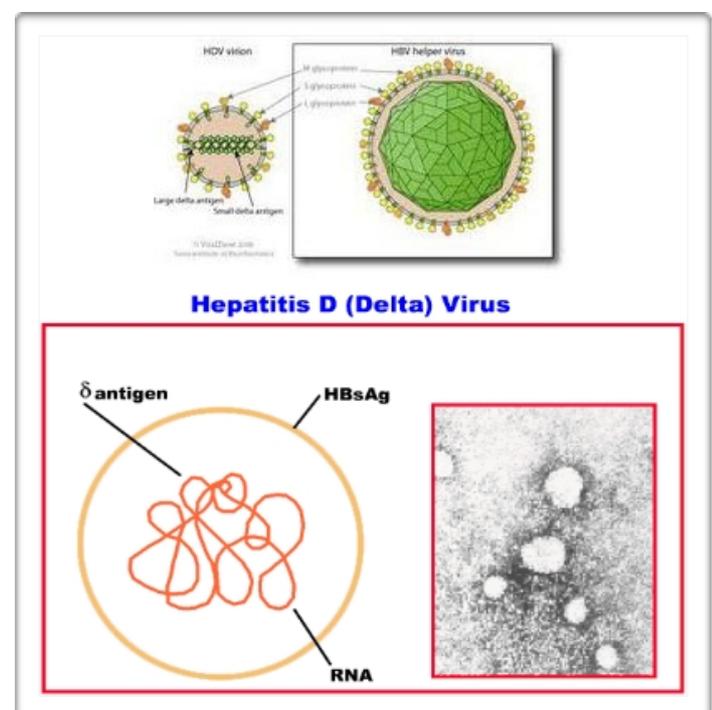
Virus dell'Epatite D (HDV)

E' responsabile del 40% delle epatiti fulminanti. E' unico, perché si serve di HBV e delle proteine della cellula bersaglio per replicarsi e produrre la sua unica proteina. Il genoma è un RNA a singolo filamento circolare, che ha un'estesa regione di basi appaiate. Il virione ha 36 nm di diametro ed il genoma è circondato dal core dell'antigene δ , che all'esterno è rivestito da un pericapside contenente HBsAg (essenziale per la replicazione del virus).

L'antigene δ è presente in due forme, piccola e grande. L'agente δ si lega agli epatociti ed entra. L'RNA polimerasi II della cellula ospite sintetizza una copia di RNA per la replicazione del genoma, che poi forma una struttura a RNA detta ribozima, che taglia l'RNA circolare per produrre l'mRNA per l'antigene δ piccolo.

Il gene per questo antigene viene mutato da un enzima cellulare durante l'infezione, così che si viene a formare l'antigene δ grande. La produzione dell'antigene limita la replicazione del virus, ma promuove l'associazione del genoma con HBsAg per formare il virione, che viene così rilasciato.

Si trasmette dal sangue, dal liquido seminale e dalle secrezioni vaginali. Può replicarsi e determinare malattia solo in soggetti con infezione attiva da HBV. Sono trasmesse le vie di infezione, quindi una persona può essere **coinfettata** da HBV e da HDV. Una persona con infezione cronica da HBV può inoltre essere **sovrainfettato** con HDV, che conduce ad una progressione patologica molto più rapida. HDV deve attendere che HBV si replichi prima di potersi replicare, quindi in un'infezione



cronica, HDV si può replicare immediatamente. Il virus HDV quando si replica causa citotossicità e danno epatico. Il danno è causato maggiormente dal virus δ , più che dal sistema immunitario, in aggiunta poi alla patologia causata da HBV.

Le vie di trasmissione sono le stesse di HBV. Il virus aumenta la gravità delle infezioni da HBV. Le epatiti fulminanti sono maggiormente associate al virus δ , che può causare alterazioni cerebrali, ittero importante e necrosi epatica massiva, con l'80% di mortalità.

L'unico metodo per determinare l'infezione è il rilevamento dell'antigene con ELISA e RIA. Può essere identificato anche grazie a RT-PCR.

Non esistono trattamenti specifici. L'immunizzazione col vaccino HBV protegge anche nei confronti di una successiva infezione da HDV.

Virus dell'Epatite E (HEV)

E, come enterico, si trasmette per via oro-fecale, attraverso acque contaminate. Per struttura e dimensioni simili ai *calcivirus*. Presente nei paesi in via di sviluppo. I sintomi sono simili a quelli di HAV, con epatite acuta, ma compaiono molto più tardivamente i sintomi. La mortalità è 10 volte maggiore rispetto a quella associata ad HAV, ed è molto grave nelle donne in gravidanza.

Virus lenti non convenzionali: i Prioni

Sono responsabili di encefalopatie spongiformi, malattie neurodegenerative a lento decorso. Il "kuru", la sindrome di Creutzfeldt-Jakob (CJD), la variante CJD o vCJD, la sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), l'insomnia familiare fatale (FFI) e l'insomnia fatale sporadica sono patologie che colpiscono l'uomo, mentre la **BSE** o **encefalite spongiforme bovina** colpisce i bovini; in particolare la BSE alla fine degli anni Novanta ha causato in Gran Bretagna un'epidemia, la bovina.



Sono dei virus, ma non corrispondono alla definizione standard di virus, perché hanno delle caratteristiche diverse. Non hanno una vera struttura virale, non evocano una risposta immunitaria e sono altamente resistenti al calore (fino 80°C), disinfettanti e radiazioni. Il virus lento è un mutante di una proteina self, dell'ospite, detta prione, una piccola particella infettiva di natura proteica, che trasmette patologia. Hanno un lungo periodo di incubazione, che arriva fino a 30 anni, che dopo la comparsa dei sintomi conducono il paziente inevitabilmente alla morte, perché vanno a danneggiare il SNC, causando **encefalopatia spongiforme**. Il prione è privo di acidi nucleici, e sono aggregati di una glicoproteina idrofobica, o **PrP^{sc}** (proteina prionica delle scrapie), questo è l'agente infettivo che si riscontra nel SNC. Questa proteina deriva da una mutazione di un'altra proteina, che è una proteina self normalmente presente nella membrana cellulare, legata a GPI o glicofosfatidilinositolo, la **PrP^c** (proteina prionica cellulare). Queste due sono a livello di sequenza identiche, ma differiscono per la struttura terziaria ed alcune caratteristiche; la **sc** ha una forma globulare e si riscontra sulle vescicole citoplasmatiche nella cellula e viene secreta, è resistente alle proteasi e si aggrega in filamenti di sostanza amiloide, o fibrille; la cellulare invece ha forma estesa, si riscontra solo a livello di membrana, non è resistente alle proteasi e non si associa in fibrille.

L'**encefalopatia spongiforme** deriva dalla degenerazione vacuolare dei neuroni con perdita di funzionalità. Accade perché le proteine PrP^c sono codificate dal cromosoma 20, quindi non scatena una risposta immunitaria; sono normalmente

presenti sulle membrana cellulare. PrPc subisce una mutazione nella struttura, e viene rilasciata impilata in placche simil-amiloidee, degli aggregati cerebrali, sotto forma di PrPsc. PrPsc andrà a provocare il ripiegamento di PrPc sulla superficie cellulare, causandone un'aggregazione, il rilascio e l'acquisizione della conformazione PrPsc. Quello che succede è che la PrPsc agisce da stampo per la propria conformazione come se fosse un genoma virale. La cellula sintetizza la nuova PrPc ed il ciclo si rinnova continuamente. Le PrPsc vengono poi internalizzate dai neuroni, e si accumulano, dando alla cellula un aspetto spongiforme, la vacuolizzazione neuronale. I prioni raggiungono un'elevata concentrazione nel cervello, e causano patologia solamente in questa sede, nonostante siano riscontrabili anche in altre sedi. Come detto, non si evidenzia infiammazione, cosa che distingue questa encefalite da una classica encefalite virale.

La CJD si trasmette per iniezione, trapianto, contatto con strumenti contaminati e **alimenti**. Il "kuru" era limitato alla Nuova Guinea e derivava dal fatto che le tribù residenti erano cannibali nei confronti dei parenti defunti, così che ingerendo il cervello, dove si accumulano i prioni, si ingeriva il prione stesso. La sospensione del cannibalismo ha messo fine alla trasmissione. La **mucca pazza**, o **BSE**, era causata dall'ingestione di carne bovina contaminata, ed era provocata dall'utilizzo di mangimi animali contaminati. La GSS e FFI sono patologie ereditarie. I prioni causano una malattia neurologica degenerativa dopo un lungo periodo di incubazione, ma con rapida progressione verso la morte, con perdita di controllo muscolare, tremori forti, spasmi, perdita di coordinazione, demenza progressiva e morte. Al microscopio elettronico non è possibile rilevarli, né tantomeno è possibile rilevare anticorpi, quindi la diagnosi è su base clinica, con conferma che arriva da Western Blot, e all'autopsia, con i segni di encefalite spongiforme. Non esiste un trattamento, solo la prevenzione, decontaminando strumenti con ipoclorito di sodio al 5% o 1M di idrossido di sodio; inoltre dopo la bovina, in Gran Bretagna sono passate leggi che impediscono l'utilizzo di prodotti animali negli alimenti per il bestiame.

