

TESTI CONSIGLIATI

- **PRINCIPALI DI Microbiologia Medica** di G. Antonelli
- **Manuale di Virologia Medica** di F. Dianzani

I VIRUS

CENNI STORICI

**Geroglifico ritrovato a
Menfi (Egitto), datato ca
1400AC**

**Ritrae il sacerdote del
tempio Siptah con i tipici
segni di una poliomielite
paralitica**



E' la prima testimonianza scritta di una infezione virale

IL CONCETTO DI VIRUS: ORIGINE DELLA VIROLOGIA

- Nel 1892, **Dmitri Ivanowski**, dimostro' che estratti di foglie di tabacco malate, passati attraverso un filtro di ceramica in grado di trattenere i batteri, potevano ancora trasmettere la malattia ad altre piante.
- Nel 1898, **Martinus Beijerinck** confermò ed estese i risultati di **Ivanowski** e sviluppò per primo il concetto di “**virus**” come **agente filtrabile infettante** (*contagium vivum fluidum*)
- **INIZIA L'ERA DELLA VIROLOGIA MODERNA**

Scoperta dei virus

- 1892 - Ivanovsky – scoprì il virus del mosaico del tabacco
- 1898 - Loeffler & Frosch – scoprirono che l' agente della sindrome “mani piedi” era filtrabile
- **concetto chiave: i virus sono agenti non solo piccoli ma si replicano solo nell'ospite, NON nel brodo di coltura**
- 1901 primo virus umano: il virus della febbre gialla (W. Reed)
- 1908 Rous sarcoma virus, poliovirus
- 1915 - batteriofagi
- 1933 - influenza virus
- il termine virus deriva dal latino “veleno”.

Impatto dei virus sulle forme

di vita

- Virus sono gli organismi viventi più abbondanti sul pianeta
- Studi di metagenomica di campioni ambientali amplificati e sequenziati mostrano che i geni virali costituiscono la maggior parte della geosfera
- Virus hanno un'importanza determinante, non diversa dai batteri, sulla evoluzione, anche sull'origine del DNA e dei mammiferi

Definizione di virus

- Sono parassiti intracellulari obbligati
- Il loro genoma è costituito da DNA o RNA
- All'interno della cellula, il genoma virale si replica e dirige la sintesi di altre componenti virali, sfruttando il sistema cellulare
- La progenie virale, virioni, rappresenta il veicolo di trasmissione del genoma virale nelle cellule adiacenti, avviando un nuovo ciclo infettivo

Differenze tra virus ed organismi viventi

- Mancanza del sistema generatore di ATP
- Mancanza di attività metabolica
- Mancanza di membrane interne e ribosomi (ecc. Arenavirus)
- Un solo tipo di acido nucleico
(ecc. Poxvirus: virus a DNA, tracce di RNA
Retrovirus: virus a RNA, tracce di DNA)

Who gets them?

- Mammals and birds



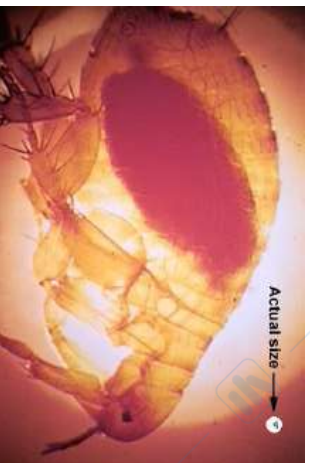
- amphibians, reptiles and fish



- plants and fungi



- insects



- even bacteria are infected by viruses

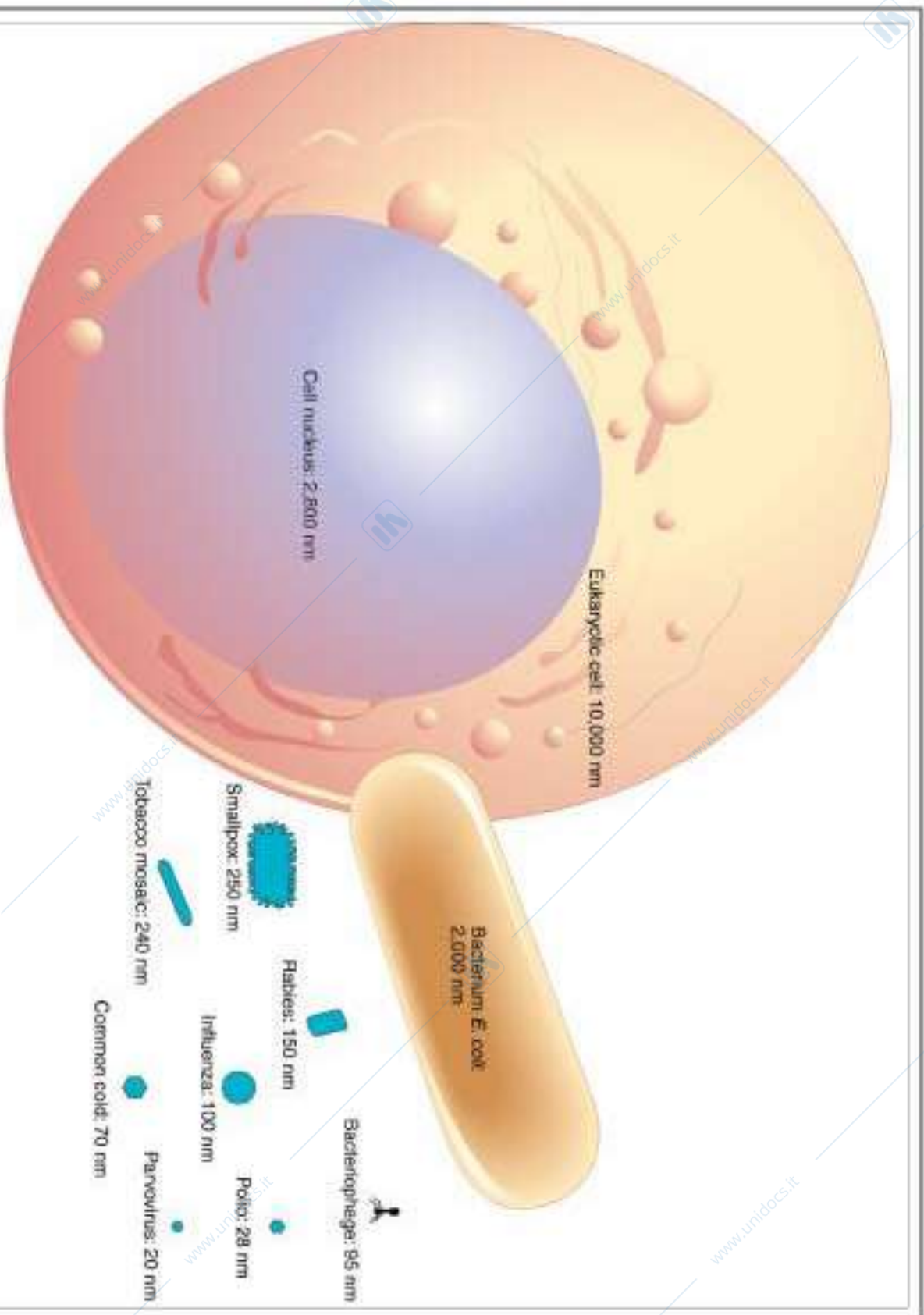


Sizes Relationships Among Microorganisms

Microorganisms

Size Relationships Among Microorganisms

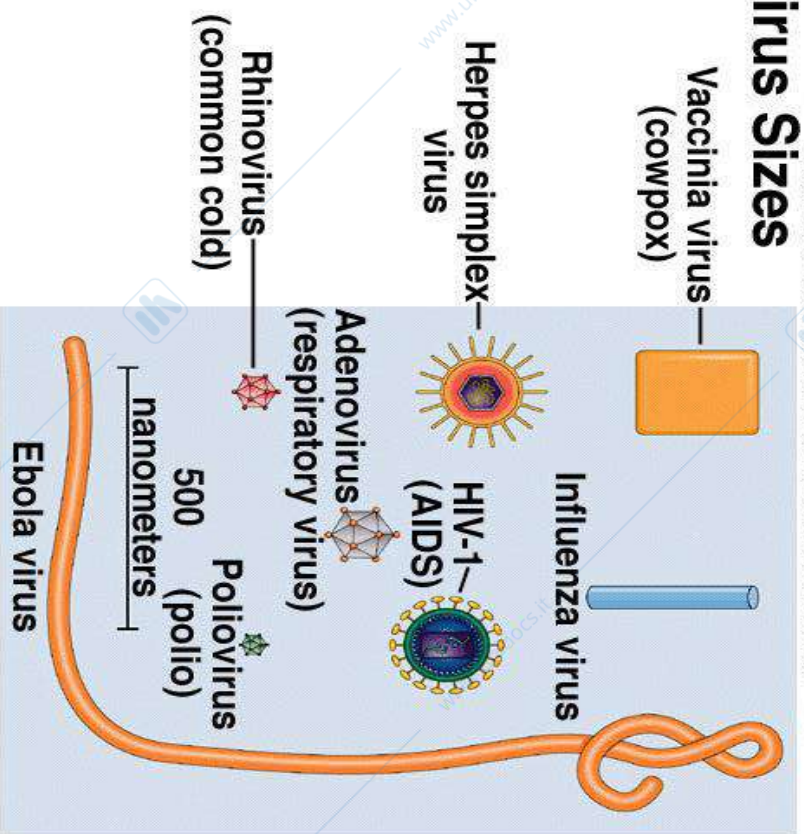
Figure 12.04



DIMENSIONI DEI VIRUS

Virus Sizes

© The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



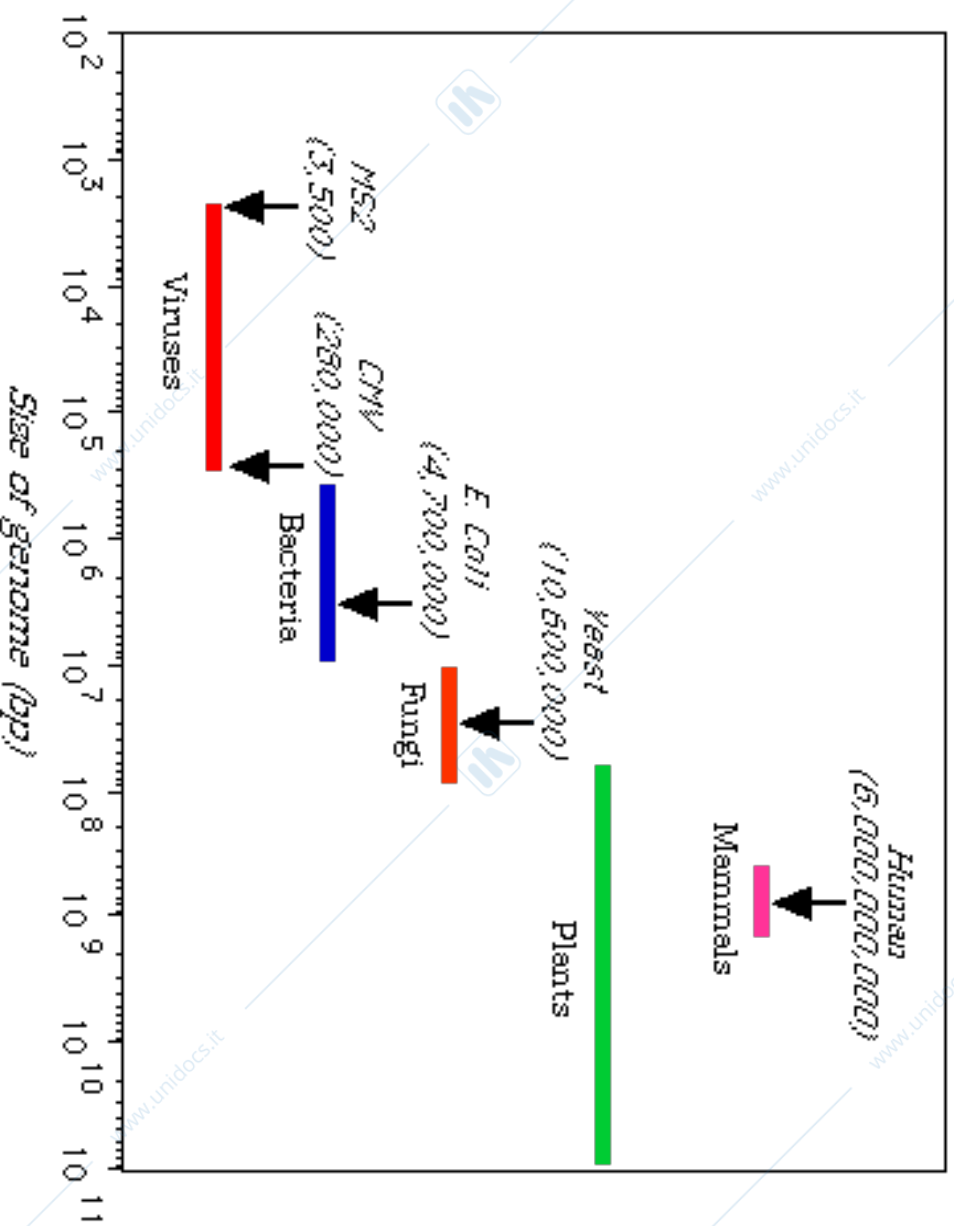
RELATIVE SIZES OF SELECTED CELLS, VIRUSES, AND MOLECULES

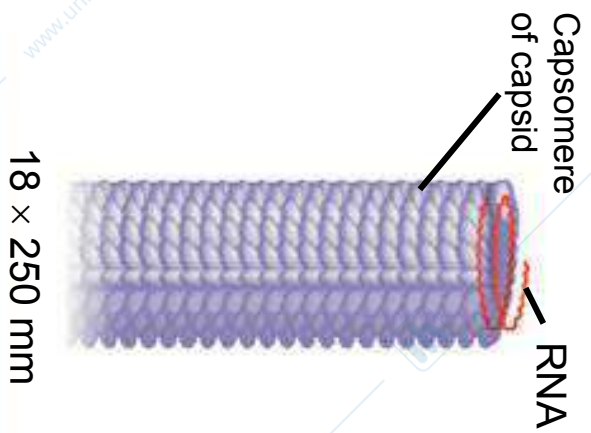
Cells	Largest Diameter (nm)	
Herpes simplex	130	
Rabies	125	
Influenza	85	
Adenovirus	75	
T2 bacteriophage	65	
Poliomyelitis	27	
Yellow fever	22	
Foot-and-mouth	21	
Tobacco mosaic	15 (but 300 in length)	
Molecules		
Hemoglobin molecule	15	
Egg albumin molecule	10	

IL GENOMA VIRALE

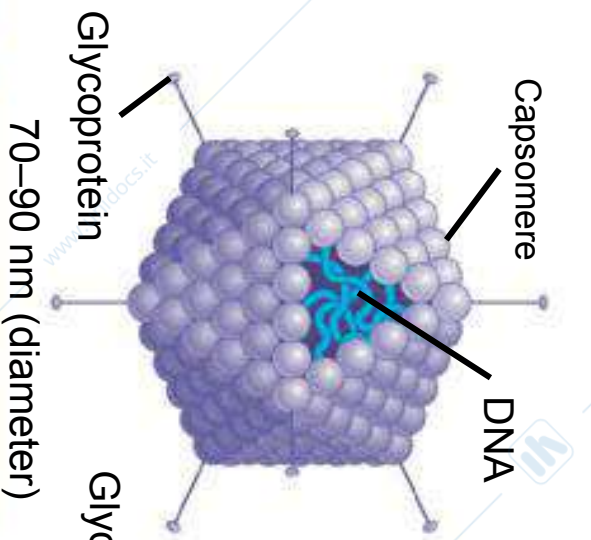
I genomi virali variano in lunghezza da 3500 nt (fago MS2) a 280 Kbp (Cytomegalovirus) e a 1,2 Mb (mimivirus)

Comparison of Genome Size:

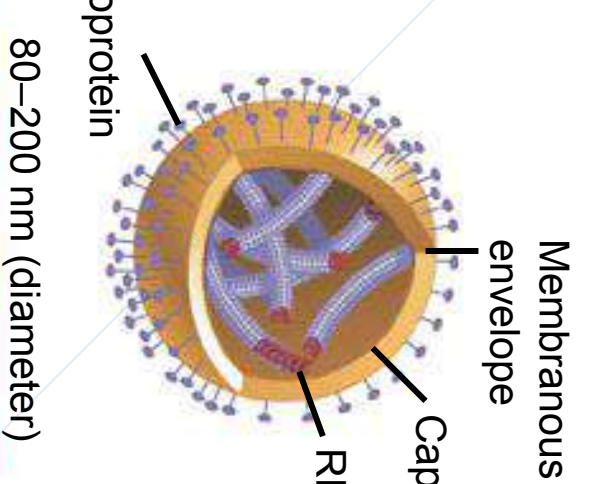




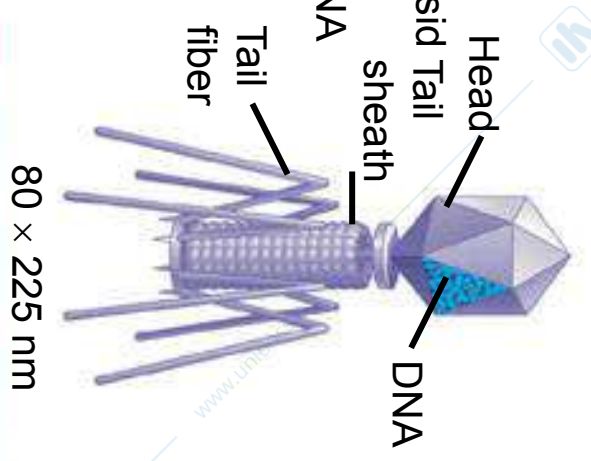
18 × 250 nm



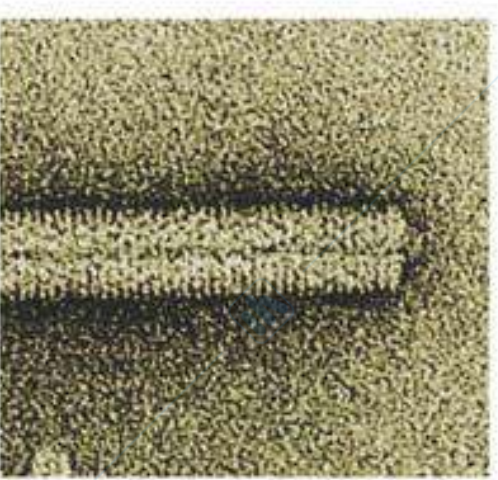
70–90 nm (diameter)



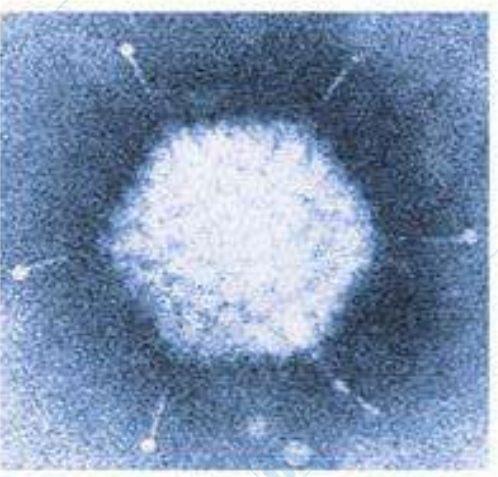
80–200 nm (diameter)



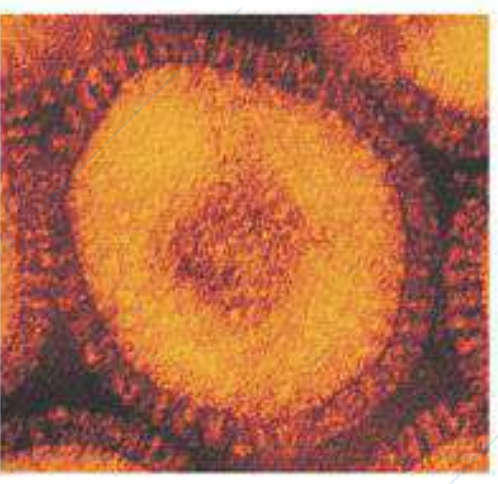
80 × 225 nm



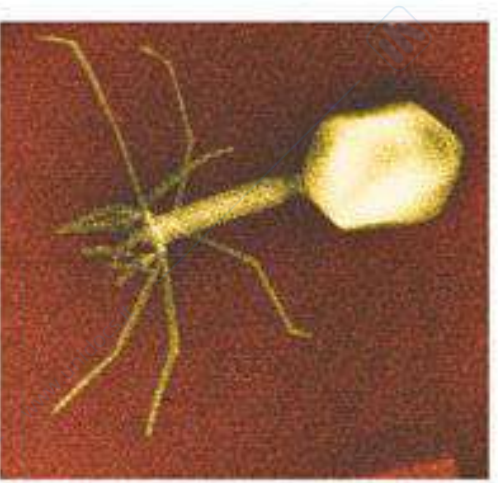
(a) Tobacco mosaic virus



(b) Adenoviruses



(c) Influenza viruses



(d) Bacteriophage T4

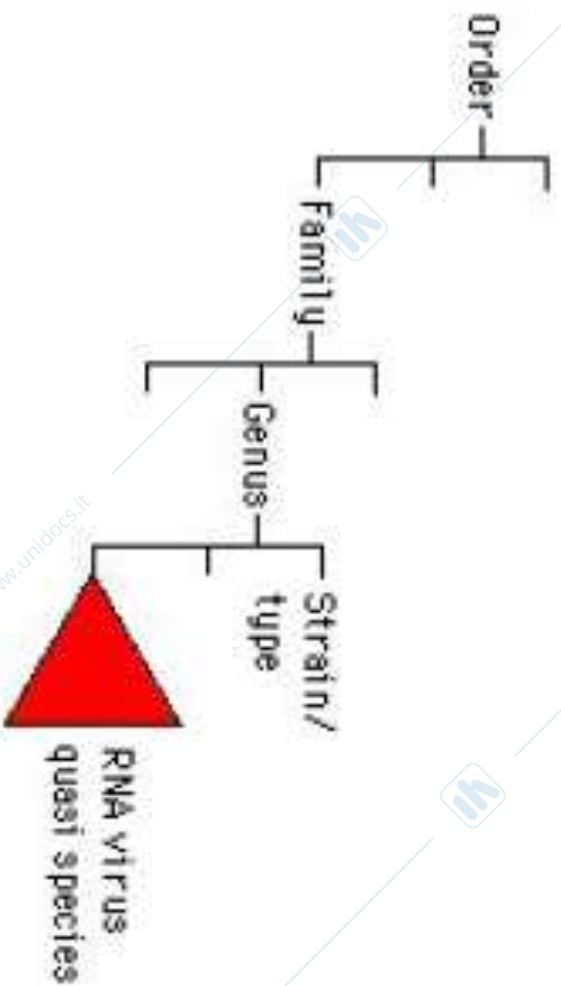
Classificazione virale in base a:

- natura del genoma nel virione
- simmetria del capside
- presenza di envelope o pericapside
- dimensione del virione & capside

CLASSIFICAZIONE VIRALE

La classificazione gerarchica dei virus prevede:

- Ordine
- Famiglia (indicata dal suffisso *viridae*)
- Sottofamiglia
- Genere (indicato dal suffisso *virus*)
- Specie *
- Ceppo/Tipo



ESEMPIO

Famiglia: *Picornaviridae* (picornavirus family)

Genere: *enterovirus*, *rhinovirus*, *aphthovirus*,
hepatovirus, *cardiovirus*

Gruppi del genere “*Enterovirus*”: *poliovirus*,
coxsackievirus A -B, *echovirus*, *enterovirus*

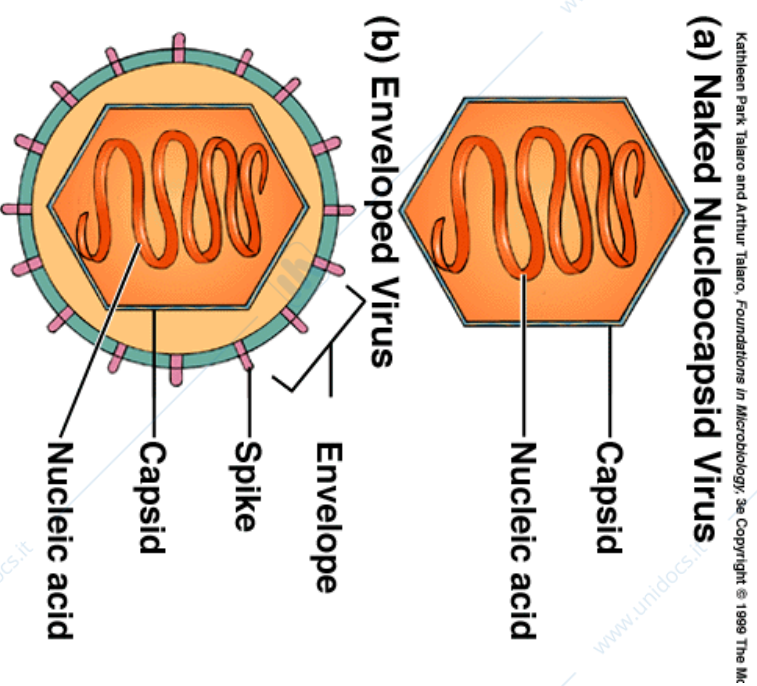
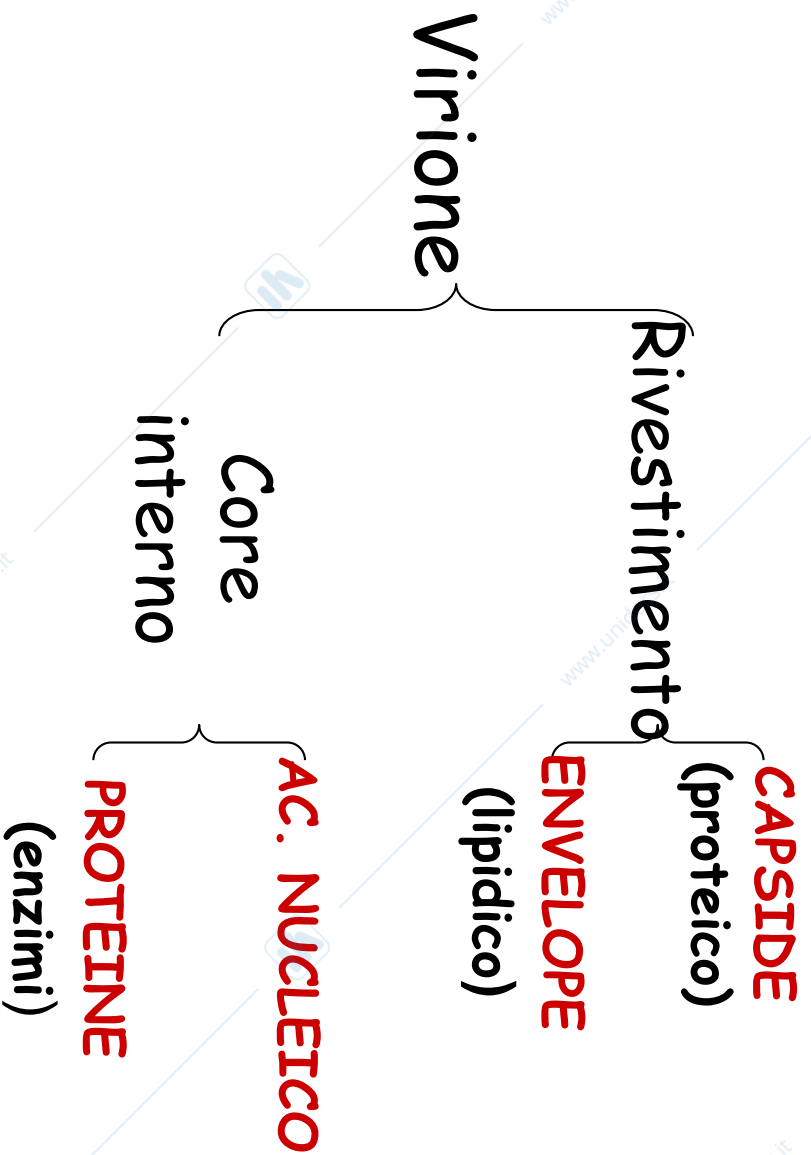
Componenti Virali

- **Proteine**
 - *Proteine strutturali*
 - *Proteine di membrana (riconoscimento del Recettore)*
 - *Enzimi*
- **Acido Nucleico genomico**
 - DNA
 - RNA
- **Envelope o pericapside presente solo in alcune famiglie virali**
 - Membrana plasmatica – es. Paramyxoviruses
 - Membrana Nucleare – es. Herpes viruses
 - Membrana del Golgi – es. Bunyaviruses

Proteine virali

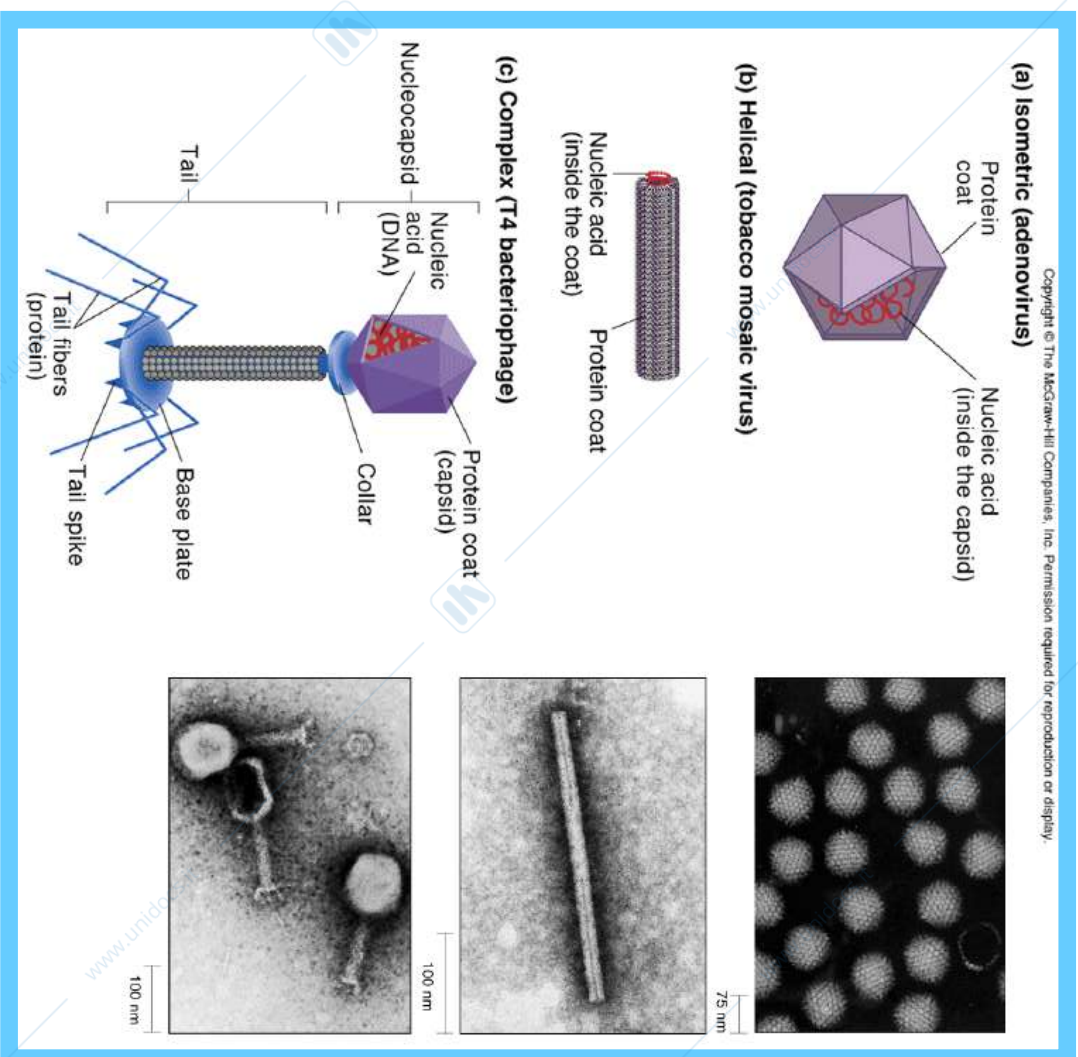
- **Proteine Strutturali** sono quelle che costituiscono la struttura del virione
- **Proteine non-strutturali** sono per lo più ad attività enzimatica ed hanno diverse funzioni

STRUTTURA DEI VIRUS



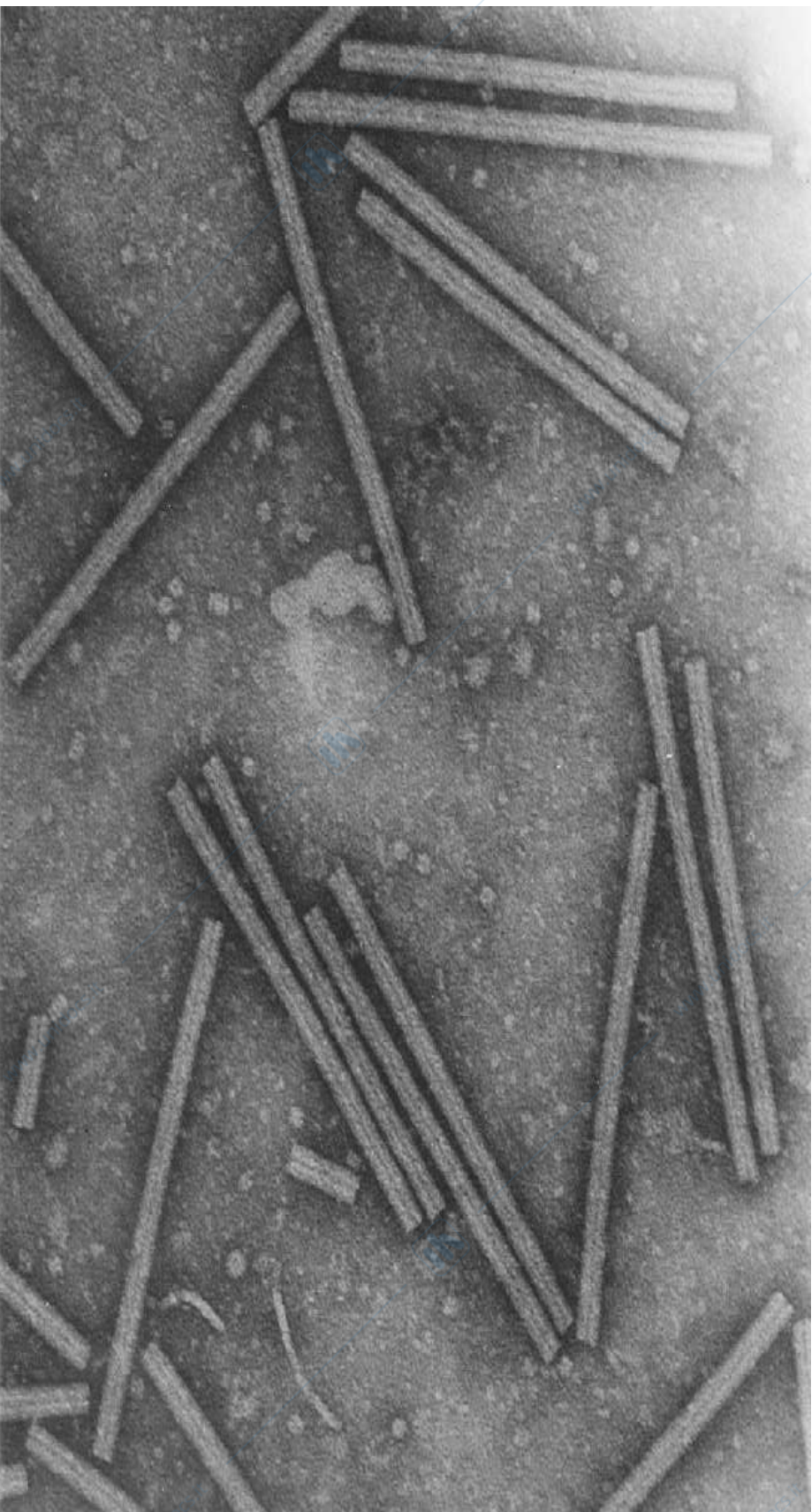
IL CAPSIDE

- **Funzione:** protezione, riconoscimento recettori, trasporto il genoma al nucleo
- **Struttura:** strutture regolari a partire da subunità irregolari
- **Economia di genoma:** due simmetrie per l'architettura del virione
- **Simmetria elicoidale** : TMV, Rhabdovirus
- **Simmetria icosaedrica:** adeno, herpes, picornavirus
- **Le forze** che legano insieme i protomeri sono **non covalenti**.
- I virioni sono dati dall' interazione proteina-proteina, proteina-ac. nucleico, proteina-lipidi

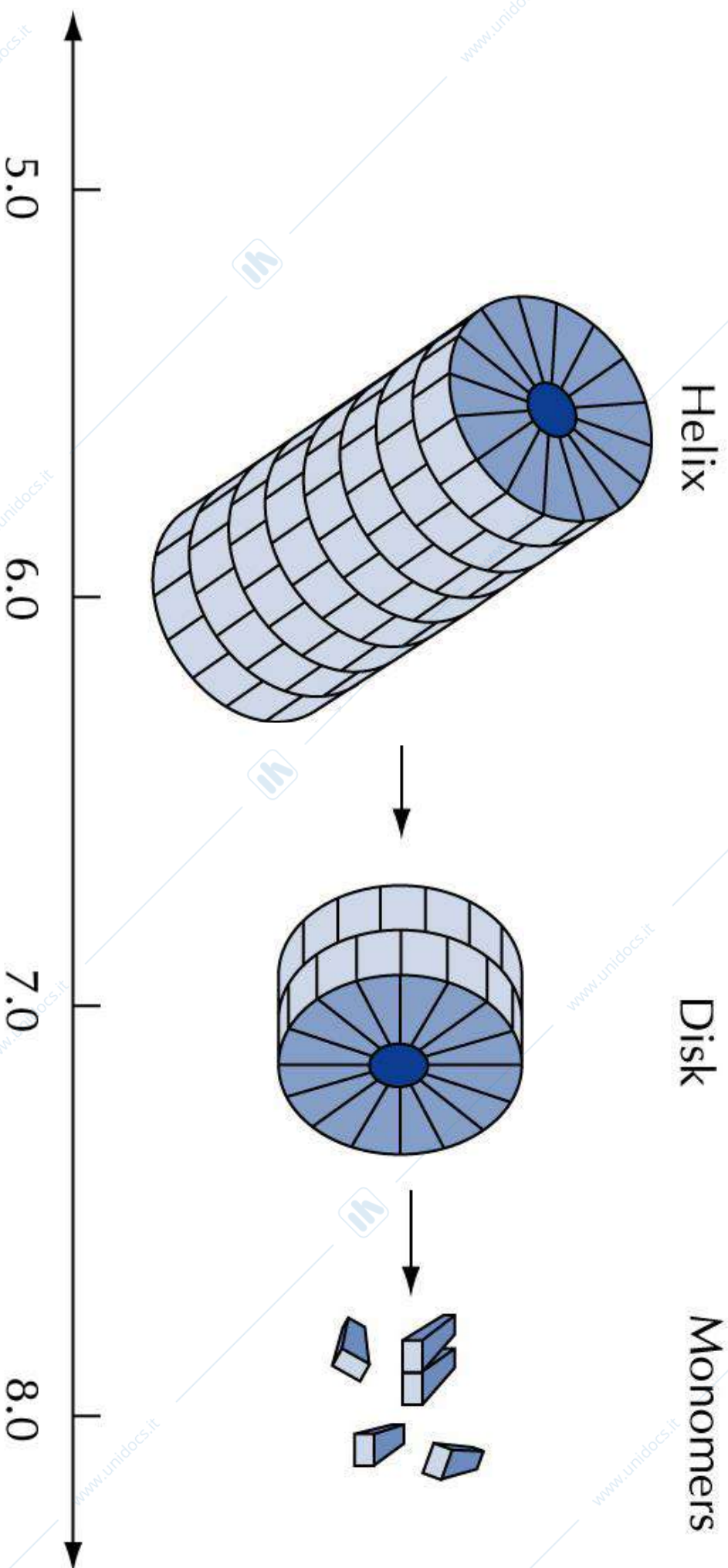


CAPSIDI ELICOIDALI:

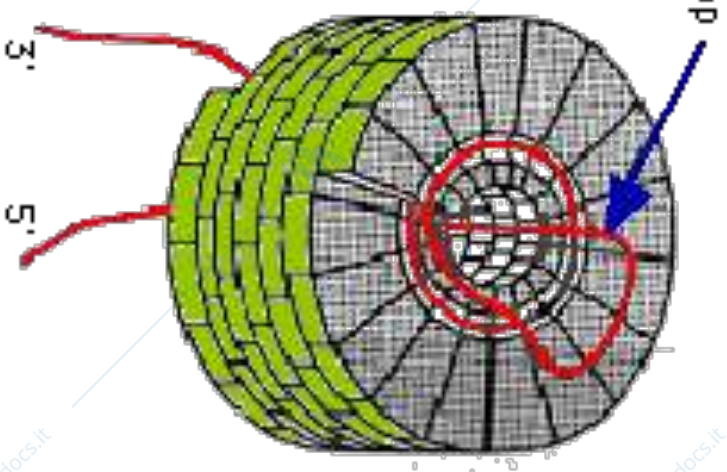
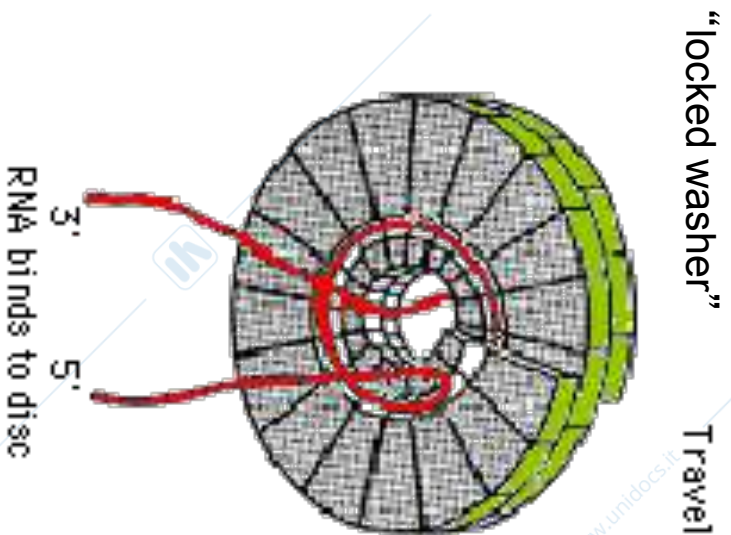
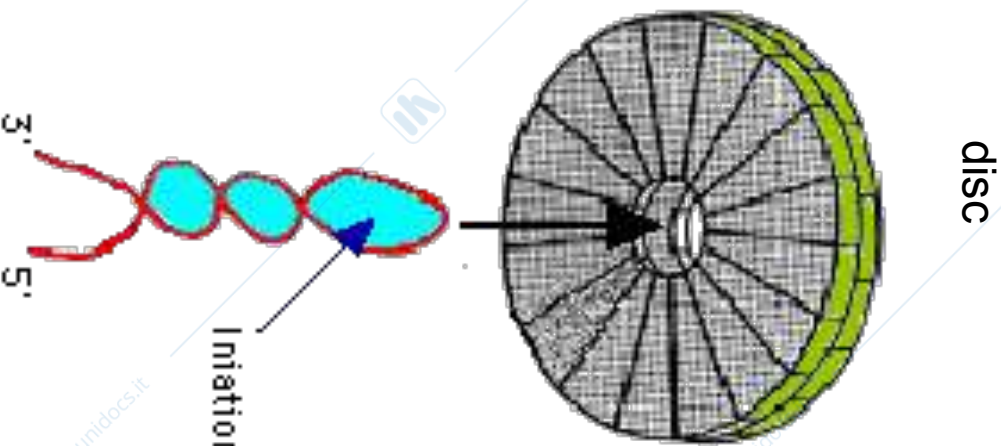
VIRUS DEL MOSAICO DEL TABACCO (TMV)



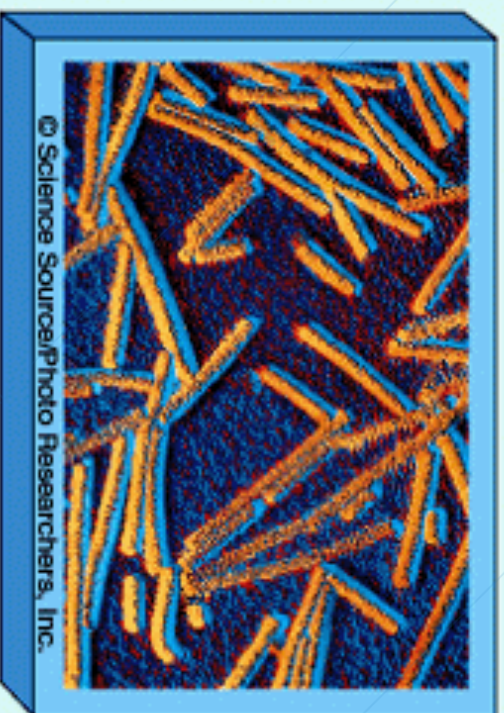
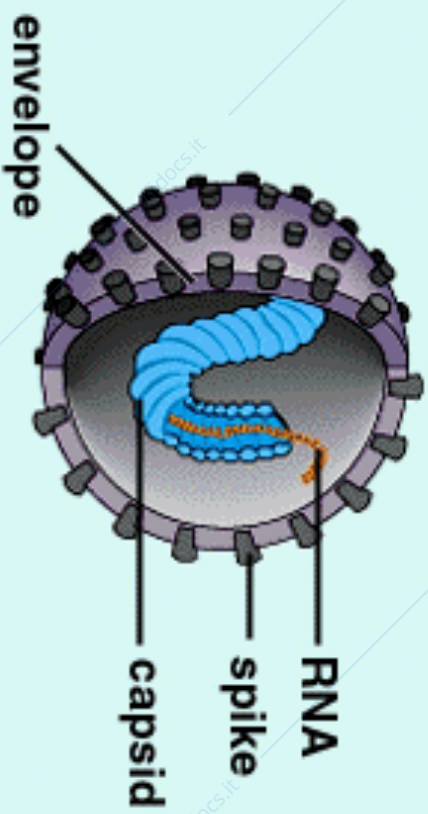
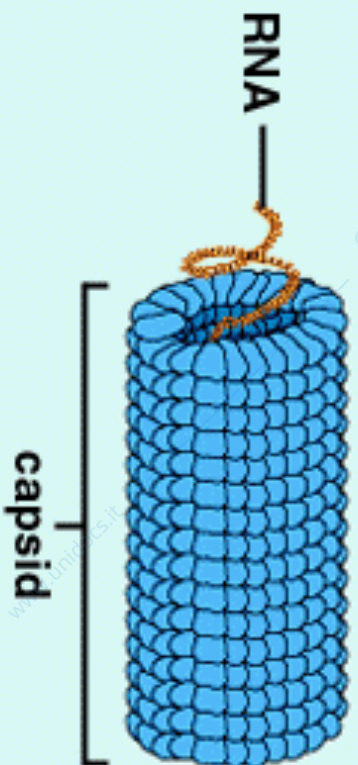
DENATURAZIONE DI TMV



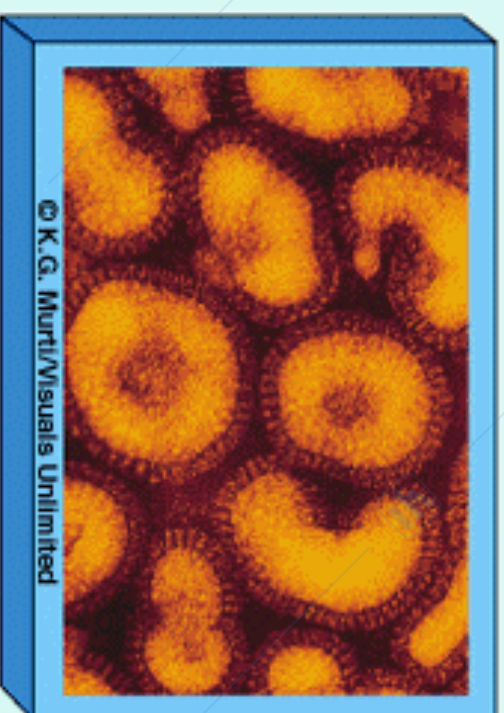
TMV - ASSEMBLAGGIO



I CAPSIDI ELICOIDALI DI VIRUS ANIMALI POSSONO ESSERE RIVESTITI DI ENVELOPE

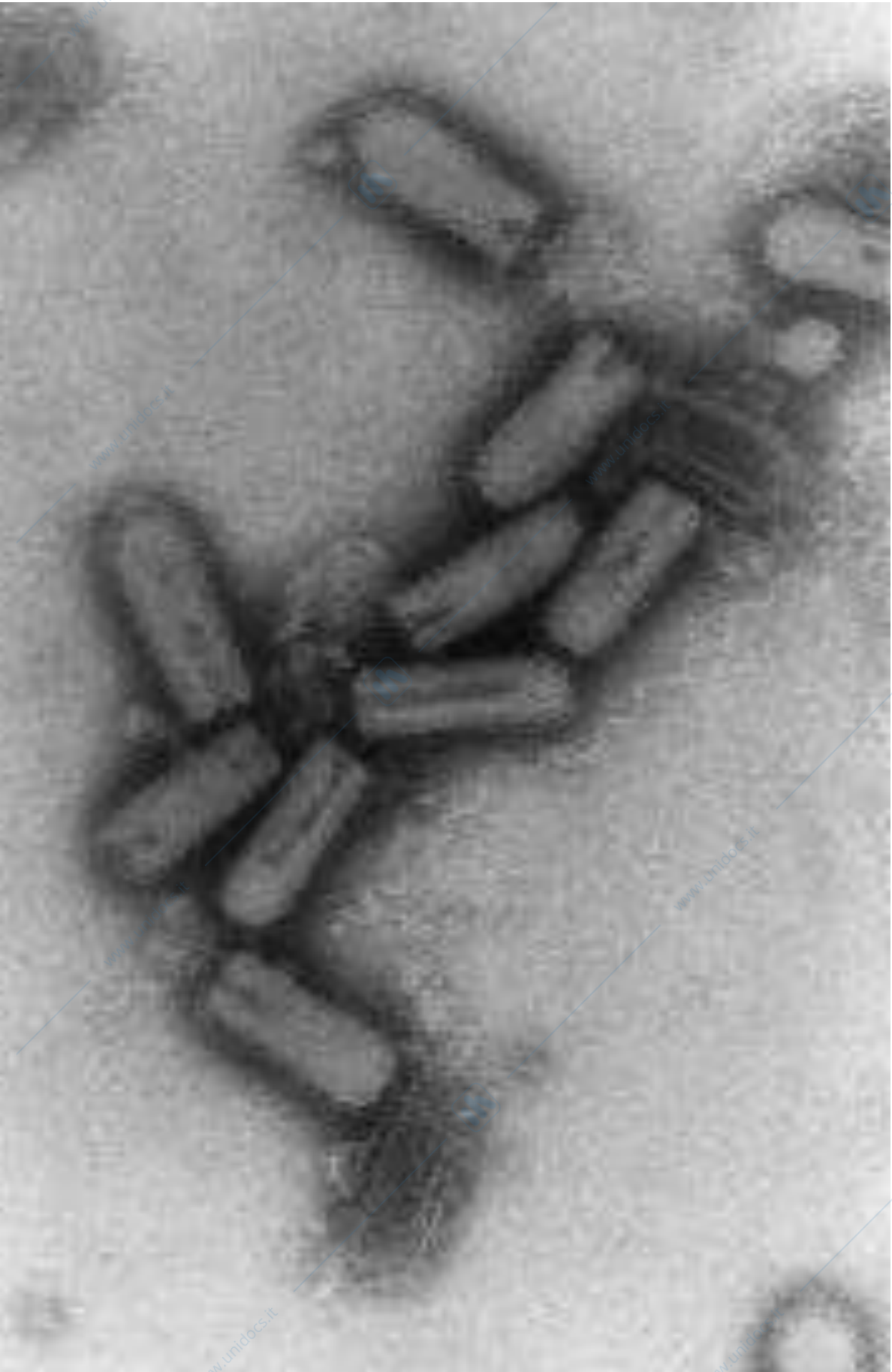


50 nm
c. Tobacco mosaic virus: An RNA virus with a helical capsid.



20 nm
d. Influenza virus: An RNA virus with a helical capsid surrounded by an envelope with spikes.

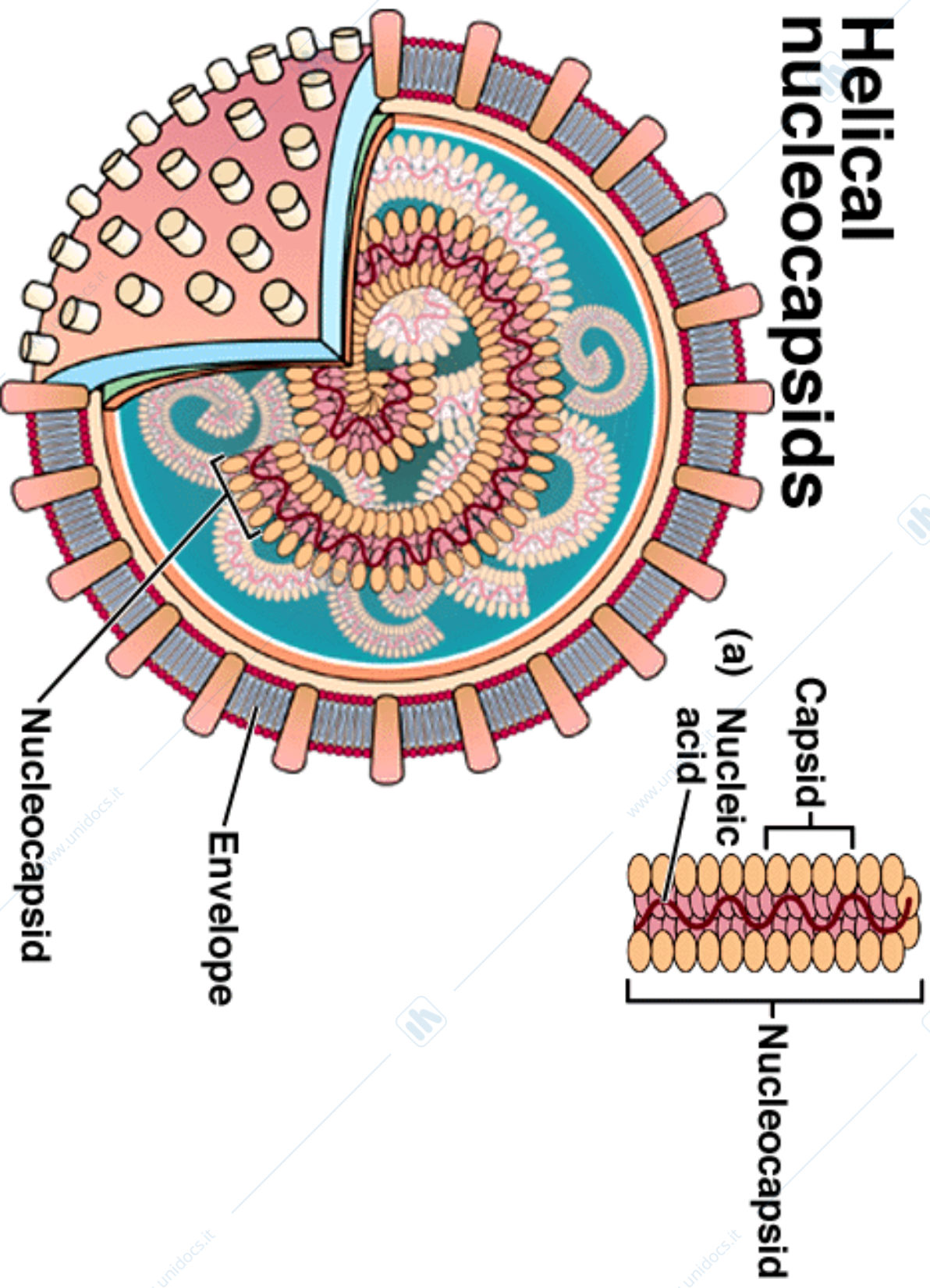
CAPSIDI ELICOIDALI: RHABDOVIRUS



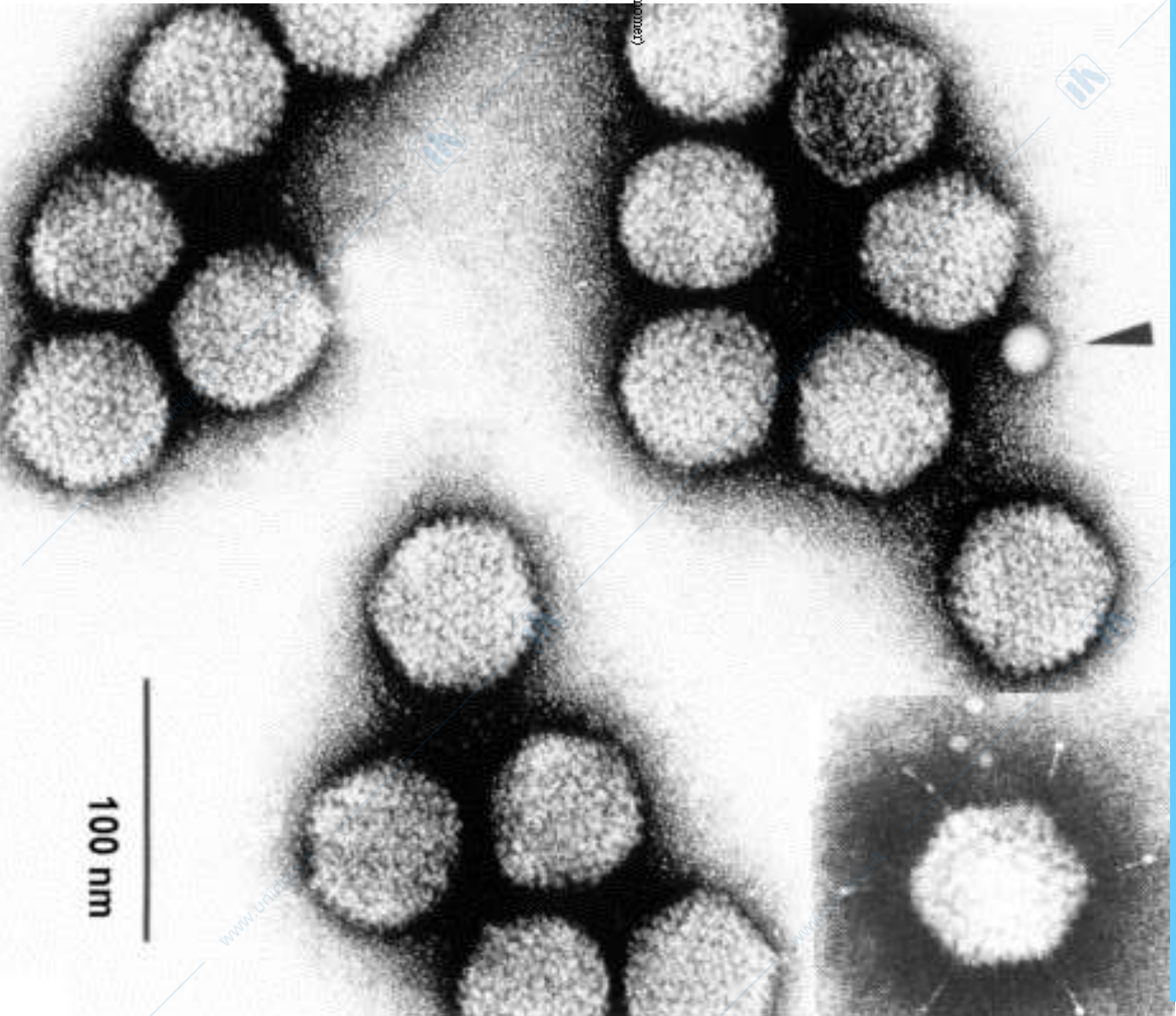
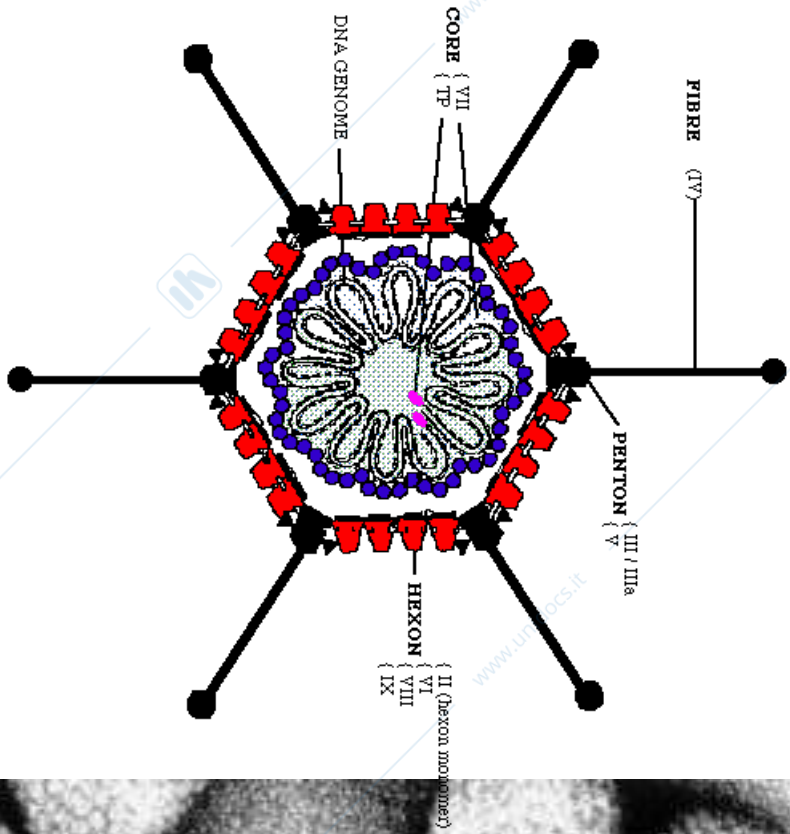
INFLUENZA VIRUS

Kathleen Park, Talero and Arthur Talero, *Foundations in Microbiology*, 3e Copyright © 1999 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Helical nucleocapsids

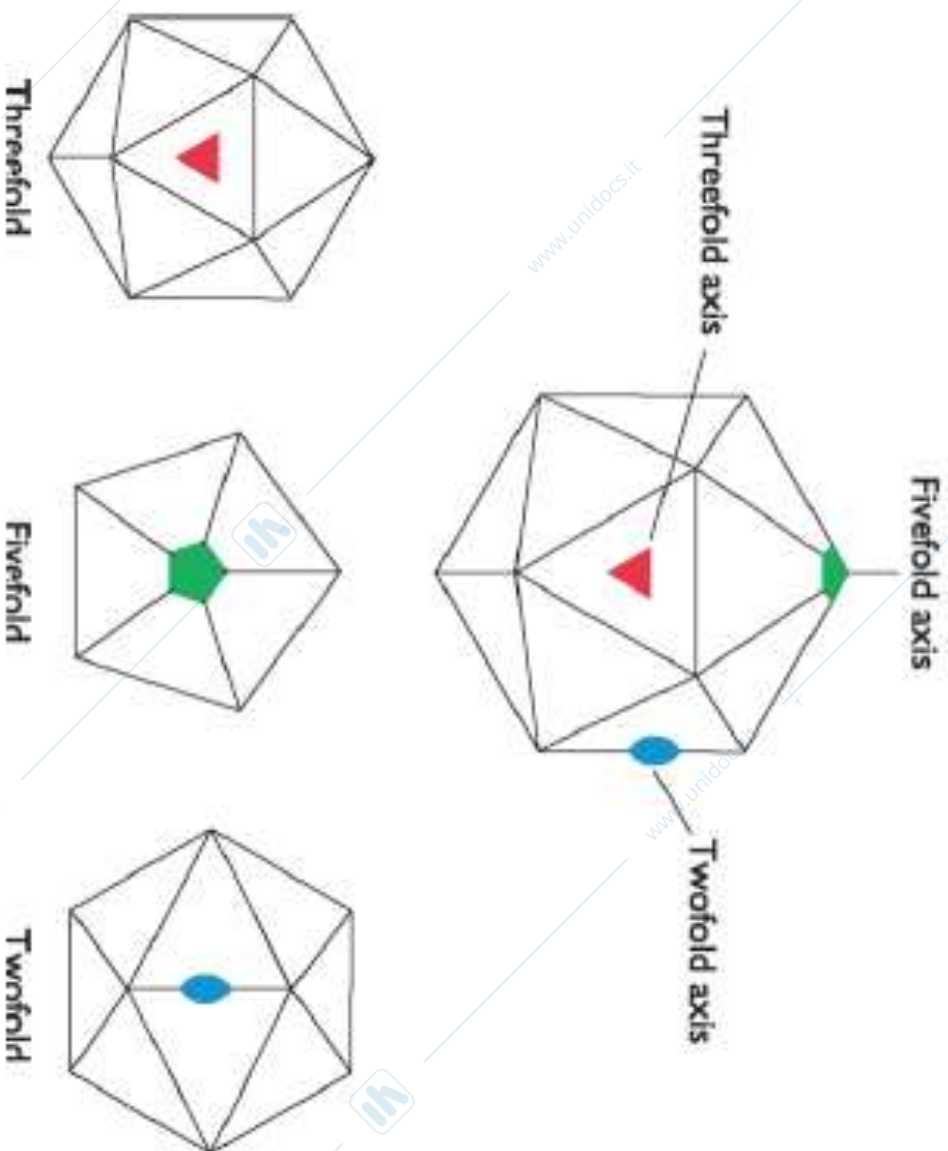


CAPSIDI ICOSAEDRICI: ADENOVIRUS

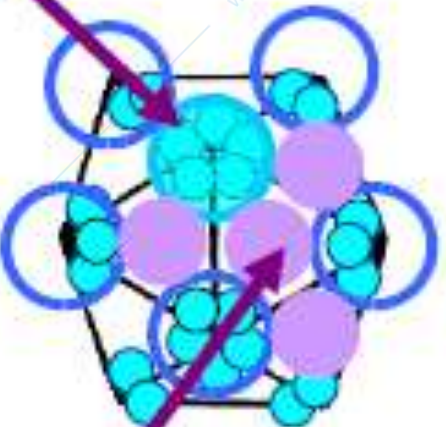


COS'È UN ICOSAEDRO?

L'icosaedro è un poliedro regolare con 20 facce triangolari e 12 vertici



SIMMETRIA ICOSAEDRICA



CAPSOMERO
= **PENTONE**

CAPSOMERO
= **ESONE**

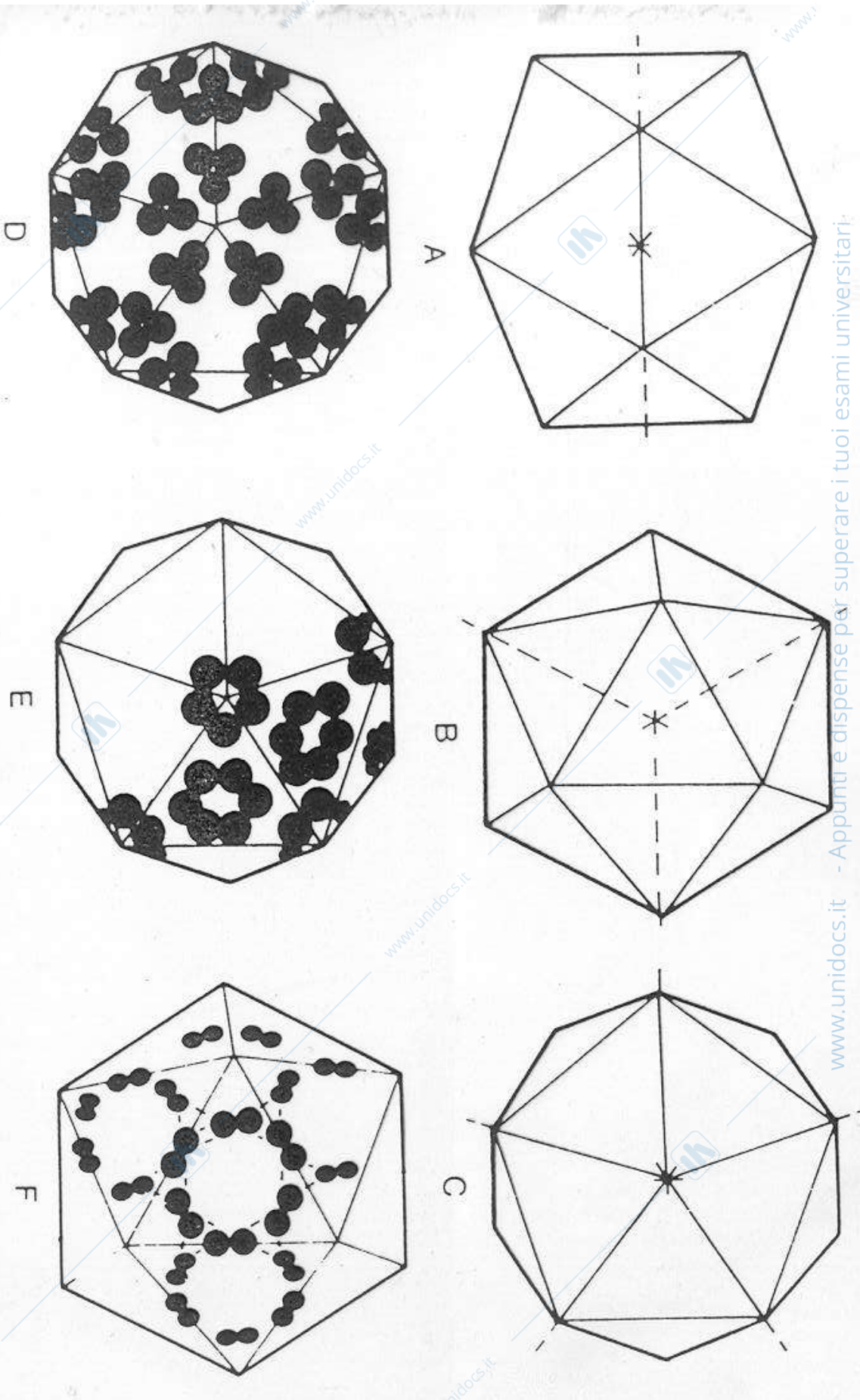
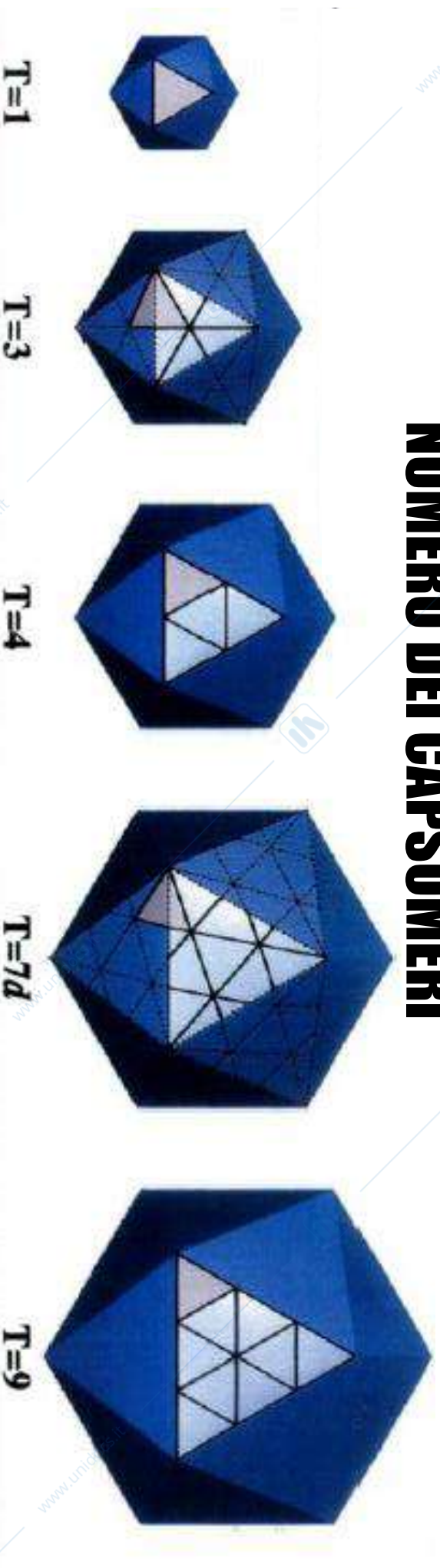
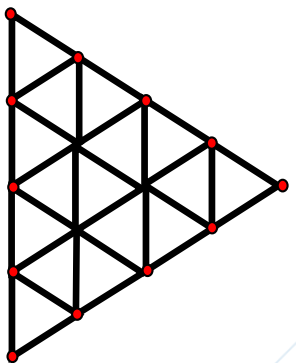


Fig. 1-3 (Top row) Icosahedron viewed along twofold (A), threefold (B), and fivefold (C) axes of symmetry. (Bottom row) Various clusterings of capsid polypeptides are responsible for the characteristic appearances of particular viruses as seen by negative contrast electron microscopy. For example, when capsid polypeptides are arranged as 60 trimers, capsomers themselves are difficult to define; this is the case with foot-and-mouth disease virus (D). When capsid polypeptides are grouped as 12 pentamers and 20 hexamers they form bulky capsomers as is the case with parvoviruses (E). When capsid polypeptides form dimers on the faces they produce ringlike features on the virion surface, as is the case with caliciviruses (F).

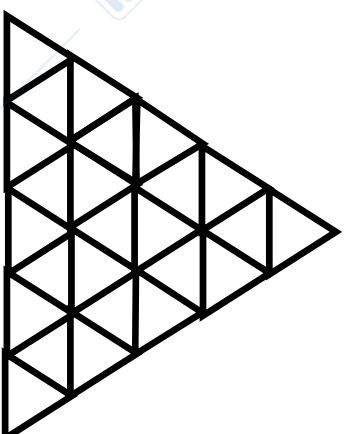
NUMERO DEI CAPSOMERI



. Calcolo del numero di triangolazione* = T



Herpesvirus 16



Adenovirus 25

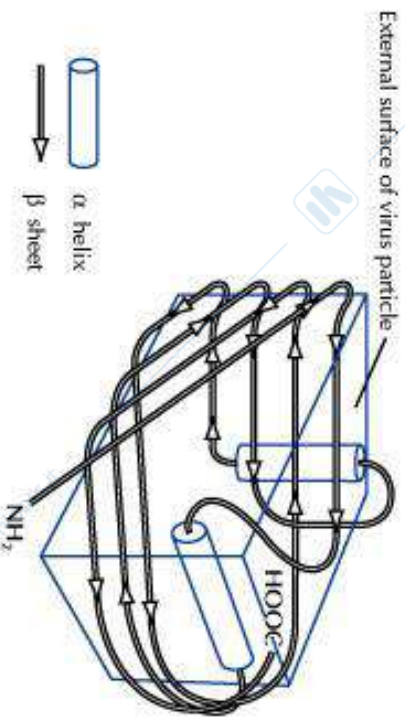
$$N = (10 \times T) + 2$$

(es. Adenovirus T = 25

$$N = 252)$$

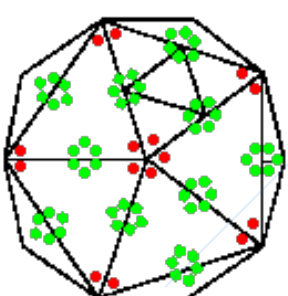
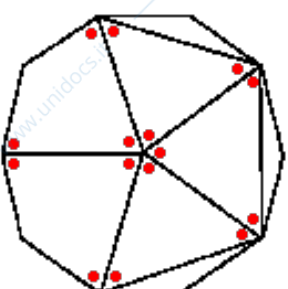
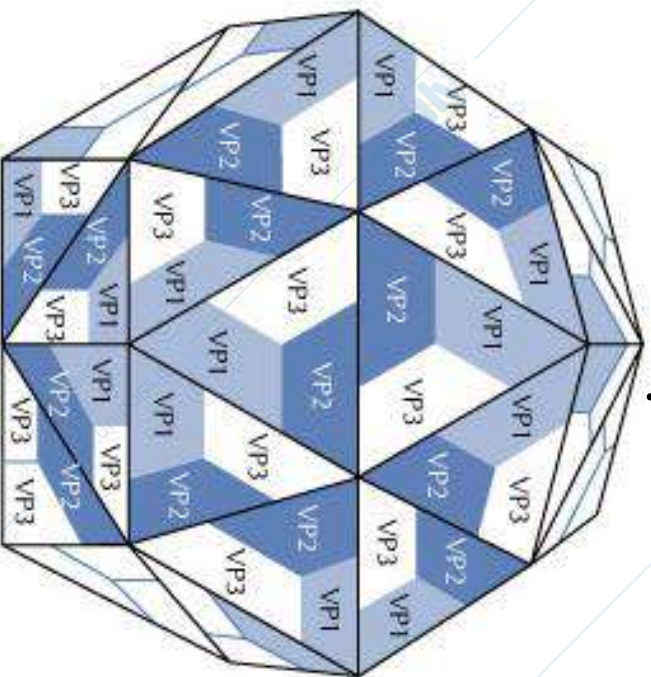
*tracciando delle rette che congiungono tutti i capsomeri adiacenti di una faccia

CAPSIDI ICOSAEDRICI: POLIOVIRUS

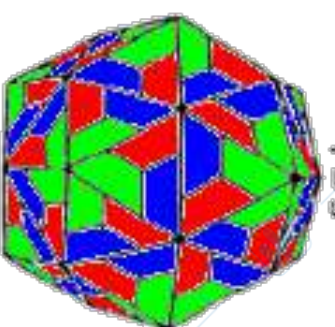


© Academic Press, 2000.

unità strutturali: protomeri



unità morfologica: capsomeri

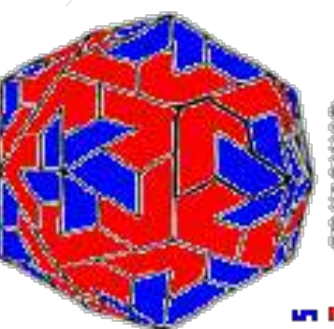
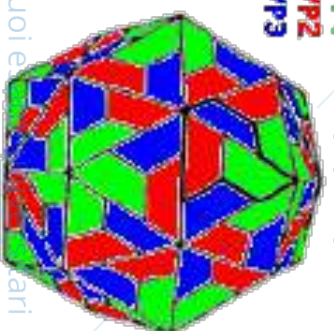


VP1
VP2
VP3

Poliovirus

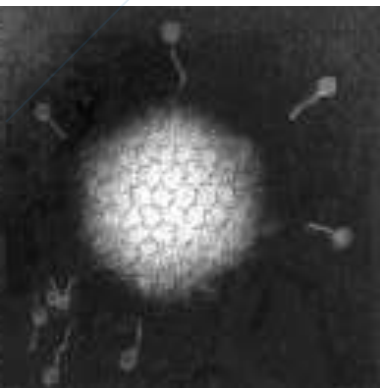
Coxsackievirus

15



© Academic Press, 2000.

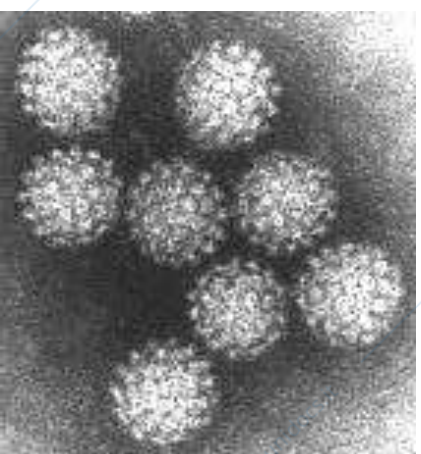
Morfologie virali



adenovirus

100 nm

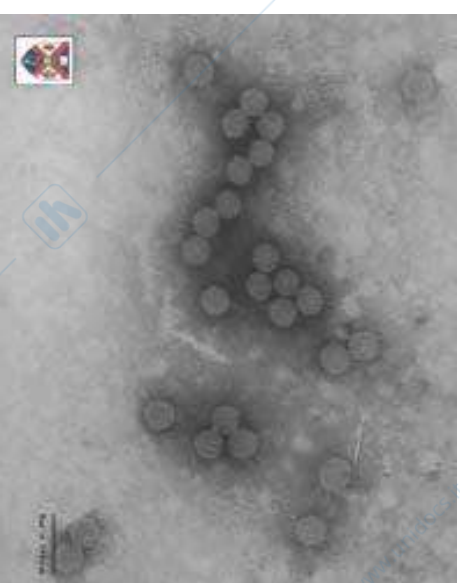
1 nm = 1 millionth of a mm
100 nm = 1 ten thousandth of a mm



papillomavirus

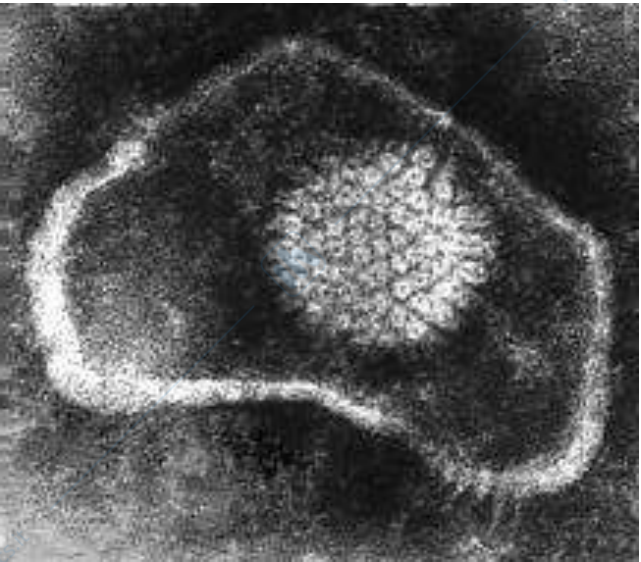


morbillivirus



parvovirus

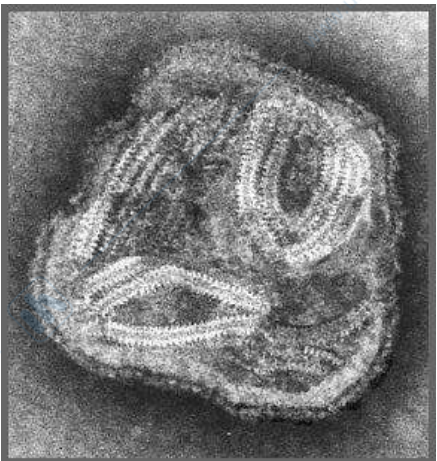
herpesvirus



100 nm

1 nm = 1 millionth of a mm
100 nm = 1 ten thousandth of a mm

parainfluenza
virus

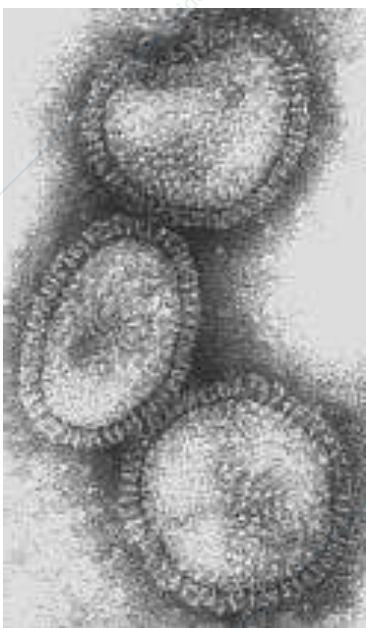


100 nm

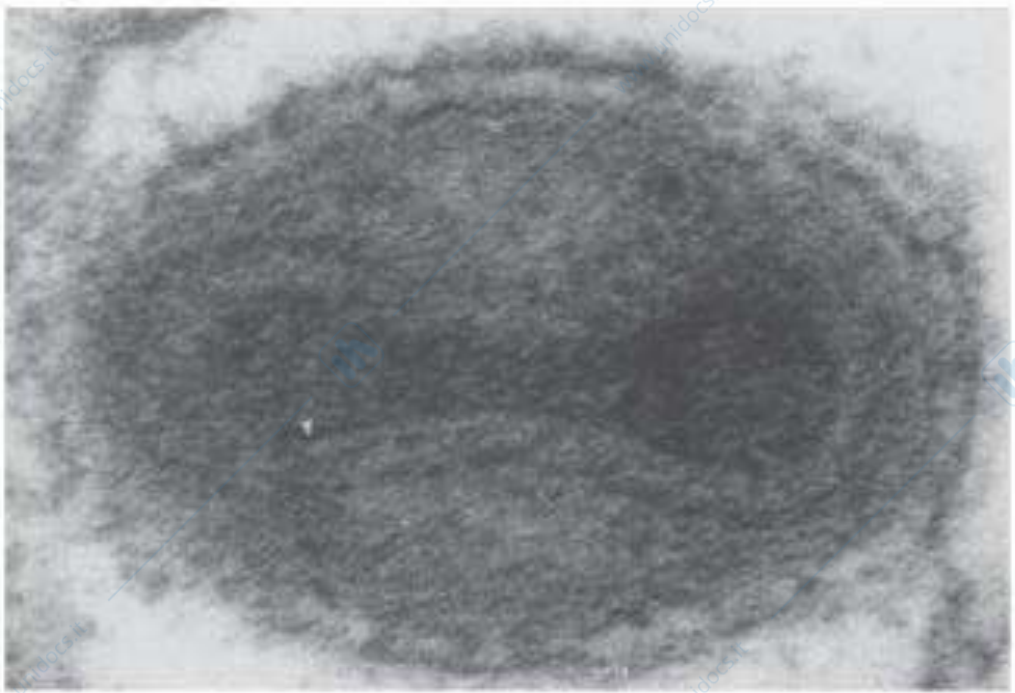
poxvirus



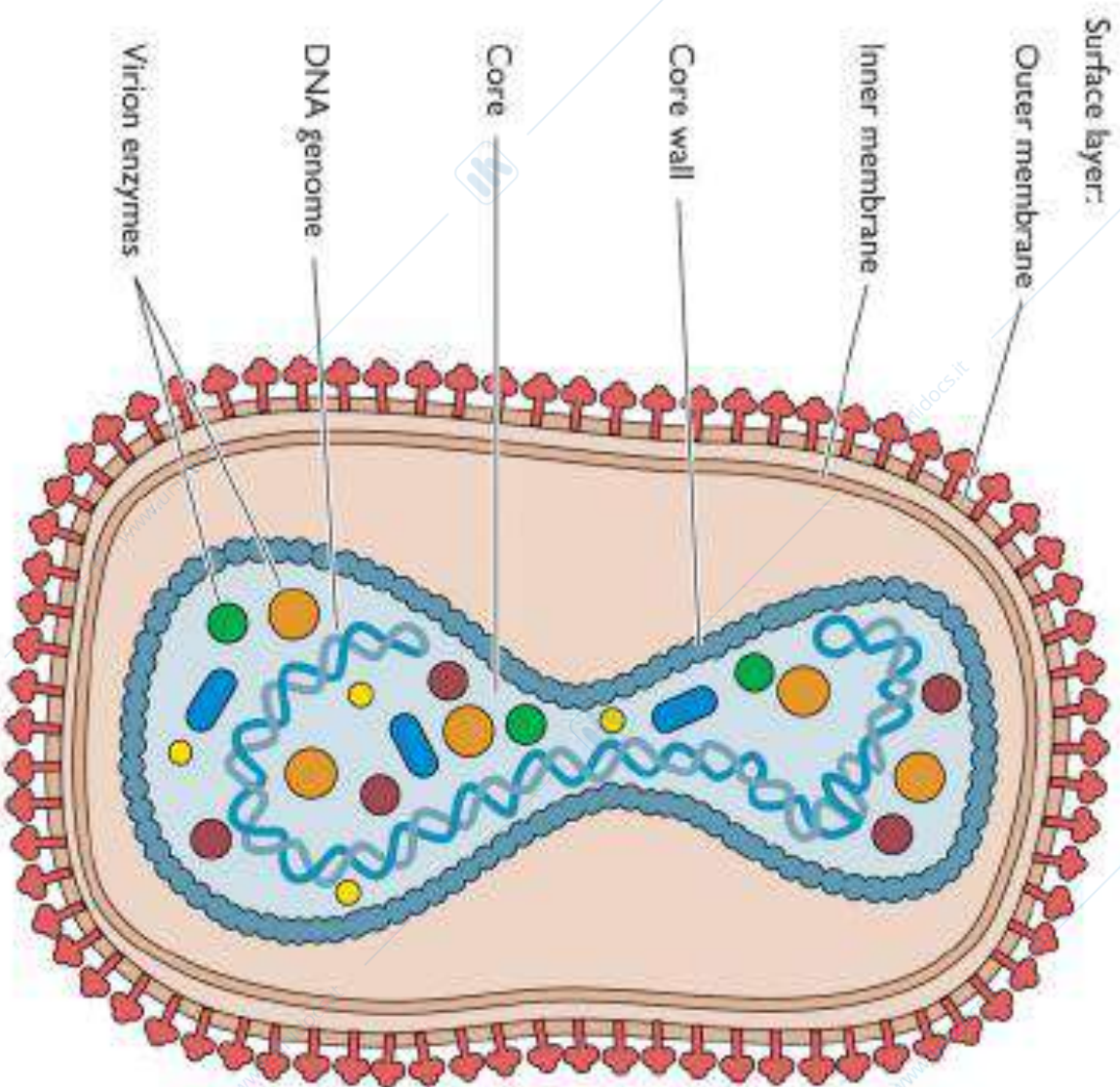
influenzavirus



100 nm

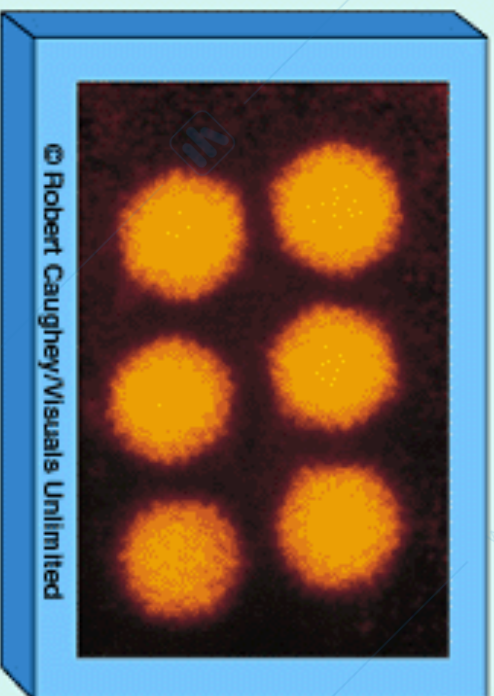
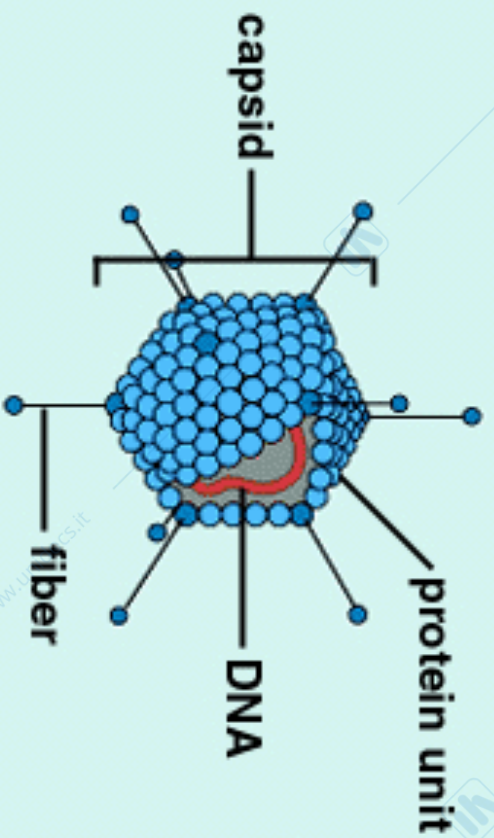


Complex viruses: Vaccinia virus

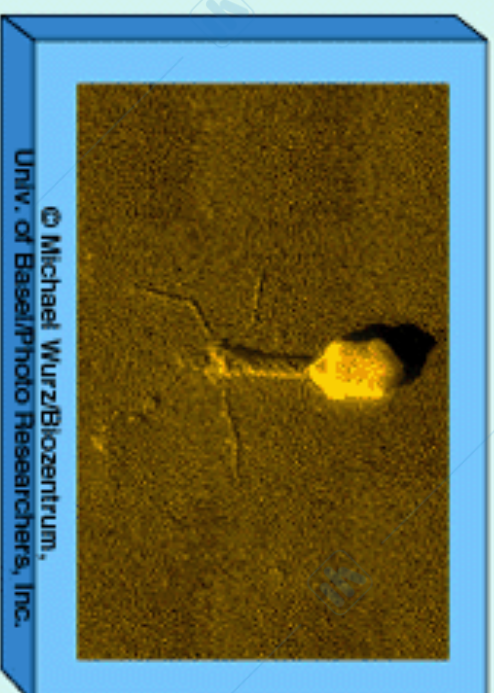
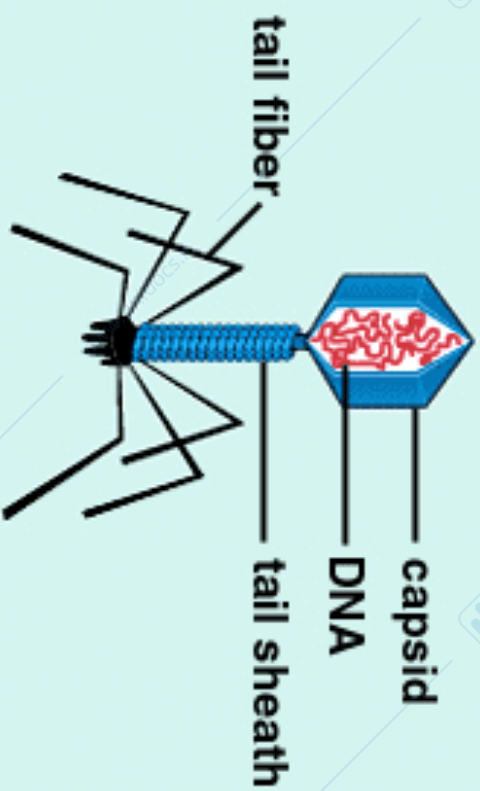


VIRUS COMPLESSI: I BATTERIOFAGI

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

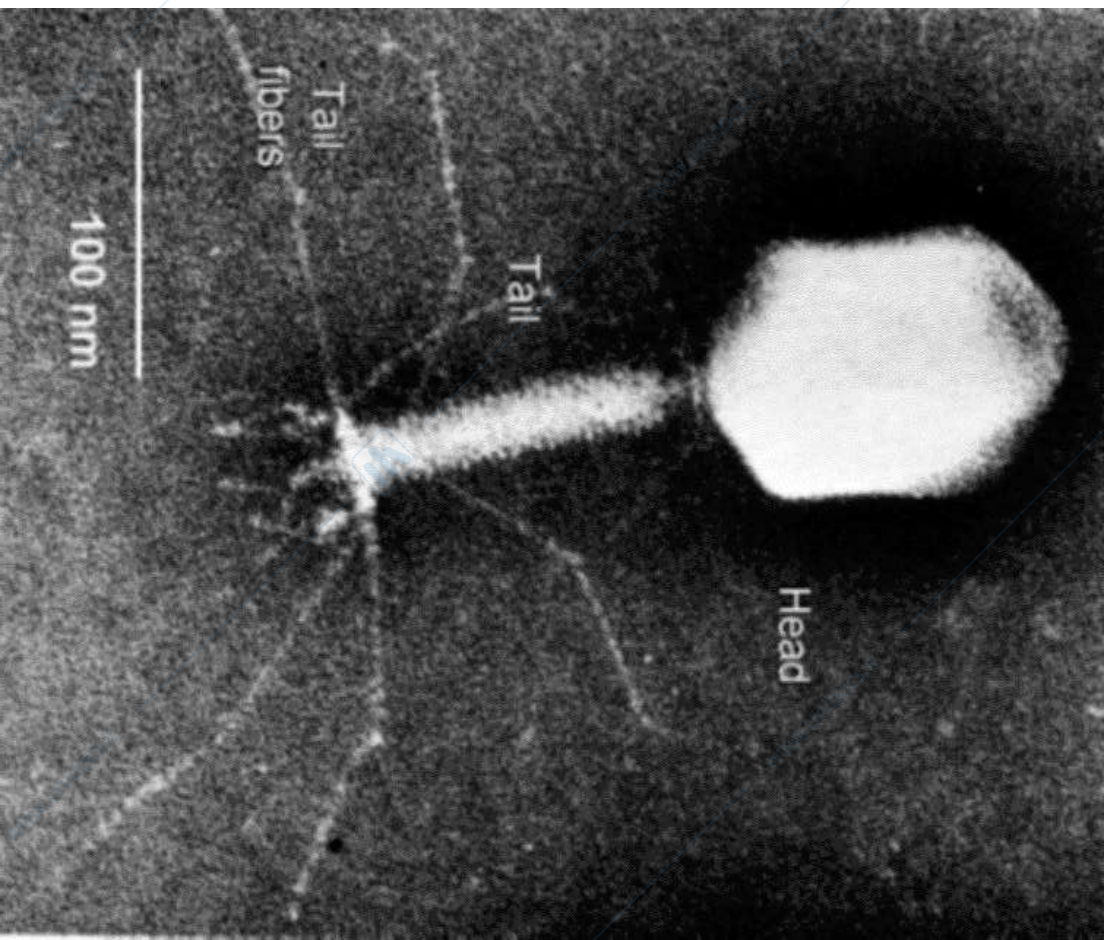


a. Adenovirus: A DNA virus with a polyhedral capsid and a fiber at each corner.



b. T-even bacteriophage: A DNA virus with a polyhedral head and a helical tail.

IL BATTERIOFAGO T4



Proteine virali

- **Proteine Strutturali** sono quelle che costituiscono la struttura del virione
- **Proteine non-strutturali** sono per lo più ad attività enzimatica ed hanno diverse funzioni

Principali attività di proteine virali

- Enzimi che intervengono nella interazione virus-cellula ospite (es. neuramminidasi)
- Enzimi necessari alla trascrizione di mRNA (es. RNA polimerasi RNA dipendente, trascrittasi inversa, RNA polimerasi DNA dipendente (Poxvirus))
- Enzimi necessari per trascrivere RNA genomico in DNA (es. trascrittasi inversa (retrovirus))
- Enzimi necessari alla replica e processamento DNA virionico (HBV)
- Protein kinasi (es. HBV, HSV)

IL GENOMA VIRALE: PROPRIETA'

DNA o RNA, singola e doppia elica, lineare e circolare, unico o frammentato

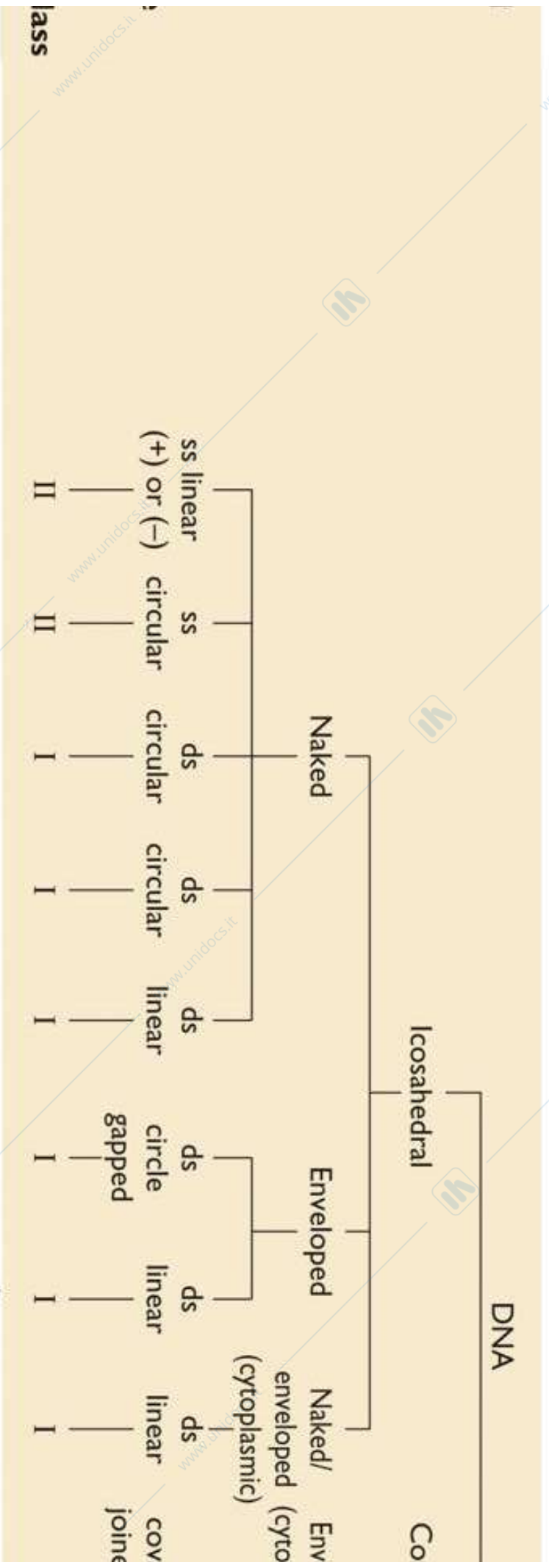
Strettamente impacchettato nel capside
Associato a Ioni⁺ o a proteine basiche (virali o cellulari) per neutralizzare le cariche negative dei gruppi fosfato

Sequenze di riconoscimento per il packaging nella struttura primaria e secondaria

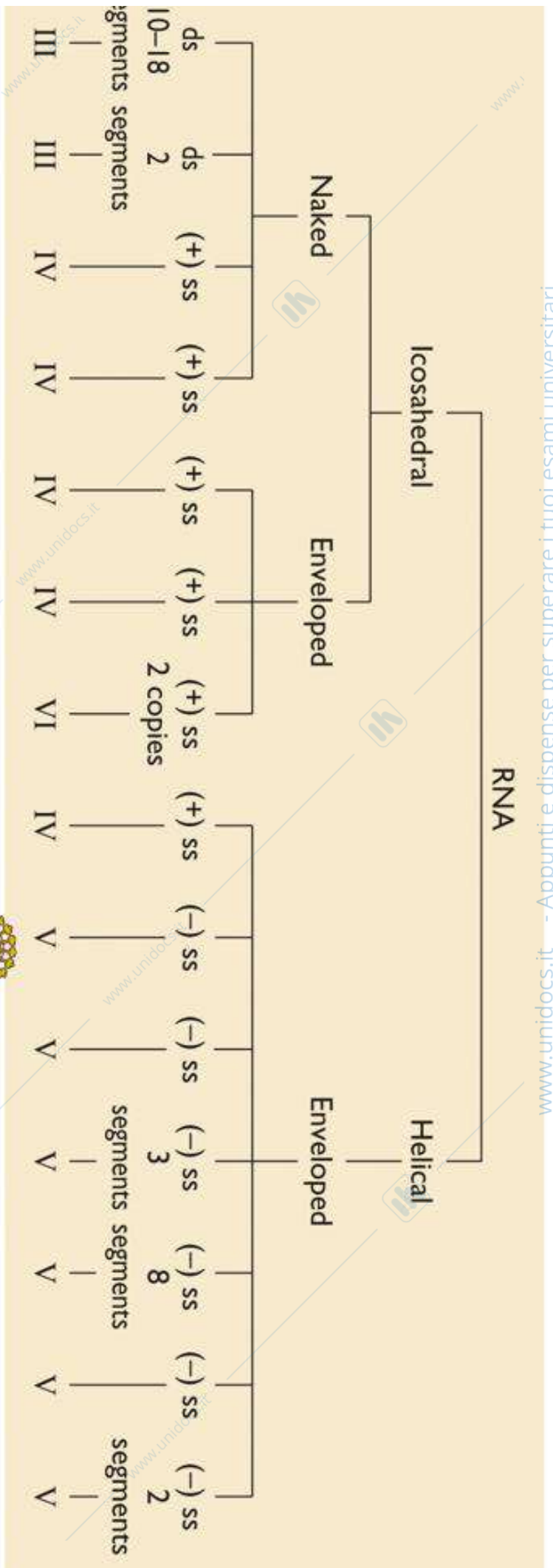
'Necessità' di un innesco per la replicazione : Estremità ridondanti, ripetute o associate a varie proteine per l' innesco della duplicazione; tRNA come primers

Potenziabile di informazione **altamente compresso** (geni sovrapposti), possibilità di splicing multipli e alternativi nell mRNA (geni sovrapposti), RNA genomico a **polarità (+) o (-)** rispetto al messaggero genomi **ambisensò** (misto di + e -)

LE CARATTERISTICHE DEL GENOMA VIRALE DEFINISCONO LE DIVERSE STRATEGIE DI REPLICAZIONE



Family	Genome Type	Size (nm)	Structure	Envelope
Parvo	(-)	18-26		No
Circo	(-)	12-26		No
Polyoma	(-)	40		No
Papilloma	(-)	55		No
Adeno	(-)	70-90		No
Hepadna	(+)	42		Yes
Herpes	(-)	150-200		Yes
Irido	(-)	125-300		No



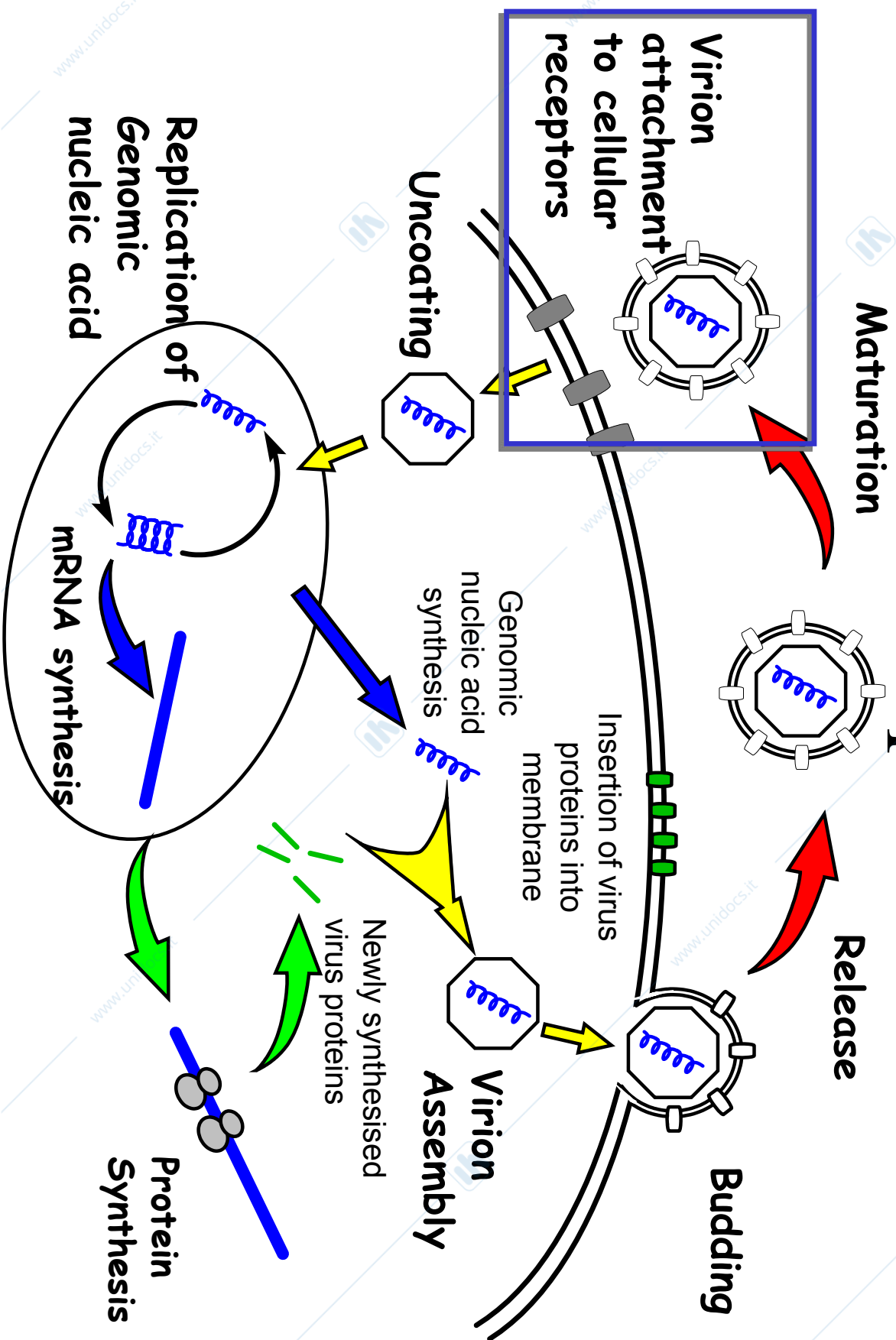
Reo	Birna	Calici	Picorna	Flavi	Toga	Retro	Corona	Filo	Rhabdo	Bunya	Ortho-myxo	Para-myxo	Arena
(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
60-80	60	35-40	28-30	40-50	60-70	80-130	80-160	80 X 790-14,000	70- 85 X 130-380	90-120	90-120	150-300	50-300
22-27	7	8	10	12	12	16-21	12.7	13-16	13.5-21	13.6	16-20	10-14	

Fasi di replica virale

Adsorbimento

- Penetrazione
- Uncoating
- Trascrizione, traduzione
- Replicazione del genoma
- Assemblaggio
- Rilascio

Virus replication



Attacco, Penetrazione, e “Uncoating”

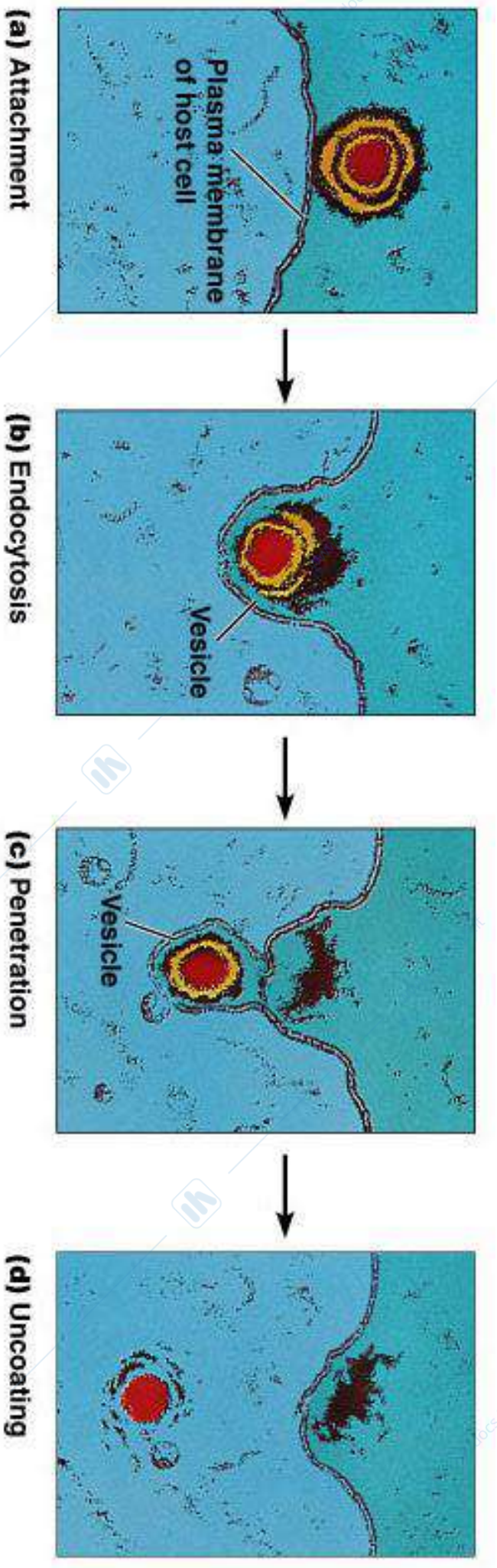


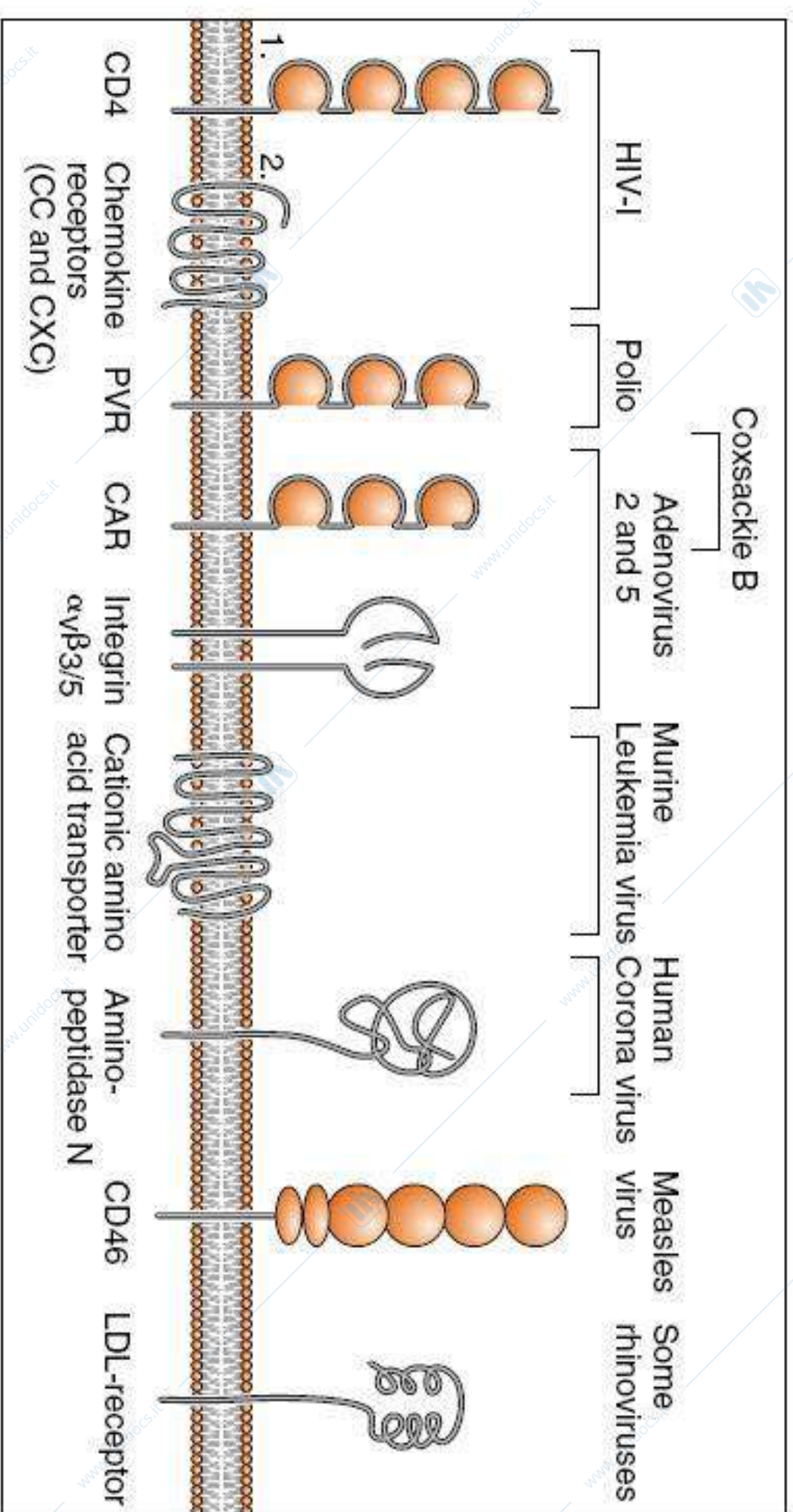
Figure 13.14

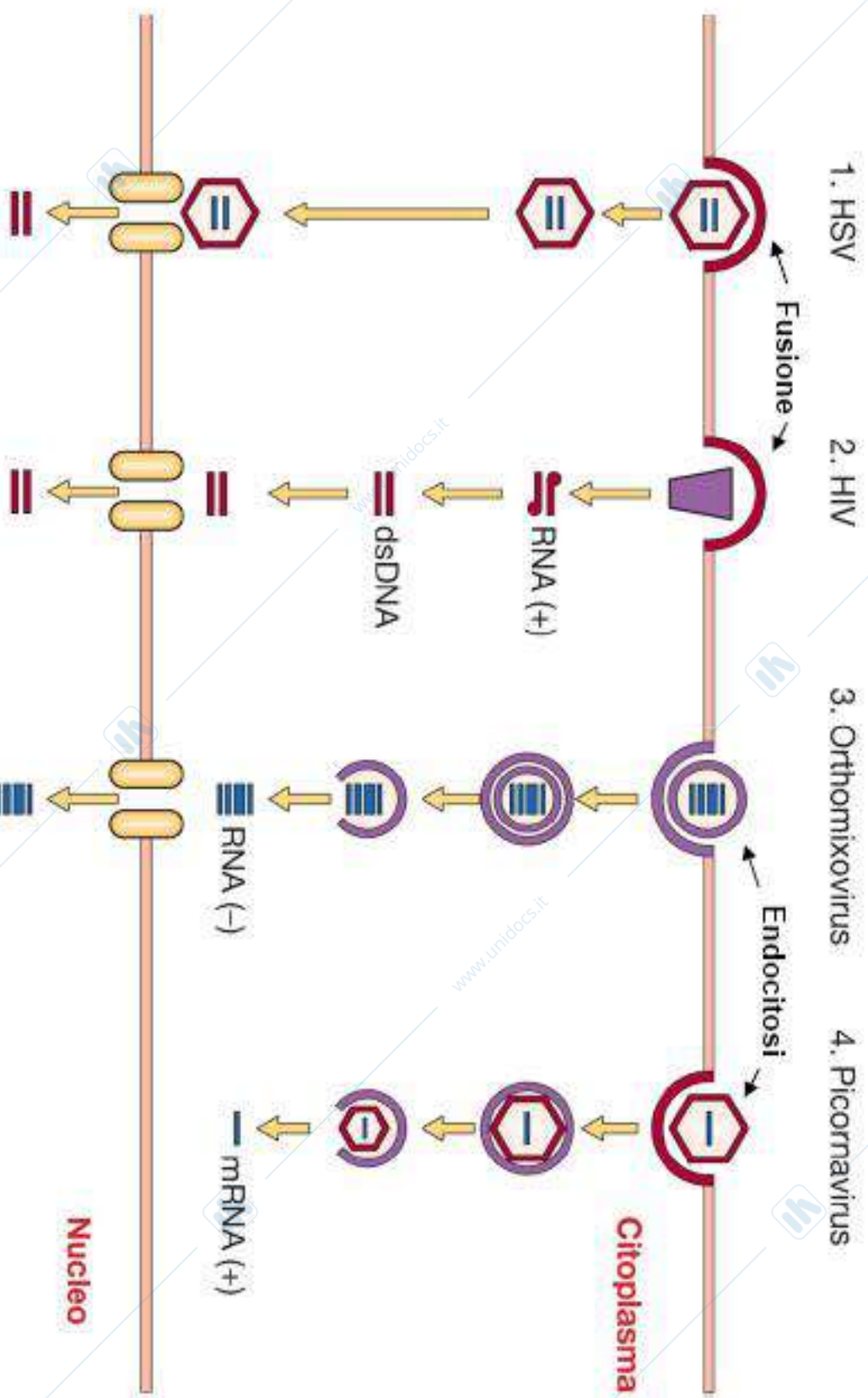
TABLE 6-6. Examples of Viral Receptors

Virus	Target Cell	Receptor*
Epstein-Barr virus	B cell	CD3d complement receptor CR2 (CD21)
Human immuno- deficiency virus	Helper T cell	CD4 molecule and che- mokine co-receptor
Rhinovirus	Epithelial cells	ICAM-1 (immunoglobulin superfamily protein)
Poliovirus	Epithelial cells	Immunoglobulin super- family protein
Herpes simplex virus	Many cells	Immunoglobulin super- family protein
Rabies virus	Neuron	Acetylcholine receptor
Influenza A virus	Epithelial cells	Sialic acid
B19 parvovirus	Erythroid precursors	Erythrocyte P antigen (globoside)

* Other receptors for these viruses may also exist.
ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule.

Recettori virali





G. Antonelli e M. Clementi

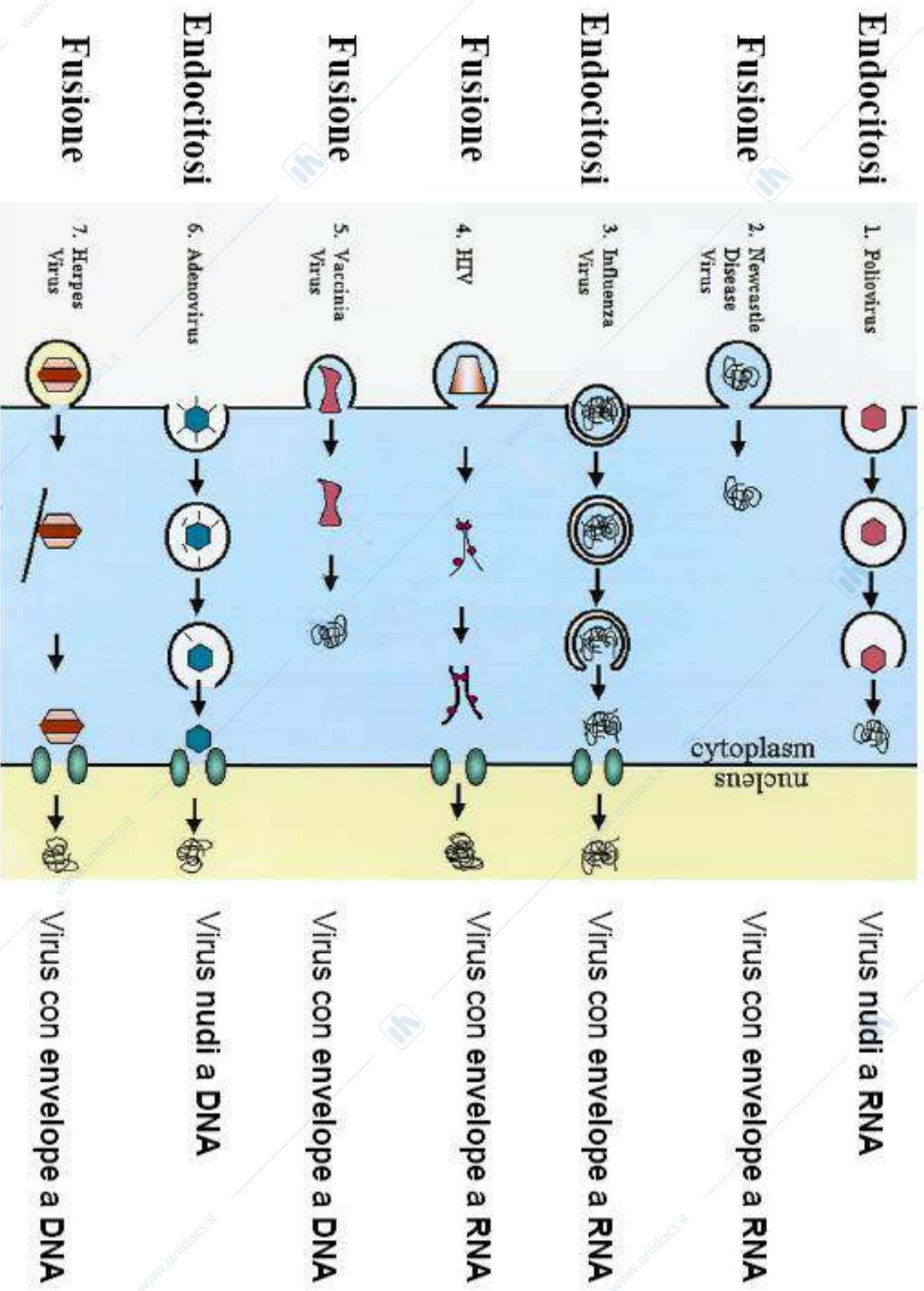
Principi di Virologia Medica

Copyright 2008 C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana

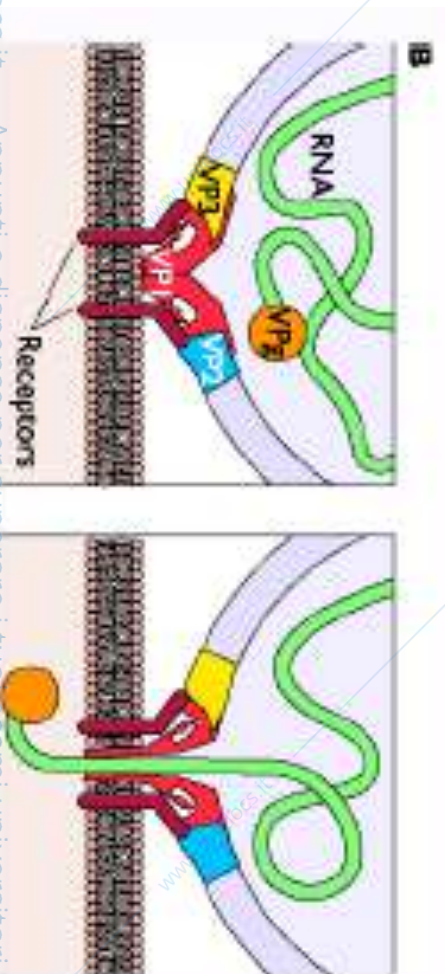
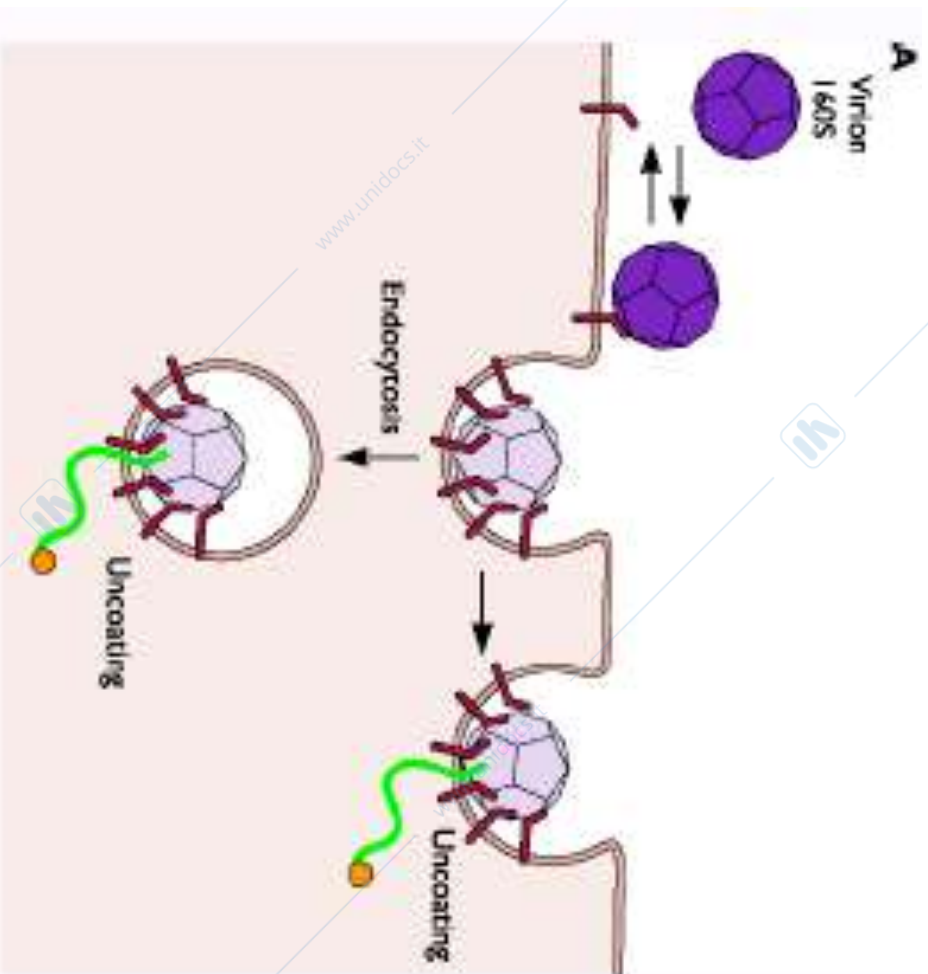
Meccanismi di entrata per diverse classi di virus

Penetrazione

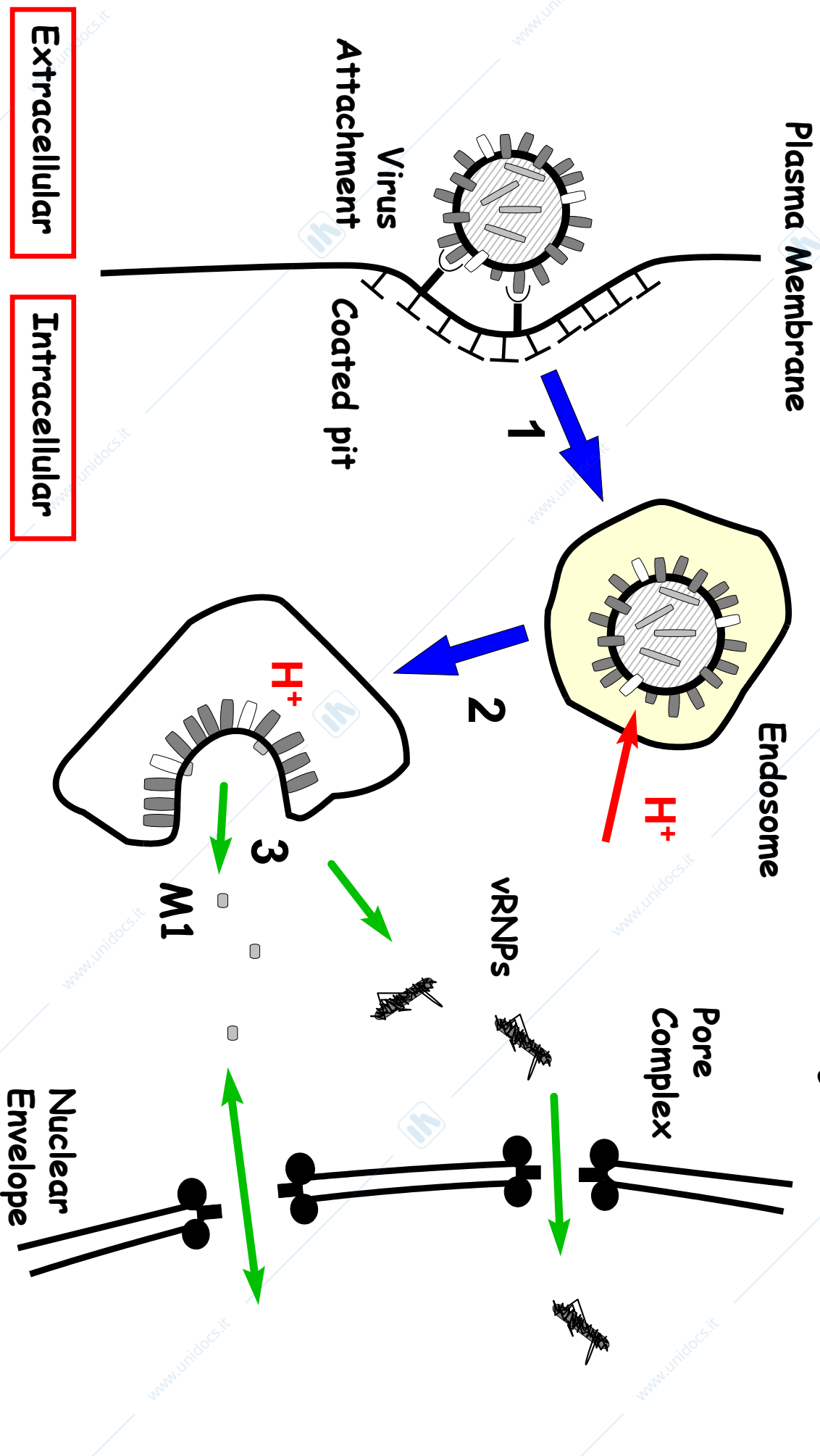
Scapsidamento



Modello di entrata di virus privo di pericapside: poliovirus

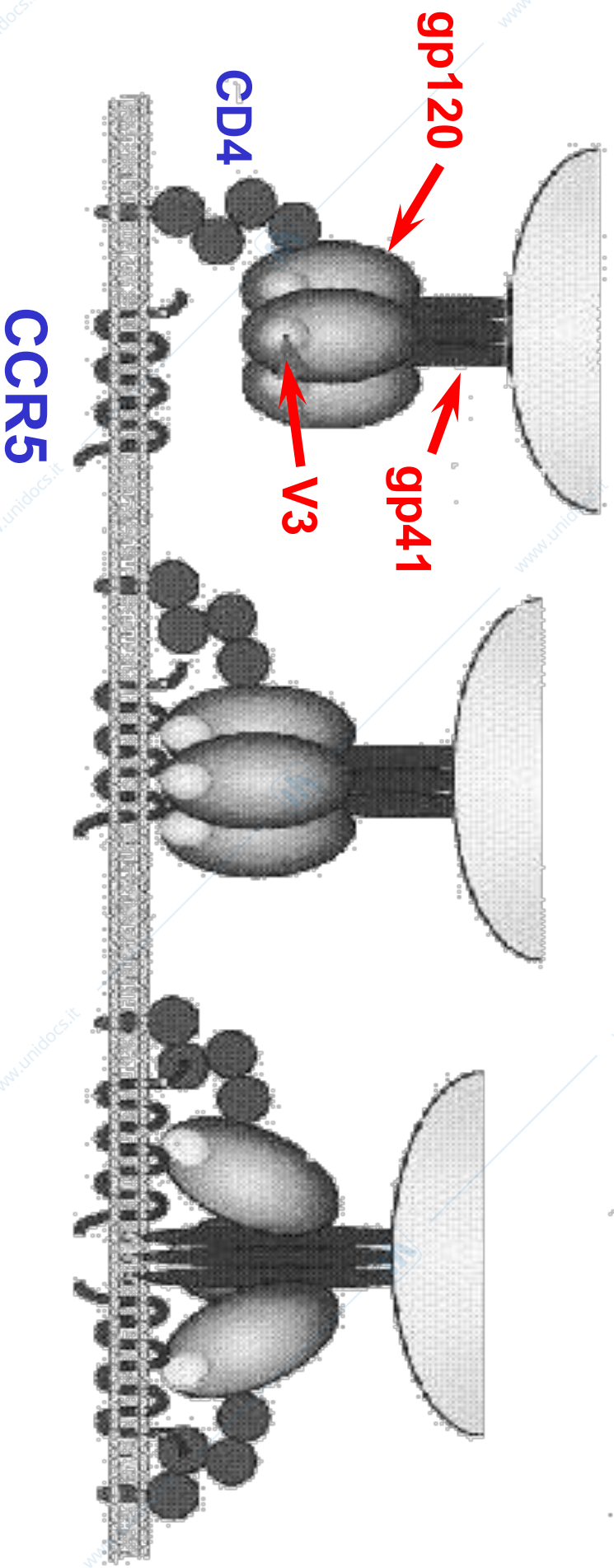


Influenza virus entry



HIV Receptor Interaction

CD4 Binding → **CCR5 Binding** → **Fusion Peptide Exposure**



Pericapside o envelope

Tipico dei virus **ANIMALI**.

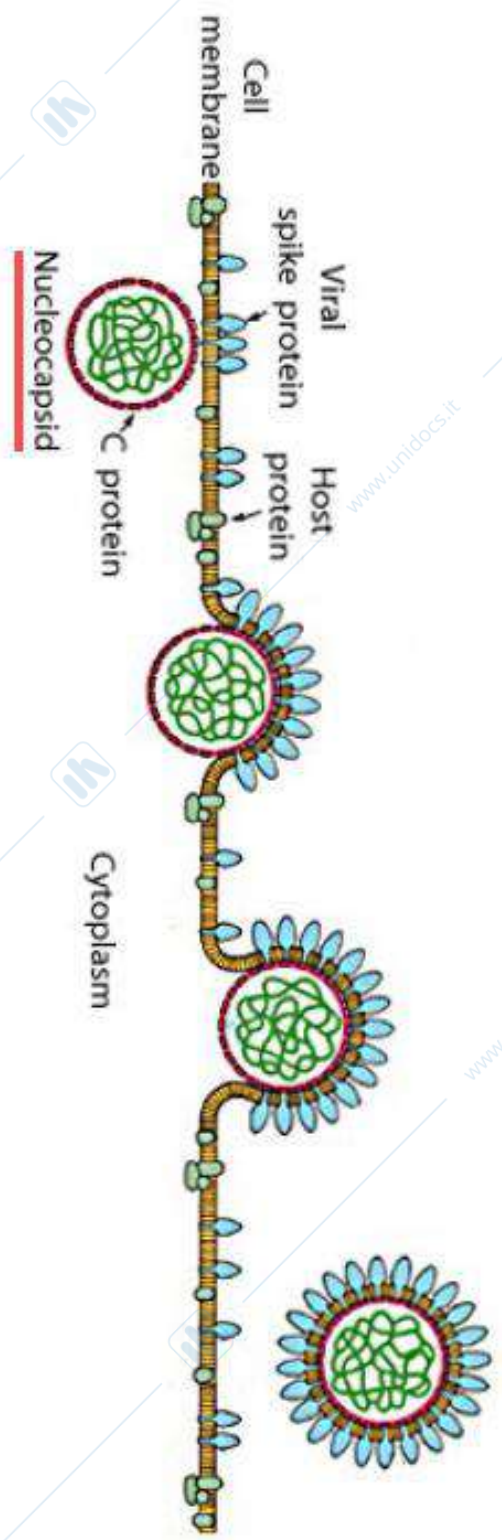
Il mantello pericapsidico o envelope è costituito da **fosfolipidi e glicoproteine**

Deriva dalle membrane della cellula ospite per mezzo di un processo di **gemmazione** .

Le glicoproteine che formeranno le **spicole** sono codificate dal virus

Queste strutture sono importanti nella fase d'attacco del ciclo replicativo virale

Membrane virus buds from cell membrane:
Creates new virus that has cell's membrane as a coat (containing virus proteins) and a nucleocapsid inside



www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.unidocs.it

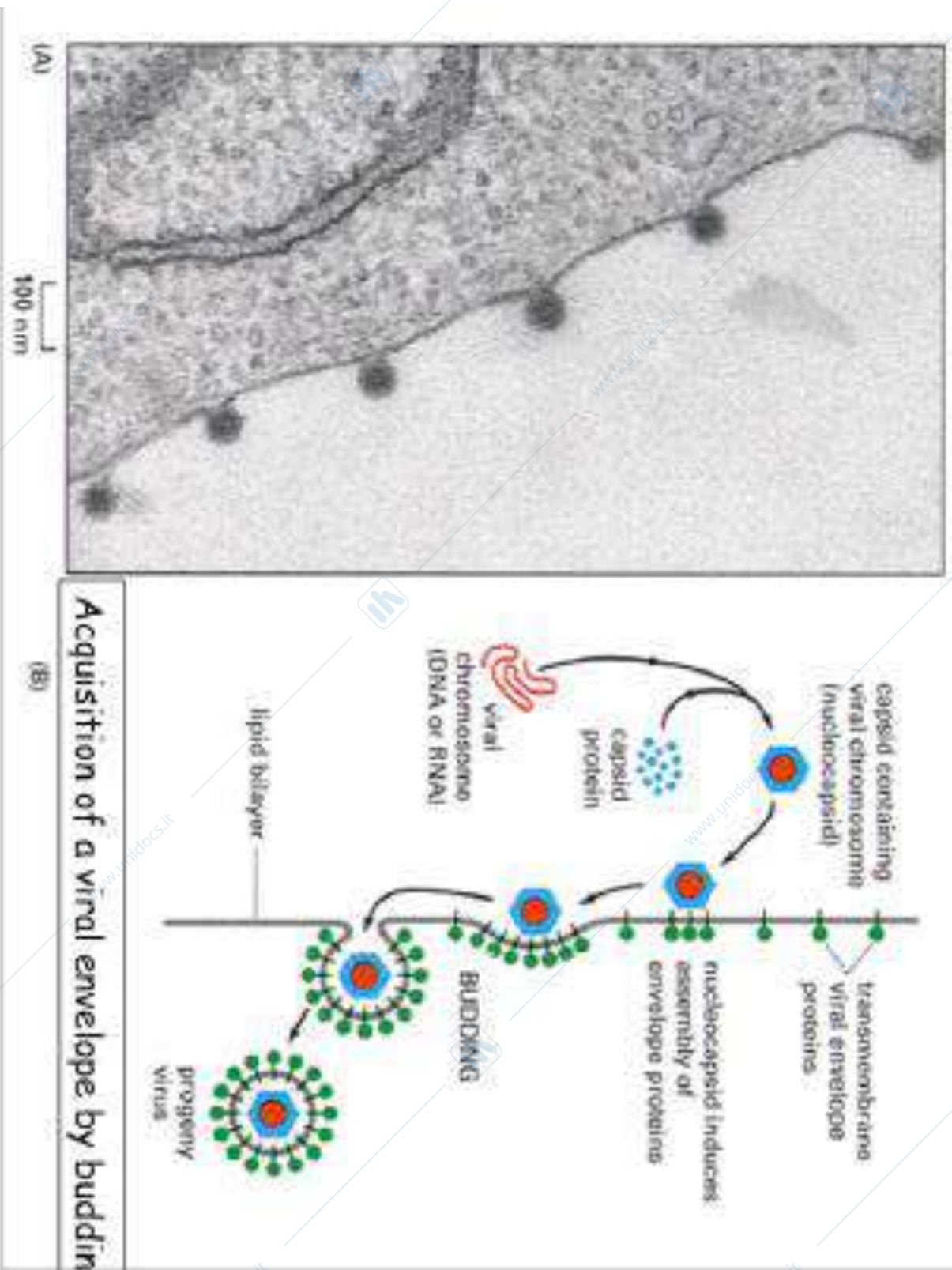
www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.unidocs.it

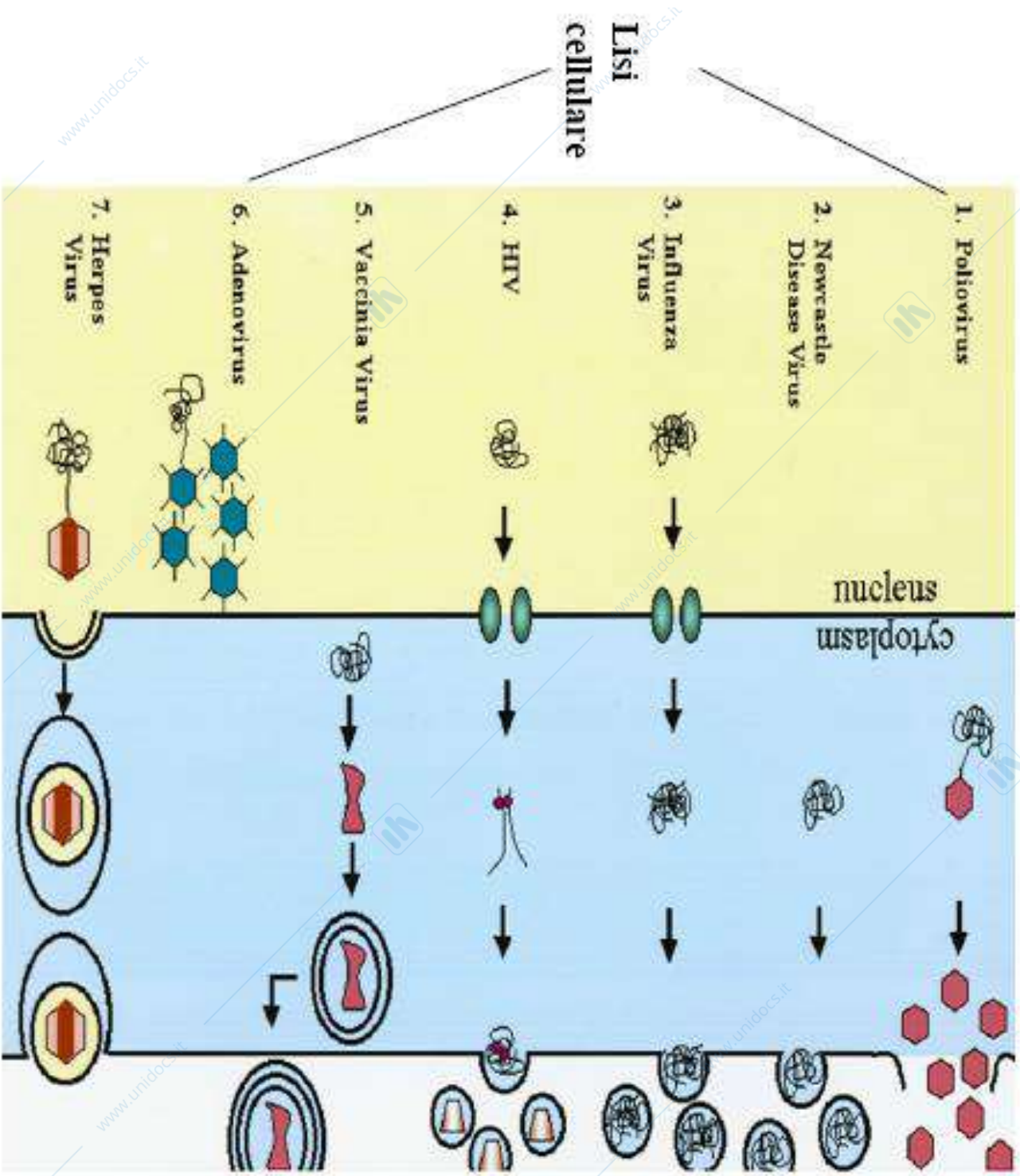
www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

Rilascio dei virioni dalla cellula



VIE DI USCITA PER DIFFERENTI CLASSI DI VIRUS

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari



Virus nudi a RNA

Virus con envelope a RNA

Virus con envelope a RNA

Virus con envelope a RNA

Virus con envelope a DNA

Virus nudi a DNA

Virus con envelope a DNA

Batteriofagi

Ciclo litico vs ciclo lisogeno

- **Ciclo litico** (fago virulento)
- Rilascio del virus e uccisione della cellula
- **Ciclo lisogeno** (fago temperato)
 - Il DNA fagico si integra con il genoma cellulare
Viene espressa una proteina fagica che previene la trascrizione di altri geni fagici
 - Può essere trasmesso alla cellula batterica sorella
 - Può iniziare un ciclo litico in risposta a segnali ambientali

CICLO LITICO E LISOGENO

I fagi si dividono in

LITICI

TEMPERATI

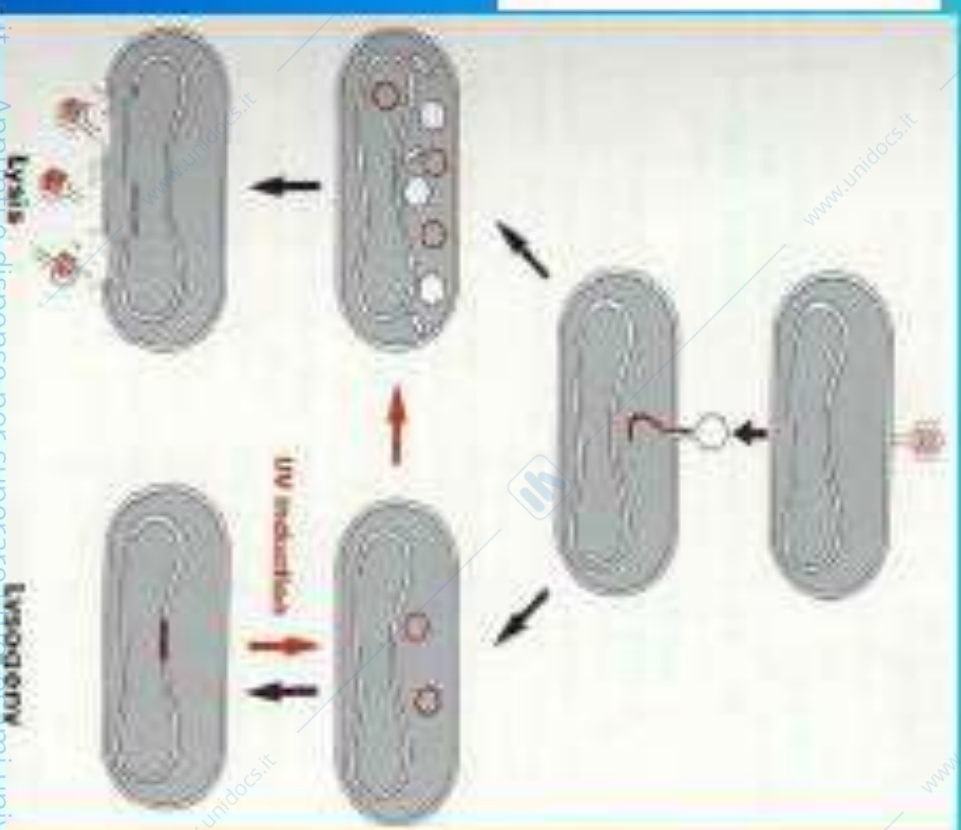
si moltiplicano e alla fine lisano sempre la cellula ospite

possono produrre il fenomeno della **LISOGENIA** oppure lisare la cellula come i litici.

Ciclo litico

Espressione dei geni:

- Immediati precoci
- Early o precoci
- Late o tardivi



Ciclo lisogenico

Inizialmente uguale all'altro

- Geni litici repressi da specifiche proteine fagiche precoci e attiva operon dell'immunità.
- Il genoma fagico si integra nel cromosoma

LISOGENIA

Fenomeno inizialmente identificato in colture batteriche che, pur contenendo basse quantità di fagi infettivi, non andavano incontro a lisi.

Capacità del DNA di alcuni fagi di integrarsi nel genoma del batterio e persistere indefinitamente senza essere trascritto.

Il DNA del fago lisogenico, all'interno della cellula (integrato o meno) viene detto PROFAGO:

Si può integrare in posizioni a caso o in posizioni ben precise del cromosoma

Si integra per cross over fra il genoma fagico circolarizzato e il genoma dell'ospite.

Si può escindere dopo induzione e andare incontro a ciclo litico.

CONVERSIONE FAGICA: effetti sul fenotipo del batterio.

Esempio: secrezione di tossine (difterica, eritrogenica, botulinica)

1 Attachment. The T4 phage uses its tail fibers to bind to specific receptor sites on the outer surface of an *E. coli* cell.

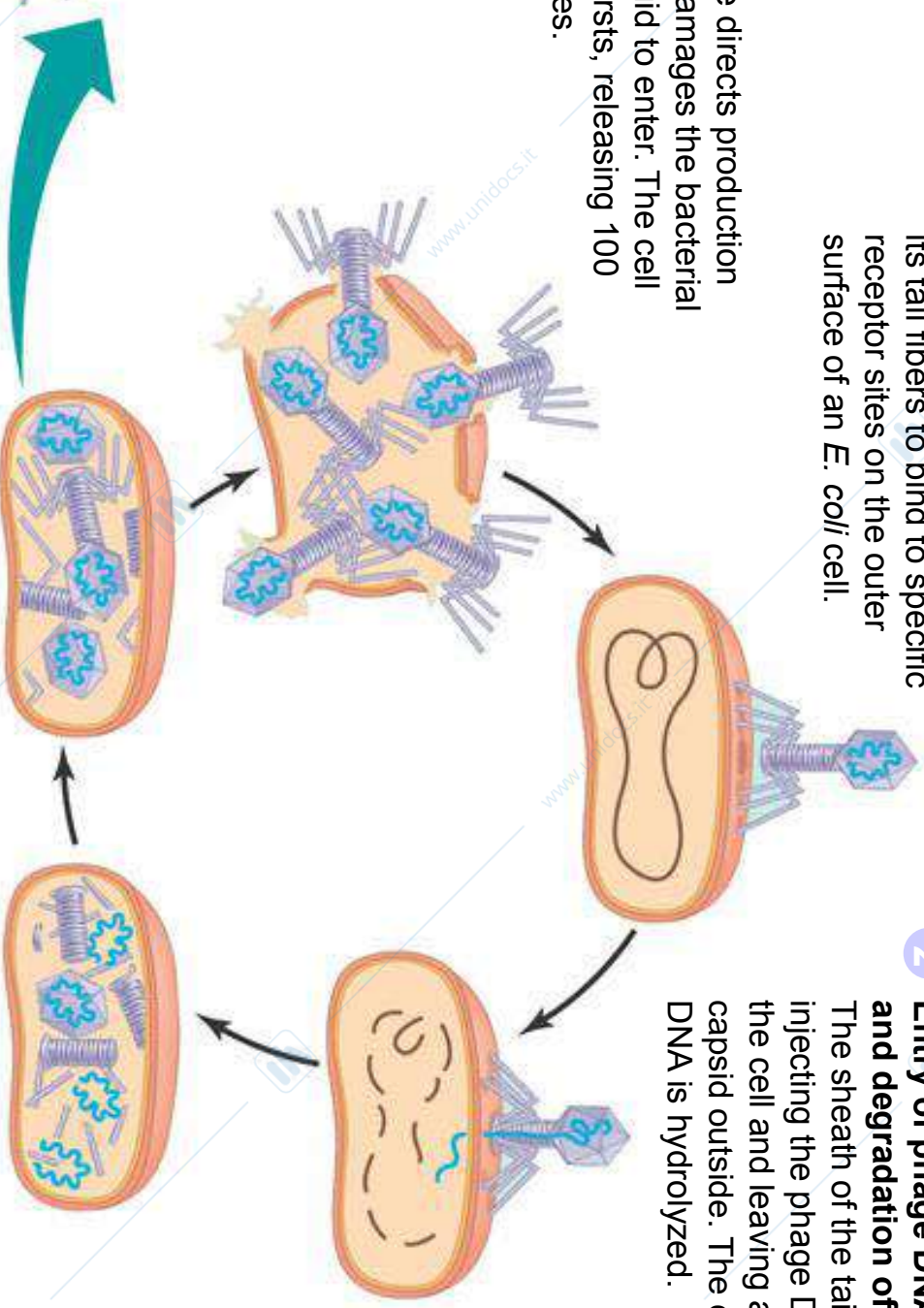
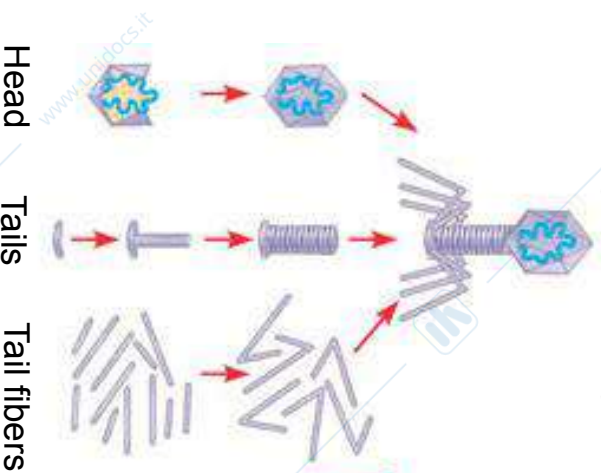
2 Entry of phage DNA and degradation of host DNA. The sheath of the tail contracts, injecting the phage DNA into the cell and leaving an empty capsid outside. The cell's DNA is hydrolyzed.

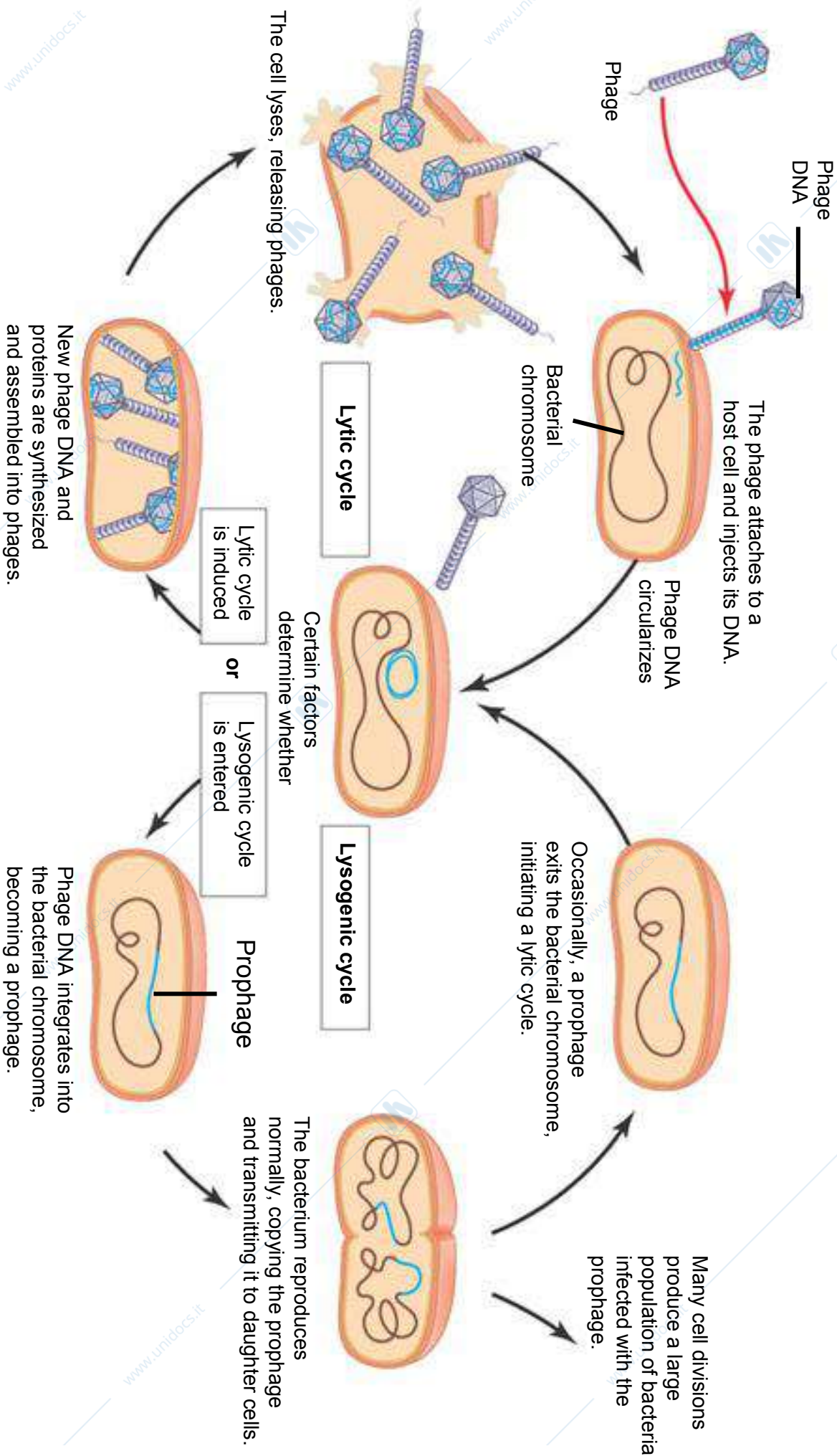
5 Release. The phage directs production of an enzyme that damages the bacterial cell wall, allowing fluid to enter. The cell swells and finally bursts, releasing 100 to 200 phage particles.

4 Assembly. Three separate sets of proteins self-assemble to form phage heads, tails, and tail fibers. The phage genome is packaged inside the capsid as the head forms.

3 Synthesis of viral genomes and proteins. The phage DNA directs production of phage proteins and copies of the phage genome by host enzymes, using components within the cell.

Phage assembly



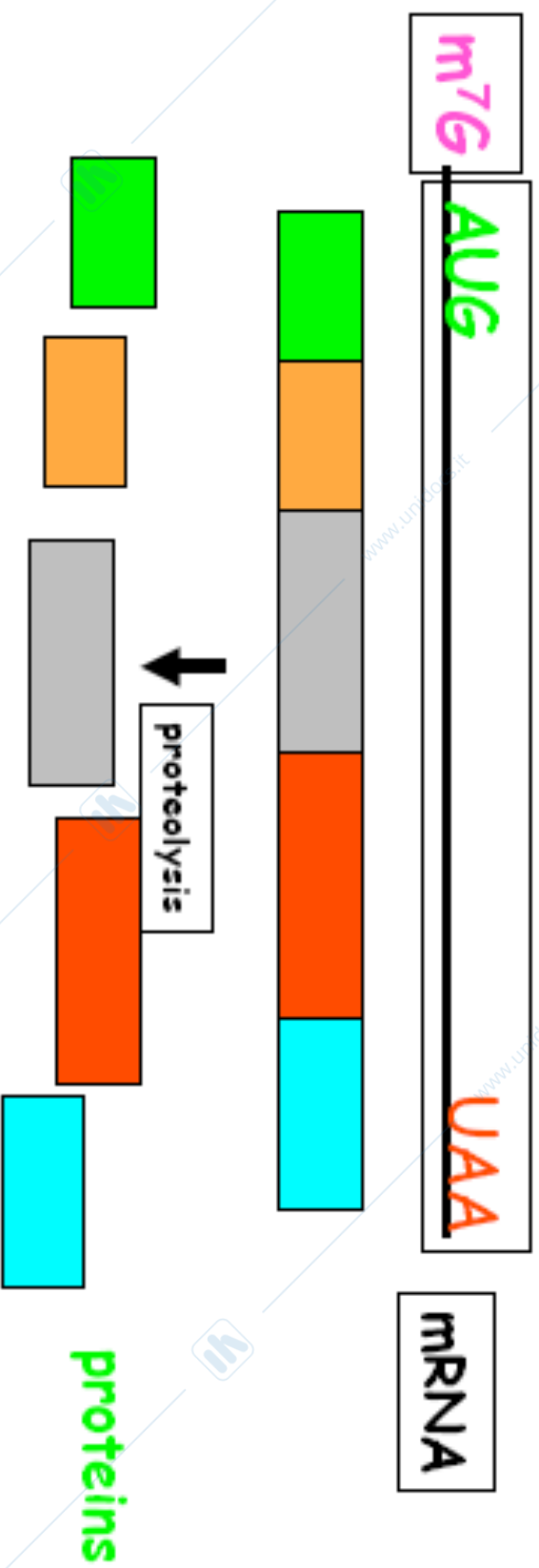


Viral mechanisms to maximize coding capacity

- ❖ **polyproteins**
- ❖ **leaky scanning**
- ❖ **re-initiation**
- ❖ **suppression of termination**
- ❖ **ribosomal frameshifting**

Viral mechanisms to maximize coding capacity

capacity: **polyproteins**



in: **picornavirus, flavivirus, alphavirus and retrovirus**

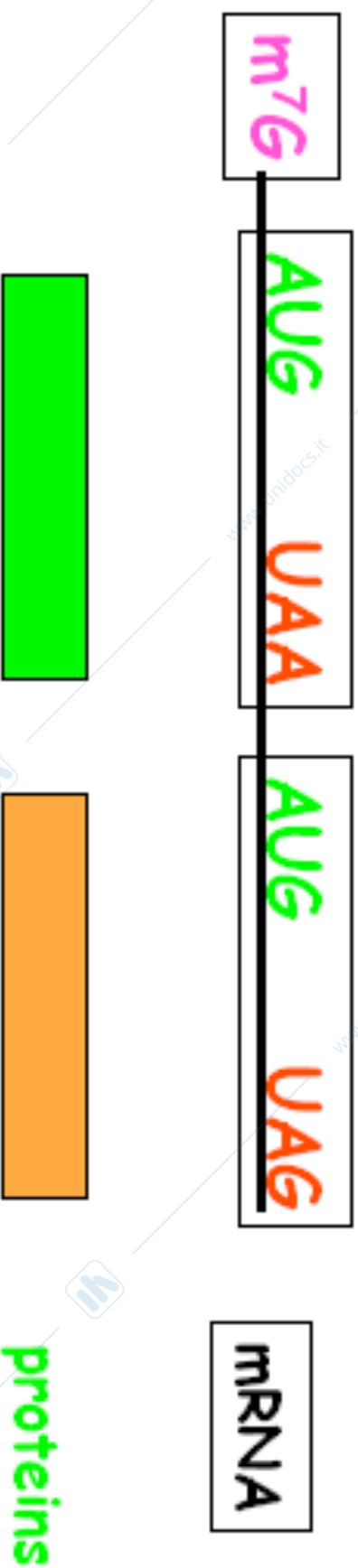
Viral mechanisms to maximize coding

capacity: **leaky scanning**



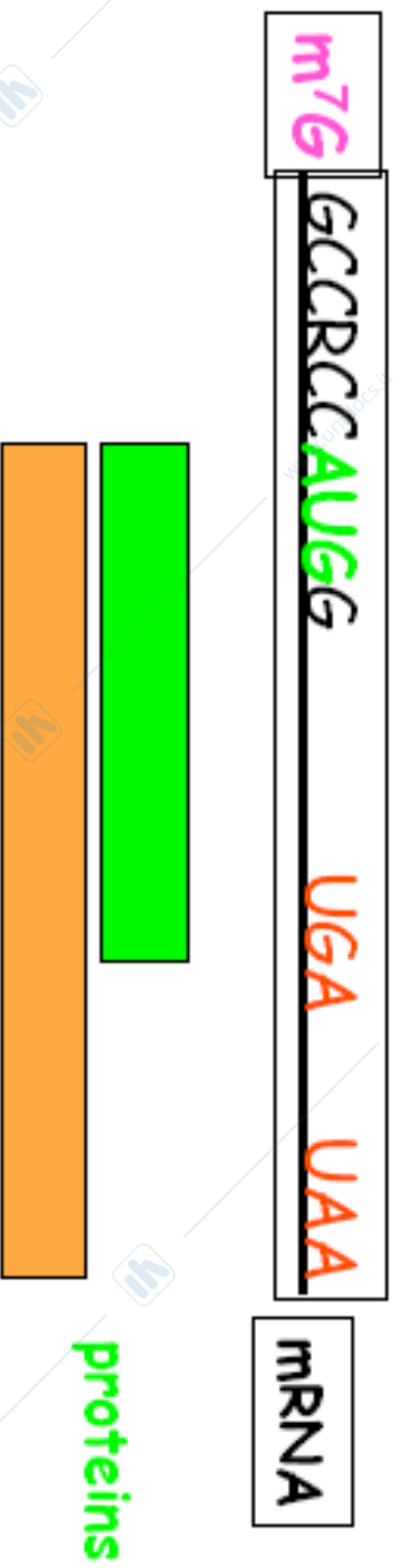
in: **sendai virus P/C mRNA, HIV type 1, simian virus 40**

Viral mechanisms to maximize coding capacity: **Re-initiation**



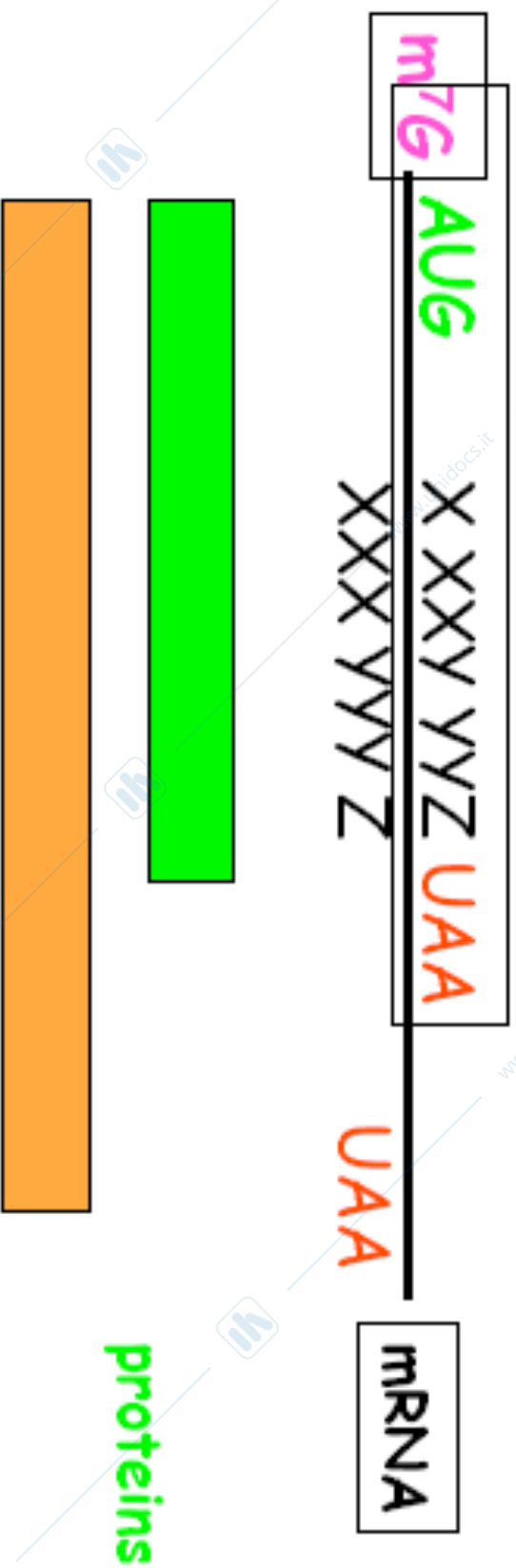
in: **influenza B RNA 7, cytomegalovirus gp48**

Viral mechanisms to maximize coding capacity: nonsense suppression



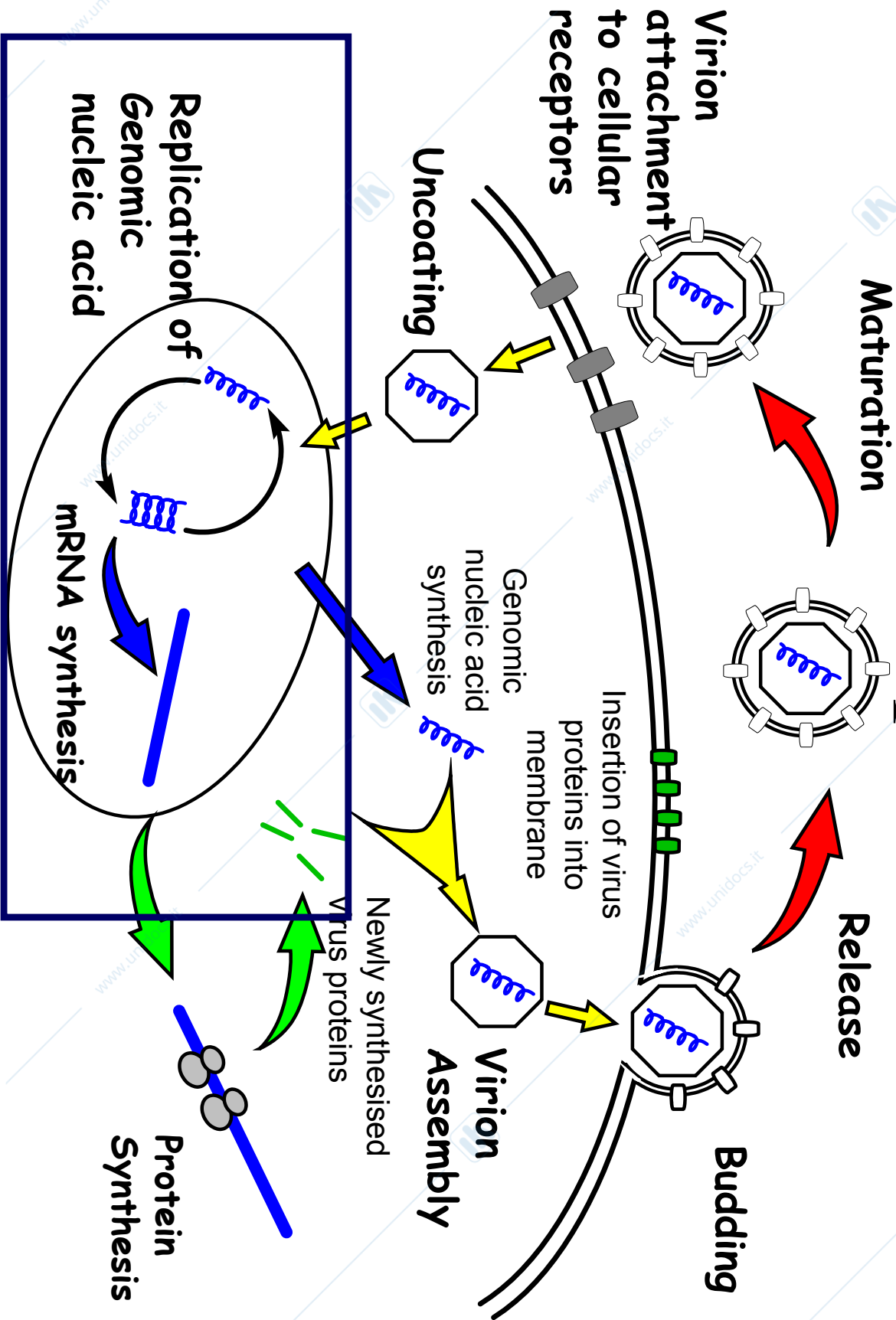
in: **alphavirus nsP4, retrovirus Gag-Pol**

Viral mechanisms to maximize coding capacity: **frameshifting**

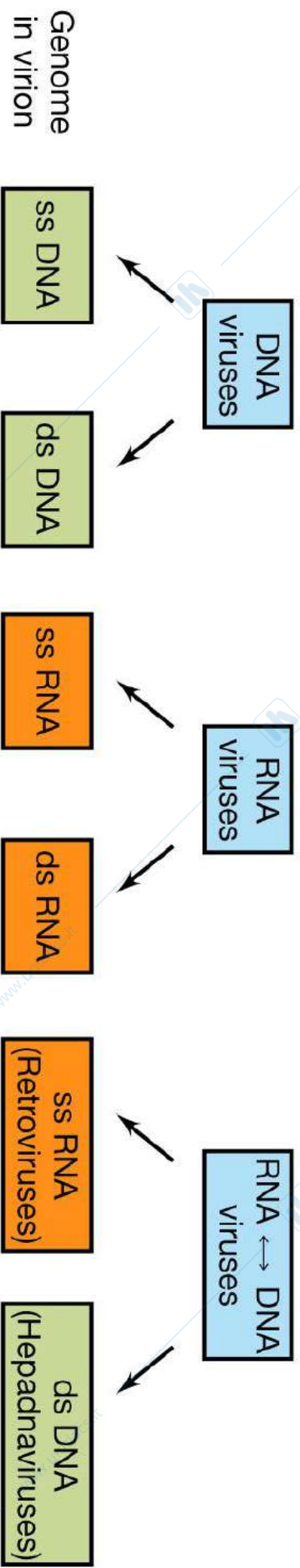


in: **coronavirus, human astrovirus, retroviral Gag-Pol**

Virus replication



Il genoma virale



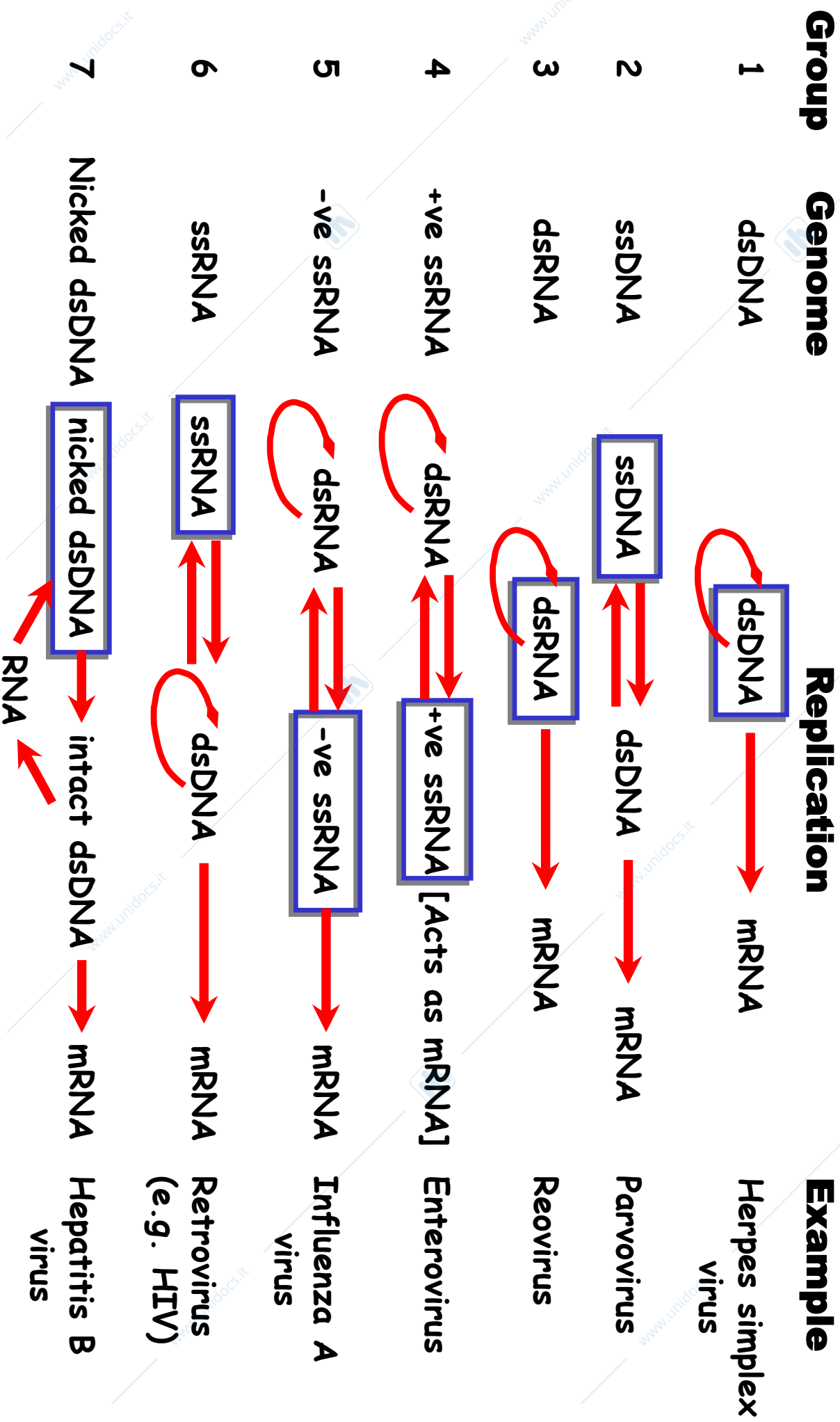
Codifica per la sintesi delle componenti virali e degli enzimi della replicazione
E' costituito da una molecola di DNA o RNA singola o multipla, segmentata circolare o lineare.

Può essere a singolo filamento (ss)

A doppio filamento (ds)

L'mRNA virale si lega ai ribosomi della cellula ospite e viene tradotto in proteine virali

Baltimore Classification of Viruses



VIRUS A DNA

Replicazione nucleare

Replicazione citoplasmatica
POXVIRUS

Replicazione nucleare e citoplasmatica
HEPADNAVIRUS

REPLICAZIONE del DNA VIRALE

SEMICONSERVATIVA

Parvovirus - Papillomavirus e Poliommavirus: DNA pol cellulare

Adenovirus - Herpesvirus: DNA pol virale

> velocità
> errori

**Target per agenti antivirali
(es. acyclovir, AZT)**

Replicazione del genoma dei virus a DNA : **le proteine di riconoscimento della regione ORI**

Tutti i virus a DNA devono codificare almeno una proteina per iniziare la replicazione del genoma

I virus più grandi codificano anche la loro DNA polimerasi e altre proteine essenziali per la replicazione del genoma

Caratteristiche comuni:

**legame di specifiche proteine alla regione ORI del genoma virale.
il legame con le proteine tende a distorcere la regione ORI**

**Molte delle proteine reclutate sulla regione ORI hanno attività di elicasi
ATP-dipendente per lo srotolamento del DNA virale**

**eventuale reclutamento di proteine cellulari
per la replicazione del DNA virale**

TRASCRIZIONE DEI VIRUS A DNA

Presenza di proteine regolatrici virali e/o cellulari che interagiscono con sequenze “promoter” al 5’ dei geni virali

Utilizzano RNA pol II cellulare

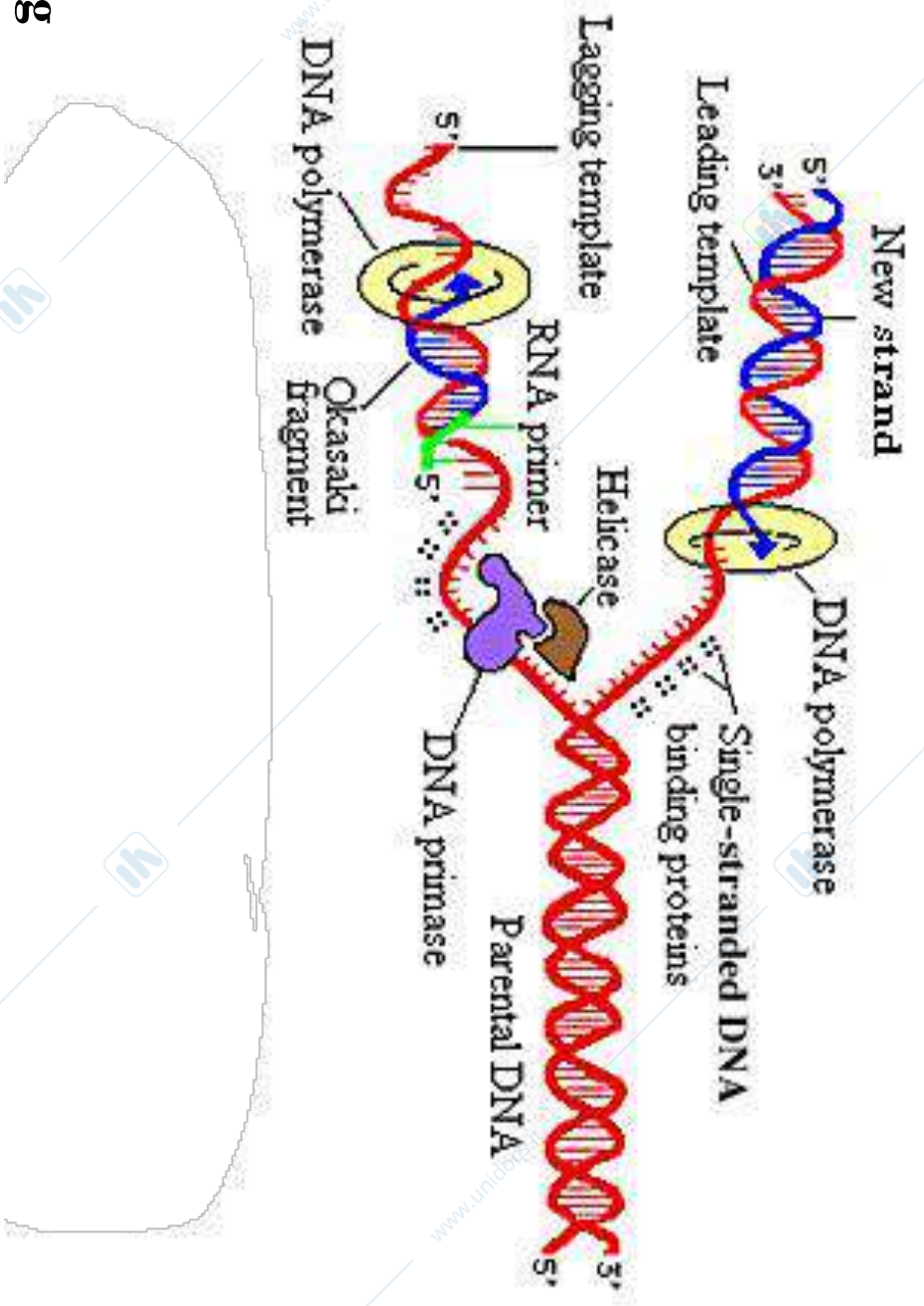
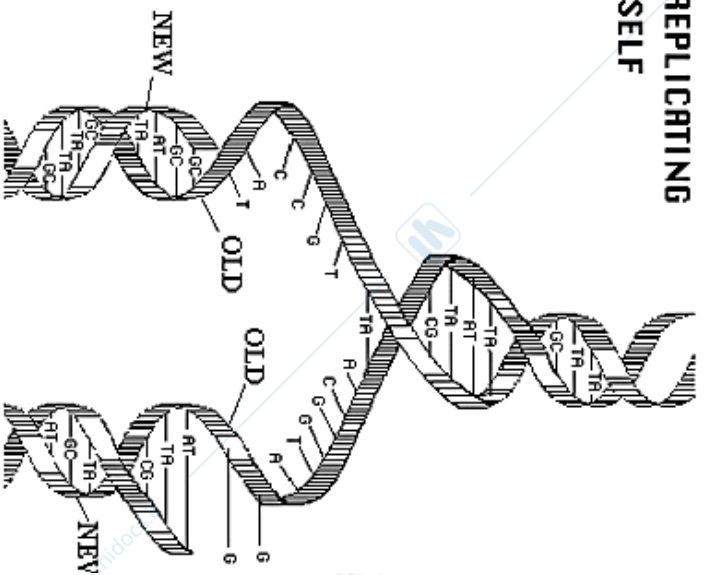
Trascrizione di geni su filamenti diversi di DNA ed in direzione opposta (es. SV40 = *early* e *late* su filamenti opposti)

5’ sequenze “cap”
3’ poli A (100-200 residui di adenina)

➤ mRNA con introni
Splicing

➤ mRNA policistronici
lettura in ORF differenti

DNA REPLICATING ITSELF



DNA helicases: Unwinding

DNA binding proteins: Prevents winding back

DNA primase: formation of DNA/RNA primer (from free nucleosides in cell)

DNA polymerase: Catalyse elongation of new strand (5' - 3')

Lagging strand:

DNA ligase: Connects Okasaki fragments

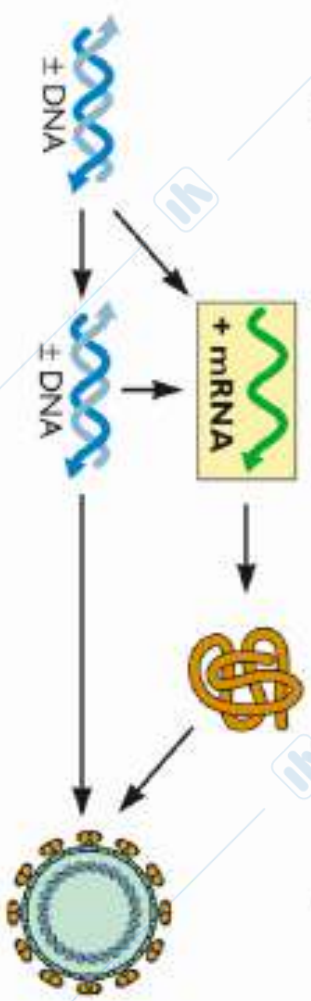
1^a CLASSE

I Classe. La prima classe comprende i virus a DNA bicitenario, cioè la quasi totalità dei virus a DNA. La sintesi di mRNA è realizzata dalla RNA-polimerasi della cellula, che ha sede nel nucleo, come avviene per Herpesvirus, Adenovirus e Papovavirus.

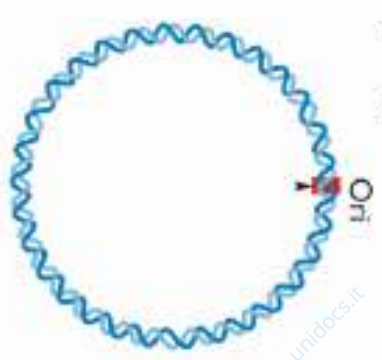
Questi virus costituiscono la sottoclasse 1^aa e svolgono la maggior parte degli eventi replicativi nel nucleo della cellula.

Gli altri virus, con genoma a DNA bicitenario, come i Poxvirus e gli Iridovirus, possiedono una propria RNA-polimerasi associata al virione, che consente loro di replicarsi nel citoplasma (sottoclasse 1[°]b).

A dsDNA genome: Polyomaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae



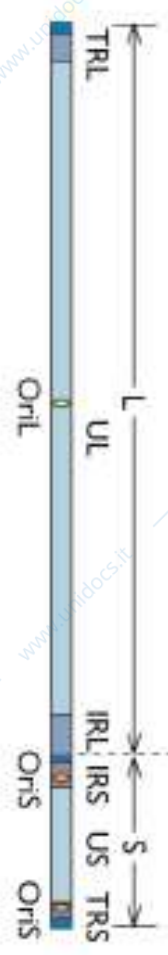
B Polyomaviridae (5 kbp)



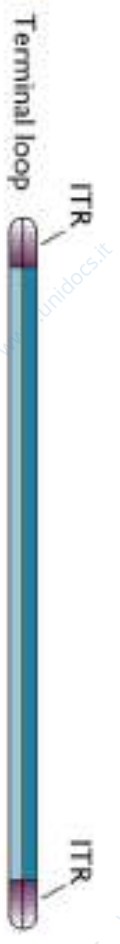
C Adenoviridae (36-48 kbp)



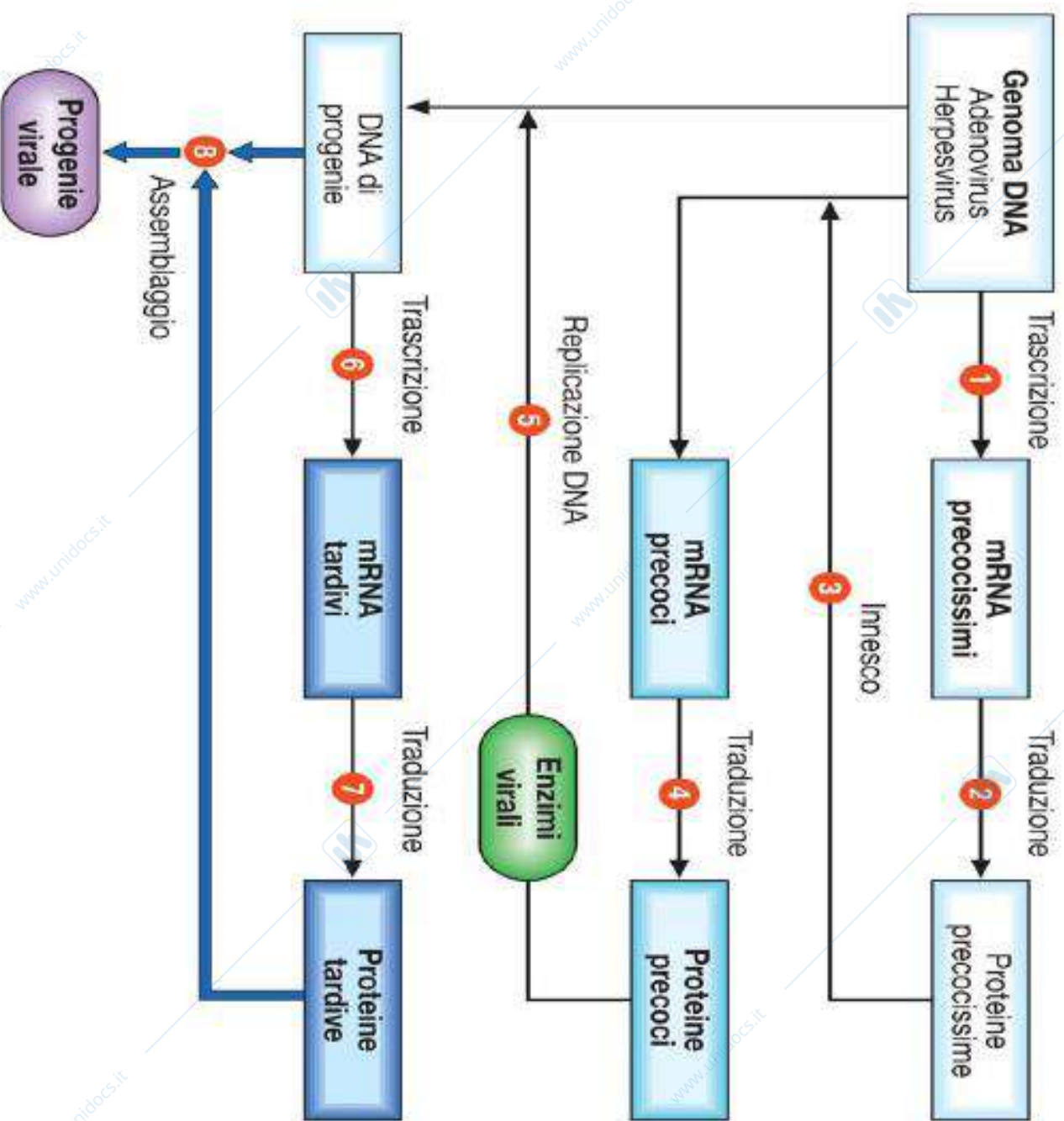
D Herpesviridae (120-220 kbp)



E Poxviridae (130-375 kbp)

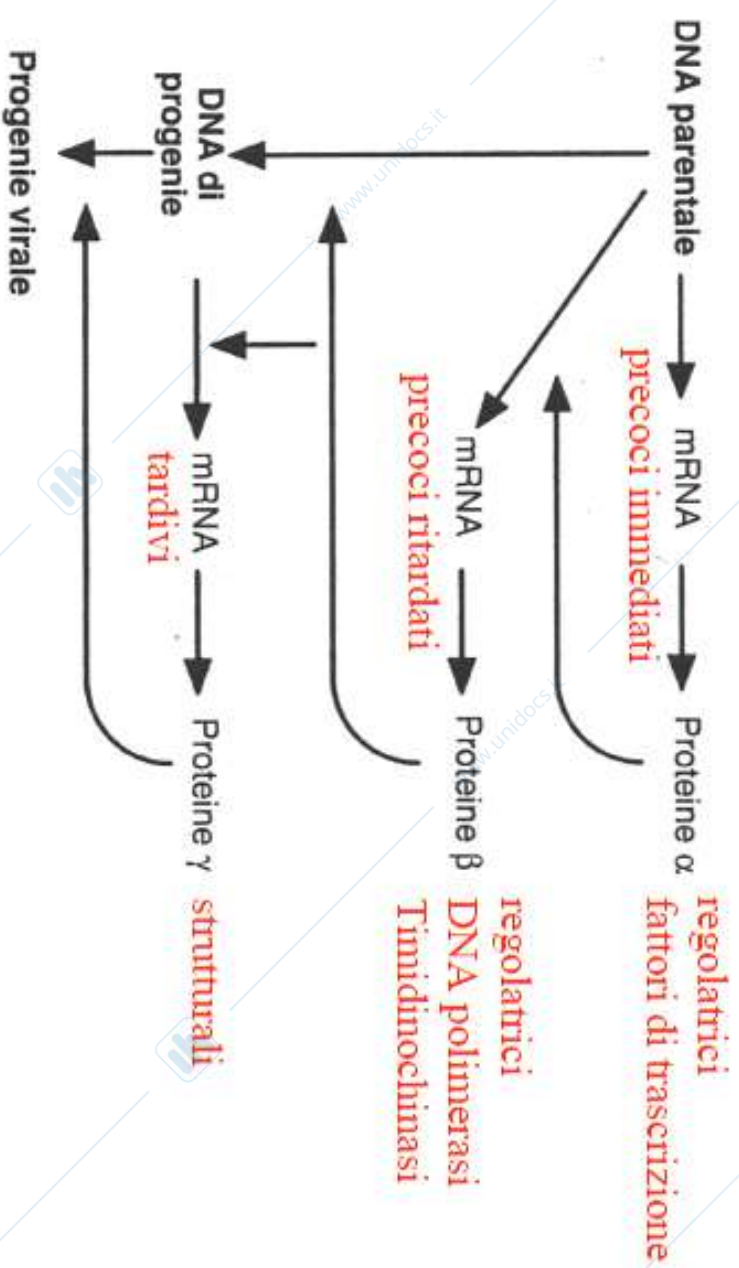


REPLICAZIONE DI ALCUNI VIRUS CON GENOMA dsDNA



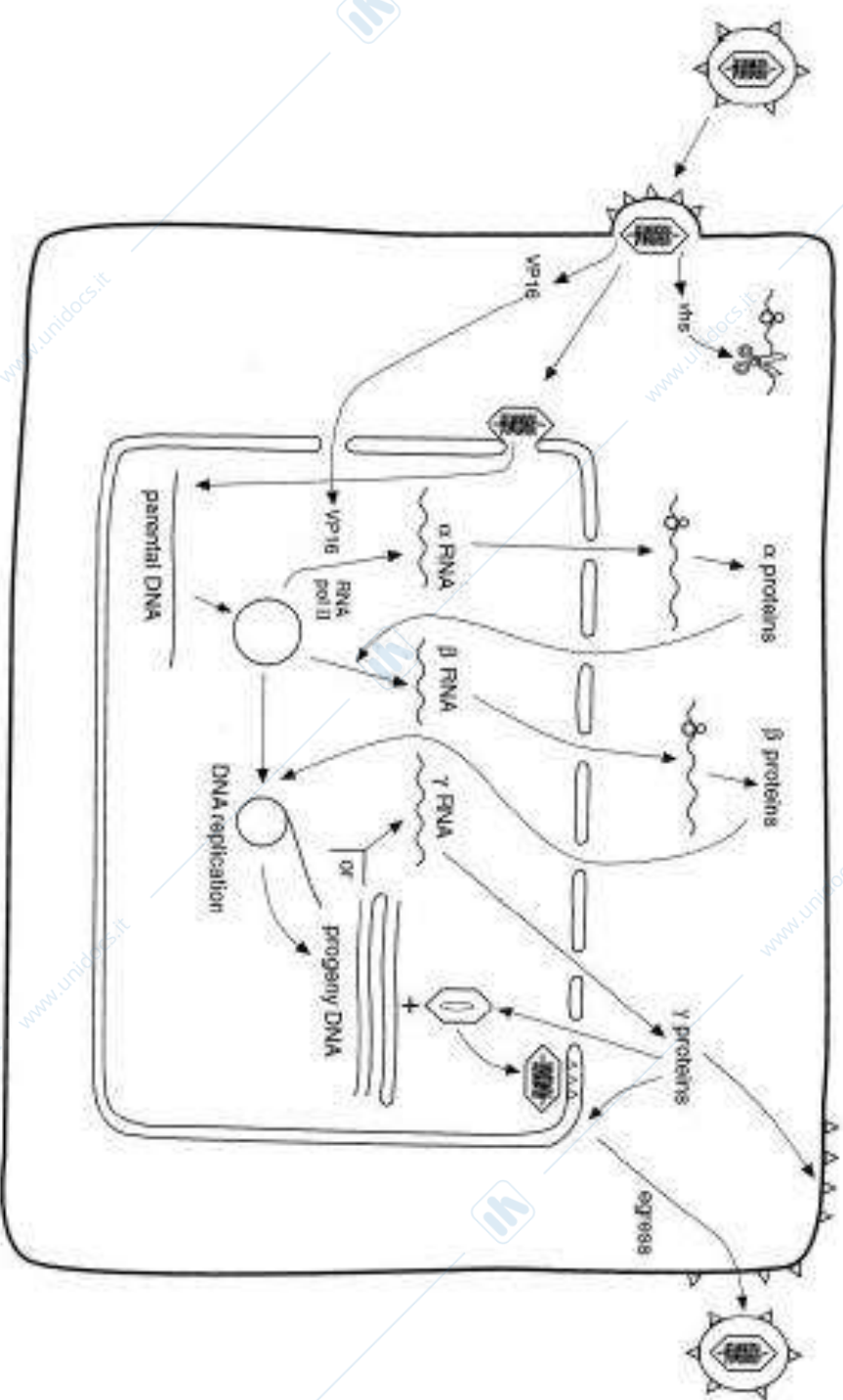
1. trascrizione del DNA in mRNA precocissimi
2. traduzione dei messengeri precocissimi
3. innesco della sintesi dei messengeri precoci da parte delle proteine precocissime
4. traduzione degli mRNA precoci
5. replicazione del DNA virale ad opera di enzimi virali neoformati
6. trascrizione e successiva traduzione degli mRNA tardivi
7. trascrizione del DNA neoformato
8. assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi

Schema della replicazione degli herpesvirus



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.

Diagram of the replication cycle of HSV



Herpes Virus

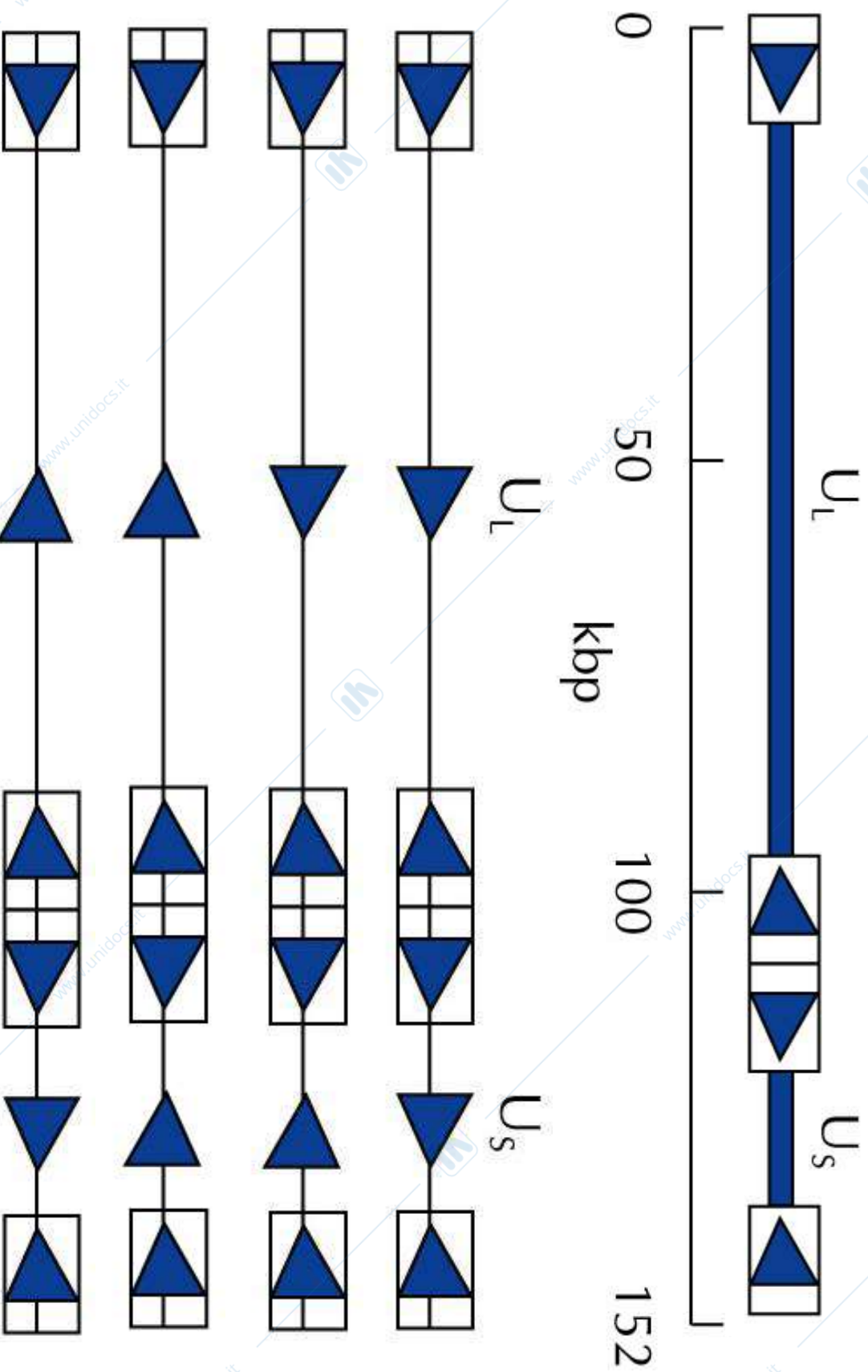
L'acido nucleico a DNA a doppia elica è formato da due sequenze geniche, una lunga (UL) e una successiva corta (US), affiancate da due sequenze terminali ripetute.

Queste sequenze uniche 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.

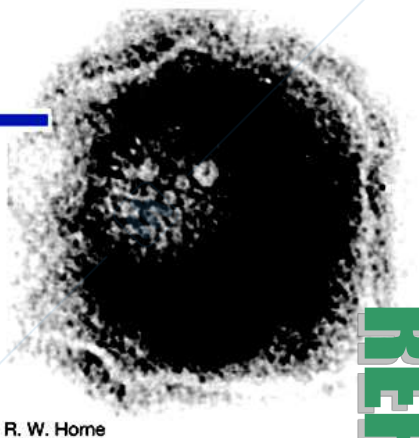
Il DNA del virione dal peso molecolare di 100 milioni dalton è avvolto intorno ad una struttura proteica a forma di toroide (nucleosoma) e può codificare per almeno **81 polipeptidi diversi**.

Il DNA è lineare nella fase di quiescenza, poi circolarizza durante la moltiplicazione (come alcuni batteriofagi).

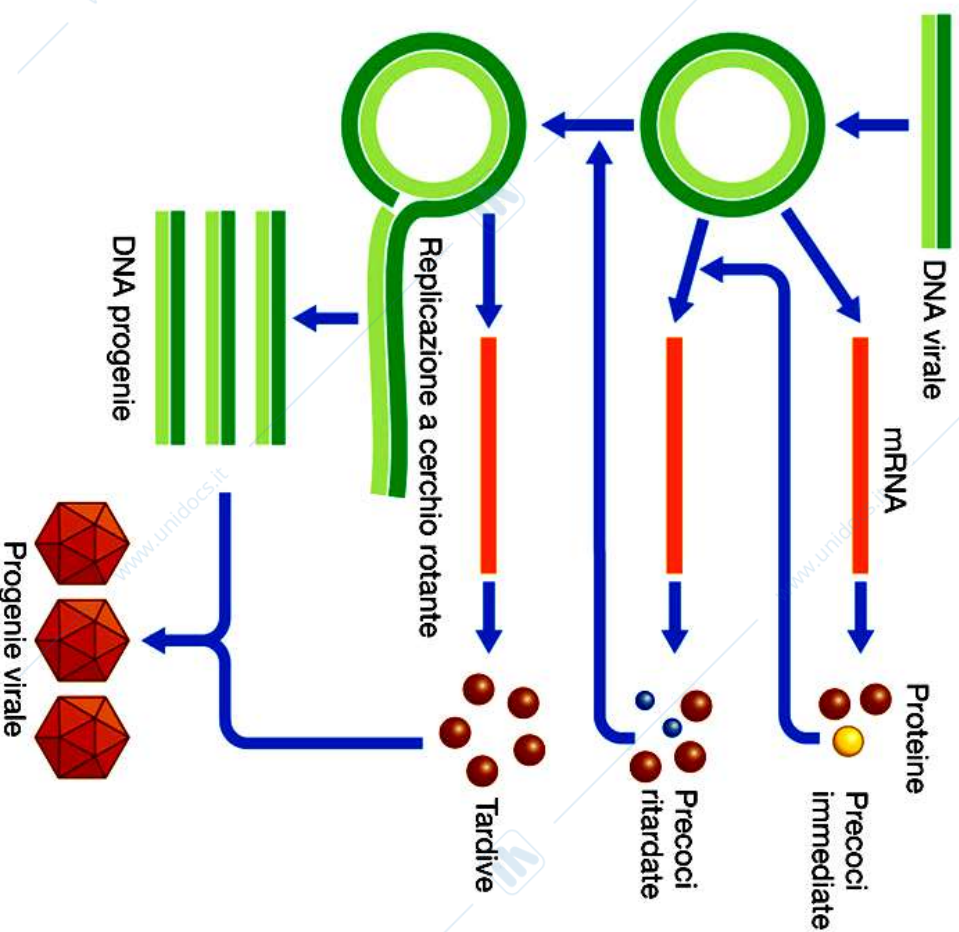
Genomi a DNA, herpesviridae



REPLICAZIONE DEL GENOMA DI HSV-1



R. W. Home



La replicazione del DNA virale avviene nel nucleo per circolarizzazione e sintesi tramite cerchio rotante

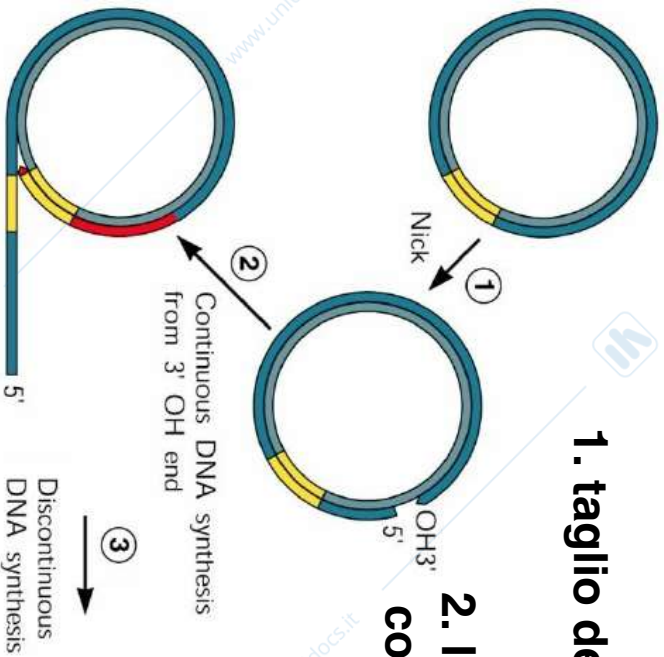
proteine beta

L'assemblaggio della particella virale avviene nel nucleo e l'acquisizione del tegumento esterno avviene per gemmazione sulla membrana nucleare

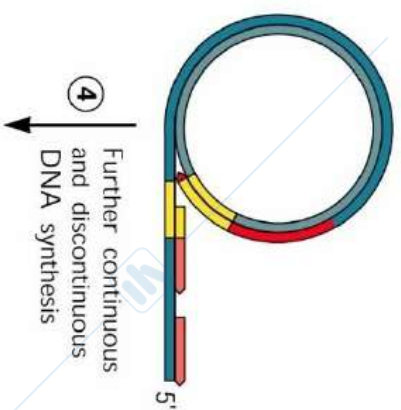
Modello di replicazione del DNA dei virus erpetici

Cerchio rotante

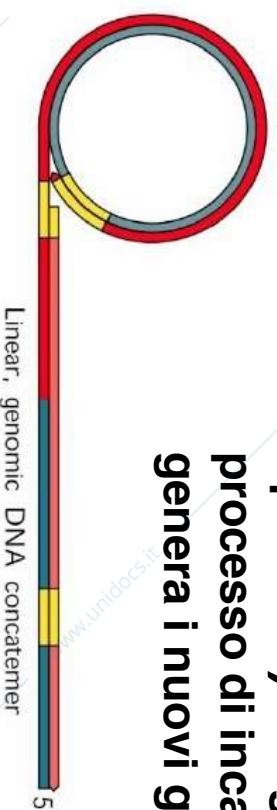
1. taglio della molecola circolare : 3'-OH utilizzato come primer



2. la sintesi della nuova elica provoca la dislocazione dell'elica complementare



3 e 4. sintesi in continuo della forma circolare e sintesi discontinua sull'elica dislocata con formazione di concatameri di dsDNA



Il taglio del DNA (sequenza terminale ripetuta a) congiuntamente al processo di incapsidamento del DNA genera i nuovi genomi virali lineari

VIDEO

www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.unidocs.it



www.unidocs.it

www.unidocs.it



www.unidocs.it

www.unidocs.it



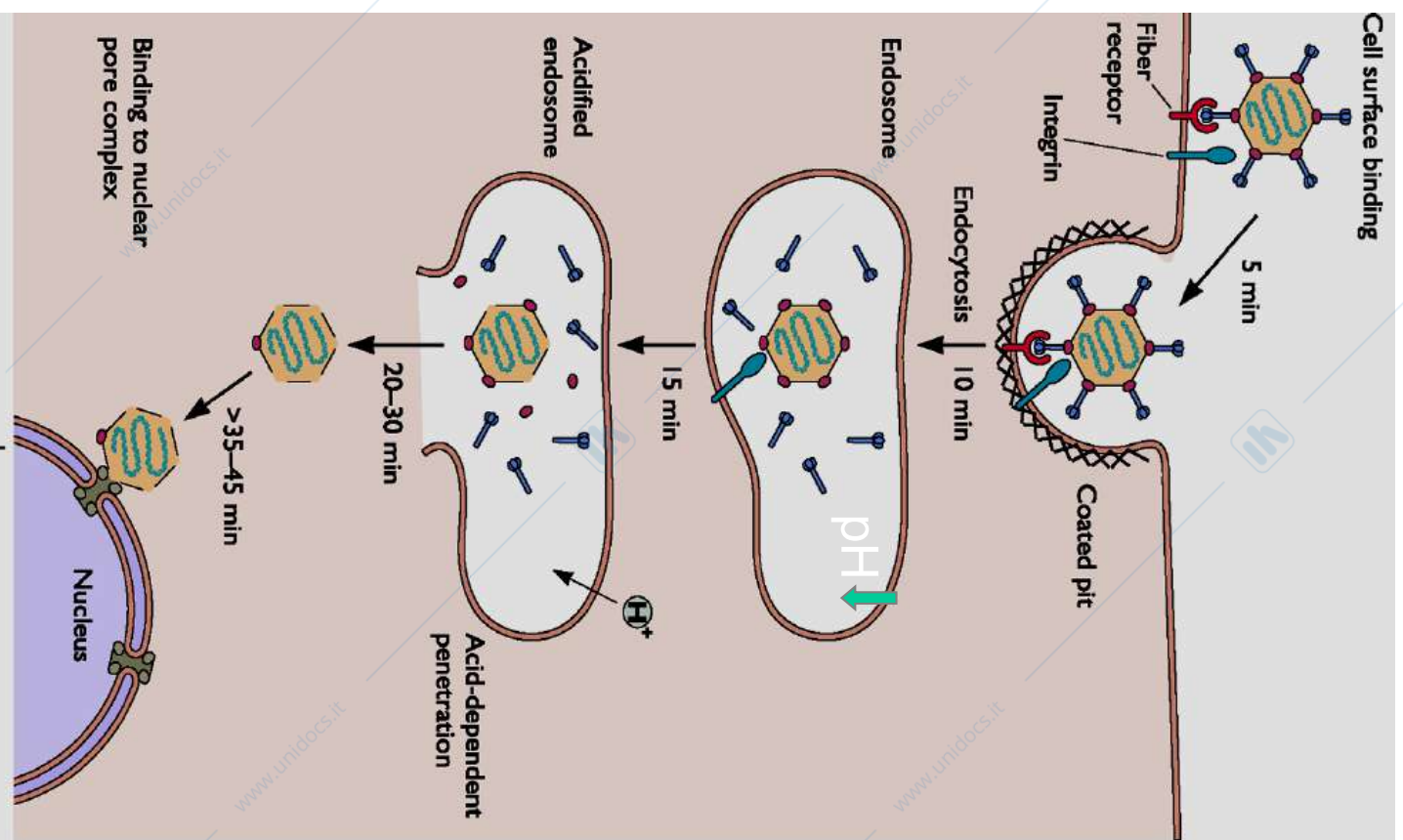
www.unidocs.it

www.unidocs.it

Penetrazione di

Adenovirus

- entrata mediata da endocitosi clatrina-dipendente
- Perdita delle fibre
- Lisi della membrana degli endosomi mediato dalla proteina della base dei pentoni
- A livello dei pori nucleari la struttura capsidica subisce un disassemblaggio parziale:
 - perdita dei pentoni III e della proteina IIIa
 - dissociazione della proteina VIII
 - degradazione proteolitica della proteina VI da parte della proteasi presente nel virione (adenina)
 - perdita della proteina IX



CICLO DI REPLICAZIONE

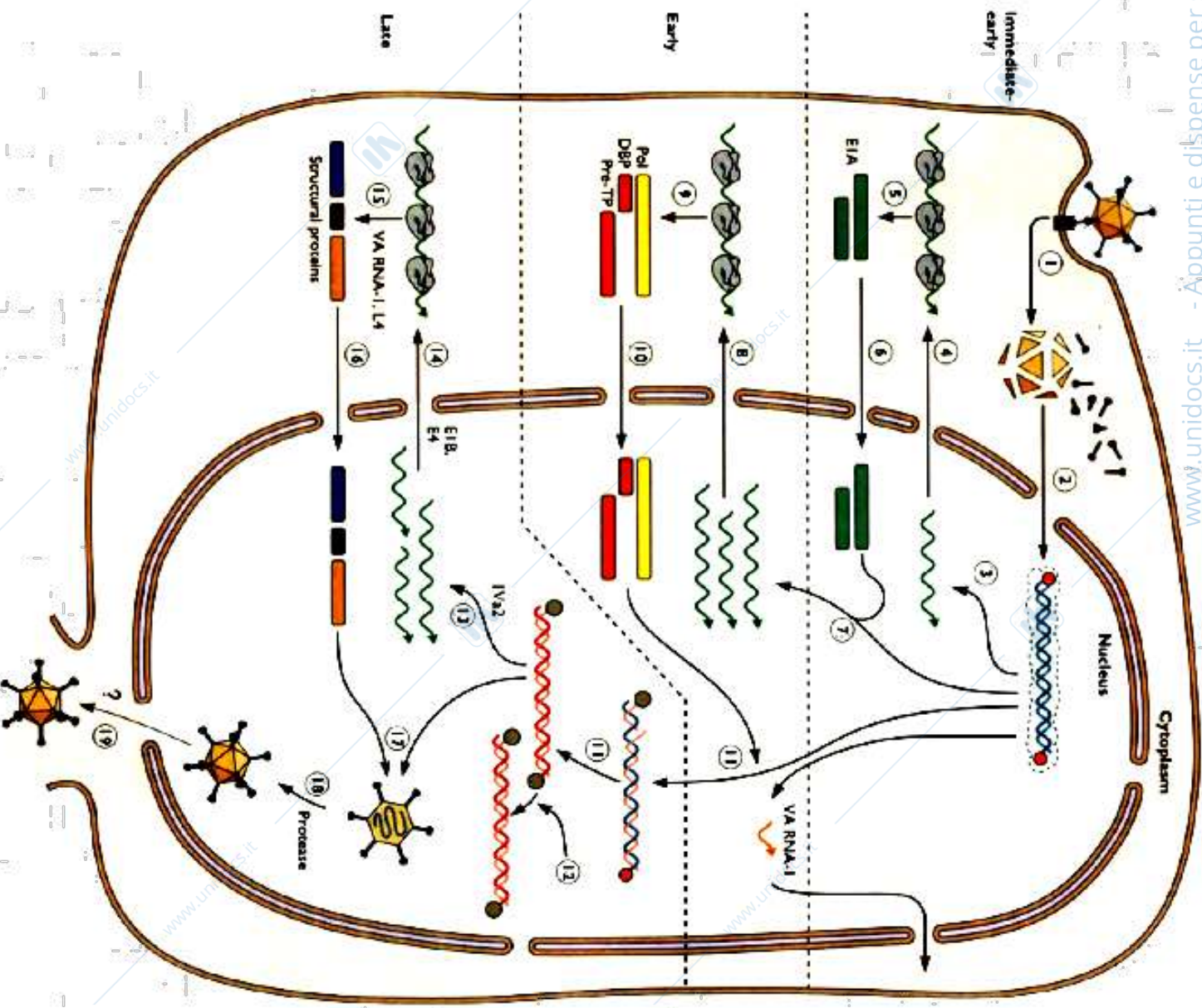
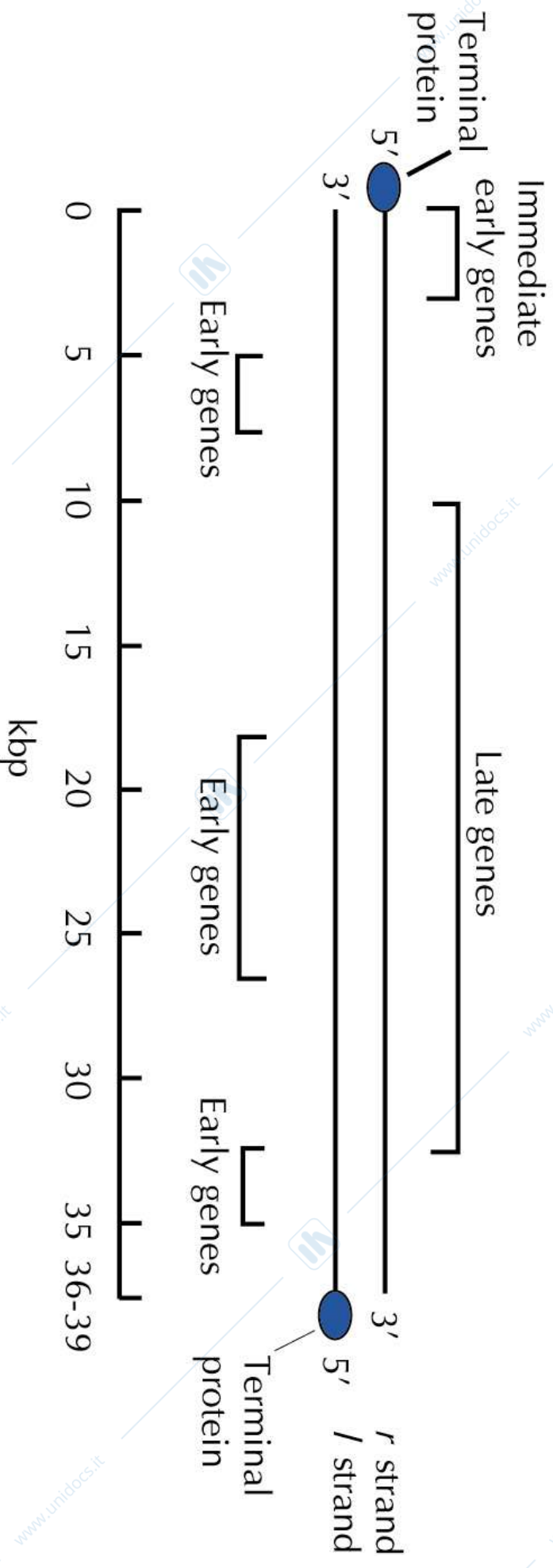


Figure 16 Single-cell reproductive cycle of human adenovirus type 1

Genomi a DNA, adenoviridae

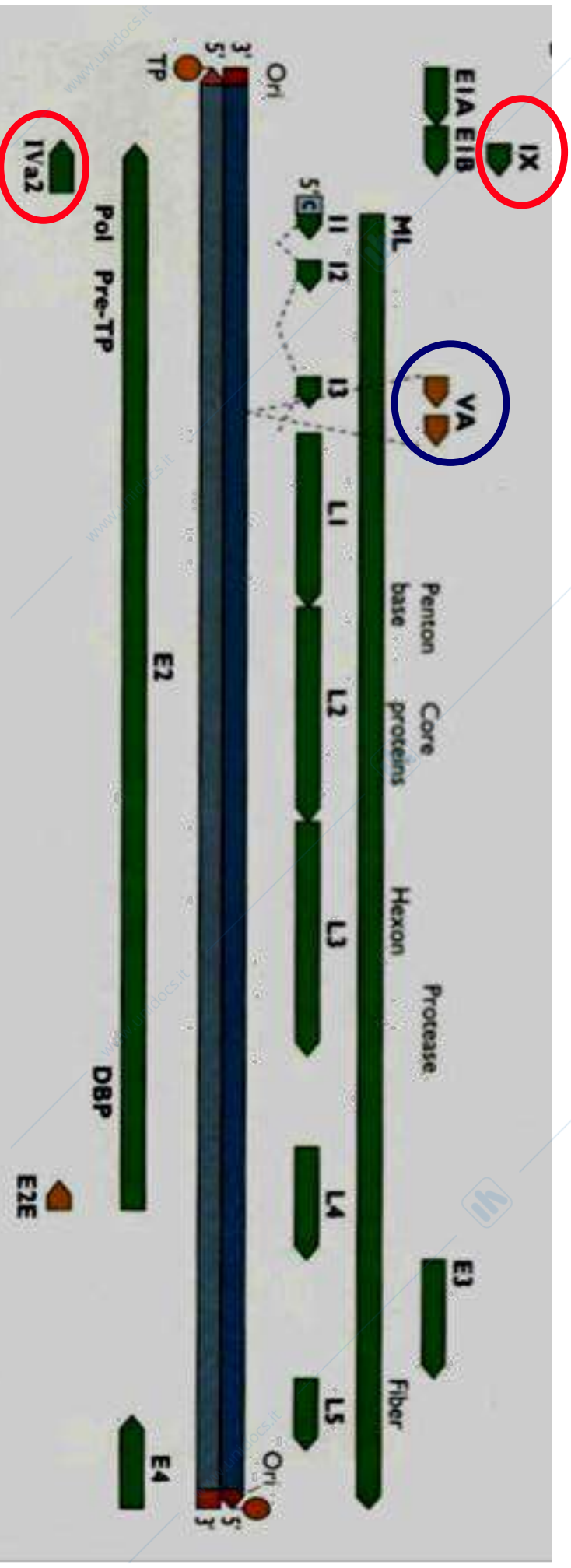


ESPRESSIONE GENICA degli ADENOVIRUS

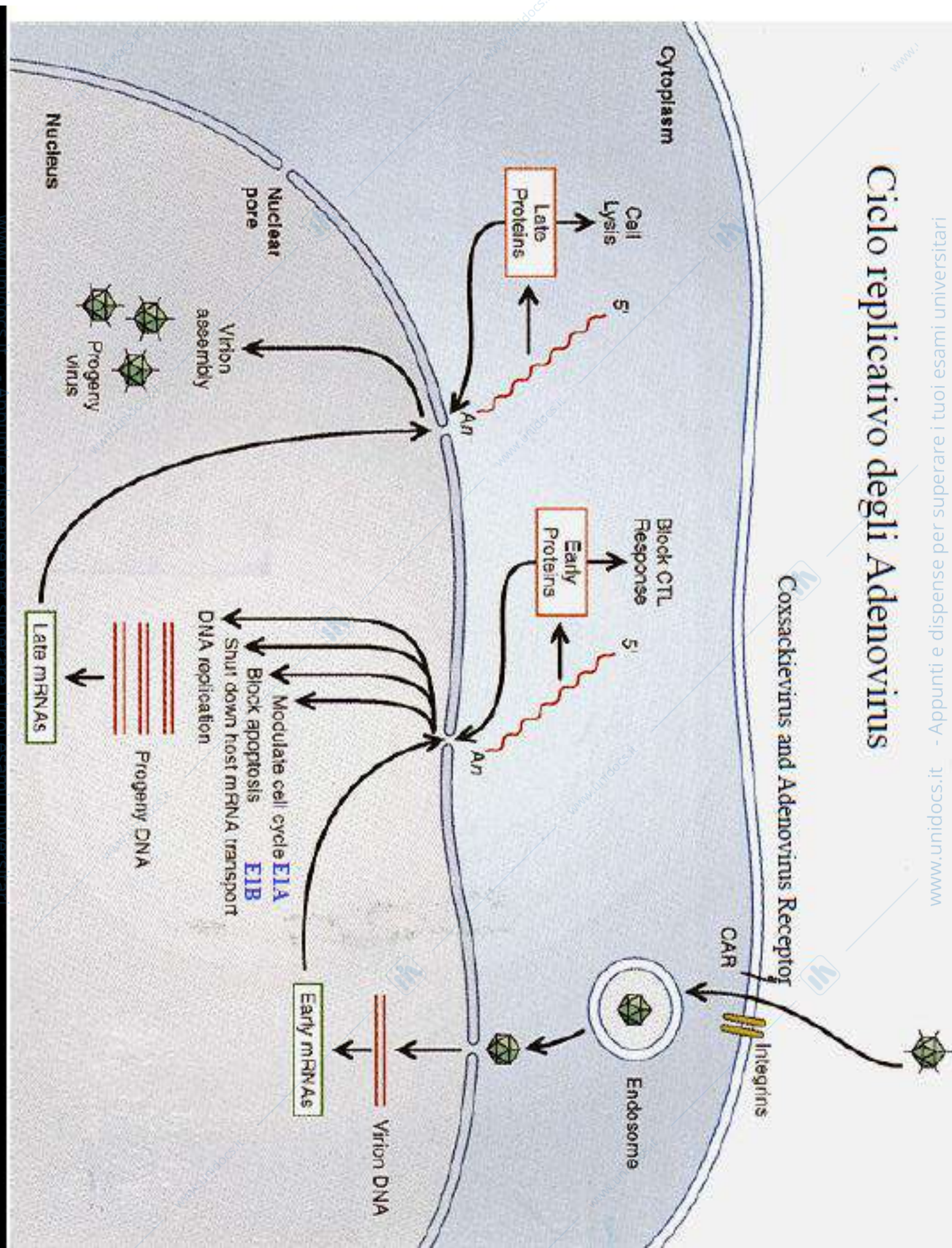


geni precoci
geni tardivi

50 proteine

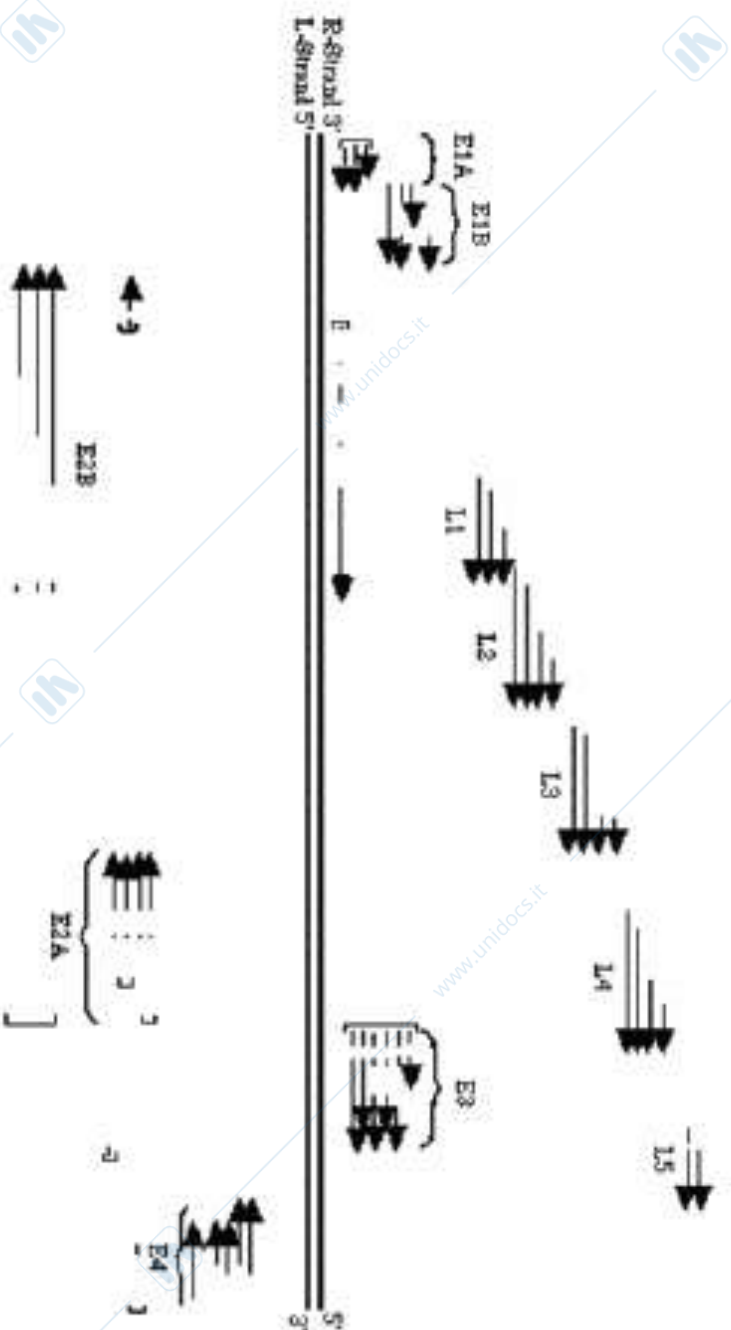


Ciclo replicativo degli Adenovirus



Gli mRNA subiscono complesse modificazioni post-trascrizionali, vanno incontro a tagli multipli (*splicing*) che precedono l'inizio della sintesi proteica.

L'*mRNA splicing* è stato descritto per la prima volta negli Adenovirus.



Prima, ed in maniera indipendente della replicazione del genoma, vengono trascritti gli mRNA per le proteine immediate precoci (immediate early) e precoci (early).

La trascrizione del genoma degli Adenovirus è regolata da alcuni fattori virali (virus-encoded trans-acting regulatory factors).

Gli *Early genes* sono codificati in entrambi i filamenti del DNA (l = "leftward strand" and r = "rightward strand").

Replicazione del DNA virale

ADENOVIRUS

DNA polimerasi virale

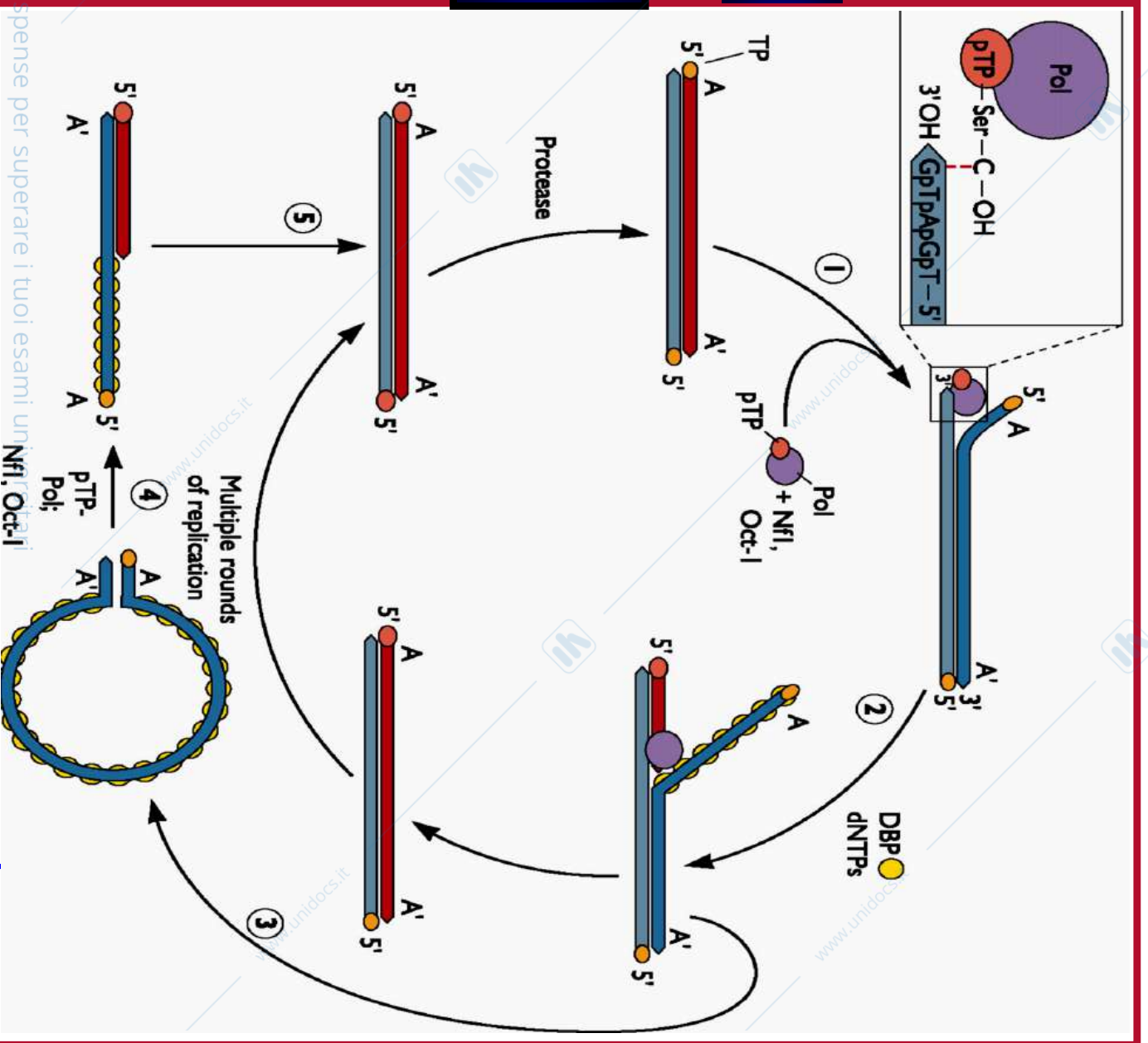
Replicazione asimmetrica: inizia al 3' di uno dei filamenti

Primer: proteina terminale p55 (sequenza ORI in ITR al 3' del filamento stampo)

l'elica di DNA dislocata forma un "panhandle" via "inverted terminal repeats" presenti al 3' e 5'

associazione **Pol-TP** e

sintesi del filamento complementare



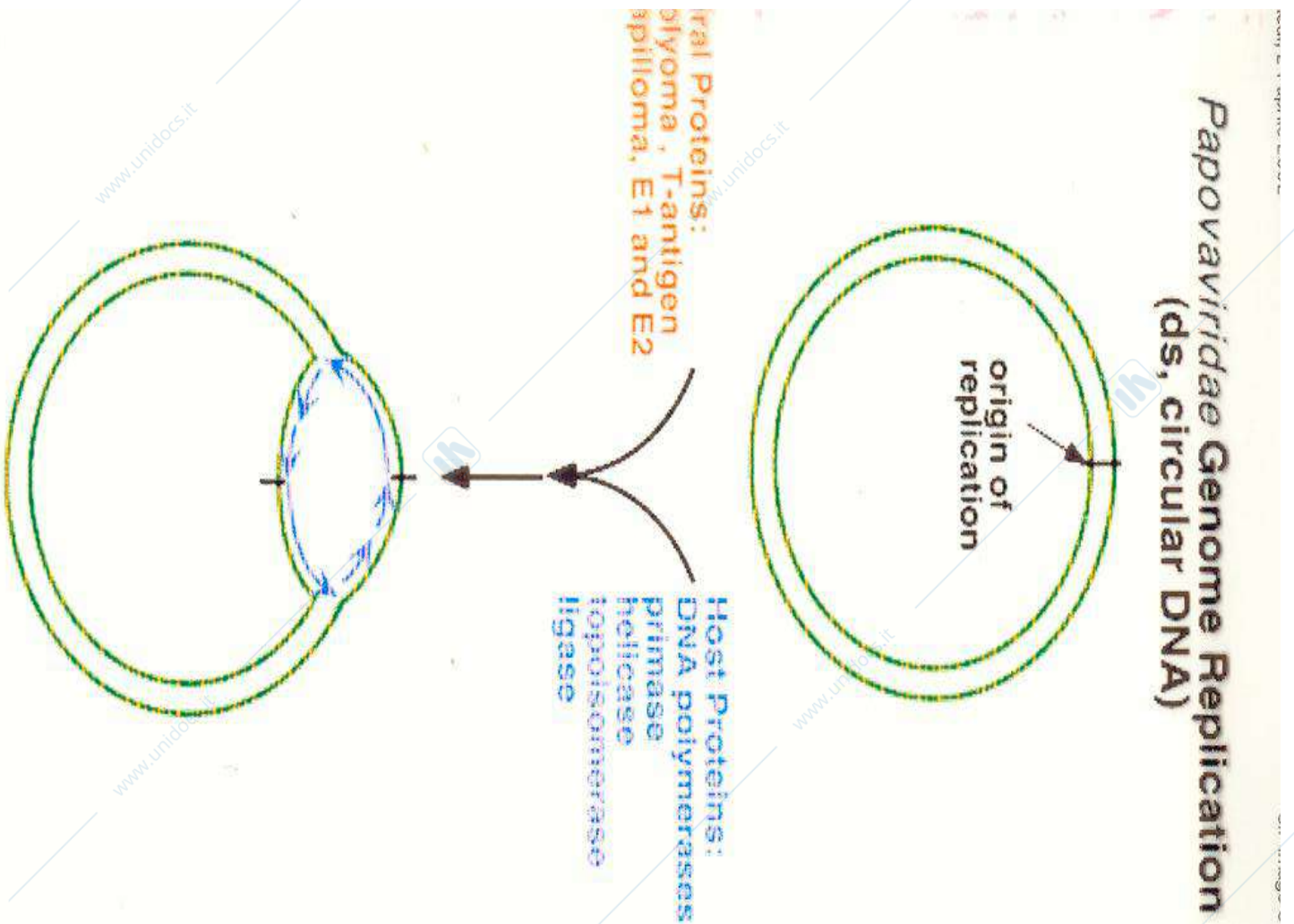
Fase	Geni trascritti
Immediate early	E1A
Early	E1B, E2A, E2B, E3, E4, some virion proteins
Late	Late genes, mostly virion proteins

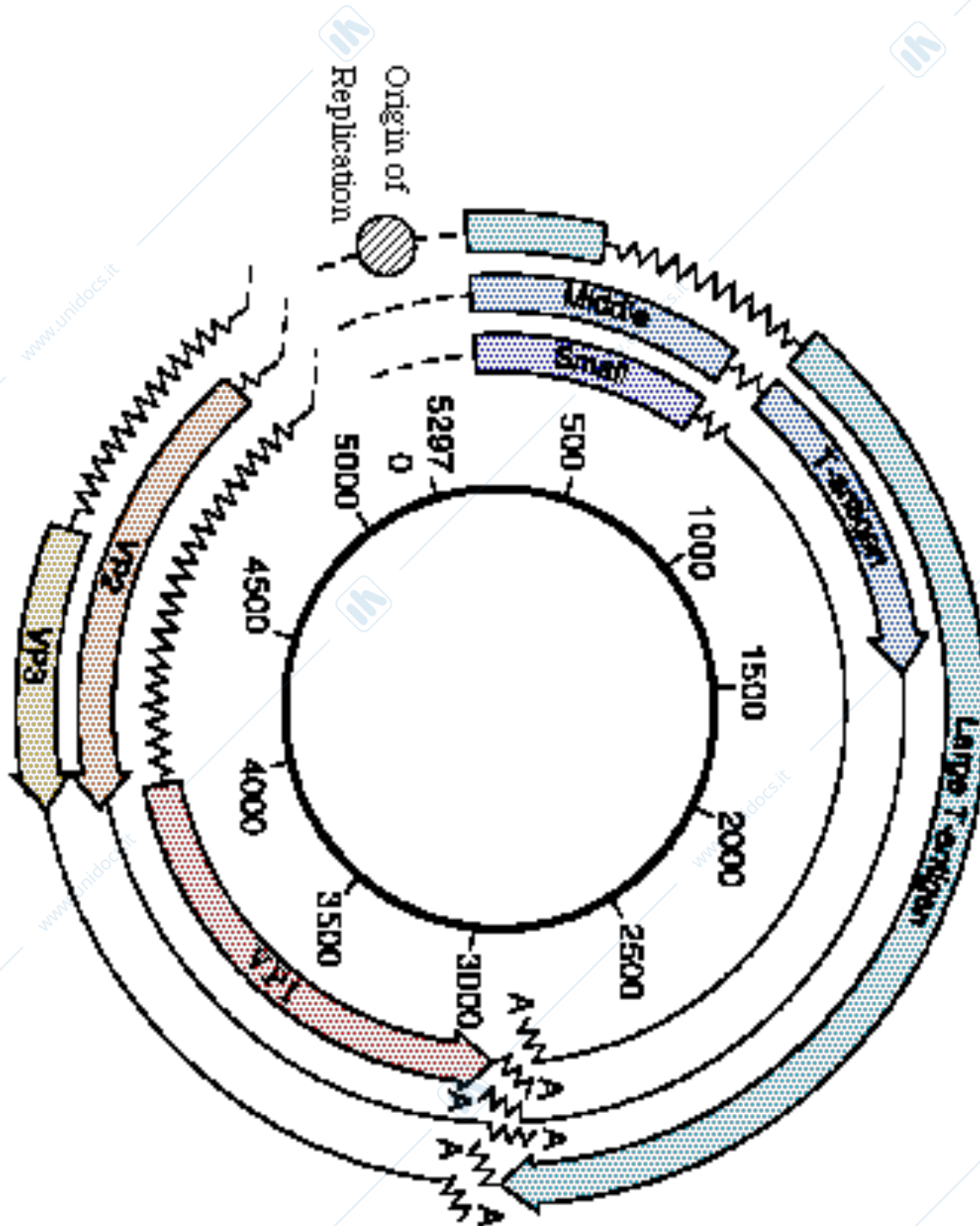
E1A fa aumentare la trascrizione di geni precoci, che a loro volta influenzano la trascrizione dei geni tardivi

E2A&B responsabili della replicazione del DNA genomico

Genomi a DNA, Polyomavirus

- Doppio filamento circolare di circa 5kbp
- Nel virione assume una struttura superavvolta ed è associato a 4 istoni cellulari H2A, H2B, H3 e H4
- Contiene 6 geni: essi sono posizionati in entrambi i filamenti e spesso sono sovrapposti
- L'origine di replicazione è circondata da sequenze non codificanti che controllano la trascrizione





II^a CLASSE

La II^a classe comprende i virus con genoma a DNA a singolo filamento positivo (\pm): Parvovirus. La replicazione avviene nel nucleo e prevede la sintesi del filamento complementare del DNA; la doppia elica di DNA è usata come stampo per la sintesi degli RNA messengeri e dei nuovi genomi virali.

A differenza dei virus a DNA a doppia elica, quelli a filamento singolo codificano soltanto le proteine del capside. Essi si affidano ai sistemi cellulari perciò che concerne la loro replicazione e trascrizione.

Parvoviridae



- 1. Conversione del ssDNA in dsDNA;**
 - 2. Trascrizione del DNA virale in mRNA precoci e 4. in mRNA tardivi;**
 - 3. Traduzione dai RNA messaggeri precoci di proteine funzionali;**
 - 5. Traduzione dai RNA messaggeri tardivi di proteine strutturali;**
 - 6. Sequestro di ssDNA genomico virale;**
 - 7. Assemblaggio di nuovi virioni.**
-

Genomi a DNA, Parvovirus

- Lineare, singolo filamento circa 5kb. Molto spesso il filamento impacchettato è quello -
- Anche i parvovirus replicazione-competente contengono solo due geni: *rep*, coinvolta nella trascrizione, *cap*, proteina del capsid
- Le terminazioni genomi hanno sequenze palindromiche di circa 115 nt, che formano strutture a forcina (*hairpin*) essenziali per l'inizio della replicazione del genoma

Parvovirus Replication

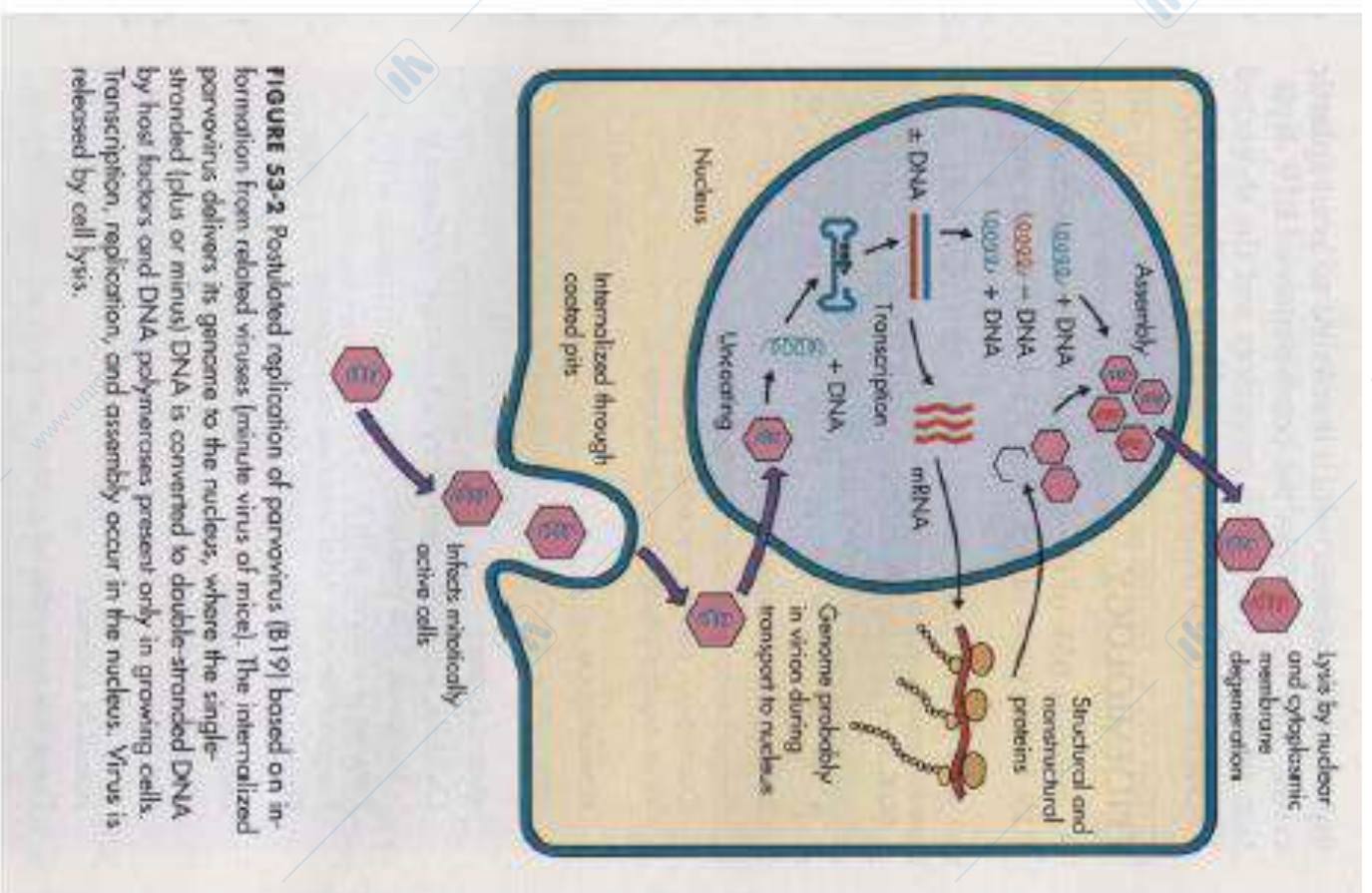
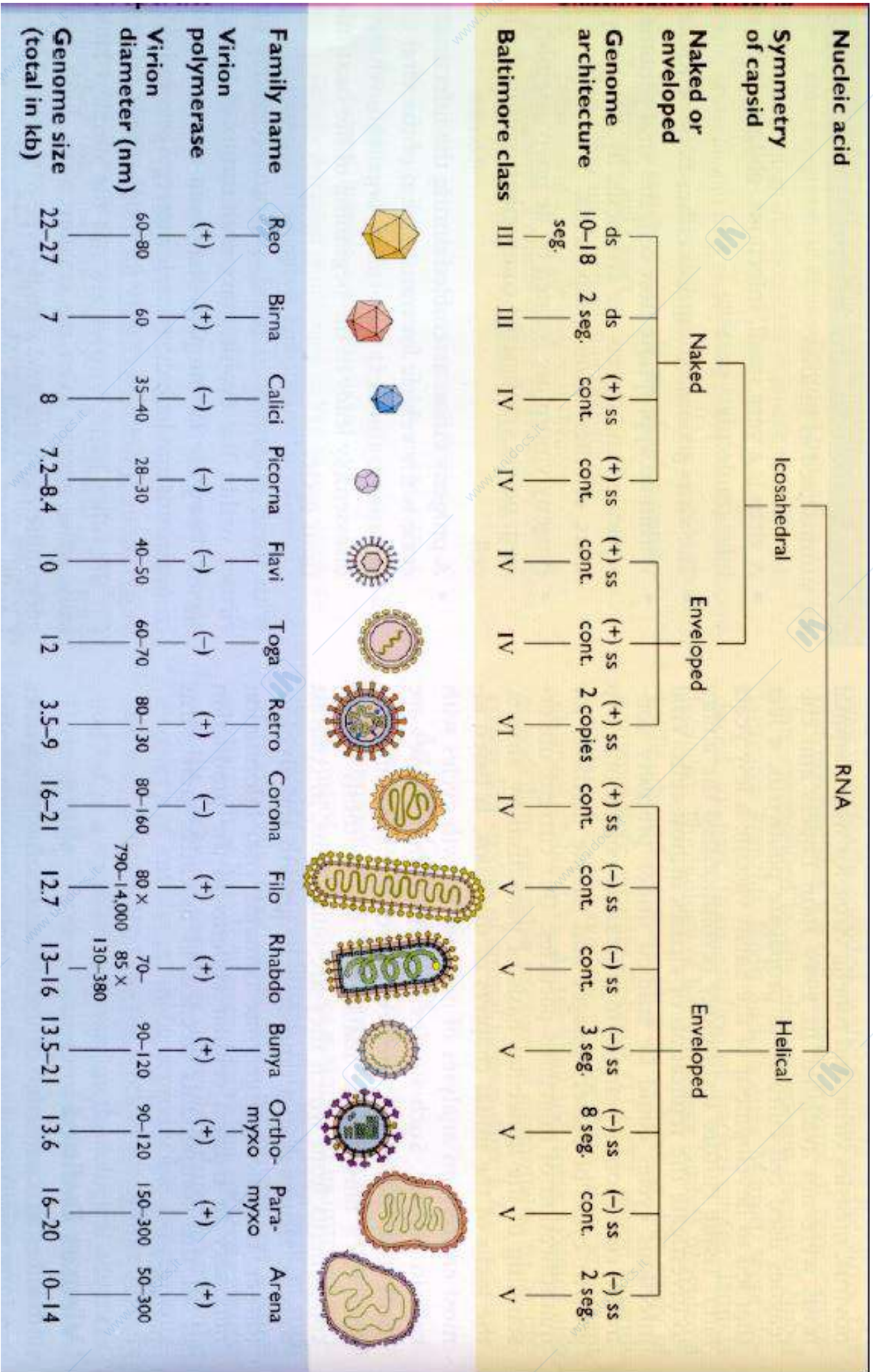
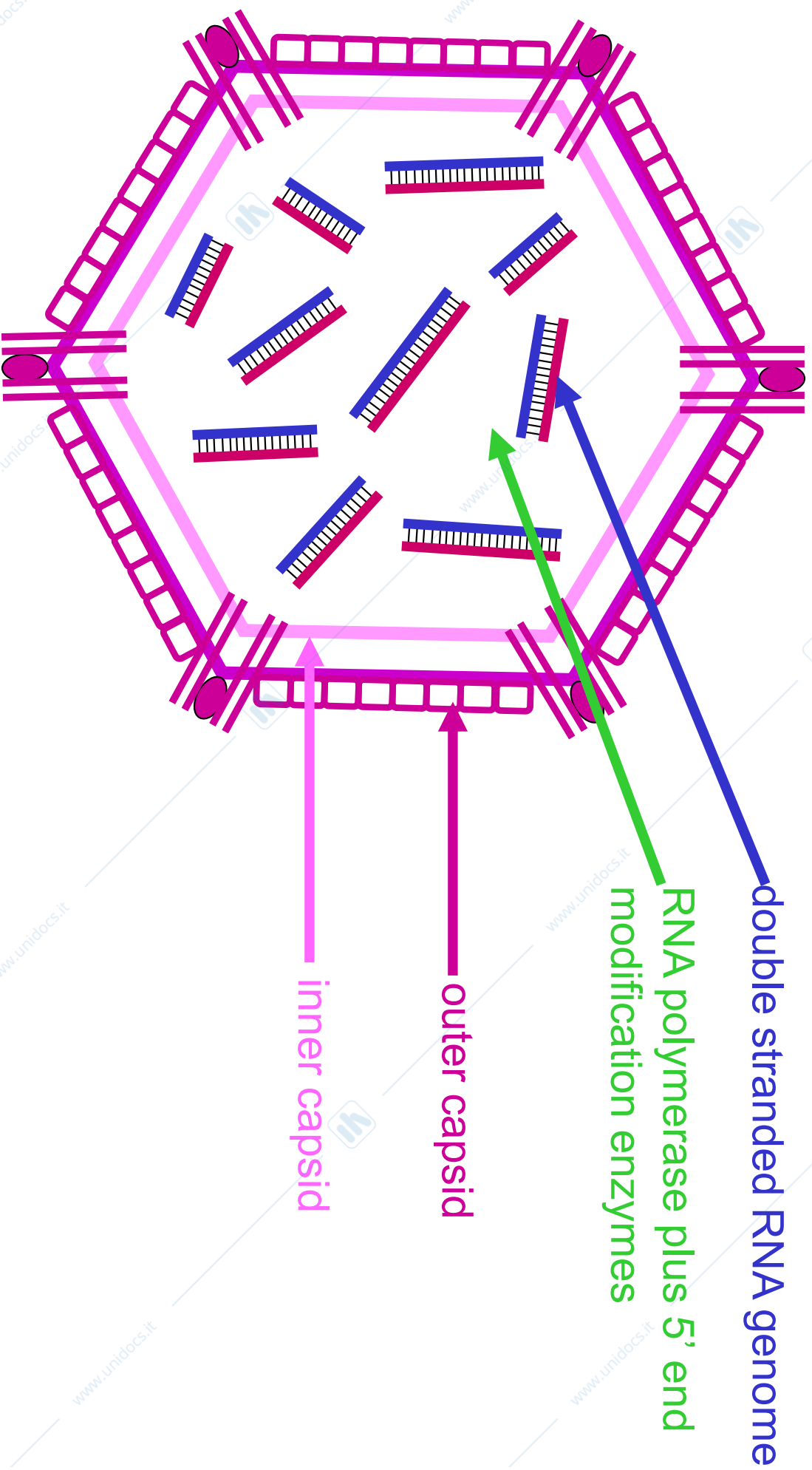


FIGURE 59-2 Postulated replication of parvovirus (B19) based on information from related viruses (minute virus of mice). The internalized parvovirus delivers its genome to the nucleus, where the single-stranded (plus or minus) DNA is converted to double-stranded DNA by host factors and DNA polymerases present only in growing cells. Transcription, replication, and assembly occur in the nucleus. Virus is released by cell lysis.

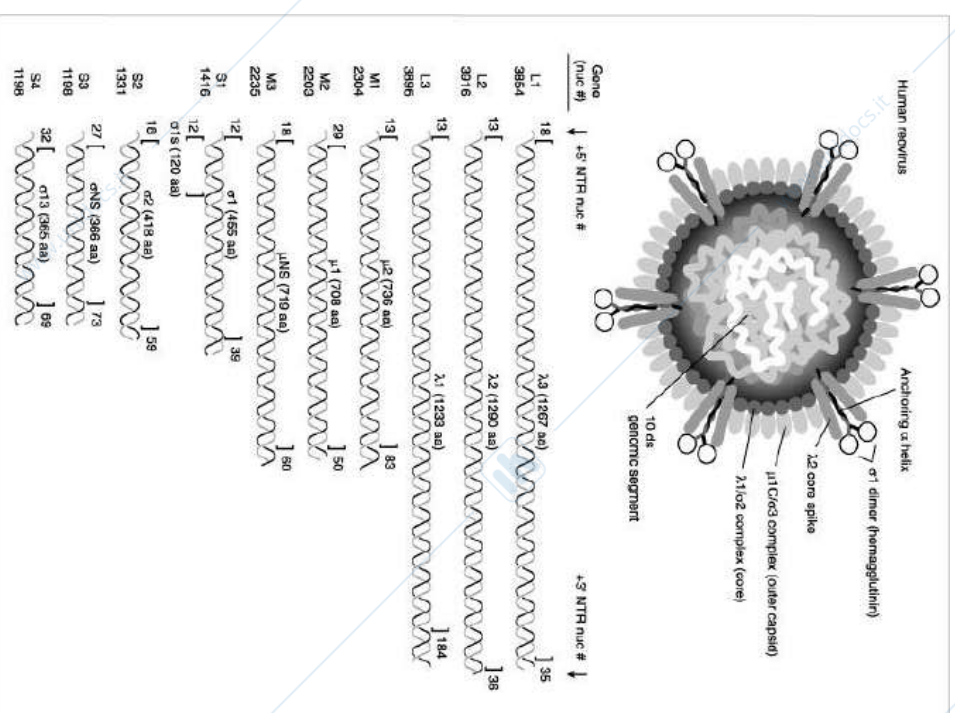


REOVIRUS FAMILY



Genomi a RNA a doppio filamento, Reoviridae (Reovirus)

- Il genoma è costituito da 10 segmenti di RNA a doppio filamento ed è impacchettato in un capside icosaedrico costituito da 2 o 3 involucri concentrici. Il capside è costituito dalle proteine strutturali vere e proprie e da proteine strutturali meno abbondanti che comprendono la trascrittasi virus-associata e tutti gli enzimi necessari per la produzione di mRNA virale, incluse quelli coinvolti nel capping e nella metilazione



III^a CLASSE

La III^a classe comprende i virus con genoma ad RNA bicitenario (es. Reovirus).

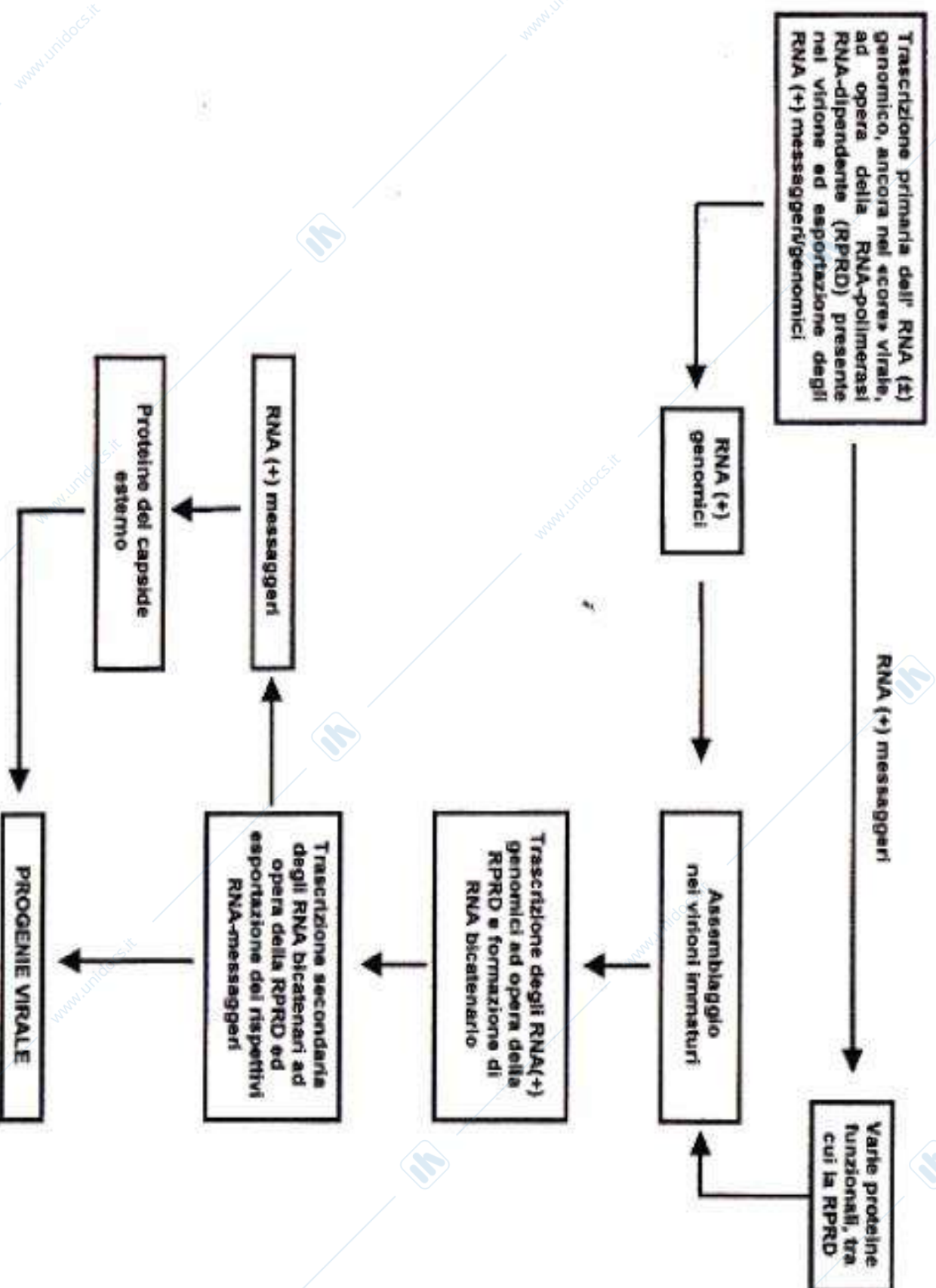
Il genoma di questi virus è suddiviso in 10-12 segmenti contenuti in un doppio capside isometrico. Ogni segmento è detto "minicromosoma", perché è trascritto separatamente e dà luogo ad un singolo RNA messaggero mono-cistronico.

Reoviridae



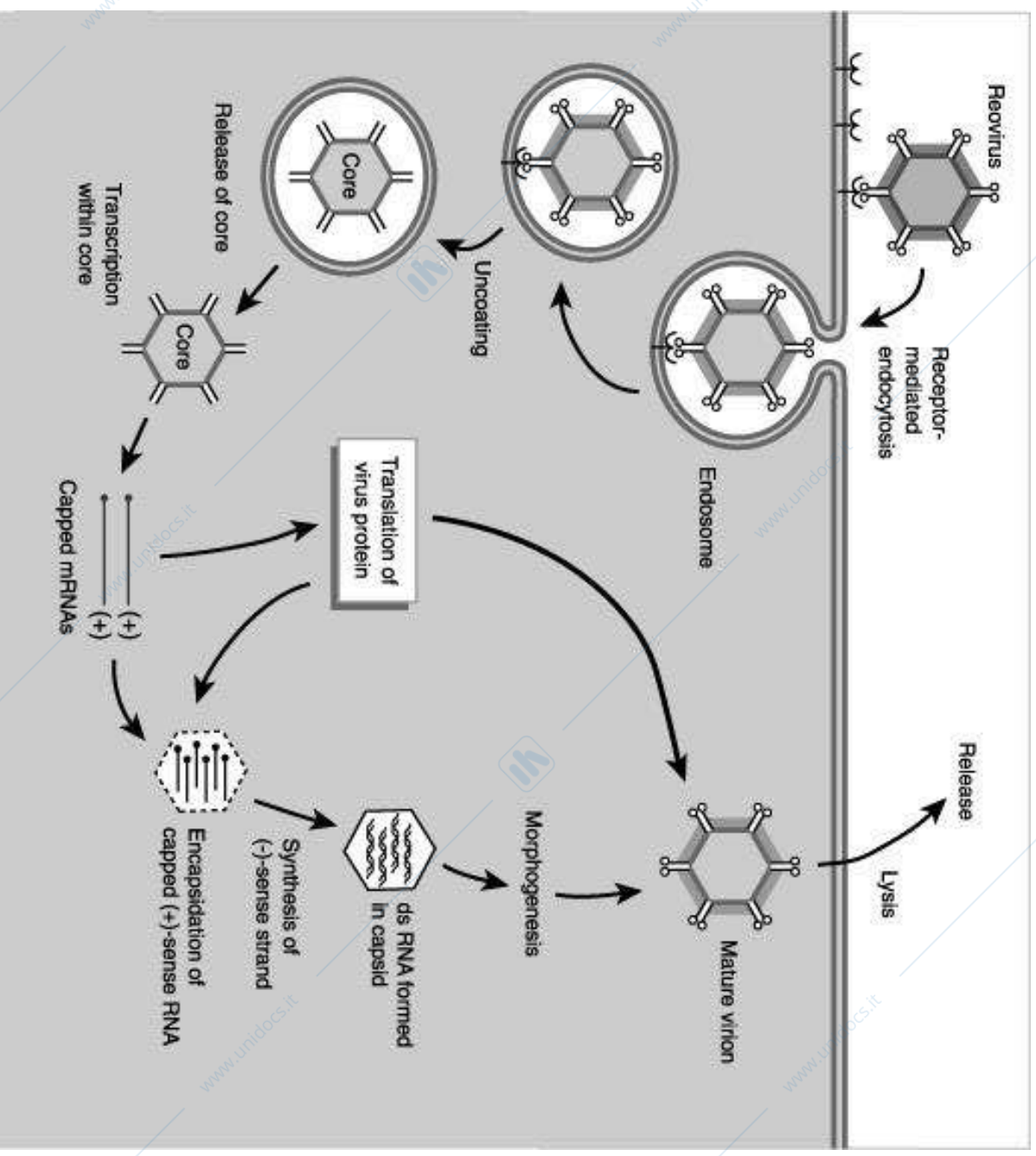
Poiché non esistono enzimi cellulari per la trascrizione diretta di RNA in RNA, sono necessari enzimi virali associati ai virioni che, dopo la penetrazione e lo scapsulamento, trascrivano il filamento genomico negativo(-) per produrre mRNA.

SCHEMA DELLE PRINCIPALI TAPPE DELLA REPLICAZIONE DEI REOVIRUS



Genomi a RNA a doppio filamento, Reoviridae (Reovirus)

Ciclo replicativo



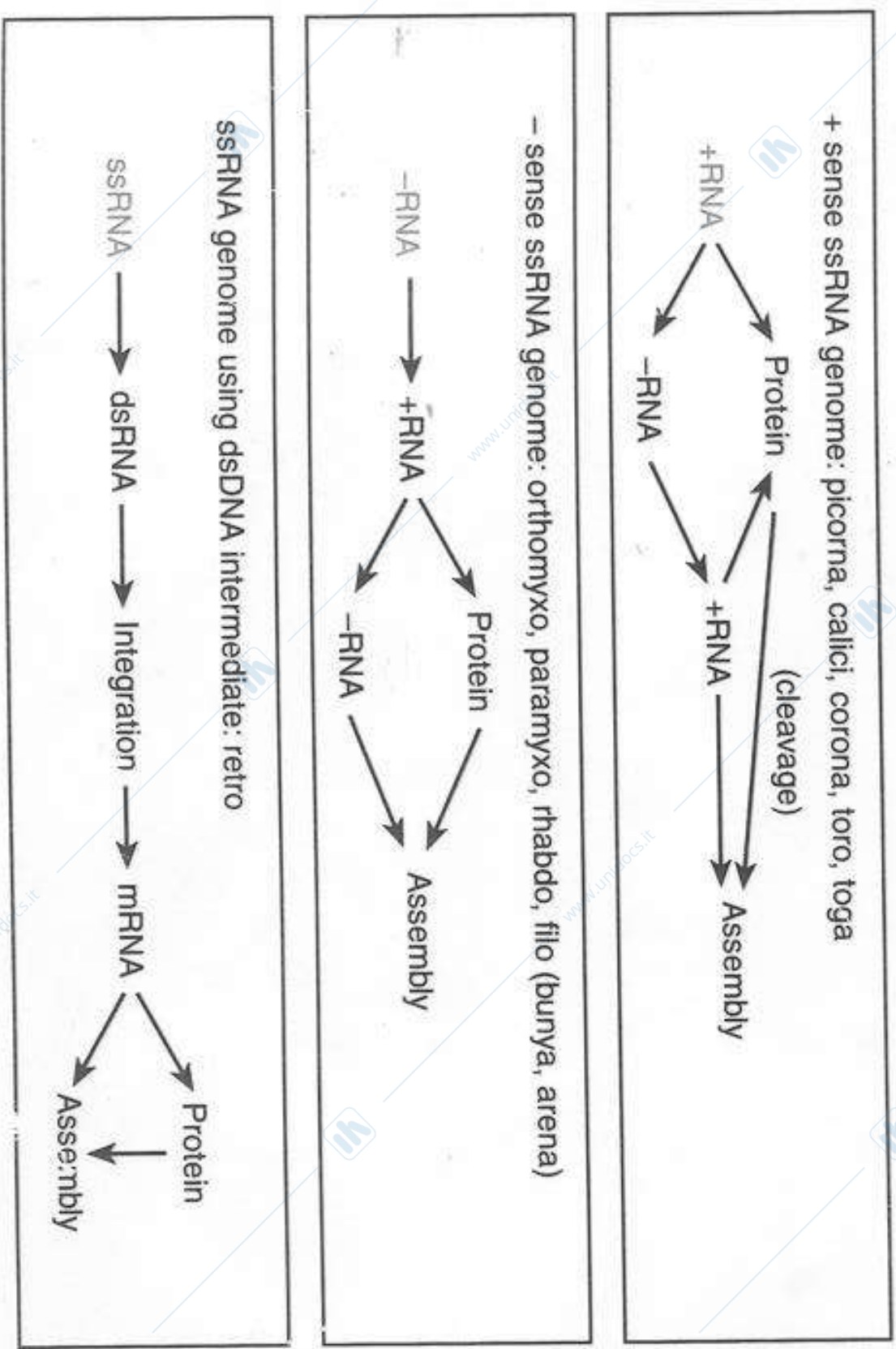
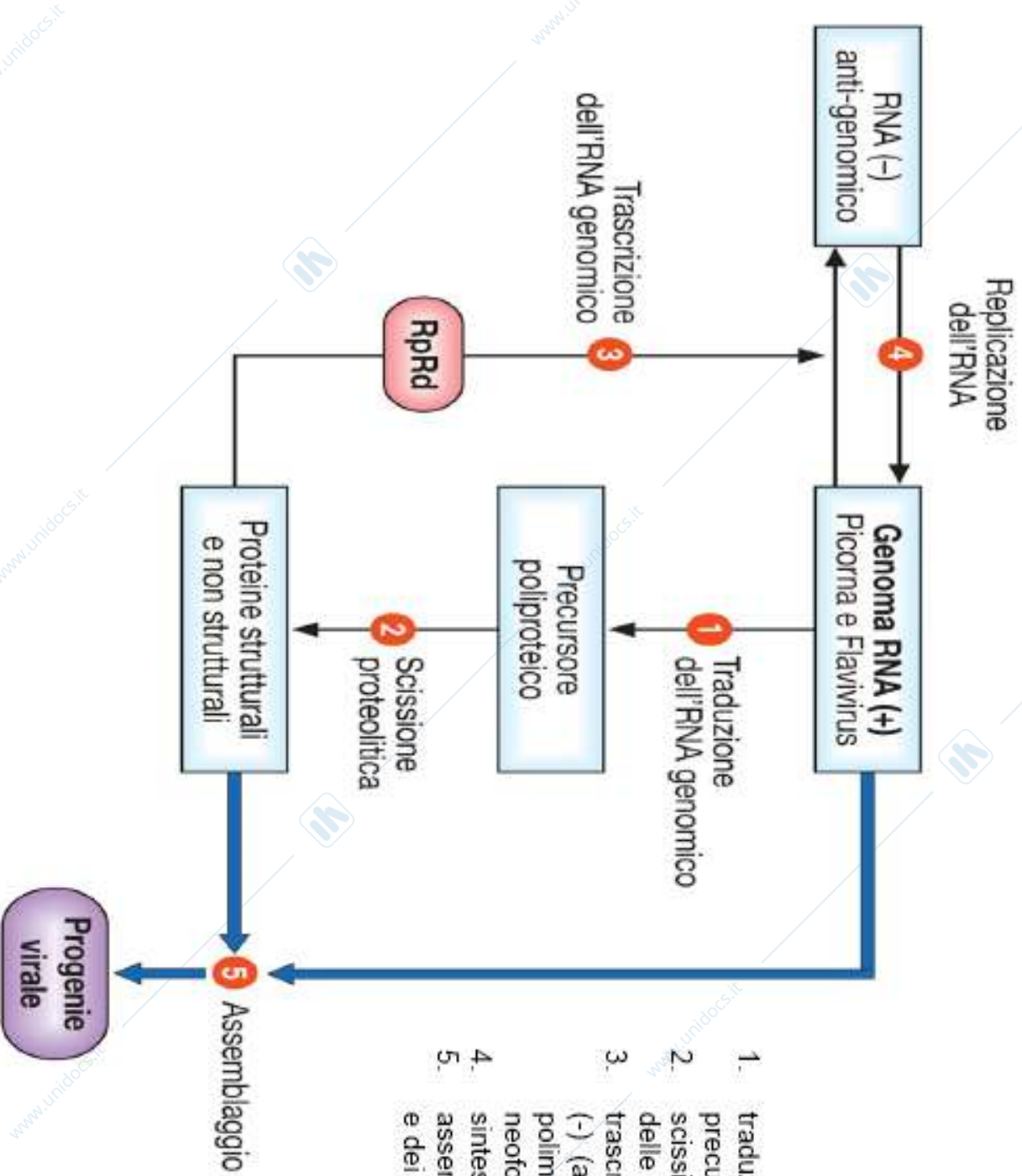


Figure 1.12: General methods of viral replication.

REPLICAZIONE DI ALCUNI VIRUS CON GENOMA A RNA (+)



1. traduzione dell'RNA genomico in un precursore poliproteico
2. scissione proteolitica e formazione delle proteine strutturali e funzionali
3. trascrizione dell'RNA genomico in RNA (-) (antigenoma) ad opera della RNA polimerasi-RNA dipendente (RpRd) neoformata
4. sintesi di nuovo RNA (+)
5. assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi

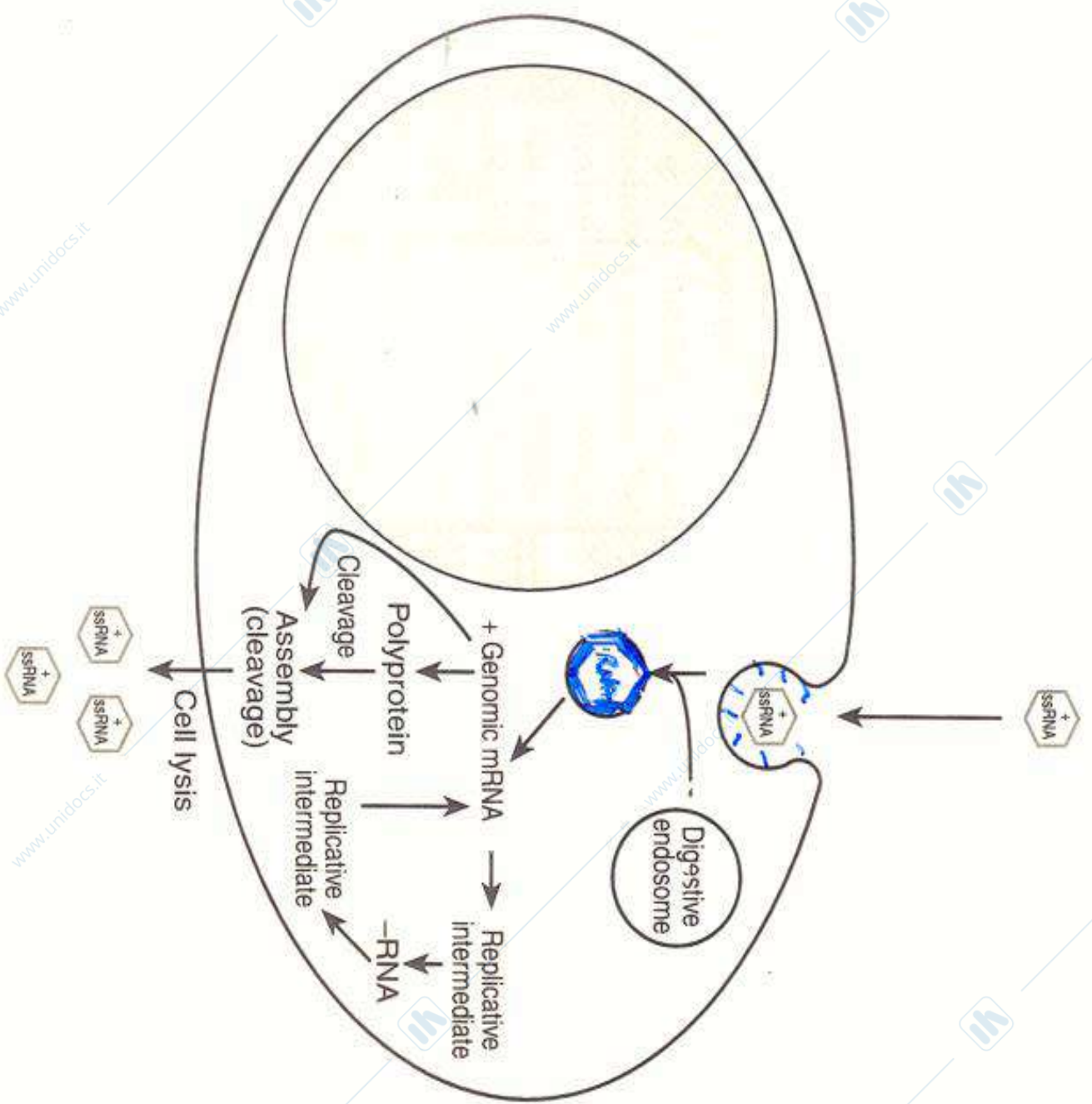
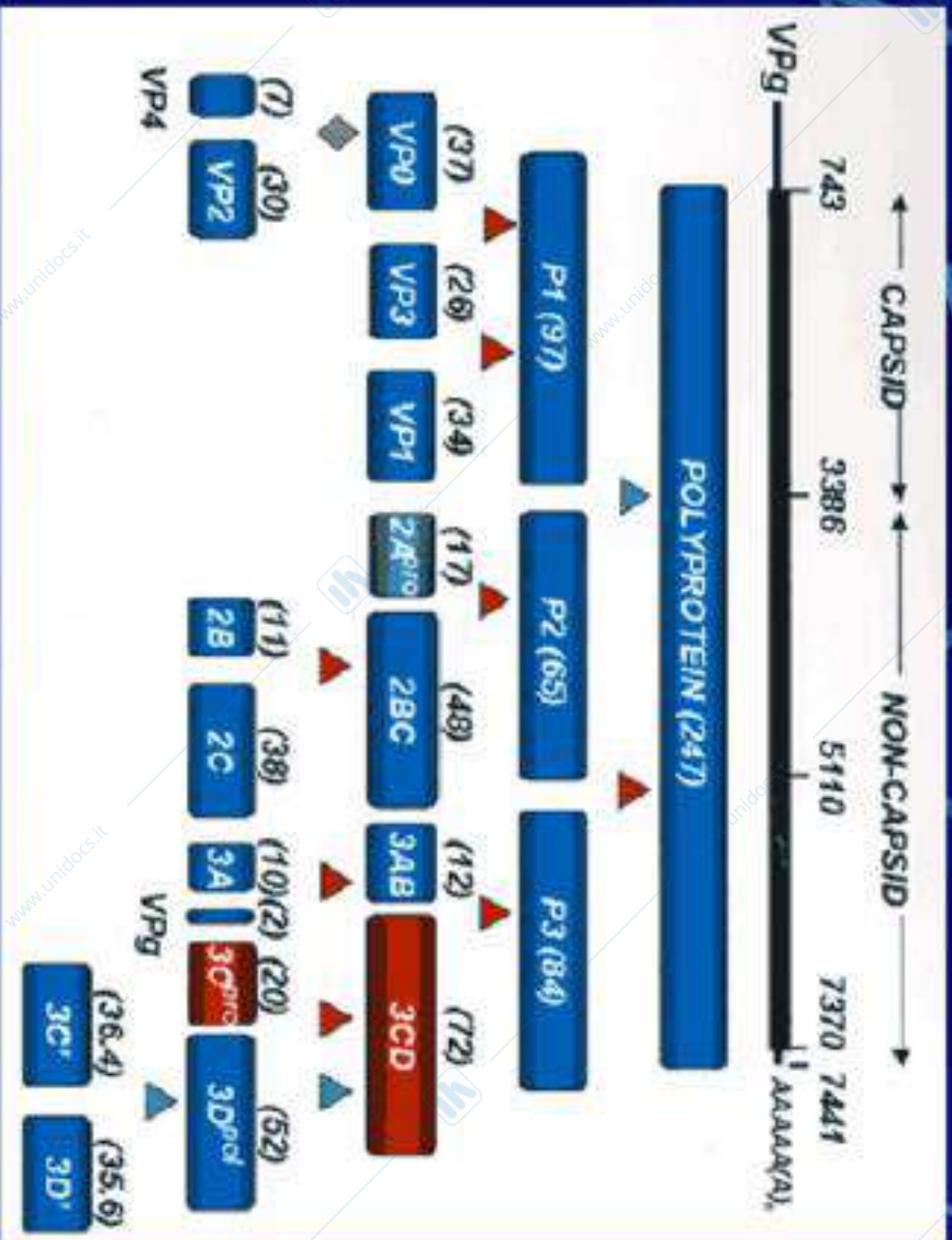


Figure 1.23: Poliovirus replication.

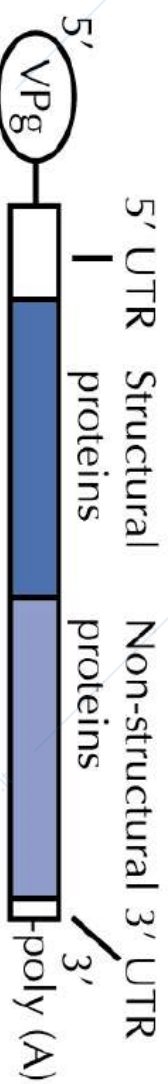
Polyprotein Strategy



Genomi a RNA (+), Picornavidae

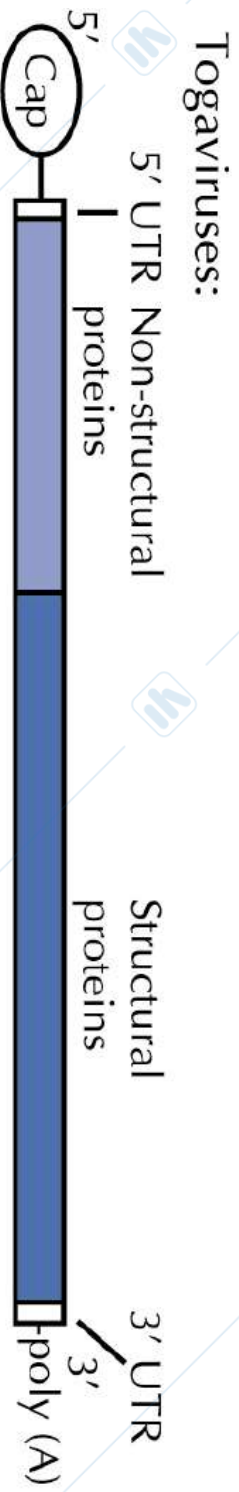
- Dimensioni dalle 7.2 alle 8.5 kb, contiene una lunga UTR al 5' (600-1200nt) importante per la traduzione, sequenze IRES (Internal Ribosome Entry Site); UTR al 3' più corta (50-100 nt) importante per la sintesi del filamento (-)
- Codifica una unica poliproteina
- Entrambe le estremità del genoma sono modificate: VPg al 5' e poliadenilizzazione al 3'

Picornaviruses:



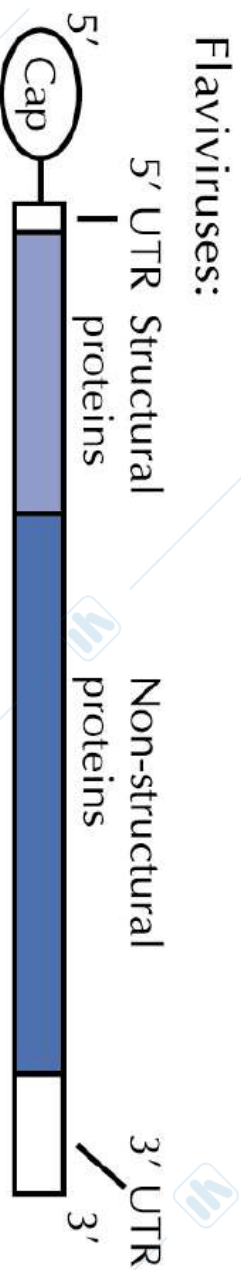
Genomi a RNA (+), Togaviridae

- Lungo circa 11.7 kb, con struttura che ricorda un mRNA messaggero con cap metilato al 5' e sequenza poli(A) al 3'

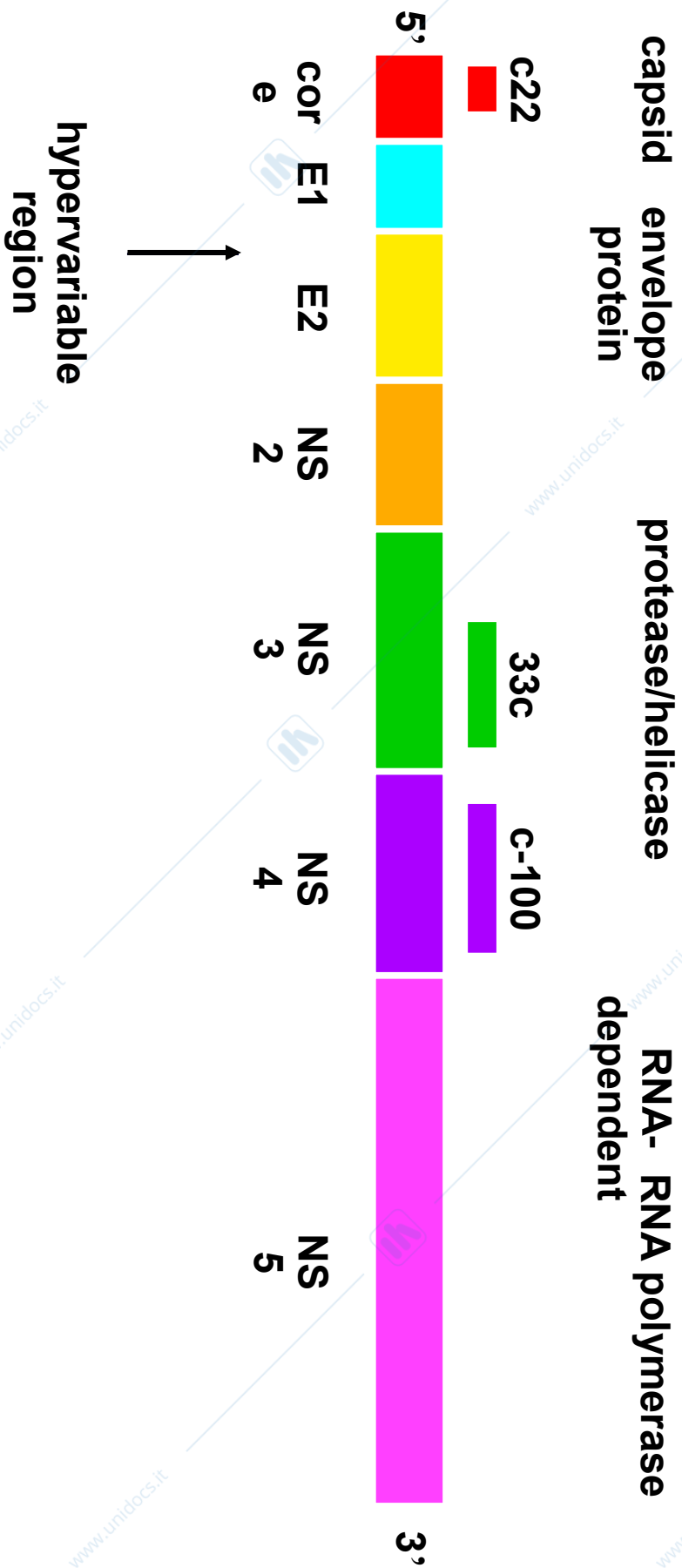


Genomi a RNA (+), Flaviviridae

- Lungo circa 10.5 kb, cap metilato al 5', in molti casi il 3' non è poliadenilato



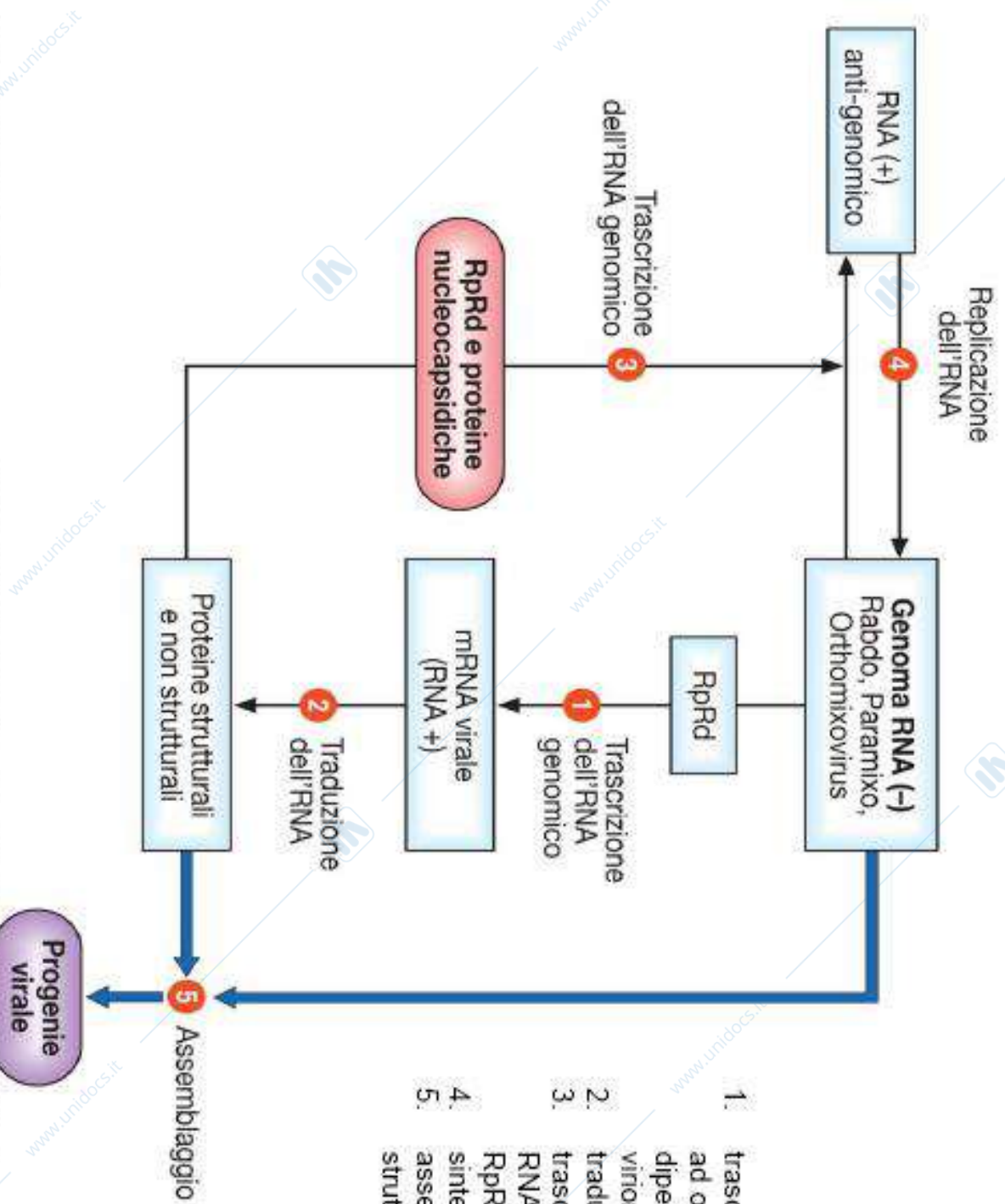
Hepatitis C Virus



Genomi a RNA (-)

- In questa classe sono presenti virus con genoma segmentato, ed alcuni con genoma ambisenso: parte a polarità (-) e parte a polarità (+)
- Nessuno di questi genomi è infettivo come RNA purificato in quanto non è riconosciuto come mRNA
- Tutti i virioni possiedono associata al genoma la polimerasi virale che sarà utilizzata, all'inizio dell'infezione, per produrre i messaggeri a partire dallo stampo RNA(-)

REPLICAZIONE DI ALCUNI VIRUS CON GENOMA A RNA (-)

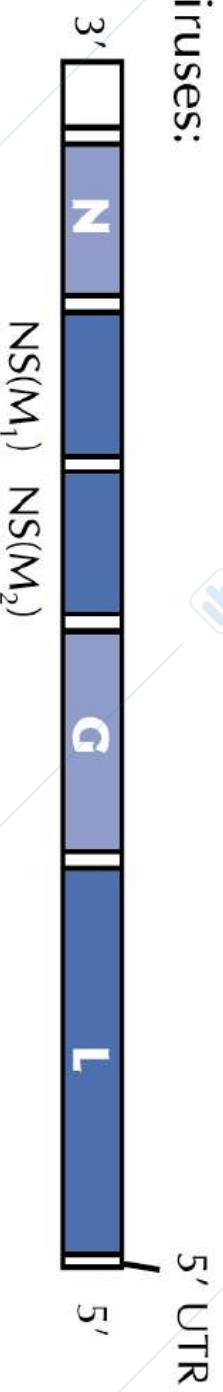


1. trascrizione dell'RNA (-) in RNA (+) ad opera della RNA polimerasi-RNA dipendente (RpRd) associata al virione
2. traduzione dell'RNA (+) neoformato
3. trascrizione dell'RNA genomico in RNA (+) (antigenoma) ad opera della RpRd virale
4. sintesi del nuovo RNA di progenie
5. assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi

Genomi a RNA (-), Rhabdoviridae

- Circa 11kb. Contiene una regione leader di 50nt al 3' e una breve UTR al 5'. E' presente un segnale di poliadenilazione alla fine di ogni gene e corte regioni intergeniche tra i 5 geni

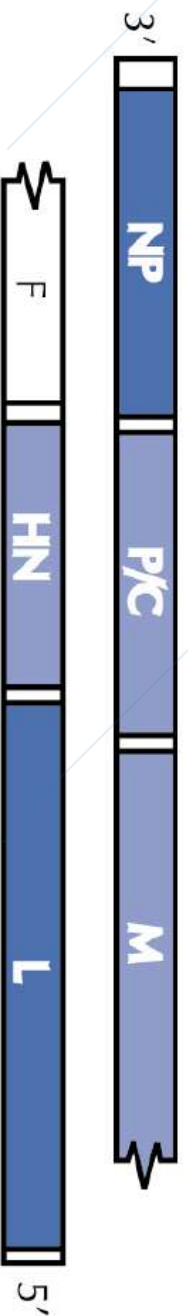
Rhabdoviruses:



Genomi a RNA (-), Paramyxoviridae

- 15-16 kb, 6 geni separati da sequenze ripetute: un segnale di poliadenilazione alla fine del gene, una sequenza intergenica (GAA) e un sito di inizio della trascrizione all'inizio del gene successivo

Paramyxoviruses:



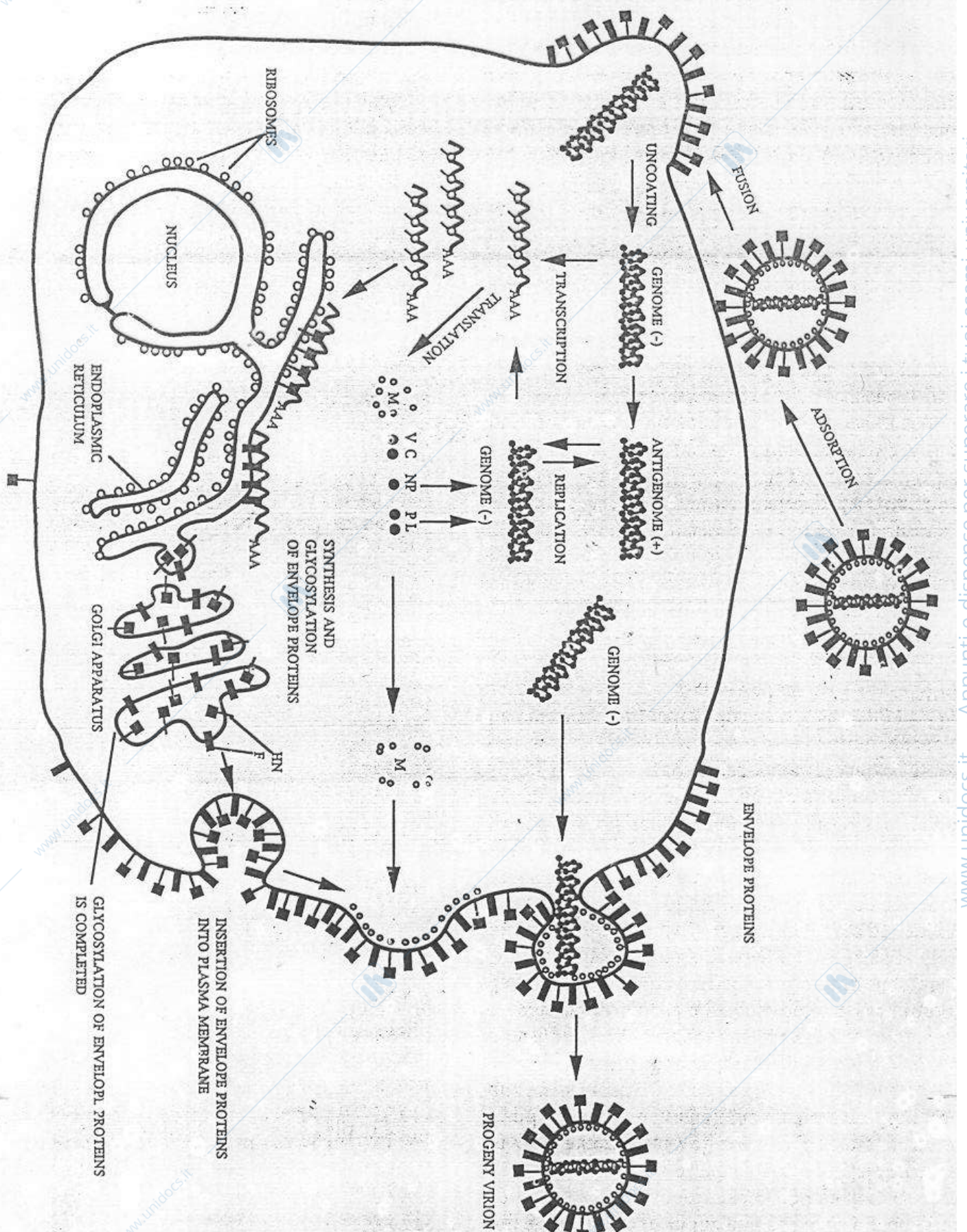
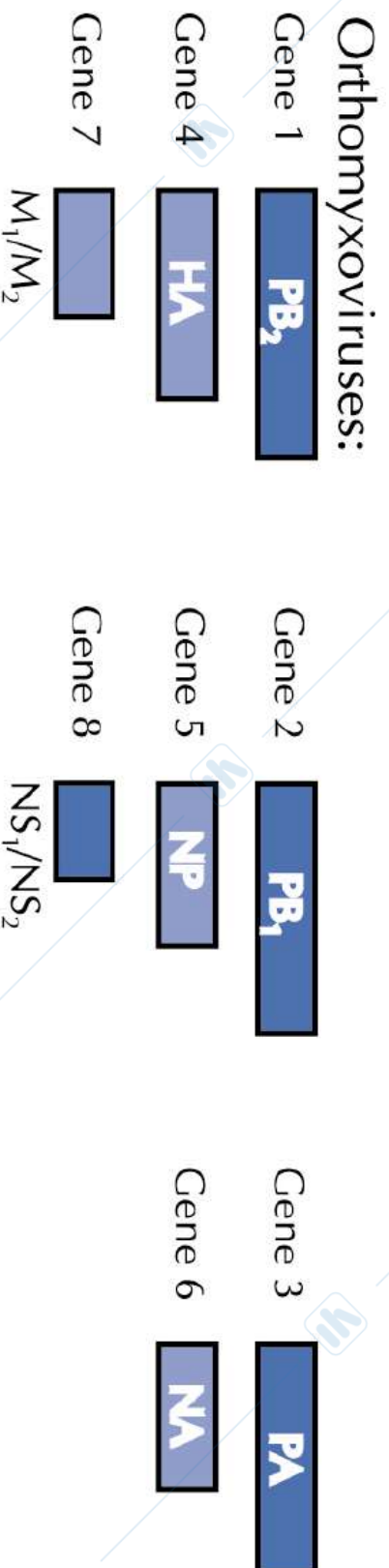


FIG. 10. Schematic representation of the life cycle of a paramyxovirus.

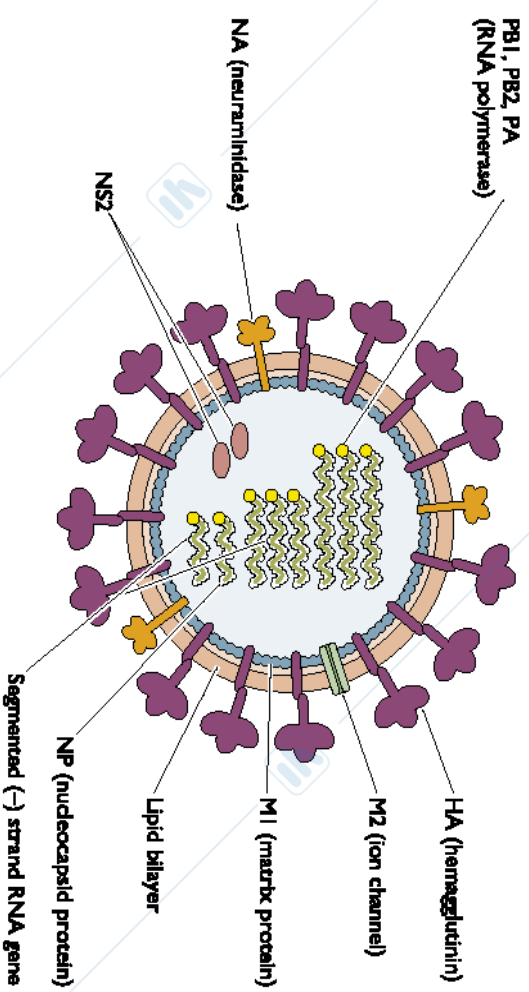
Genomi a RNA (-), Orthomyxoviridae

- Genoma segmentato, 8 segmenti (ceppi influenza A e B)



Genomi a RNA (-), Orthomyxoviridae

- I segmenti genomici non sono impacchettati come acido nucleico nudo, ma associati alla nucleoproteina e sono visibili al M.E. come strutture elicoidali



From Flint et al. *Principles of Virology* (2000), ASM Press

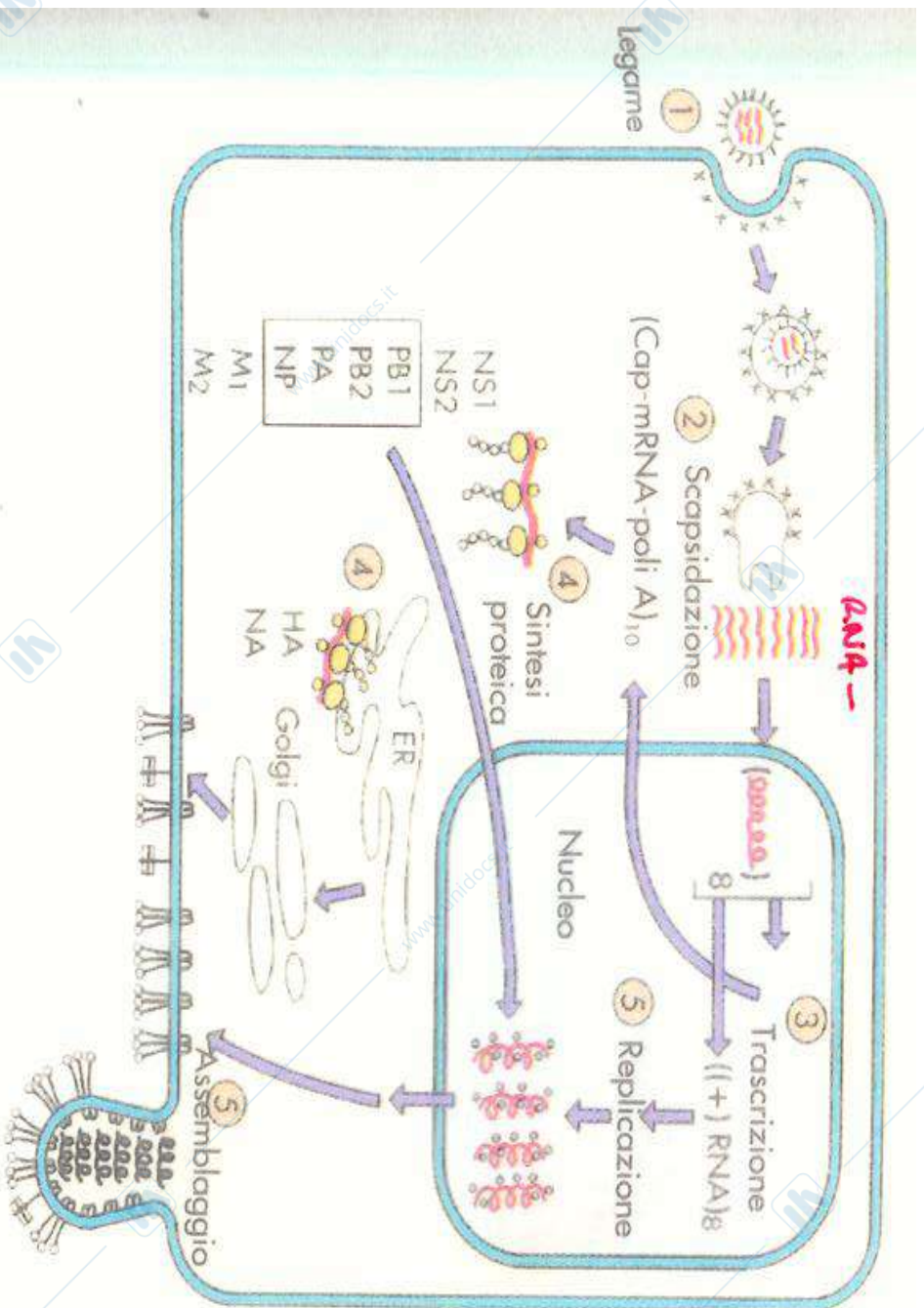


FIGURA 56-2 Replicazione del virus dell'influenza A. Dopo il legame (1) ai recettori contenenti acido sialico, il virus viene internalizzato per endocitosi e si fonde con la membrana della vescicola (2). A differenza della maggior parte dei virus ad RNA, la trascrizione (3) e la replicazione (5) del genoma avvengono nel nucleo. Vengono sintetizzate le proteine virali (4), si forma il nucleocapside elicoidale che si associa (5) con la proteina M₁, a sua volta associata a porzioni di membrana citoplasmatica contenenti le glicoproteine HA e NA. Il virus gemma dalla membrana citoplasmatica. (+), Polarità positiva; ER, reticolo endoplasmatico.

TRANSCRIPTION

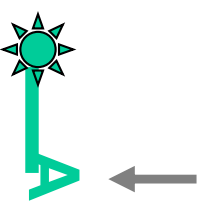
(mRNA SYNTHESIS)

 =cap

cleavage site

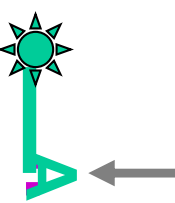


viral endonuclease



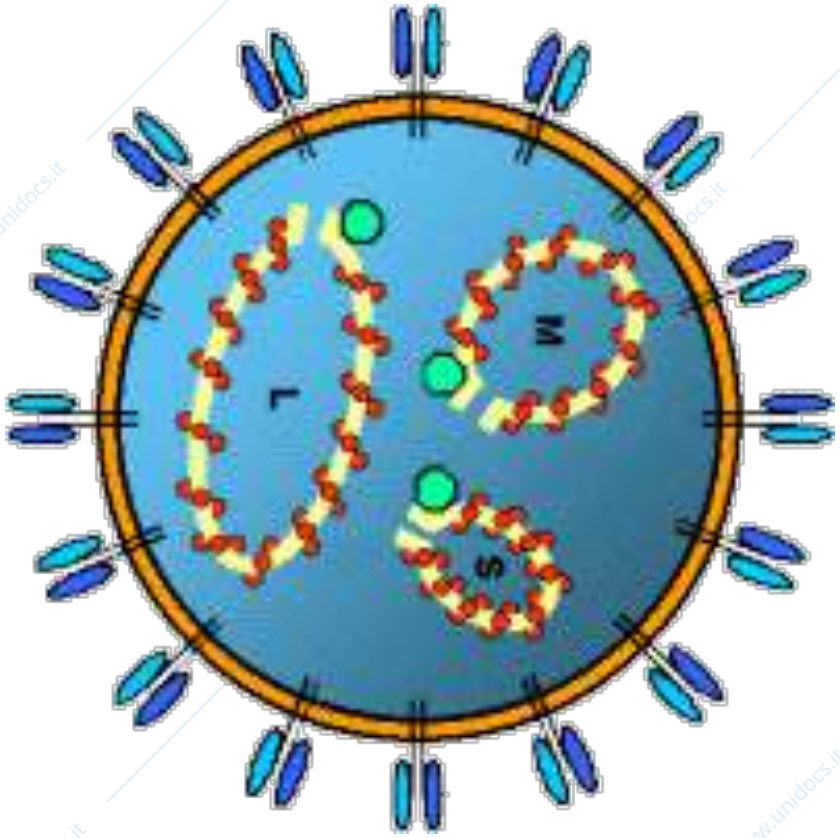
influenza virus nucleocapsid

viral polymerase

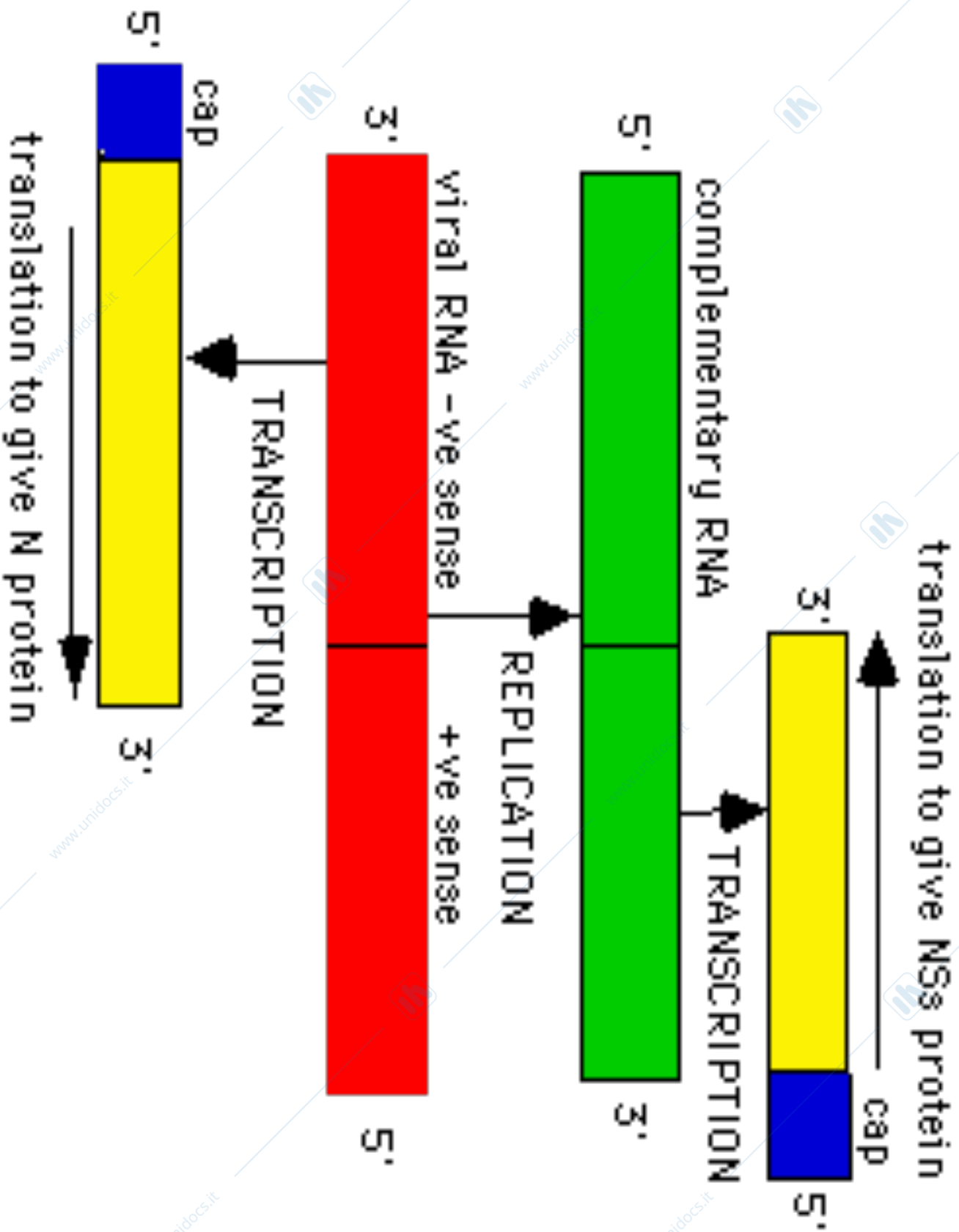


influenza mRNA



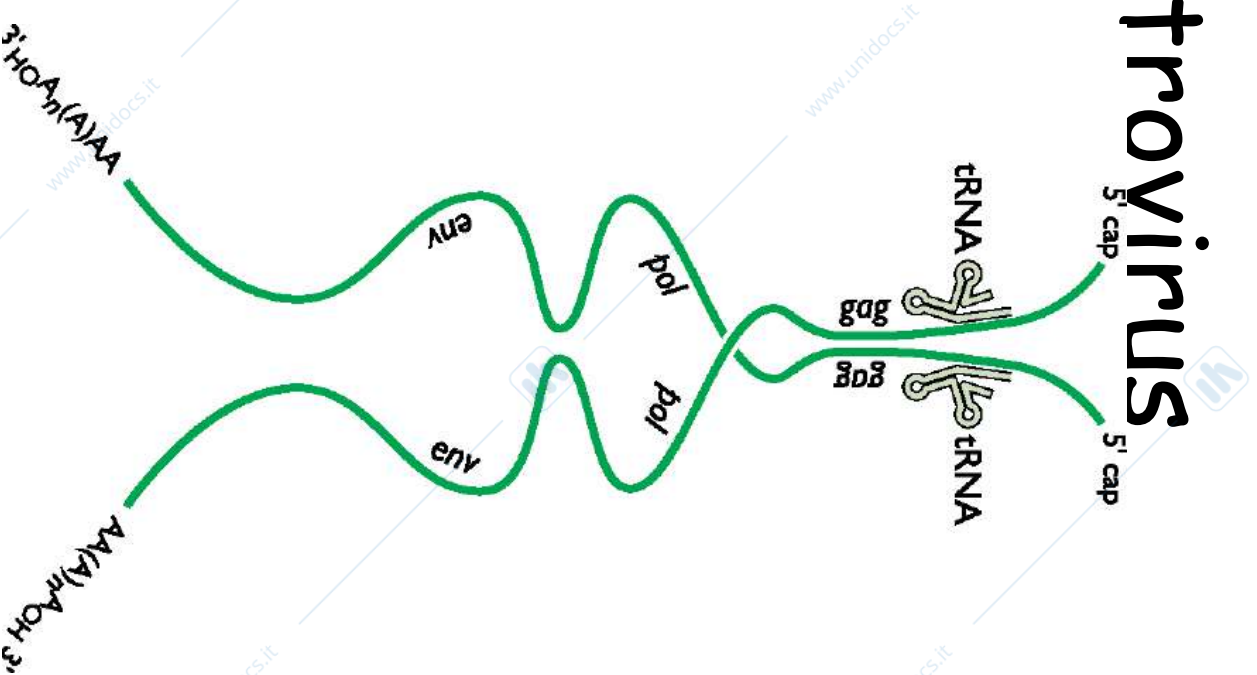


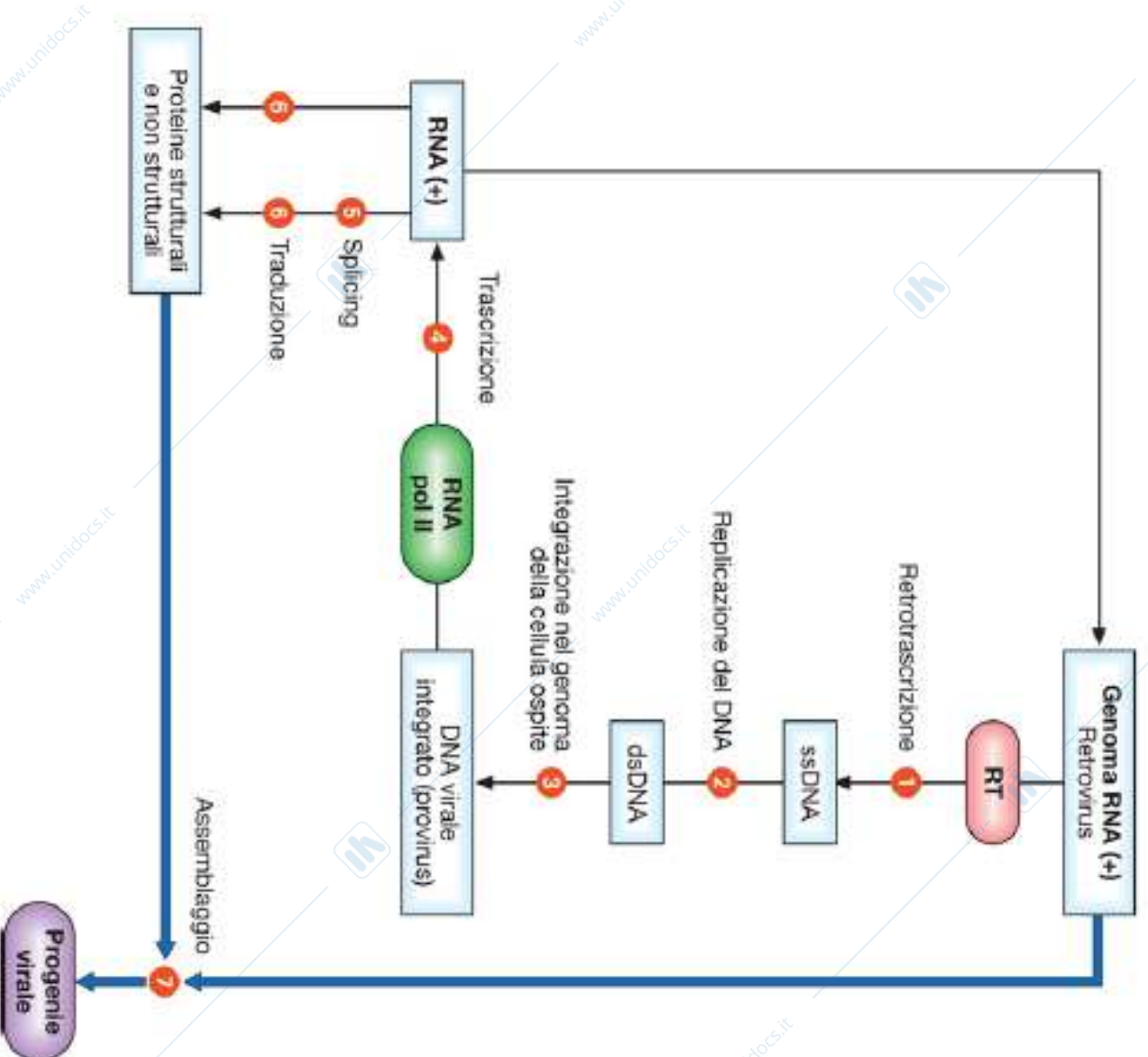
Bunyaviruses



Genoma dei retrovirus

- 4 caratteristiche principali:
- 1) sono gli unici virus diploidi: contengono due copie di RNA(+) genomico tenute insieme in più regioni attraverso appaiamento di basi
 - 2) Sono gli unici virus che richiedono uno specifico RNA cellulare (tRNA) per la replicazione





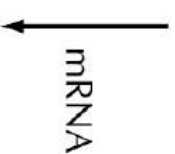
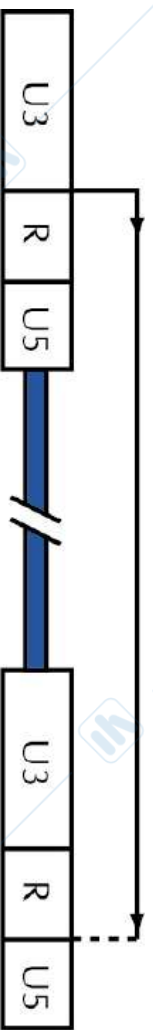
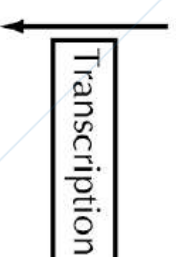
1. e 2. retrotrascrizione dell'RNA genomico in DNA ad opera della trascrittasi inversa (RT) virale
3. Integrazione del genoma virale nel DNA cellulare
4. Trascrizione del genoma virale ad opera della RNA polimerasi II
5. Splicing dell'RNA
6. Traduzione dell' mRNA (sottoposto e non a splicing)
7. Assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi

Genoma dei retrovirus

- 3) Sono gli unici virus ad RNA(+) il cui genoma non è utilizzato direttamente come mRNA
- 4) Sono gli unici virus il cui genoma è prodotto attraverso la normale trascrizione ad opera di enzimi cellulari a partire da DNA



Integrated provirus:



From Cann Principles of molecular virology (2001). Academic Press

Genoma dei retrovirus

R è una corta sequenza che forma ripetizioni dirette ad entrambe le estremità del genoma, importante durante il processo di replicazione, segnale di poliadenilazione

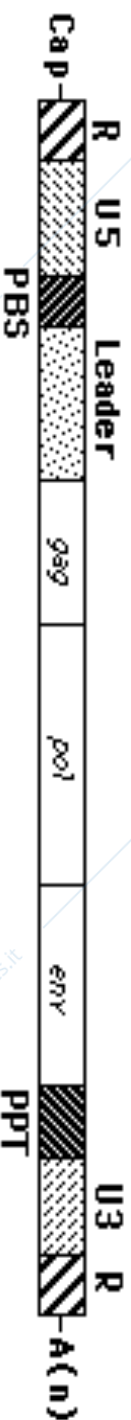
U5 sequenza unica non codificante, prima parte del genoma ad essere retrotrascritta, sito importante per l'integrazione

PBS 18nt complementari al 3' del tRNA

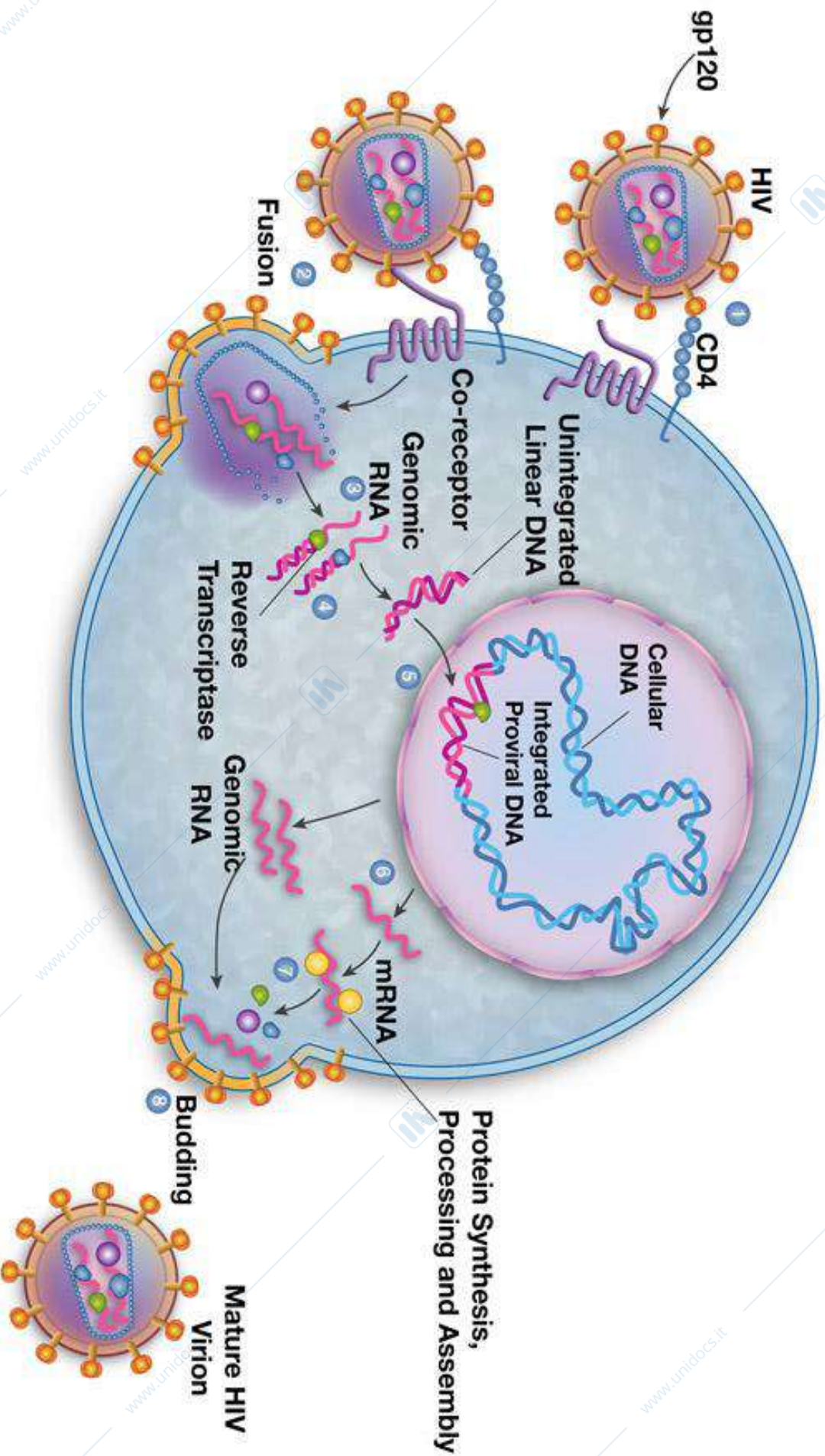
Leader (90-500nt) non tradotta, contiene SD e ψ site

PPT (c.a. 10nt) sito di inizio del filamento * di DNA

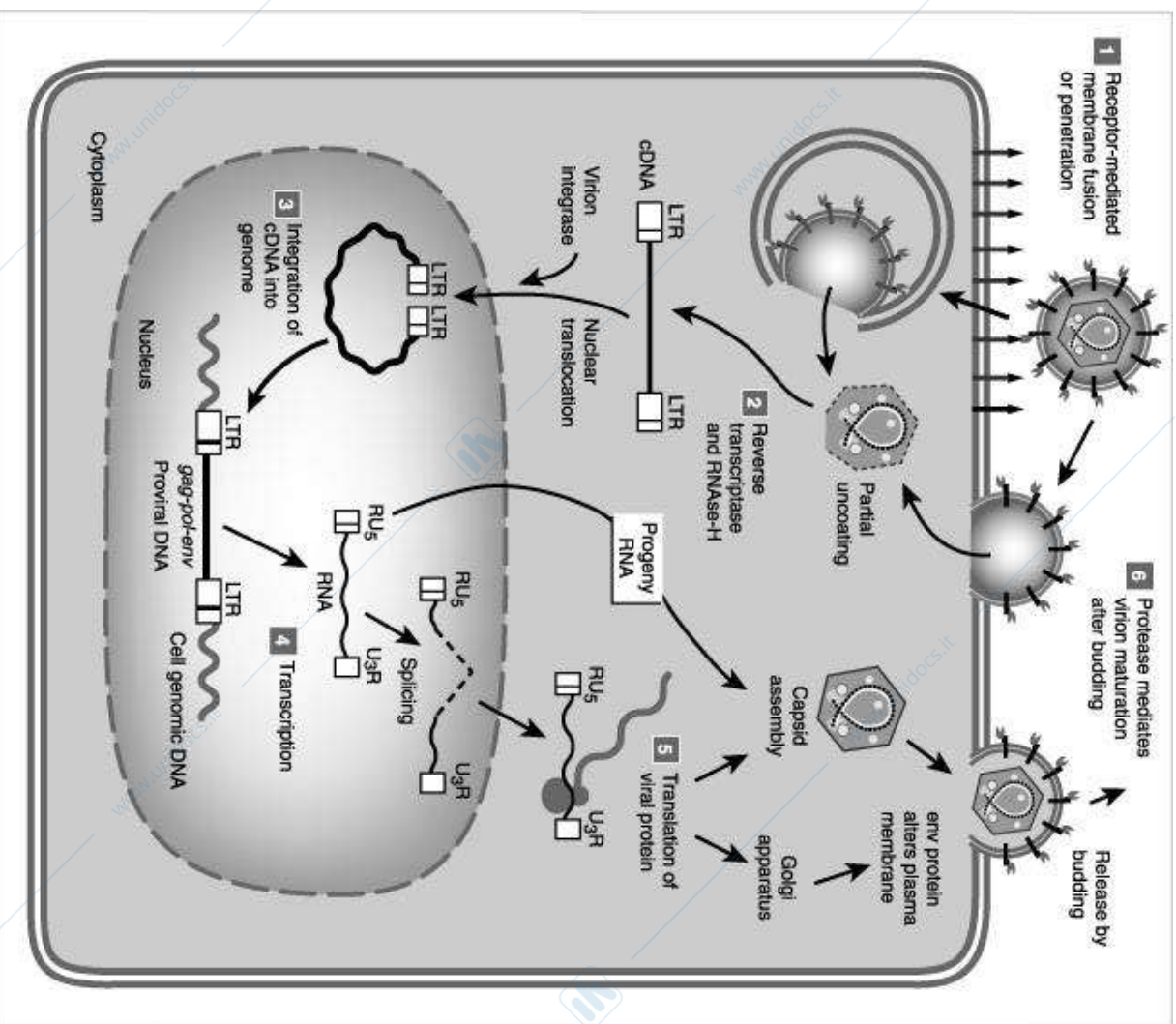
U3 regione unica non codificante (200-1200nt) contenente elementi promoter



HIV Replication Cycle



Ciclo replicativo retrovirus



From Wagner and Hewlett *Basic virology* (2003) Blackwell Science Press

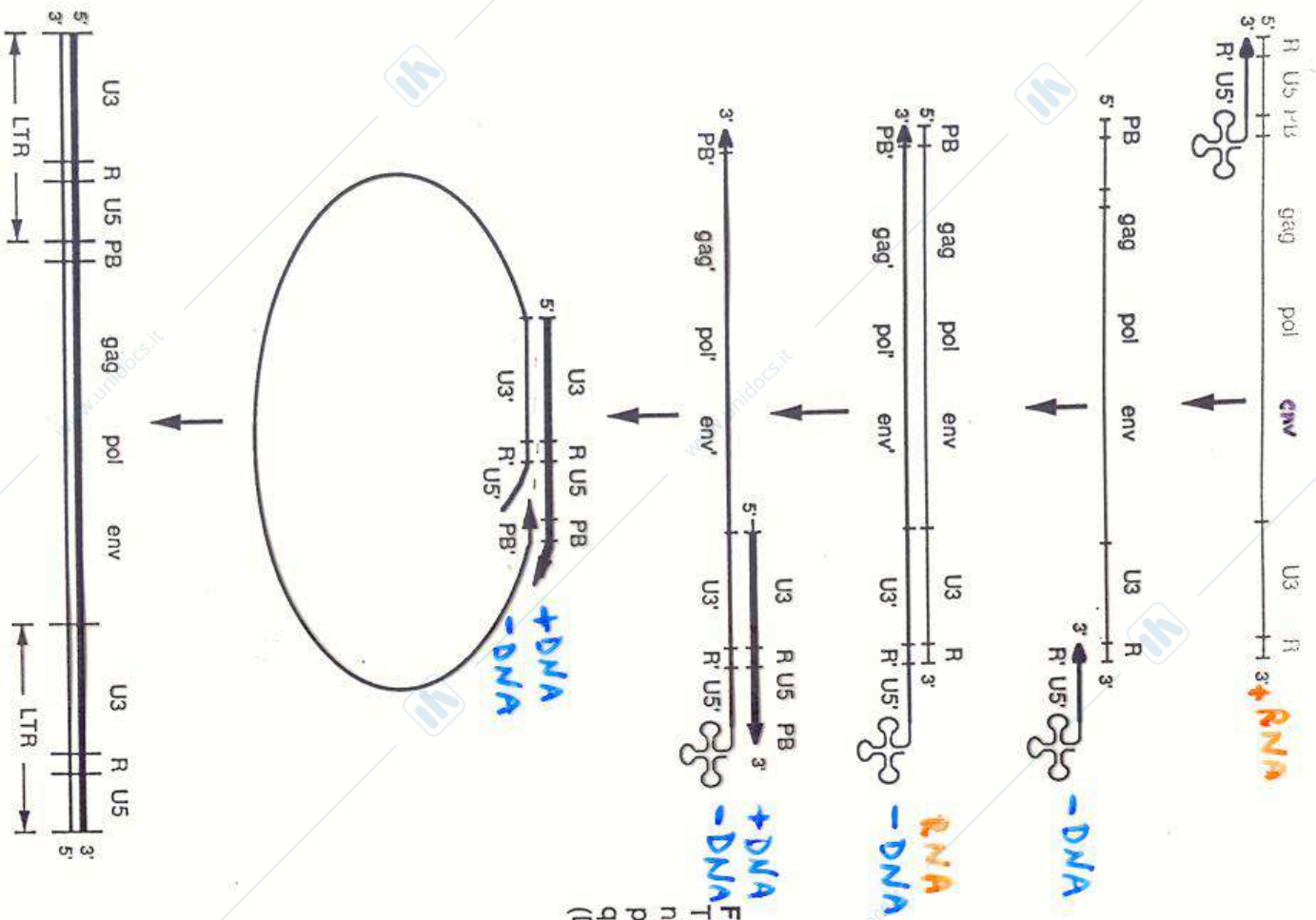


FIG. 10. Mechanism of viral DNA synthesis. Thin lines depict RNA, medium lines depict negative-strand DNA, and thick lines denote positive-strand DNA. Negative-sense sequences are also indicated by a "prime." (Drawing courtesy of S. Herman.)

Initiation of (-) strand DNA synthesis

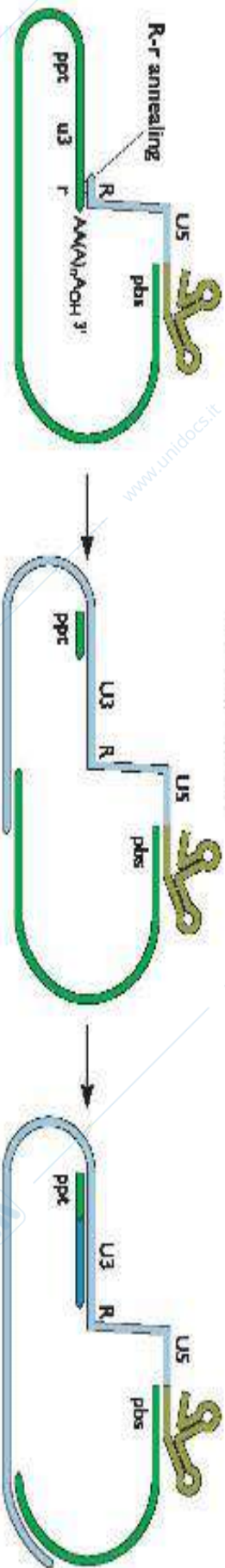
The 5' end of the viral RNA genome is degraded by the RNase H activity of RT as the (-) strand DNA is synthesized.



First template exchange

The RNA genome continues to be degraded as (-) strand DNA is synthesized

(+) strand DNA synthesis begins, primed by the ppsRNA

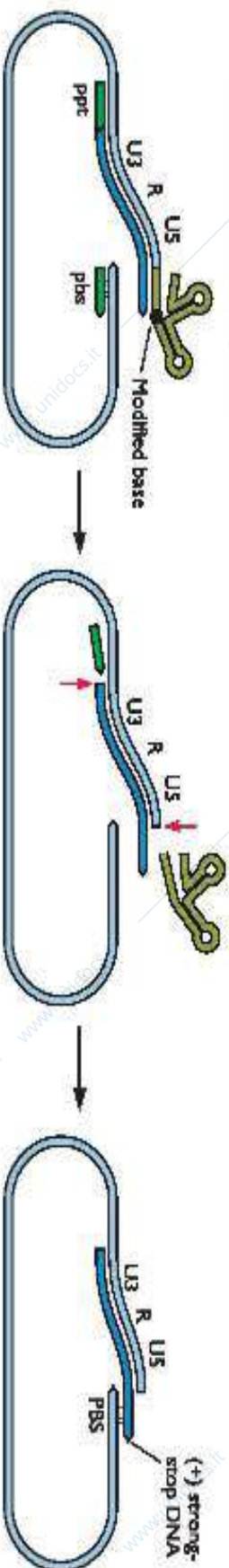


(+) strand DNA synthesis

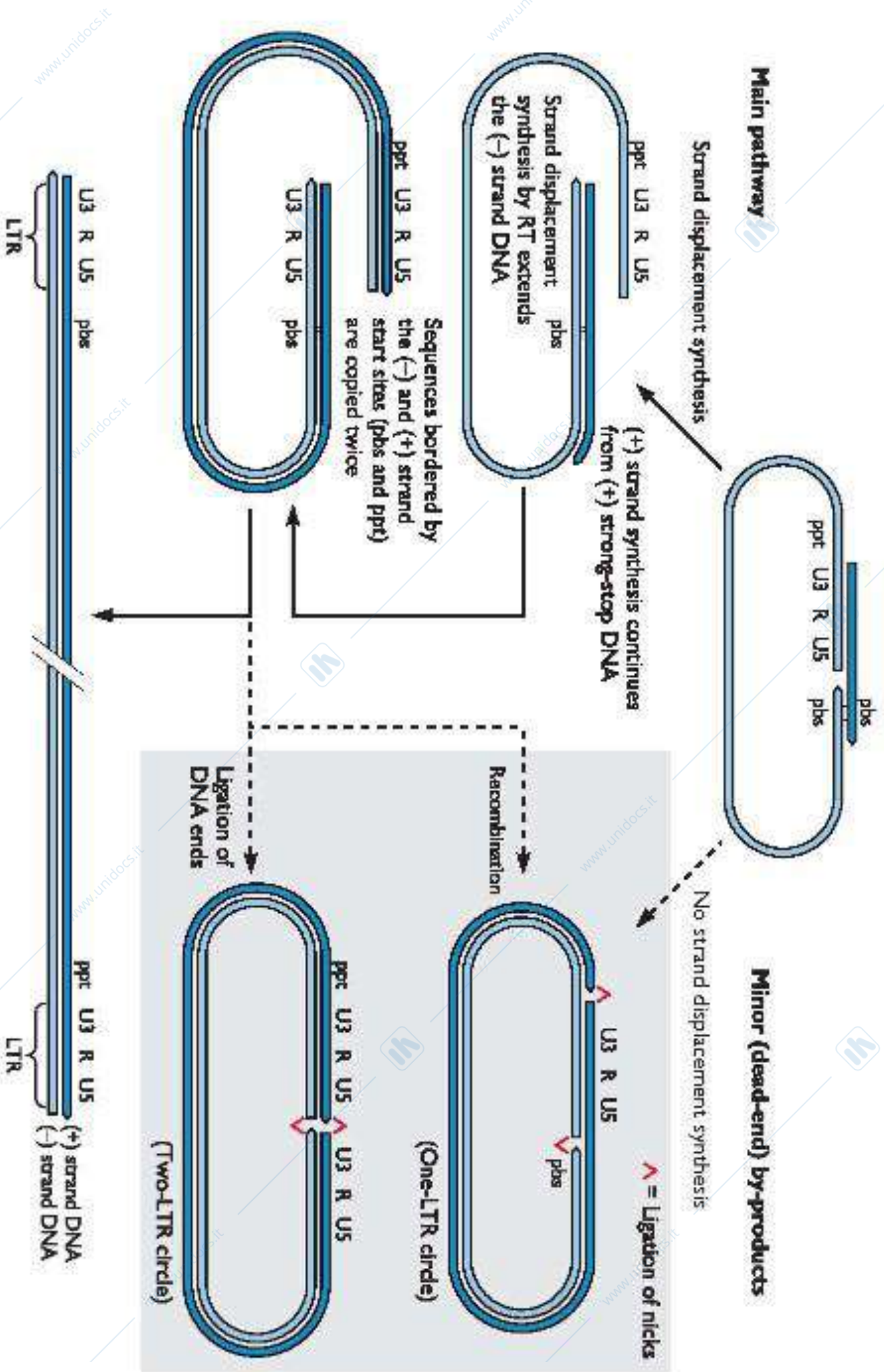
The pbs sequence is copied twice:
 • once from the RNA genome
 • once from the RNA primer

RNase H endonuclease activity of RT removes both primer RNAs

DNA ends are juxtaposed by annealing at complementary PBS sequences



Second template exchange is facilitated by annealing of PBS sequences



The Genome of HIV



HIV-1 GENOME 9749 NUCLEOTIDES

Three structural genes

LTRs

Extra open reading frames are clue to latency

These ORFs code for small proteins - antibodies in AIDS patients

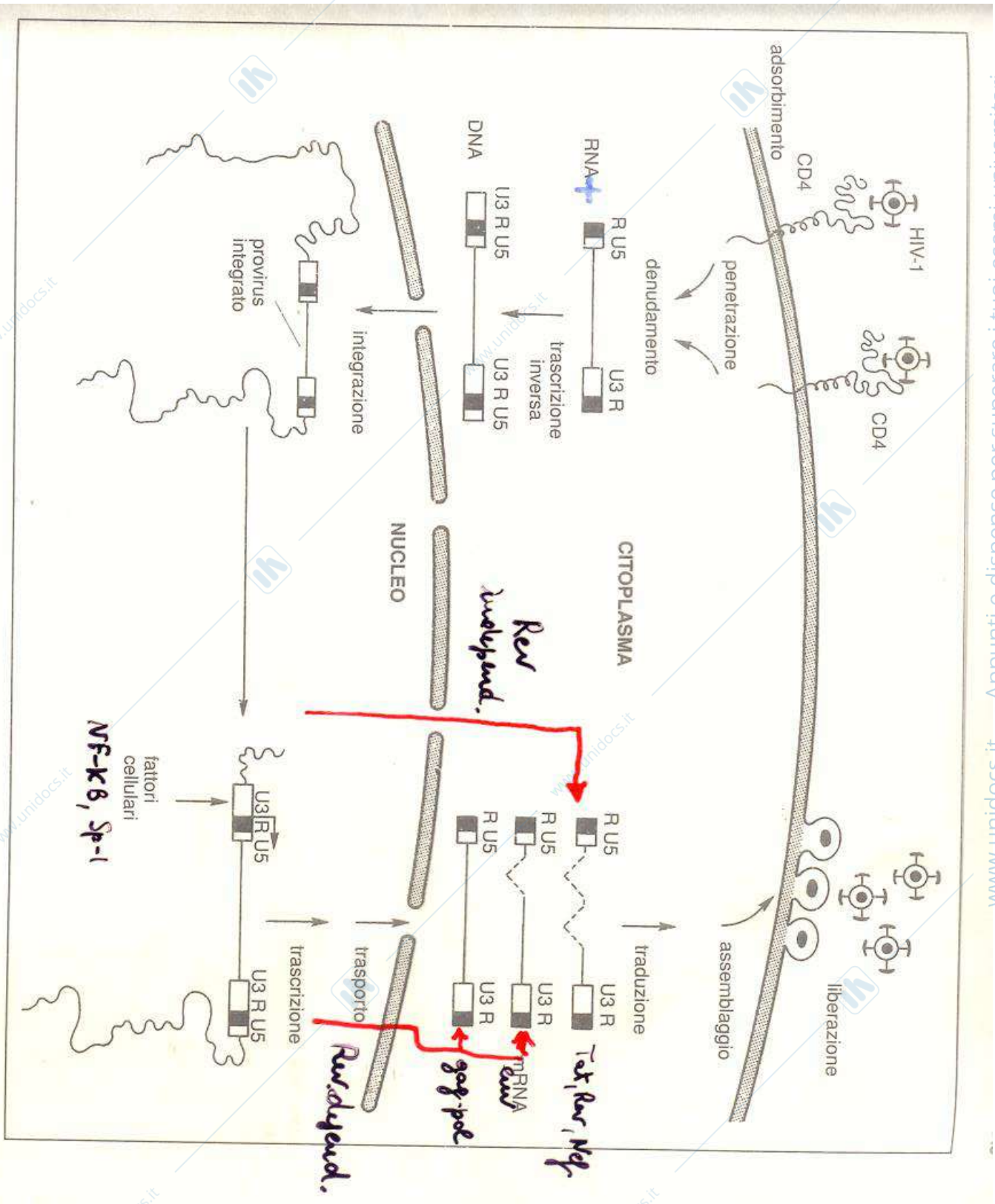
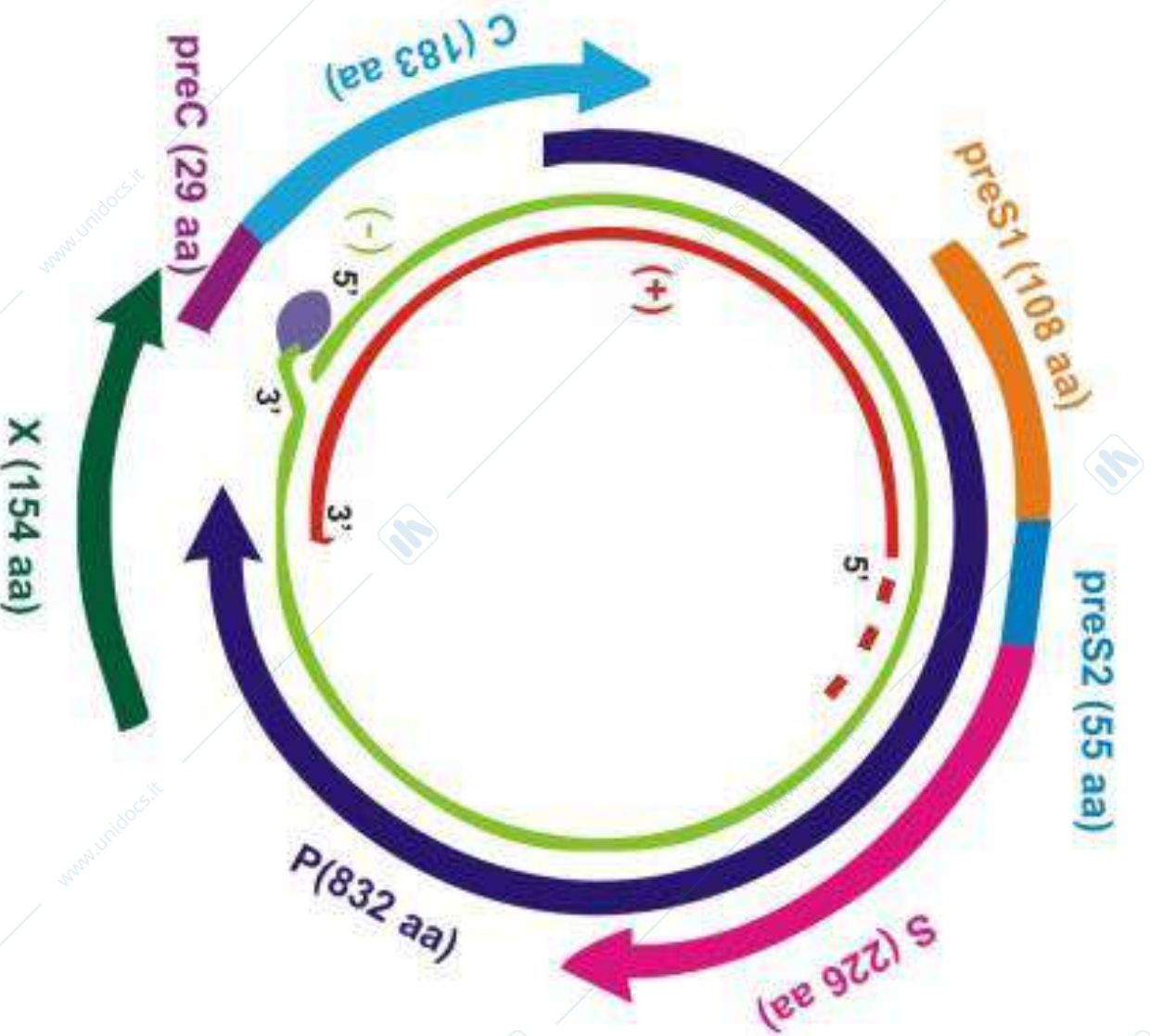


Figura 18.3 Meccanismo di replicazione dell'HIV. (Da Dianzani F. e coll.: Il libro italiano dell'AIDS, McGraw-Hill Libri Italia, Milano, 1994.)

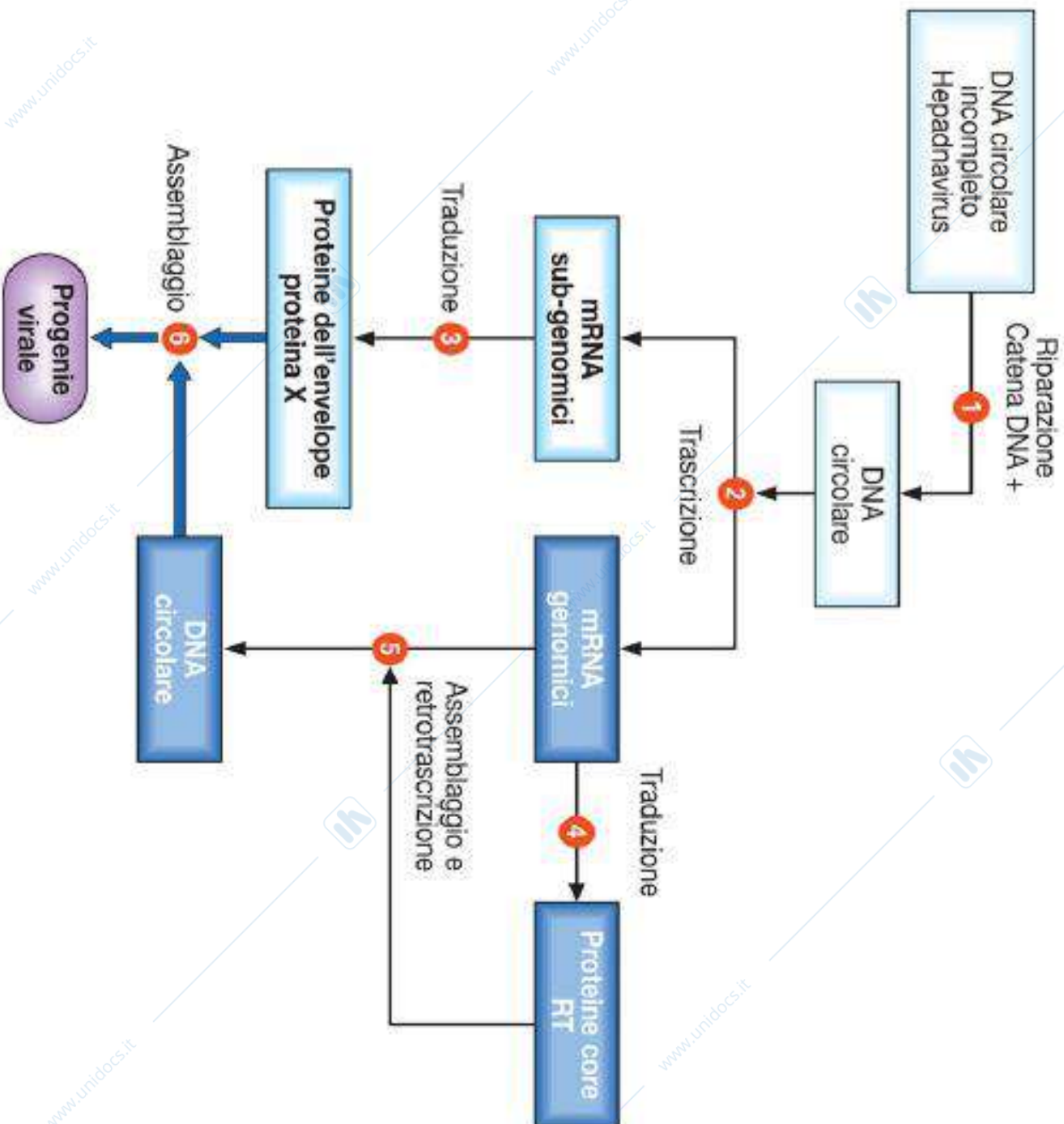
Genomi a DNA, Hepadnaviridae (HBV)

- Doppio filamento parziale, circolare aperto, con associata la DNA polimerasi RNA-dipendente (trascrittasi inversa)
- Filamento - circa 3.5 kb, filamento + variabile nelle diverse particelle, 1.7-2.8 kb
- Tre trascritti principali: 3.5, 2.4 e 2.1 kb, tutti dallo stesso filamento, condividono il 3' ma hanno un 5' diverso

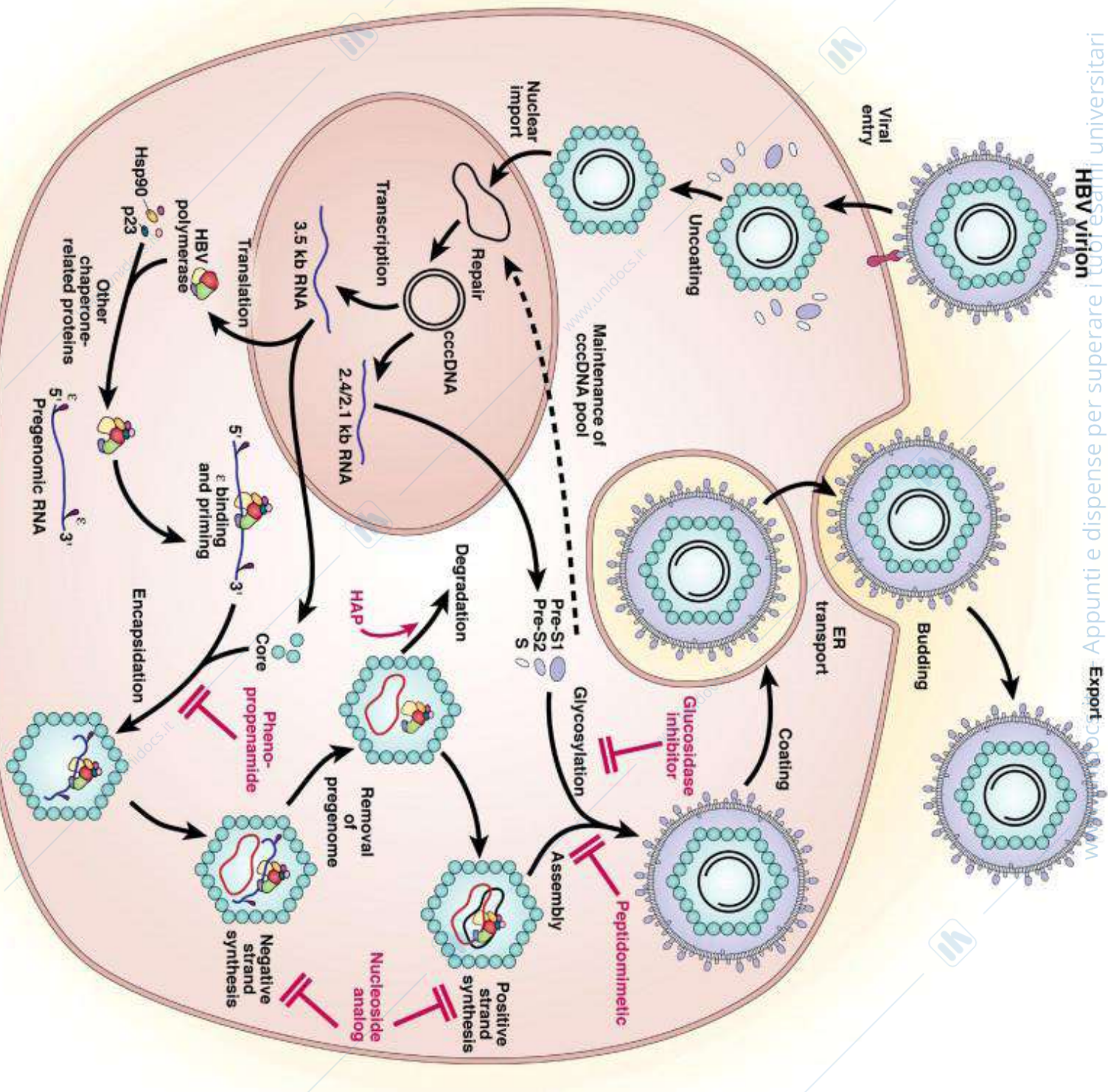
Hepatitis B Virus genome organization



REPLICAZIONE DEGLI HEPADNAVIRUS



1. riparazione della catena di DNA(+) interrotta
2. trascrizione del DNA in RNA genomici e sub-genomici
3. traduzione degli mRNA subgenomici
4. traduzione degli mRNA genomici
5. retrotrascrizione dell'RNA genomico in DNA ad opera della trascrittasi inversa (RT) virale
6. assemblaggio delle proteine strutturali e dei nuovi genomi



Virus a RNA che non hanno una fase a DNA

Genoma	RNA polimerasi RNA dependent(= transcriptase) nel virione	RNA infettivo	Evento iniziale nella cellula
Plus-stranded RNA	No	Infettivo	Traduzione
Negative-stranded RNA	Si	Non-infettivo	Trascrizione
Double-stranded RNA	Si	Non-infettivo	Trascrizione

RETROVIRUS

Genoma	RNA polimerasi DNA-dependent (=reverse transcriptase) nel virione	Infectivity of RNA	Evento iniziale nella cellula
Plus-stranded RNA	Si	Non-infettivo	Trascrizione inversa

Coltivazione e titolazione dei Virus

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).

COLTIVAZIONE E METODI DI SAGGIO DEI VIRUS

- Essendo parassiti endocellulari obbligati i virus per replicarsi necessitano di cellule viventi:

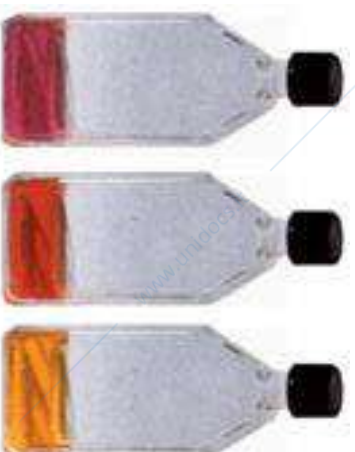
– **Animali**

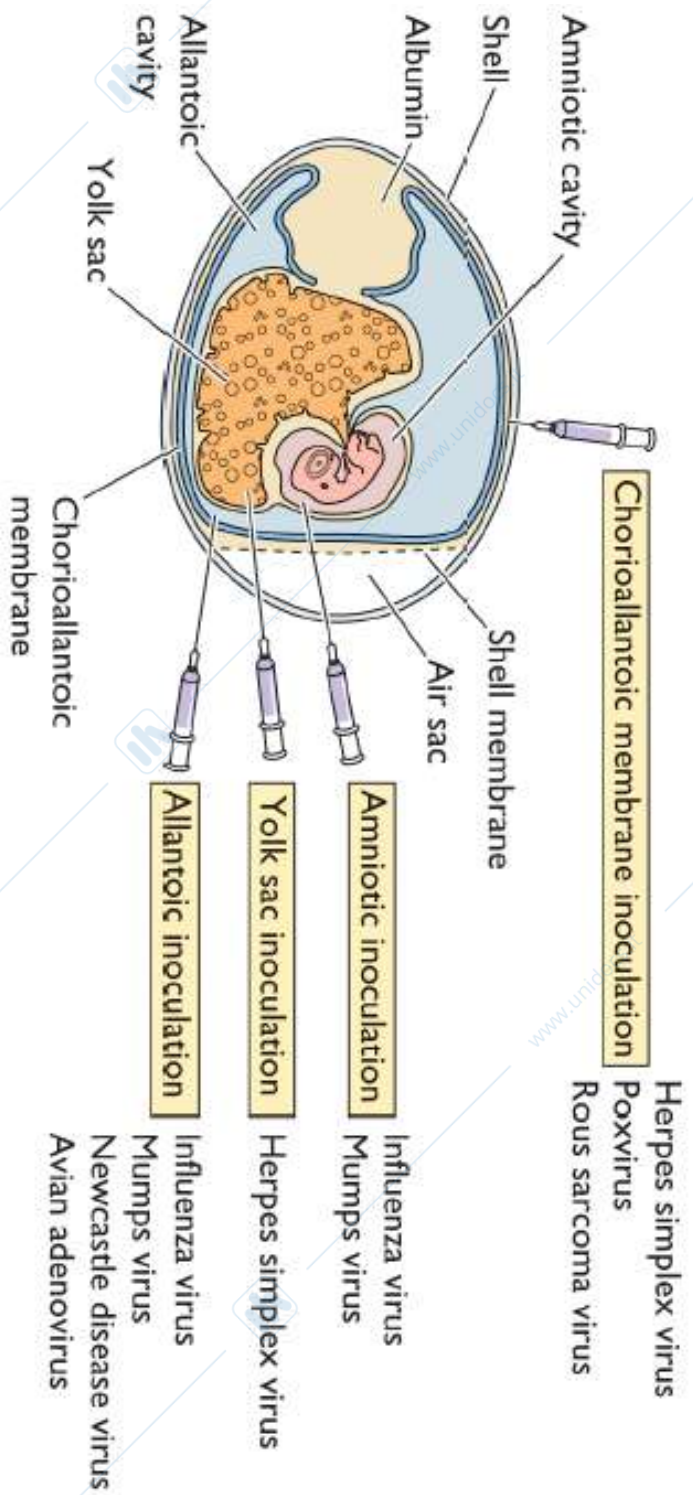


– **Uova embrionate**

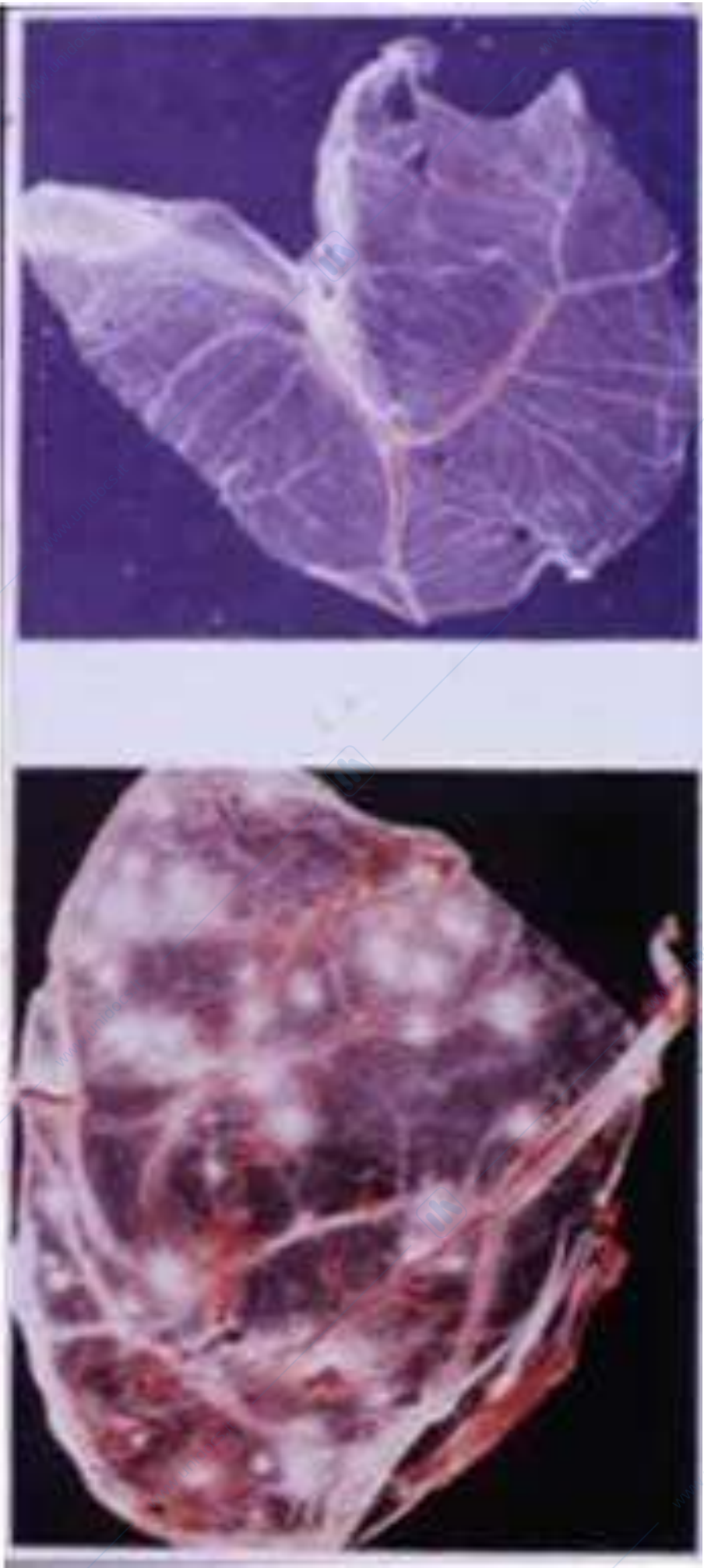


– **Cellule in coltura**





Normal & Viral Infected Chorioallantoic Chick Membranes



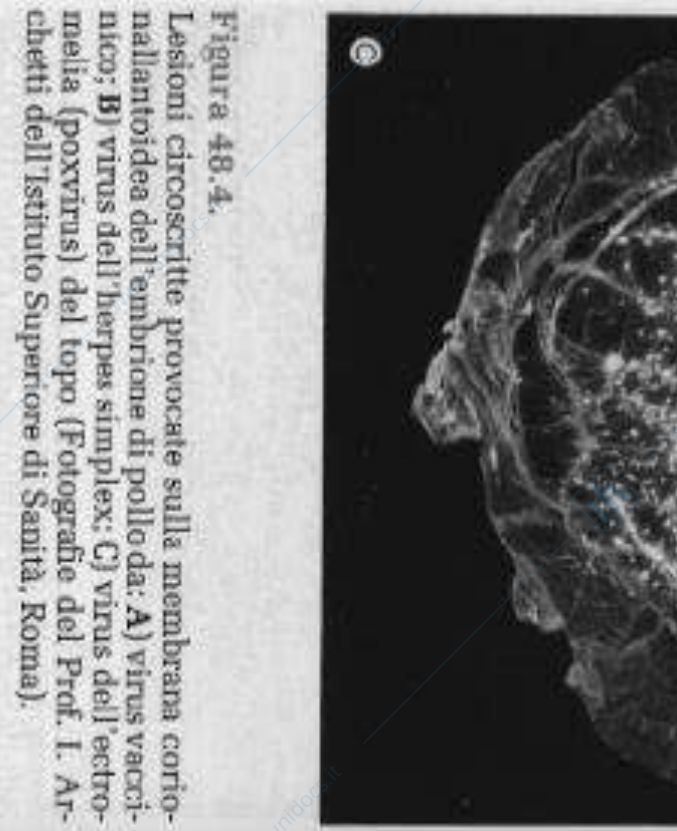
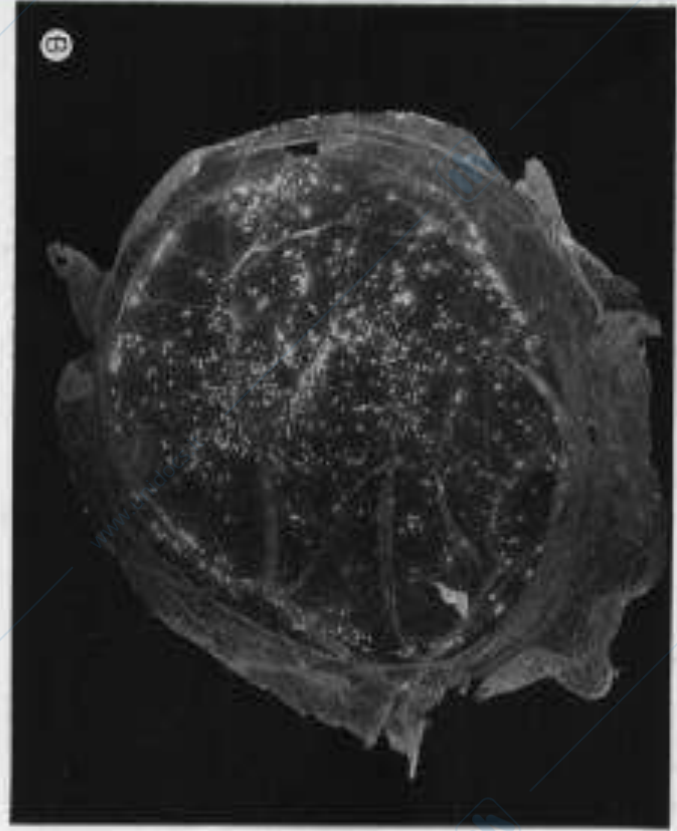
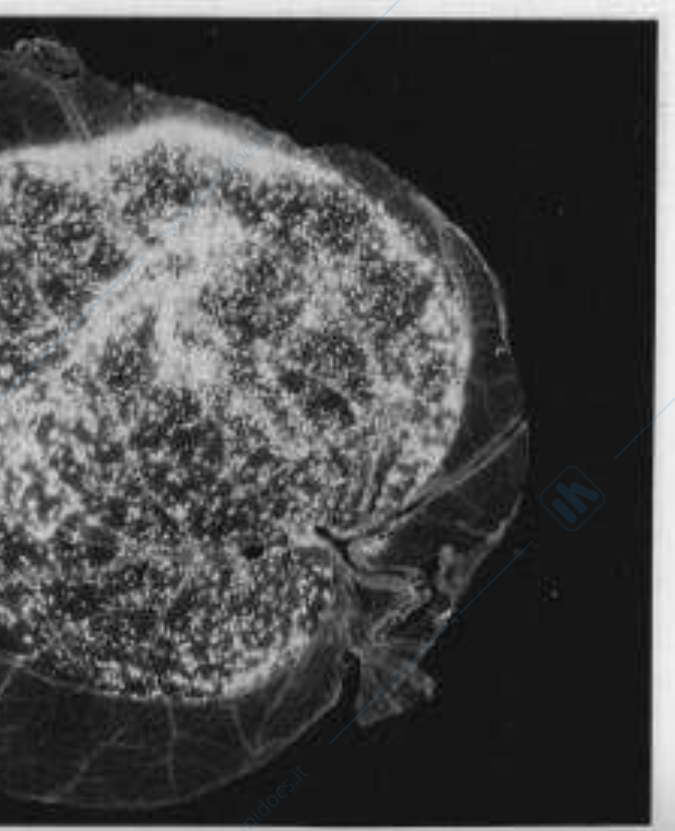
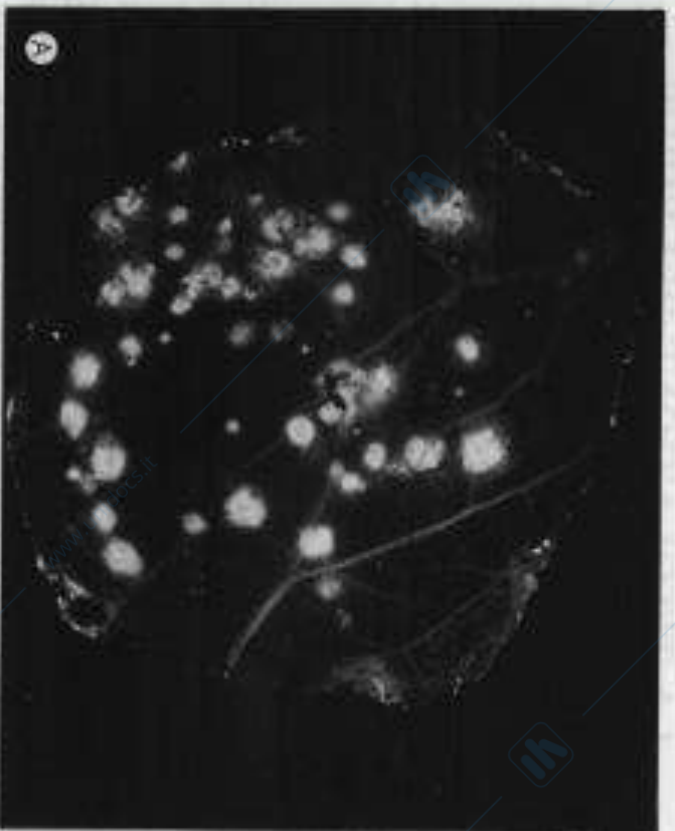


Figura 48.4.

Lesioni circoscritte provocate sulla membrana corio-nallantoidea dell'embrione di pollo da: **A)** virus vacci-nico; **B)** virus dell'herpes simplex; **C)** virus dell'ectro-melia (poxvirus) del topo (Fotografie del Prof. L. Archetti dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma).

Oggi si usano soprattutto **colture di cellule** cresciute in terreni di coltura arricchiti di aminoacidi, vitamine, siero di sangue e antibiotici (che consentono la riduzione della distruzione delle colture stesse ad opera di contaminazioni microbiche).

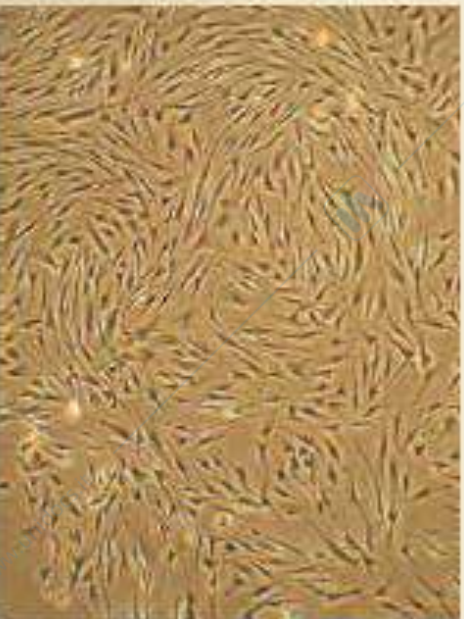
Per l'allestimento di **colture cellulari primarie**, frammenti di tessuto vengono dissociati mediante trattamento con enzimi proteolitici (tripsina, collagenasi, DNAsi) e messi in piastra.

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 .

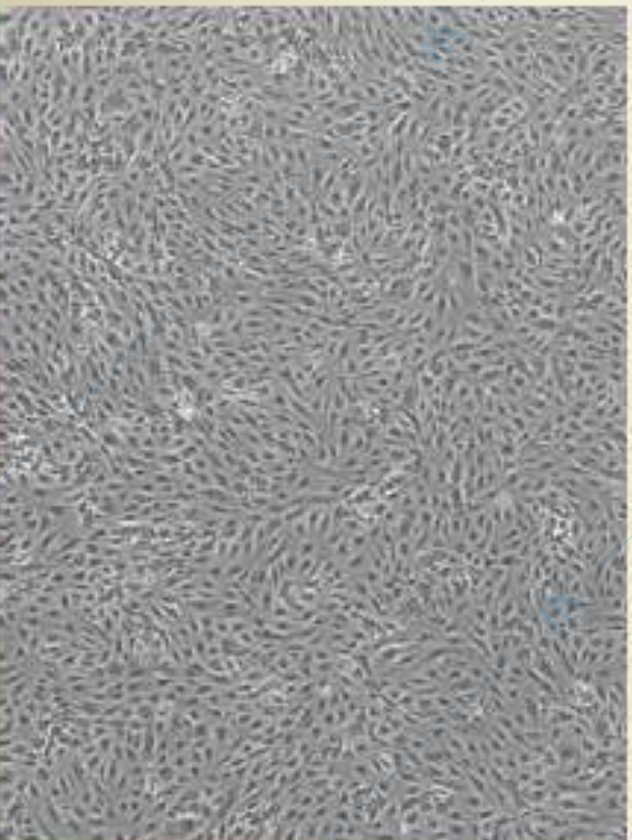
Colture cellulari PRIMARIE

Sono preparate **a partire da un organo animale o umano**. Sono normali cellule diploidi. Le cellule crescono formando uno strato continuo (confluente), dello spessore di una singola cellula (monostrato). Quando si raggiunge la confluenza, le cellule non crescono più (inibizione da contatto), e devono essere passate in altre fiasche (tripsinizzate).

Le colture primarie hanno una **VITA FINITA** (al massimo qualche decina di generazioni), dopo di che la capacità moltiplicativa si arresta e le cellule degenerano (senescenza e apoptosi).



Coltura di fibroblasti



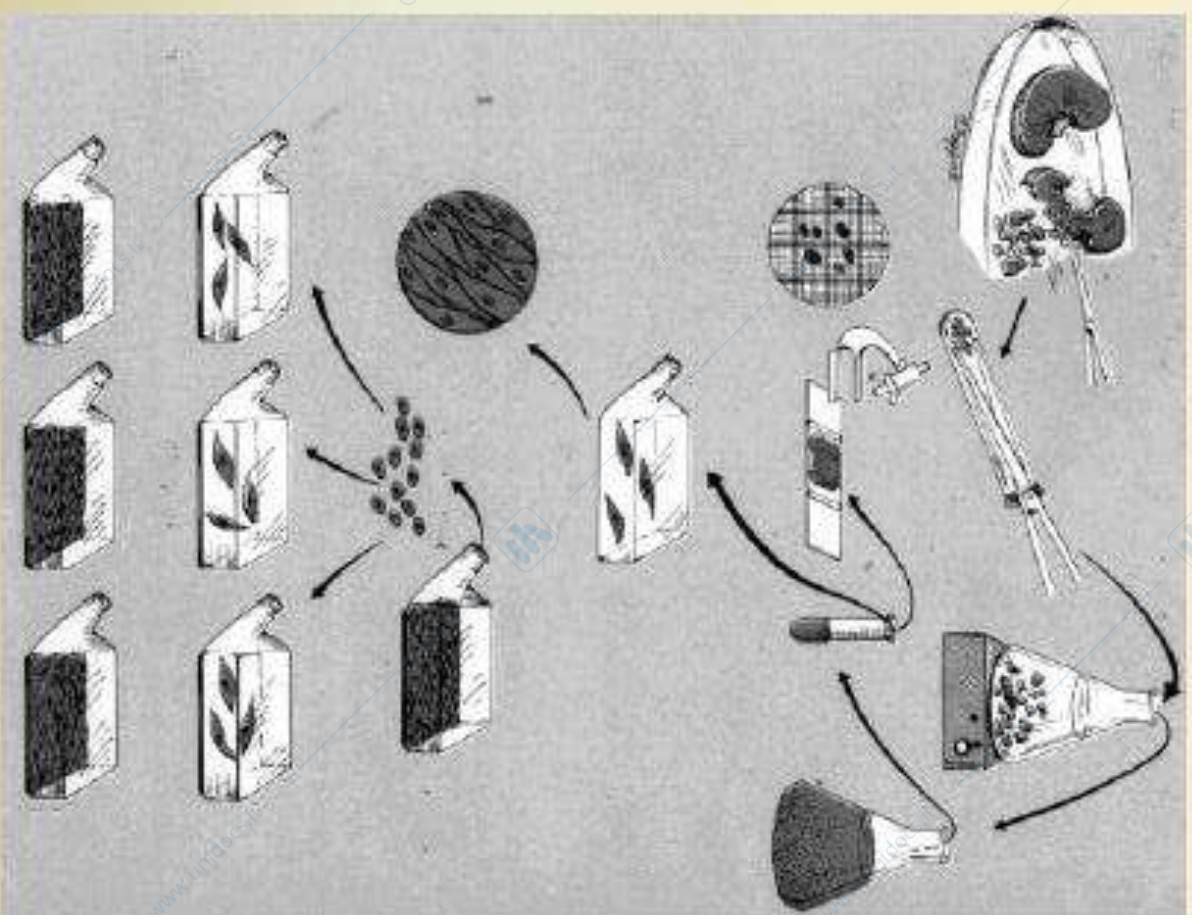
Coltura di cellule endoteliali (HUVEC)

Procedimento per ottenere una coltura primaria di cellule di rene

Il tessuto di origine viene raccolto
asetticamente (1) e suddiviso in piccoli
frammenti (2).

La digestione con enzimi proteolitici
(tripsina) (3) lo riduce ad una sospensione
di singole cellule (4), che vengono
centrifugate per eliminare la tripsina (5)
contate (6), e incubate a 37° C in fiasche di
plastica nel terreno di coltura (7).

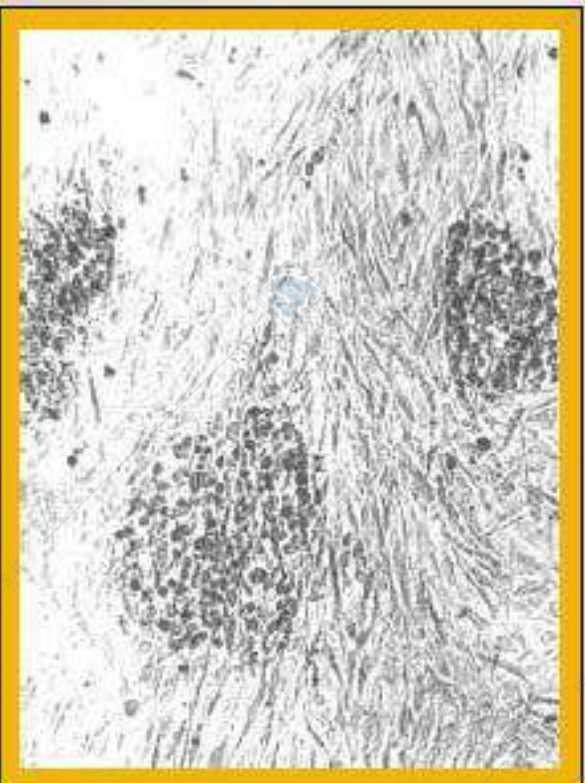
In pochi giorni, le cellule formano uno
strato continuo (8): coltura primaria.
A questo punto la crescita cellulare si
arresta (inibizione da contatto) e le cellule
possono essere usate per coltivare i virus
oppure espanso mediante tripsinizzazione
(9) e diluizione in altre fiasche.
Si formano così nuovi monostati
confluenti, che costituiscono le colture
secondarie (10).



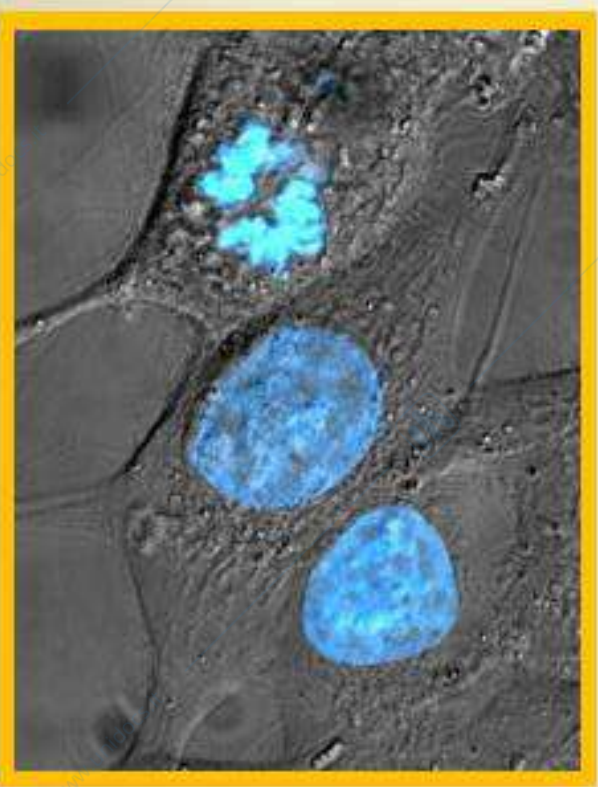
Le linee cellulari continue sono in grado di propagarsi indefinitamente, senza degenerare. Possono **derivare da un tumore o da cellule normali che sono state "trasformate"** (con virus o con sostanze chimiche) così da comportarsi come cellule derivate da un tumore. Spesso sono poliploidi.

Caratteristiche principali:

1. Sono immortalizzate
2. Hanno perso l'inibizione da contatto
3. Hanno cambiato la morfologia



Foci di cellule trasformate da Rous Sarcoma Virus

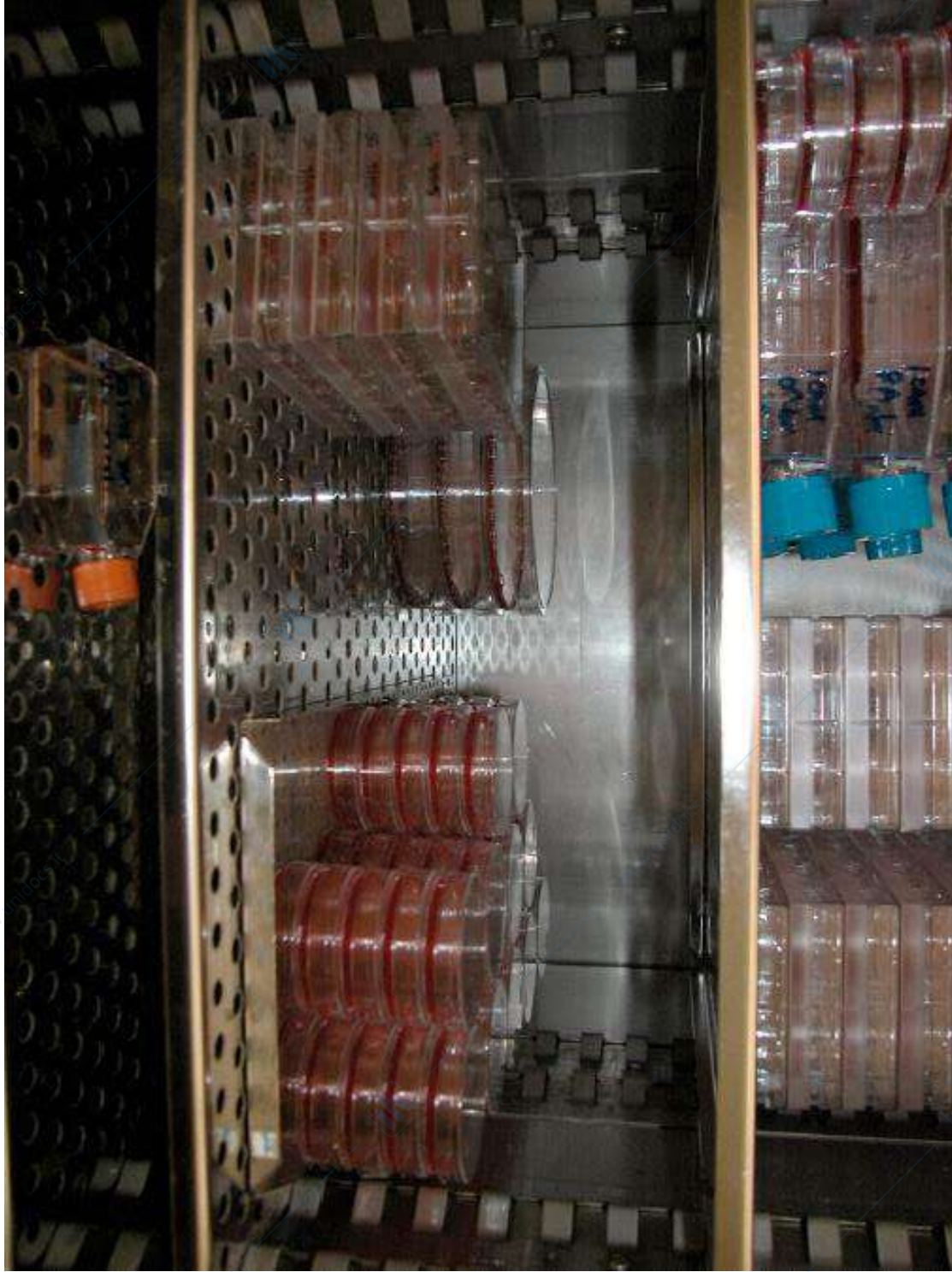


Cellule **HeLa**. Tra le prime linee cellulari umane. Il loro nome deriva da Henrietta Lacks, che morì del tumore cervicale, da cui queste cellule sono originate.

www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.i



www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it

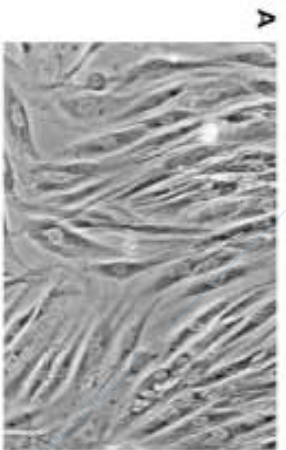
www.unidocs.it

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

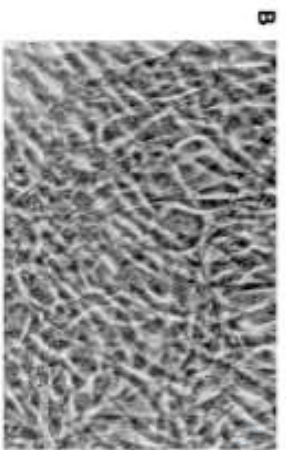
www.unidocs.it

www.unidocs.it

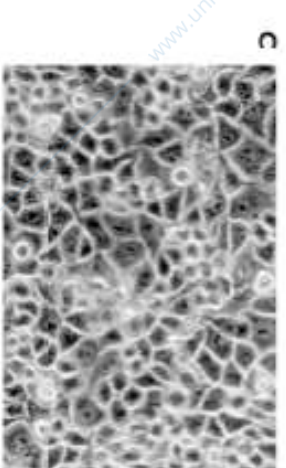
Virus cultivation



primary human
foreskin fibroblasts



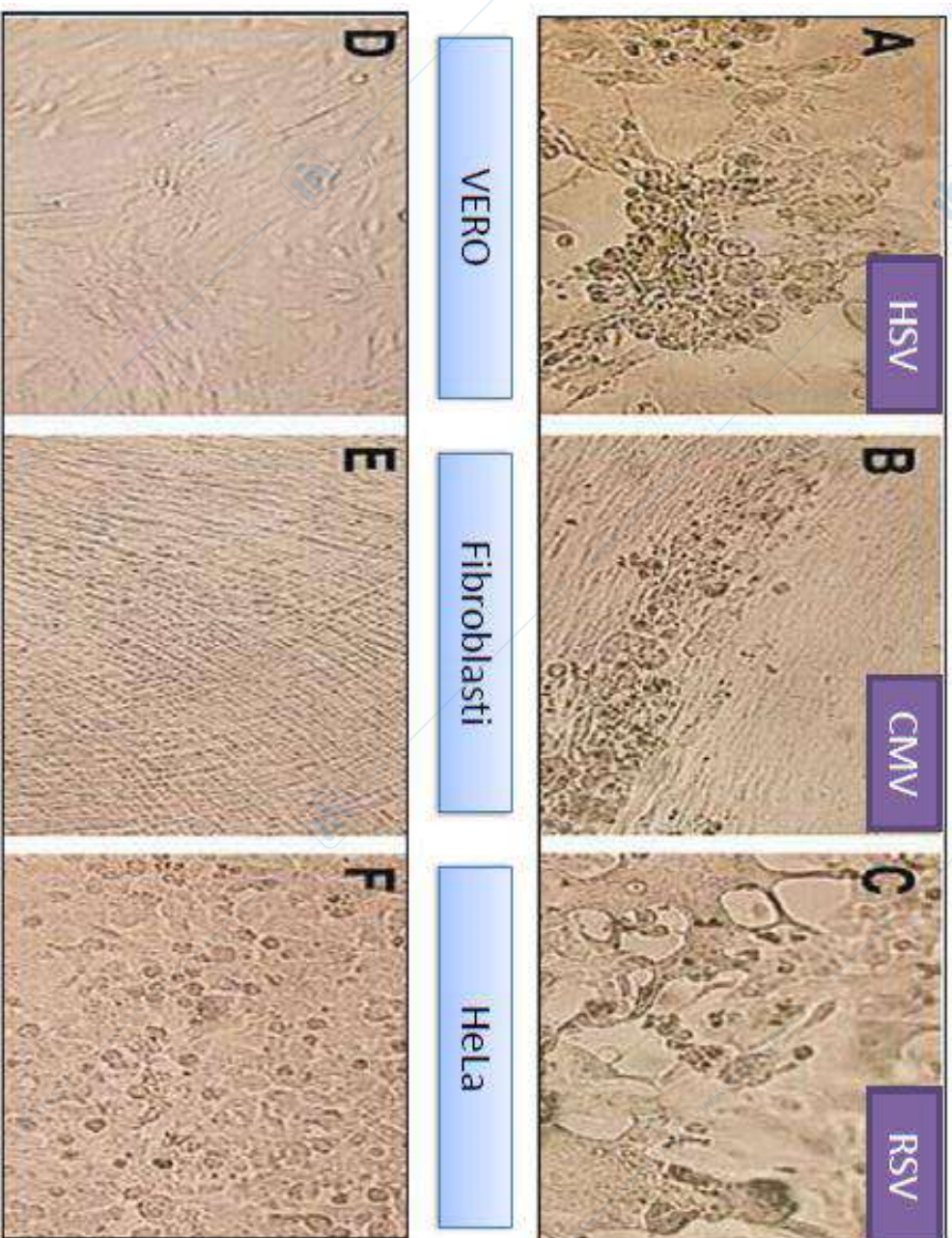
mouse fibroblast
cell line
(3T3)



human epithelial
cell line (HeLa)

continuous cell lines

Effetto citopatico



Cellule infette

Cellule non infette

METODI DI STUDIO...

Basati sulle proprietà infettanti:

- **METODO DELLE PLACCHE**

O sulle proprietà chimico-fisiche dei virioni:

- **ANALISI SIEROLOGICHE**
- **STUDI STRUTTURALI, PURIFICAZIONE, MICROSCOPIA ELETTRONICA, RAGGI X**
- **STUDI BIOCHIMICI, ELETTROFORESI ETC.**
- **ANALISI GENETICHE**
- **BIOLOGIA MOLECOLARE, SEQUENCING, BIOINFORMATICA**

Virus Detection and Quantification: Biological Methods

- *Plaque Assay*
- TCID₅₀
- LD₅₀

Titolazione dei virus – conta delle placche

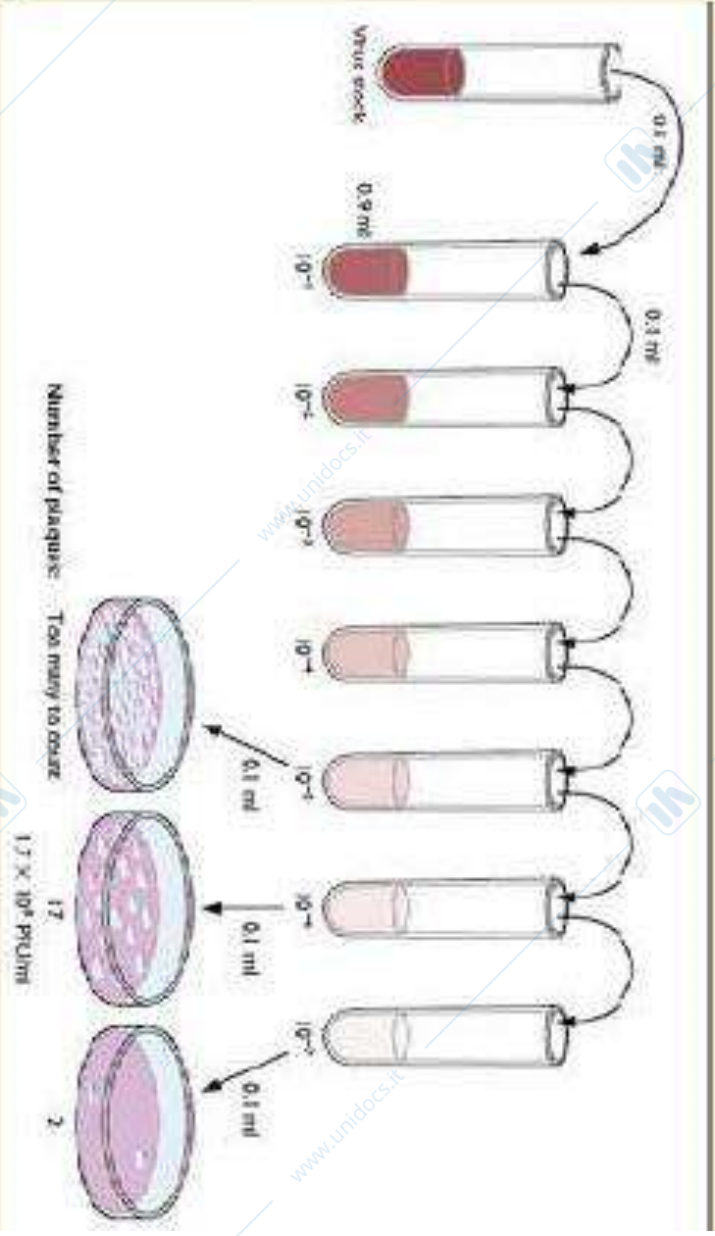
Il virus viene diluito serialmente (di 10 in 10)

Le diluizioni vengono seminate su cellule permissive.

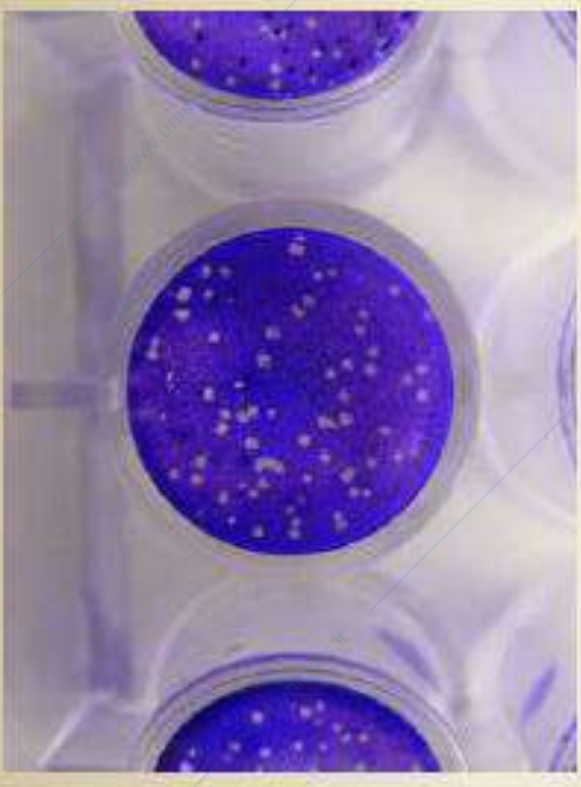
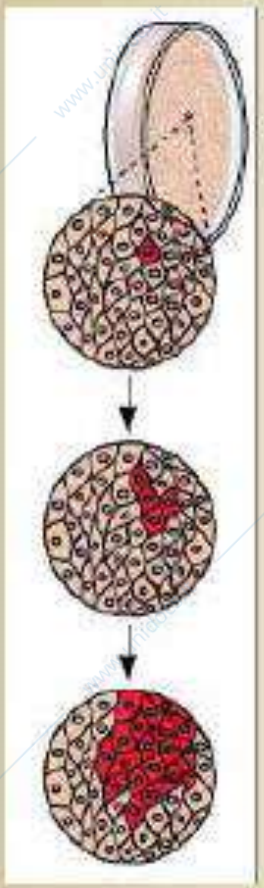
Dopo l'assorbimento, viene aggiunto terreno semi-solido o con Ab, per impedire la diffusione del virus nel terreno.

Il virus può infettare solo le cellule contigue a quella infettata inizialmente.

La diffusione per contiguit  dal virus causa la distruzione localizzata del tappeto cellulare, visibile come una "placca".



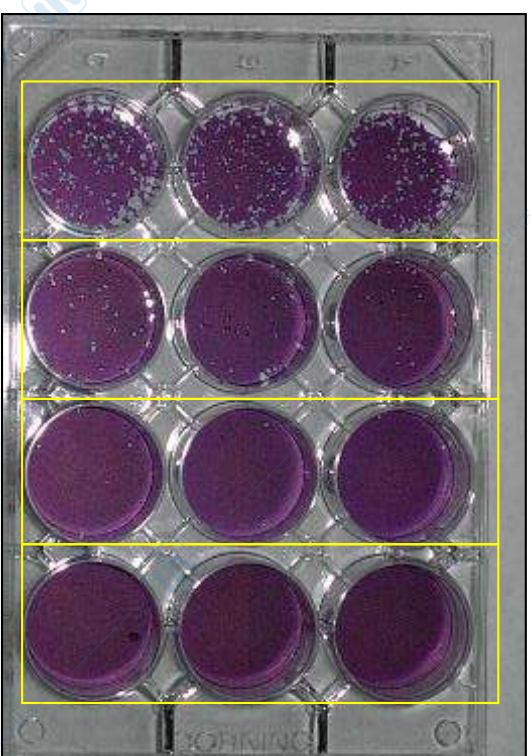
Il titolo viene espresso in PFU (plaque forming unit)



Calculation of PFU/mL

- Plaques are enumerated
- Plaque Counts are averaged over wells
- The average is then divided by the dilution times the volume

$$\frac{(43+40+38)/3}{(10^{-4} \times 0.1)} = 3,730,000 \text{ pfu/ml}$$

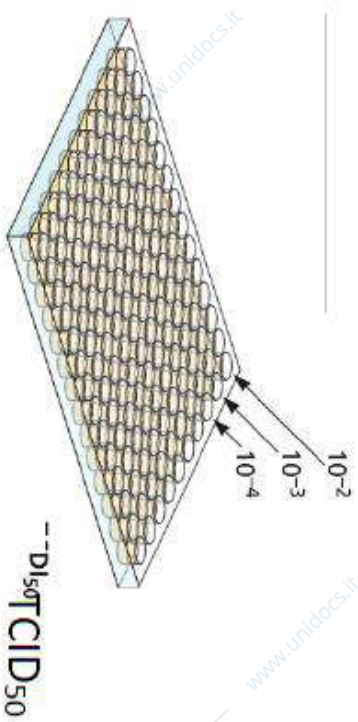


43	4	1
40	3	0
38	6	2
0	0	

Plaques formed per well

Calcolo TCID₅₀

Endpoint dilution assay



Virus dilution	Cytopathic effect									
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
10^{-6}	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

©Principles of Virology, ASM Press.

Reed & Muench Formula

I = Interpolated value of the 50% endpoint (also known as the *proportional distance*) h = dilution factor

$I = \left\{ \left(\% \text{ of wells infected at dilution above } 50\% - 50\% \right) \cdot \frac{1}{\left(\% \text{ of wells infected at dilution above } 50\% - \% \text{ of wells infected at dilution below} \right)} \right\} / h$

Example

Dilution	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Positives	24	22	7	1	0
Wells inoculated	24	24	24	24	24
%Infected	100	92	29	4	0

$$I = (92 - 50) / (92 - 29) = 42 / 63 = 0.66$$

$$50\% \text{ endpoint titre} = 10^{-3 - (0.66 \times 1)} = 10^{-3.66}$$

$$TCID_{50} = 10^{3.66} / \text{ml}$$

Titolazione dei virus - emoaagglutinazione

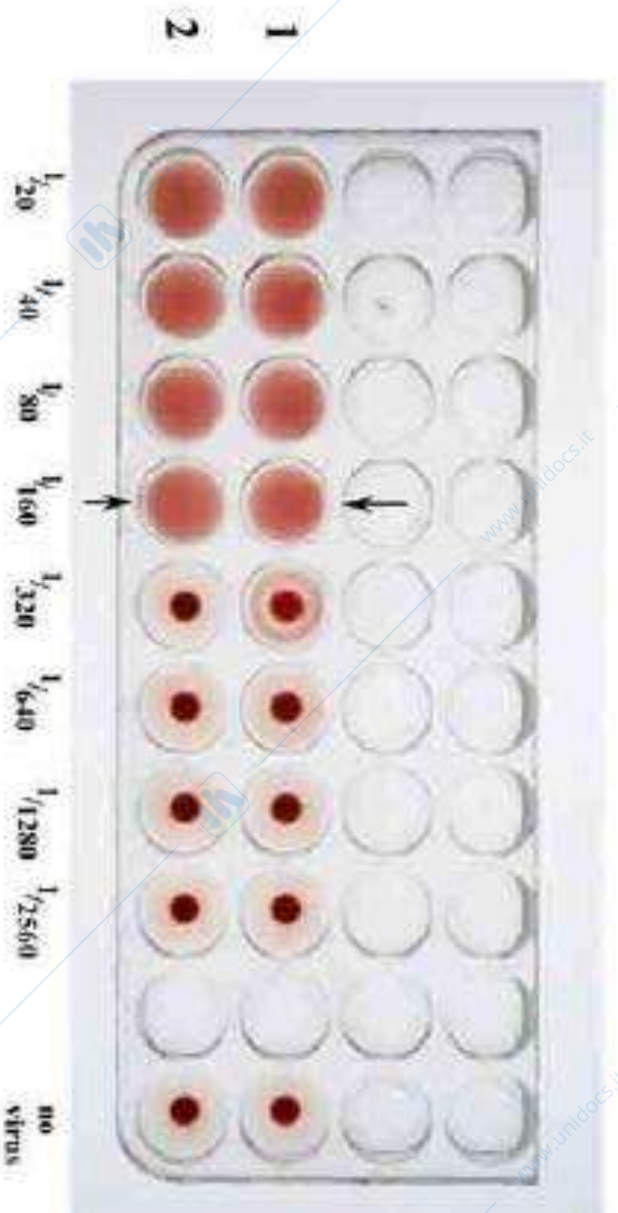
L'emoagglutinazione

sfrutta il fatto che molti virus hanno sulla

superficie una **proteina che si lega ai globuli rossi**.

Normalmente, i globuli rossi si depositano al fondo della provetta, formando un cerchio molto netto. Se è presente il virus, ogni particella virale si può legare a più cellule, formando una specie di rete, che si deposita sul fondo di tutta la provetta. Si fanno diluizioni del virus, ed il titolo è l'ultima diluizione in grado di agglutinare

Haemagglutination assay (HA assay)



1 and 2 are duplicates

The arrows show the last well in which haemagglutination was seen.

This well contains 1 HAU (U=unit).

As 0.2ml of influenza stock was assayed,

the HA titre of the stock is $160 \times 5 = 800$ HAU/ml

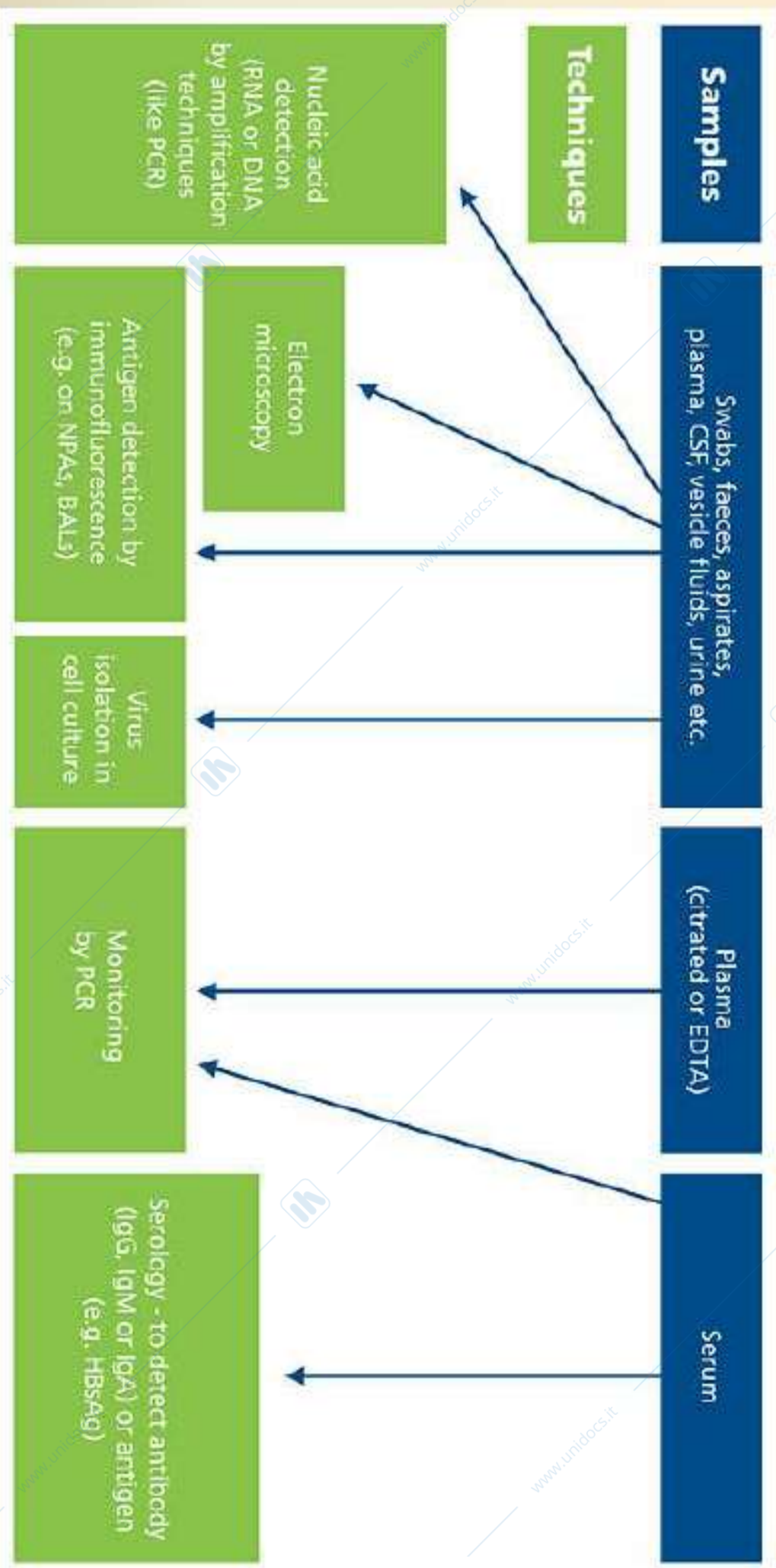
Diagnosi microbiologica

diagnosi DIRETTA
ricerca diretta del
microorganismo responsabile
della malattia o di parti di
questo

diagnosi INDIRETTA
ricerca degli *anticorpi*
specifici che si sviluppano in
seguito all'infezione da parte
del microorganismo

T. DIRETTE

T. INDIRETTE



NB – Materiale “giusto” al momento “giusto”.

Isolamento del virus in colture cellulari

Campione giusto al momento giusto. Trasporto immediato.

Il materiale clinico deve essere raccolto nei SITI di replicazione/eliminazione, in fase ACUTA INIZIALE, considerando che il picco della replicazione virale solitamente precede di 2-3 giorni la sintomatologia.

Il campione, centrifugato per eliminare cellule e batteri, viene diluito, risospeso in terreno di coltura (con aggiunta di antibiotici e antimicotici), e inoculato su opportune colture cellulari.

La presenza del virus è rivelata dal CPE, che compare, a seconda del tipo e della quantità di virus, fra 1 giorno e 2-3 settimane.

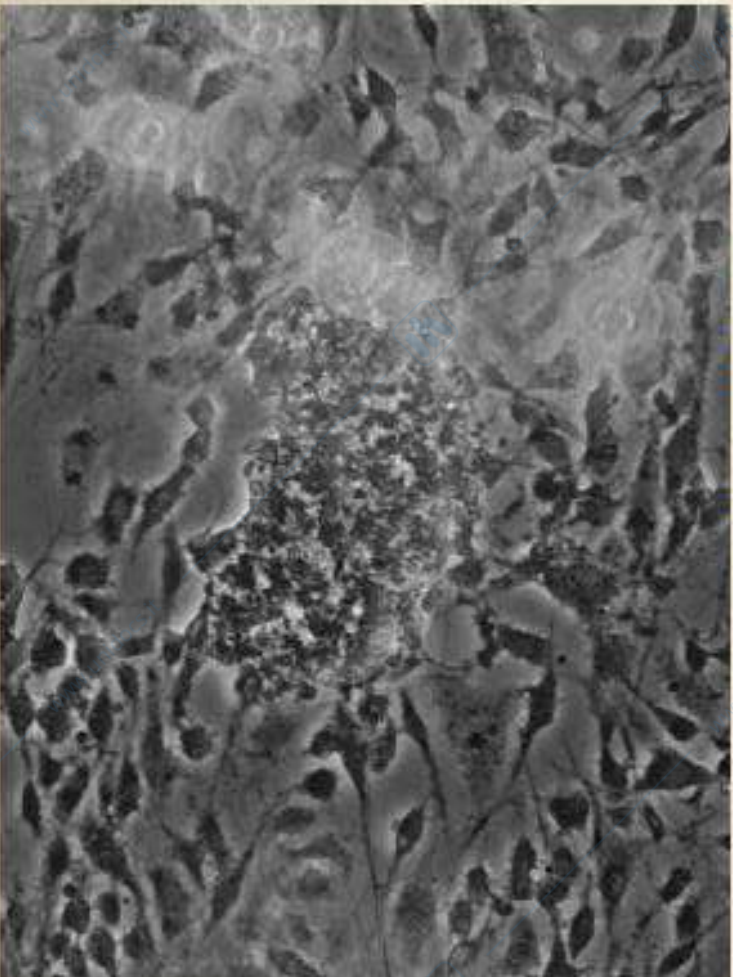
Tabella 11.2 Materiali biologici da saggiare per eseguire l'isolamento dei principali virus¹

Virus	Campioni da prelevare
Adenovirus	Secrezioni respiratorie*, leucociti, urina, tamponi congiuntivali
Citomegalovirus ⁴	Urina, saliva, secrezioni respiratorie*, leucociti
Enterovirus, poliovirus, echovirus, Coxsackievirus A2, ⁴ A ⁴ e B, virus dell'epatite A ⁴	Feci o tamponi rettali, tamponi faringei, liquor ³
Virus di Epstein-Bar ⁴	Linfociti, saliva
Herpes simplex	Liquido delle vescicole, tamponi congiuntivali
HIV ⁴	Plasma, linfociti
Influenza (A e B)	Secrezioni respiratorie*
Morbillo	Secrezioni respiratorie*, saliva, lavaggi congiuntivali, urina (cellule), linfociti
Parainfluenza	Secrezioni respiratorie*
Parotite	Liquor, saliva, urina
Parvovirus	Sangue ⁴
Respiratorio sinciziale	Secrezioni respiratorie*
Rinovirus	Secrezioni respiratorie*
Rosolia	Secrezioni respiratorie*, urina, tamponi congiuntivali
Rotavirus ⁴	Feci o tamponi rettali
Vaccella-zoster	Liquido delle vescicole o materiale di scarificazione

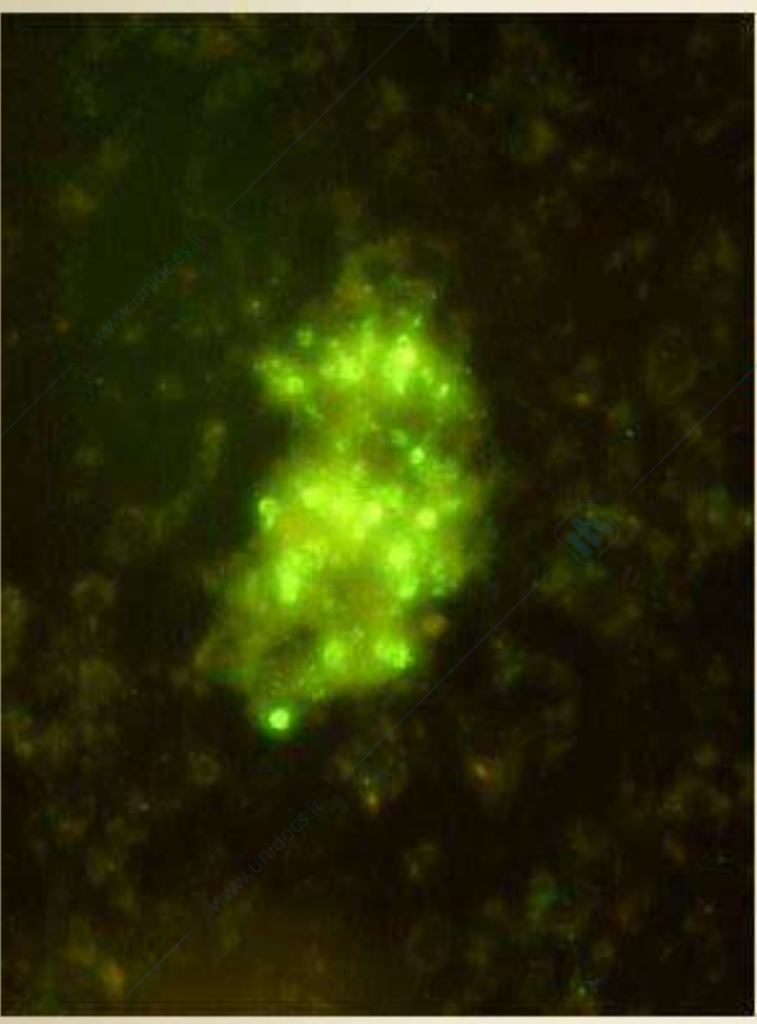
Esempi di utilizzo di colture cellulari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

Identificazione virus: ricerca Ag virali (IFA)



Cellule tiroidee umane (linea)
infettate con HHV-6



Cellule tiroidee umane (linea)
infettate con HHV-6 (IFA)

Svantaggi delle colture cellulari

- **Fino a 4 settimane per avere il risultato**
- **Spesso bassa sensibilità, dipendente anche dalle condizioni del campione**
- **Rischio di contaminazione batterica**
- **Sensibilità a sostanze tossiche presenti nel campione**
- **Molti virus non crescono in coltura: es. HBV, HPV, parvovirus, ecc.**
- **Necessità di linee cellulari diverse per diversi virus e difficoltà nell'approvvigionamento di cellule primarie**

**Poco usate per la diagnosi di routine.
Molto usate per l'ISOLAMENTO virale e la
RICERCA**

Diagnostica molecolare infezioni virali

Analisi qualitativa e quantitativa degli acidi nucleici virali:

viremia per HIV, HBV, HCV

Metodiche: PCR, RT-PCR, NASBA

Analisi genotipica delle resistenza ai farmaci in particolare per HIV, HBV, HCV

Metodiche: sequenziamento DNA, interpretazione algoritmica

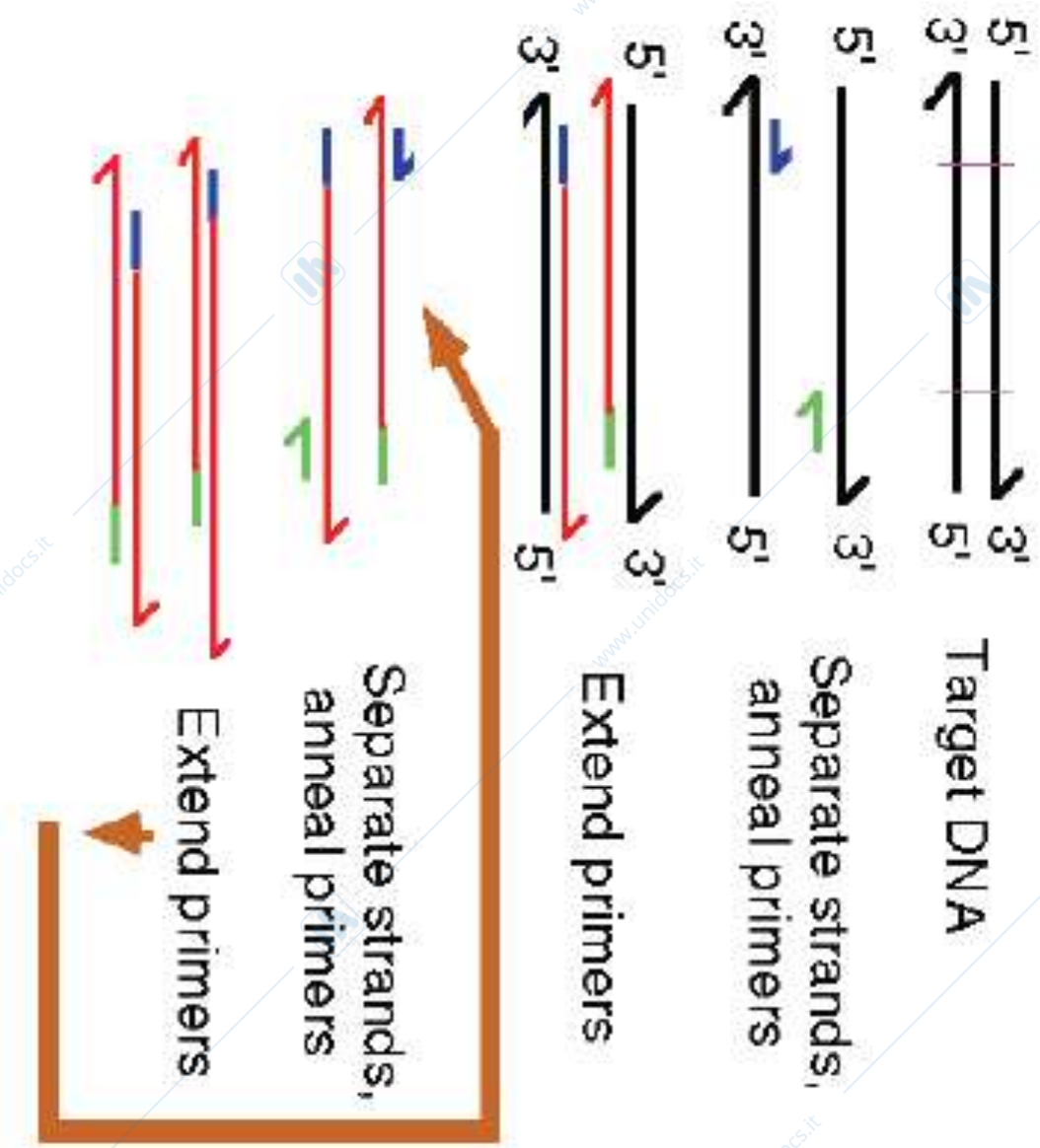


Terapia antivirale genotipo guidata

Saggi di amplificazione degli acidi nucleici

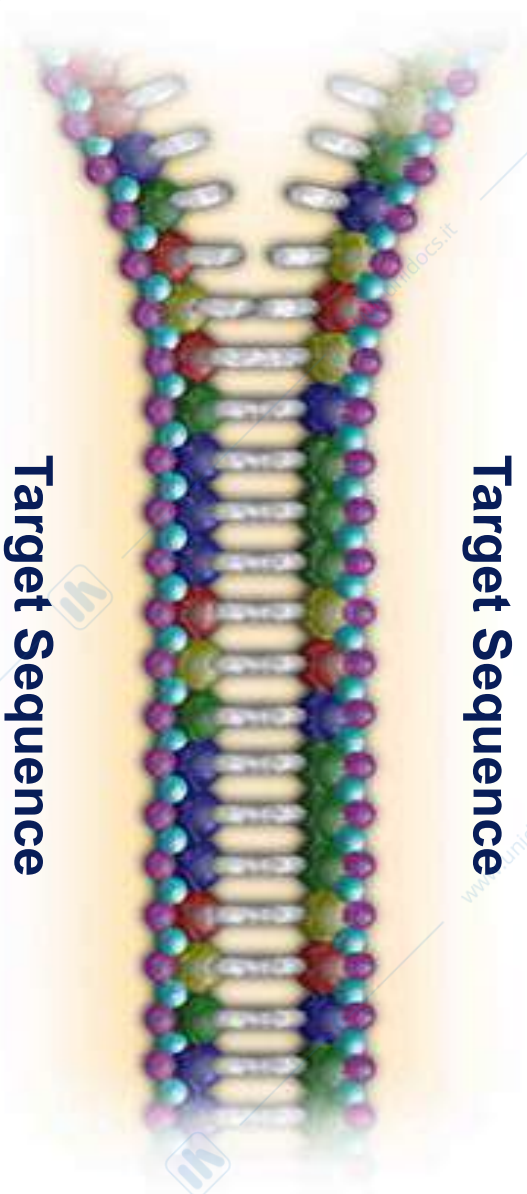
- Reazione di amplificazione a catena (PCR) permette di amplificare (DNA-polimerasi) un determinato frammento di acido nucleico.
- Cicli ripetuti di denaturazione, ibridazione e polimerizzazione fanno sì che la sequenza virale, se presente, venga amplificata in maniera esponenziale.
- Trattando il materiale estratto con trascrittasi inversa per trascrivere l'RNA in DNA, la PCR può essere usata anche con virus a RNA (RT-PCR).

Schematic of PCR



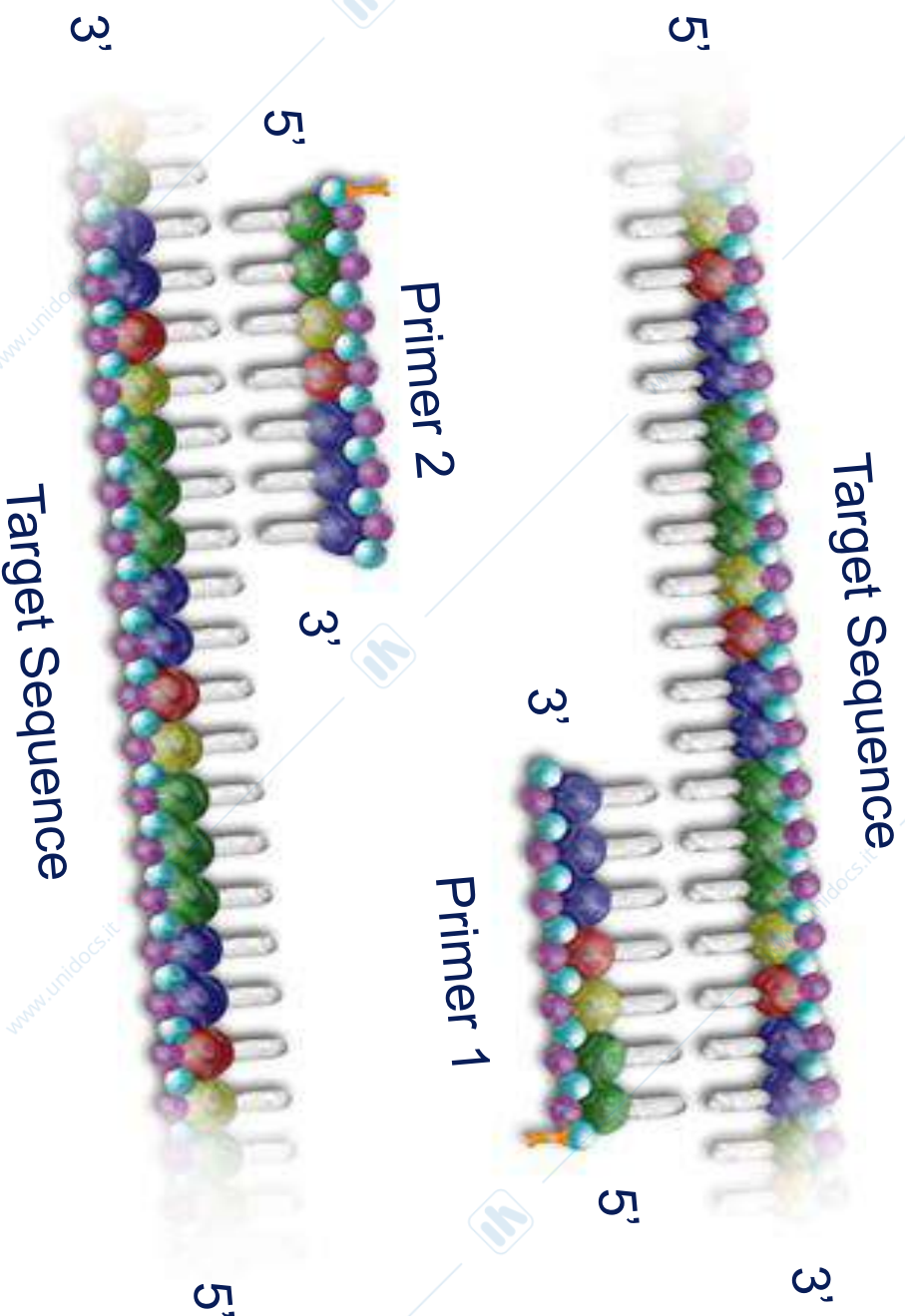
PCR Cycle - Step 1 - Denaturation Template DNA by

Heat (95°C)



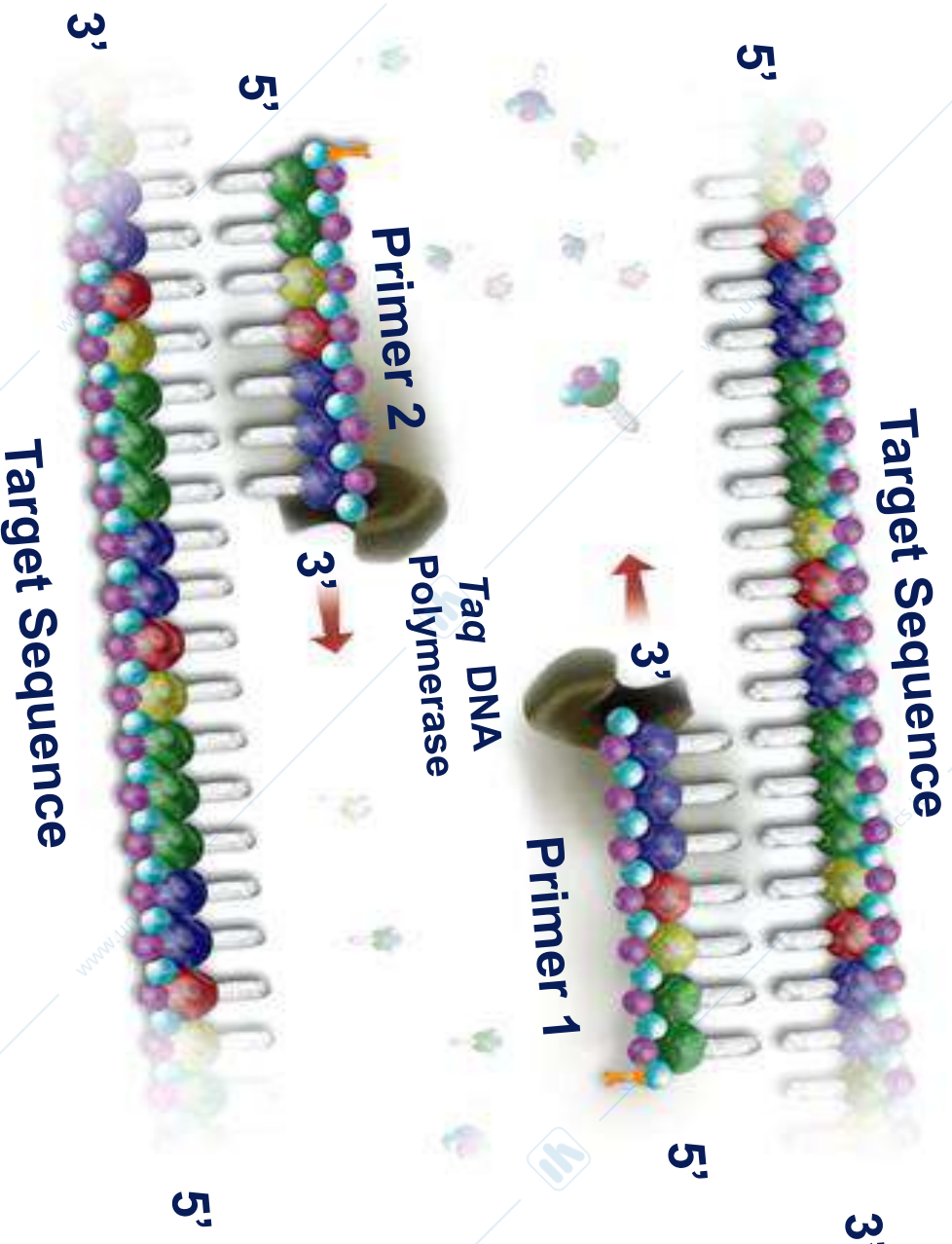
PCR Cycle - Step 2 -

Temperature is lowered (T_m) and primers anneal to target sequences



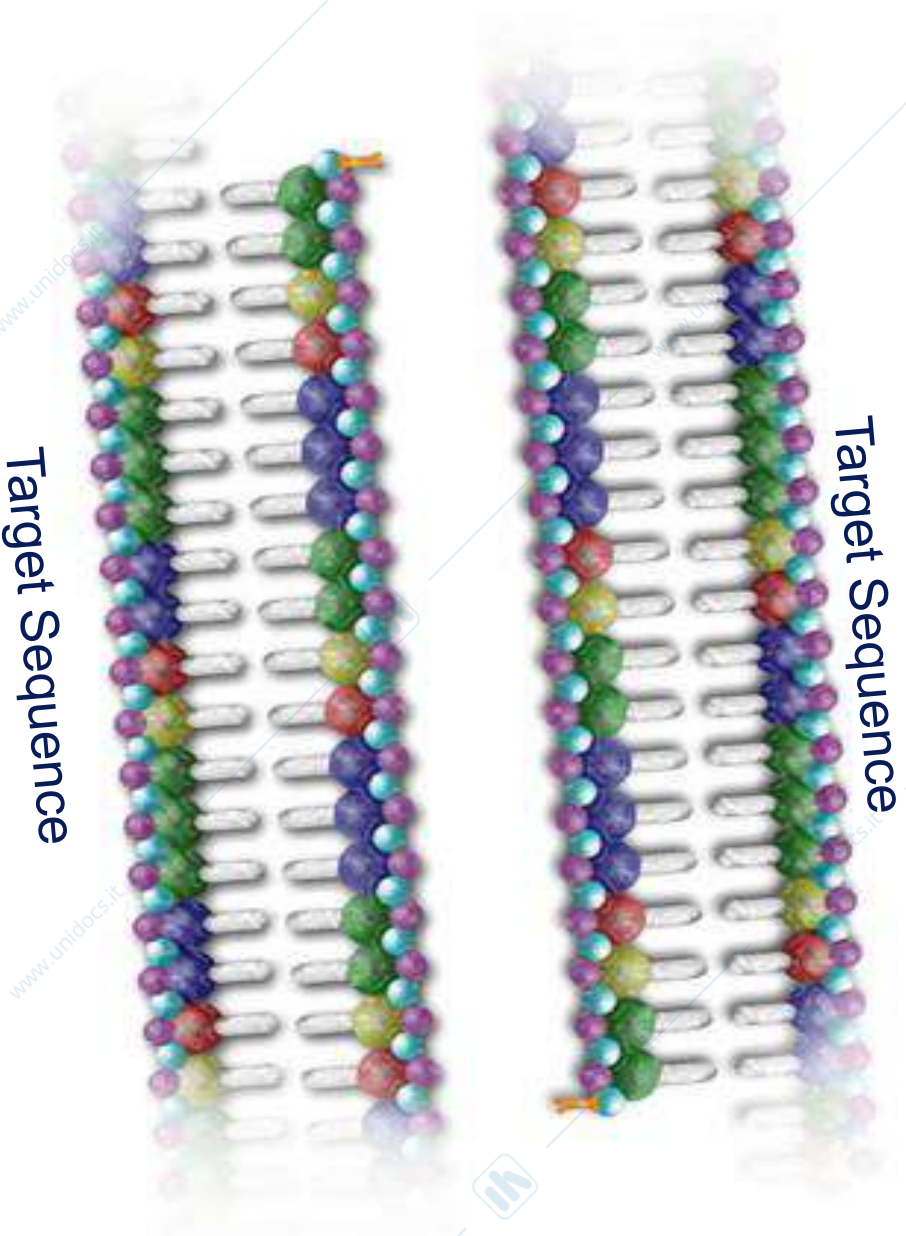
PCR Cycle - Step 3 -

At 72 °C *Taq* DNA polymerase catalyses primer extension as complementary nucleotides are incorporated

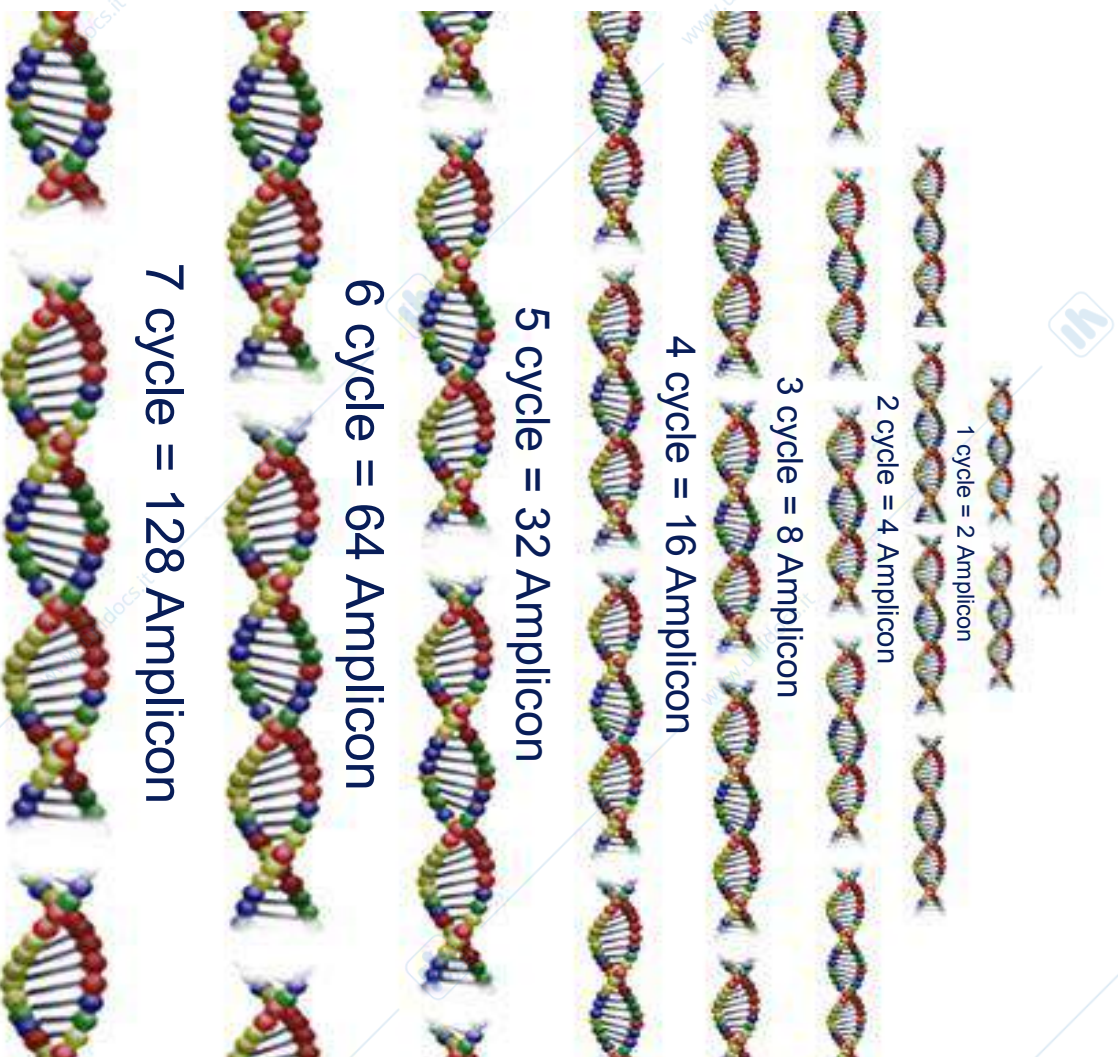


End of the 1st PCR Cycle –

Results in two copies of target sequence



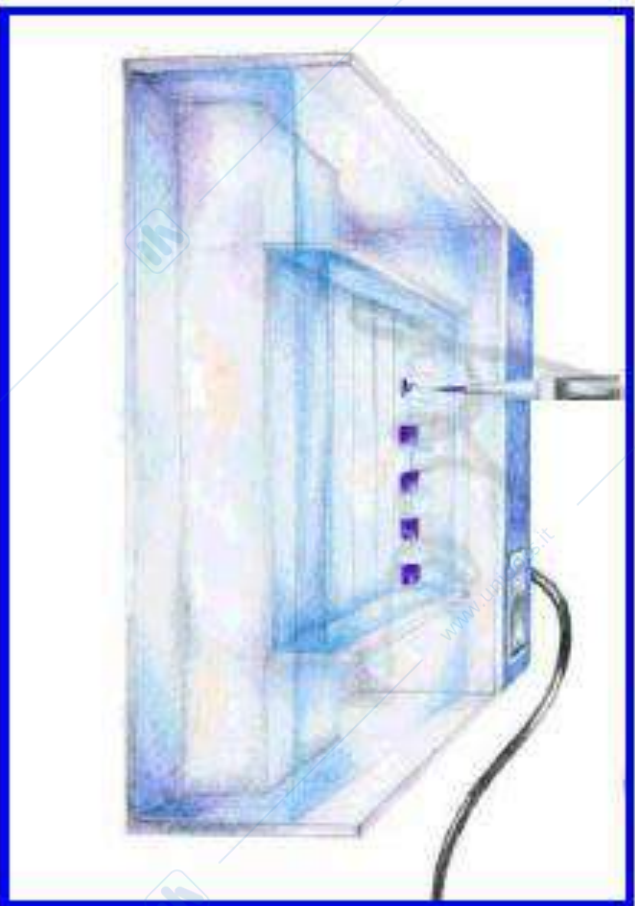
Target Amplification



No. of Cycles	No. Amplicon
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

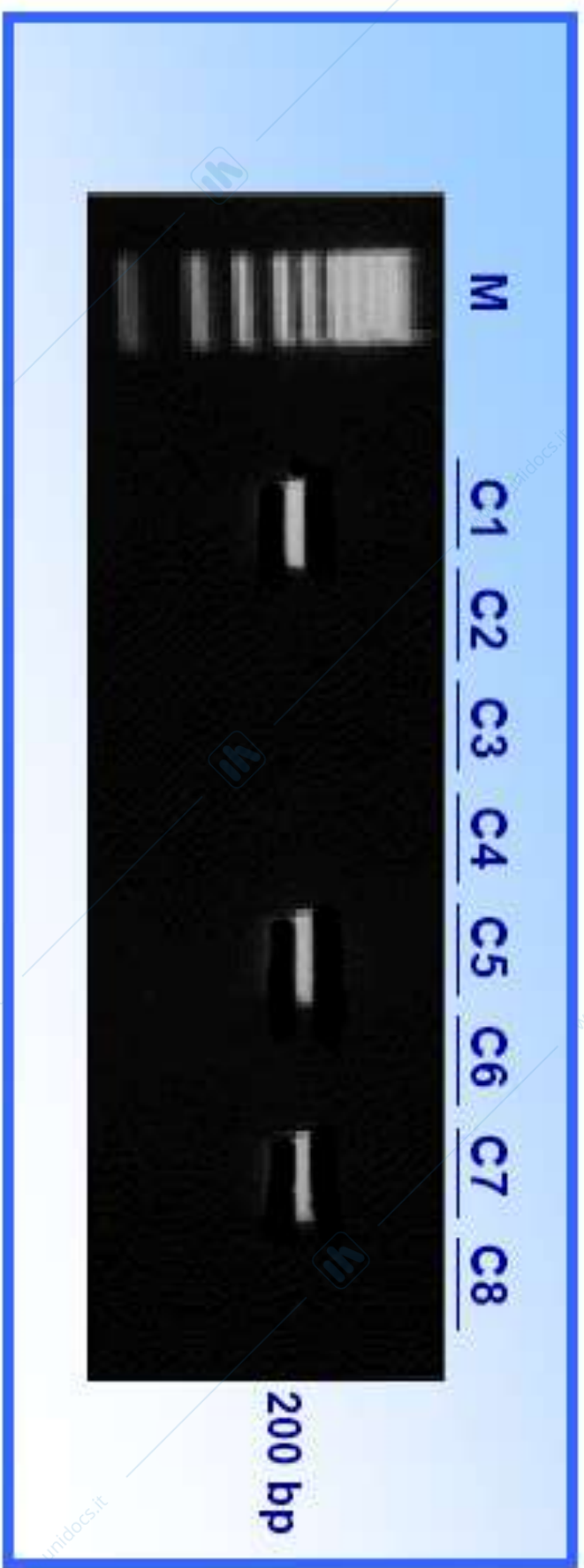


PCR: Analisi del prodotto di amplificazione



- 1) Gel di agarosio al 2%.
- 2) Elettroforesi: 100~150 volt.
- 3) Analizzare su un transilluminatore UV la banda del prodotto di amplificazione

PCR: Analisi del prodotto di amplificazione



Variations of PCR in the Diagnostic Lab

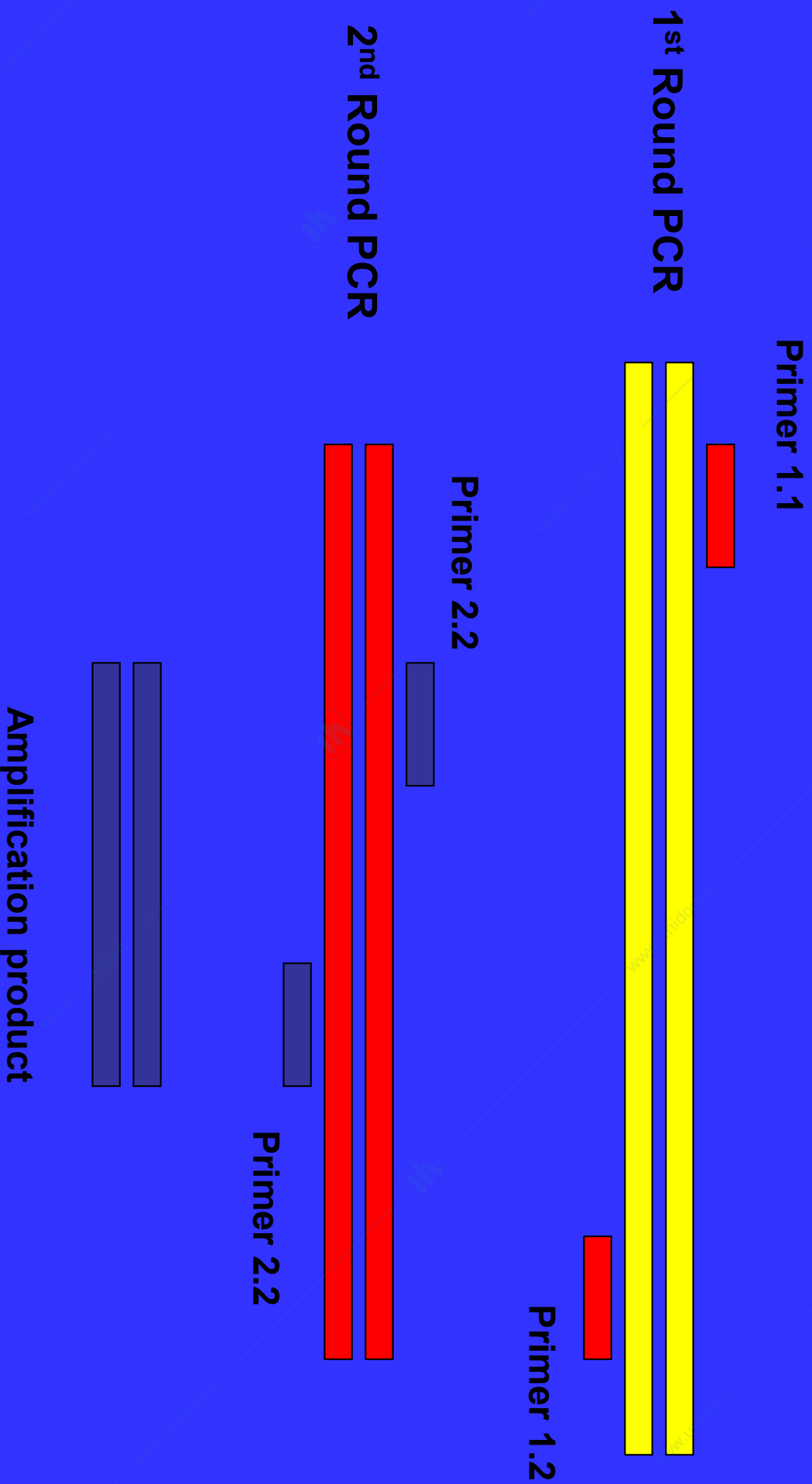
The most common variations of standard PCR used in the diagnostic laboratory are:

- Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)
- Nested PCR (n-PCR)
- Multiplex PCR (m-PCR)
- Real-time PCR

Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

- PCR amplifies DNA targets
- Many viruses contain a RNA genome
- Amplification requires RT-PCR

NESTED PCR



NESTED PCR

The advantages of n-PCR are:

- Its increased specificity (specific binding of 2nd primer pair).
- Increased sensitivity (2nd round of PCR amplification)

n-PCR is used to detect organisms present in low copy numbers

- Viruses in CSF (herpes simplex, JCV)
- Eye samples (adenovirus, herpes simplex)

PCR: Limiti

PCR



- Falsi positivi

- Analisi qualitativa

Nuove prospettive

PCR real-time



- Analisi quantitativa

Una PCR quantitativa permette di determinare in un campione la quantità di DNA presente per unità di volume.

PCR real-time: Vantaggi

- **Semplicità di automazione**
- **Flessibilità**
- **Rapidità di esecuzione**
- **Elevate sensibilità e specificità**
- **Elevata riproducibilità**

real-time real-time real-time hardware



- Intuitive programming
- Fast and accurate performance
- Flexibility for multiple users
- Small footprint

The optical module fits on the iCycler base unit, offering you Real Time Quantitative PCR capability.

iCycler BioRad



LightCycler Roche



5700 Applied Biosystems



7700 Applied Biosystems



FluorTracker Stratagene



FluorImager Molecular Dynamics

Polymerization

Forward Primer



Probe

R = Reporter
Q = Quencher

Strand displacement



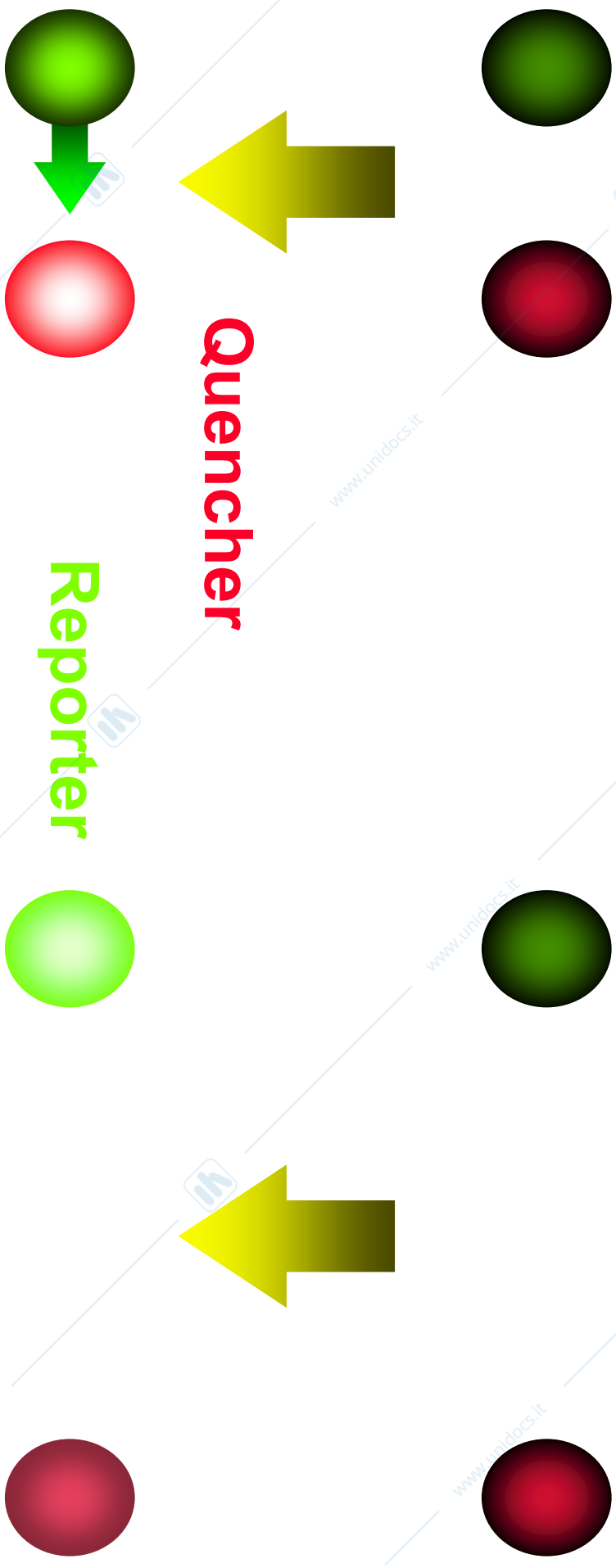
Cleavage



Polymerization completed

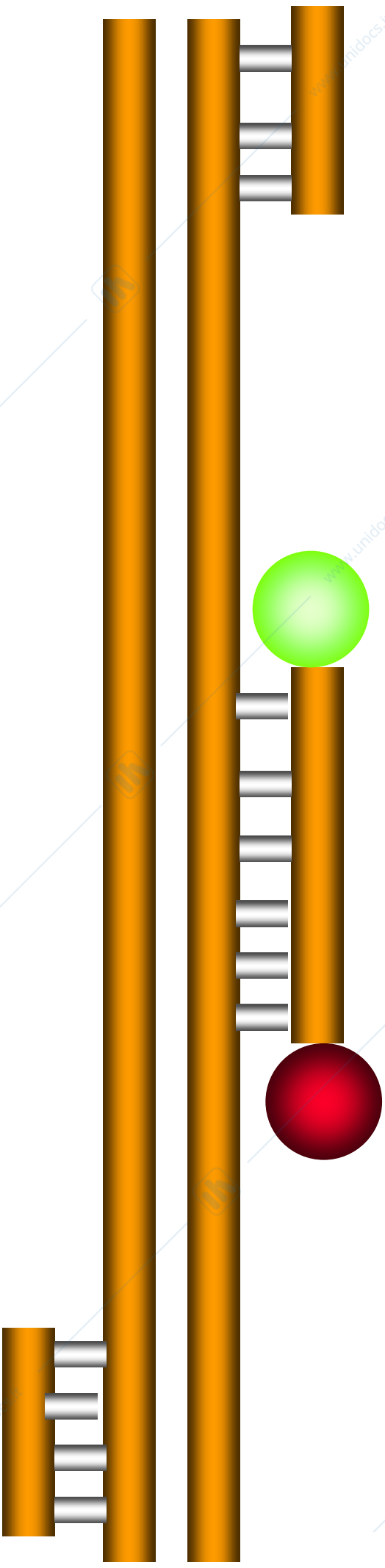
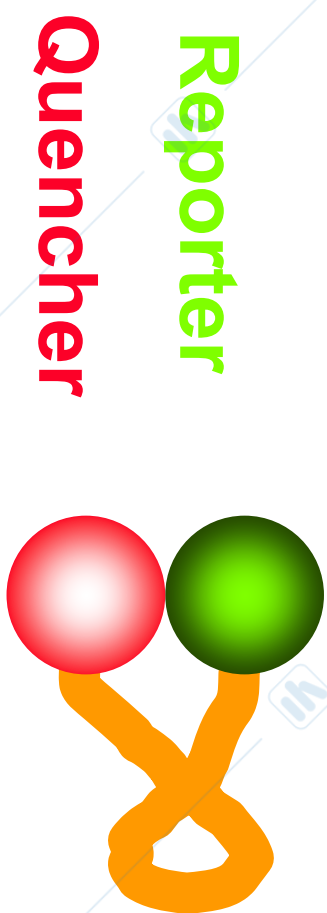


TaqMan Usano il FRET

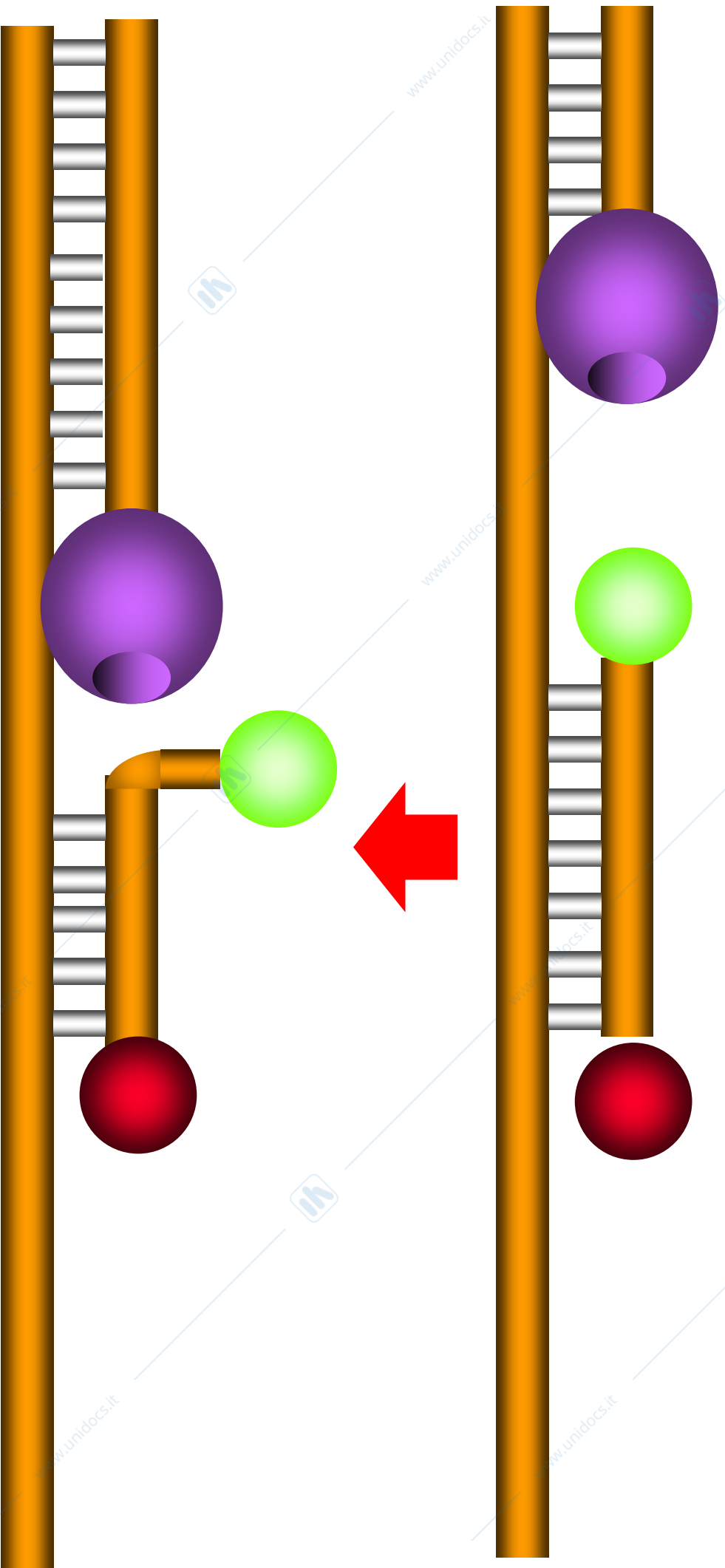


Fluorescent Resonant Energy Transfer

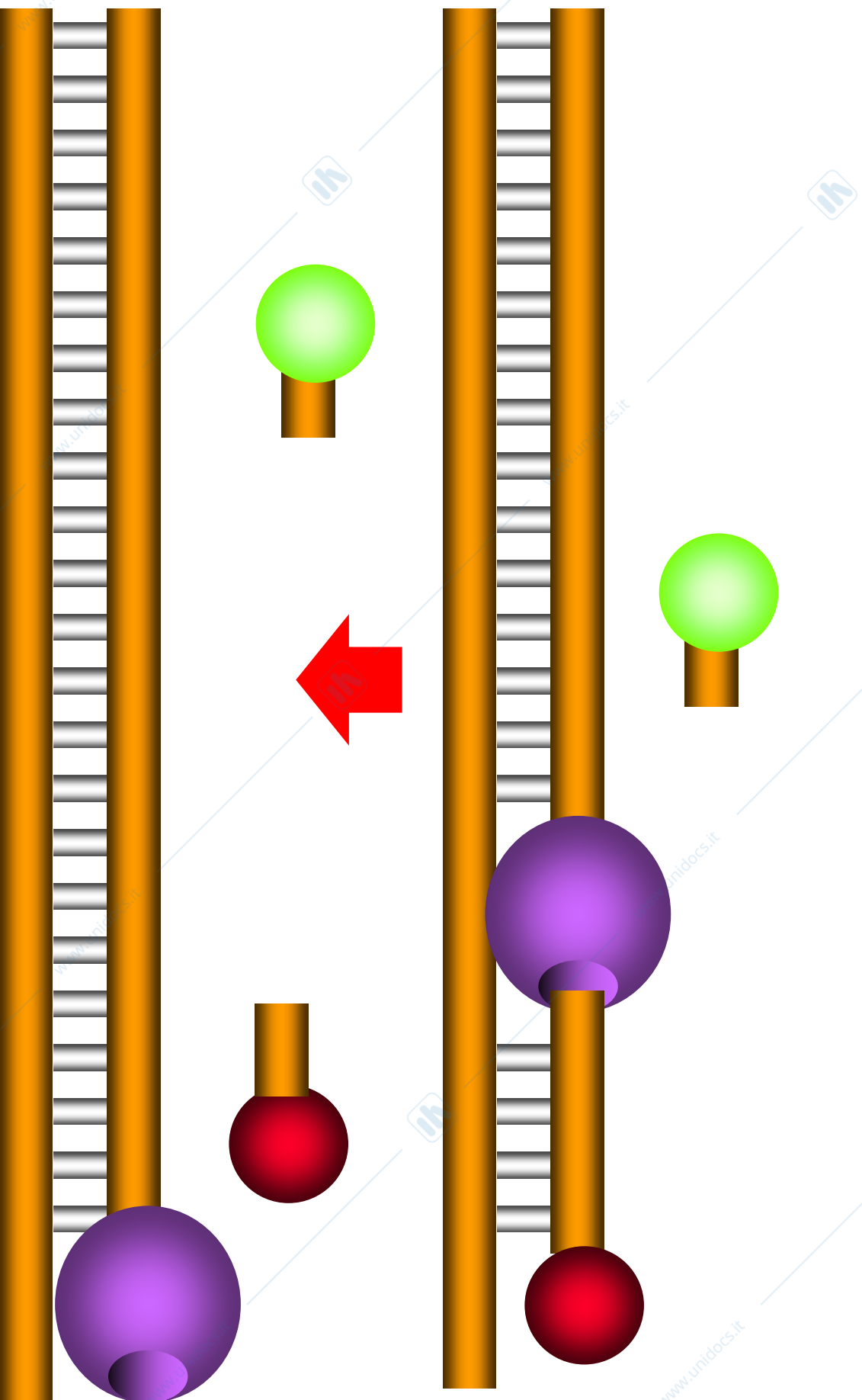
Sonde TaqMan



La Taq Polimerasi estende il primer a partire dal 3'

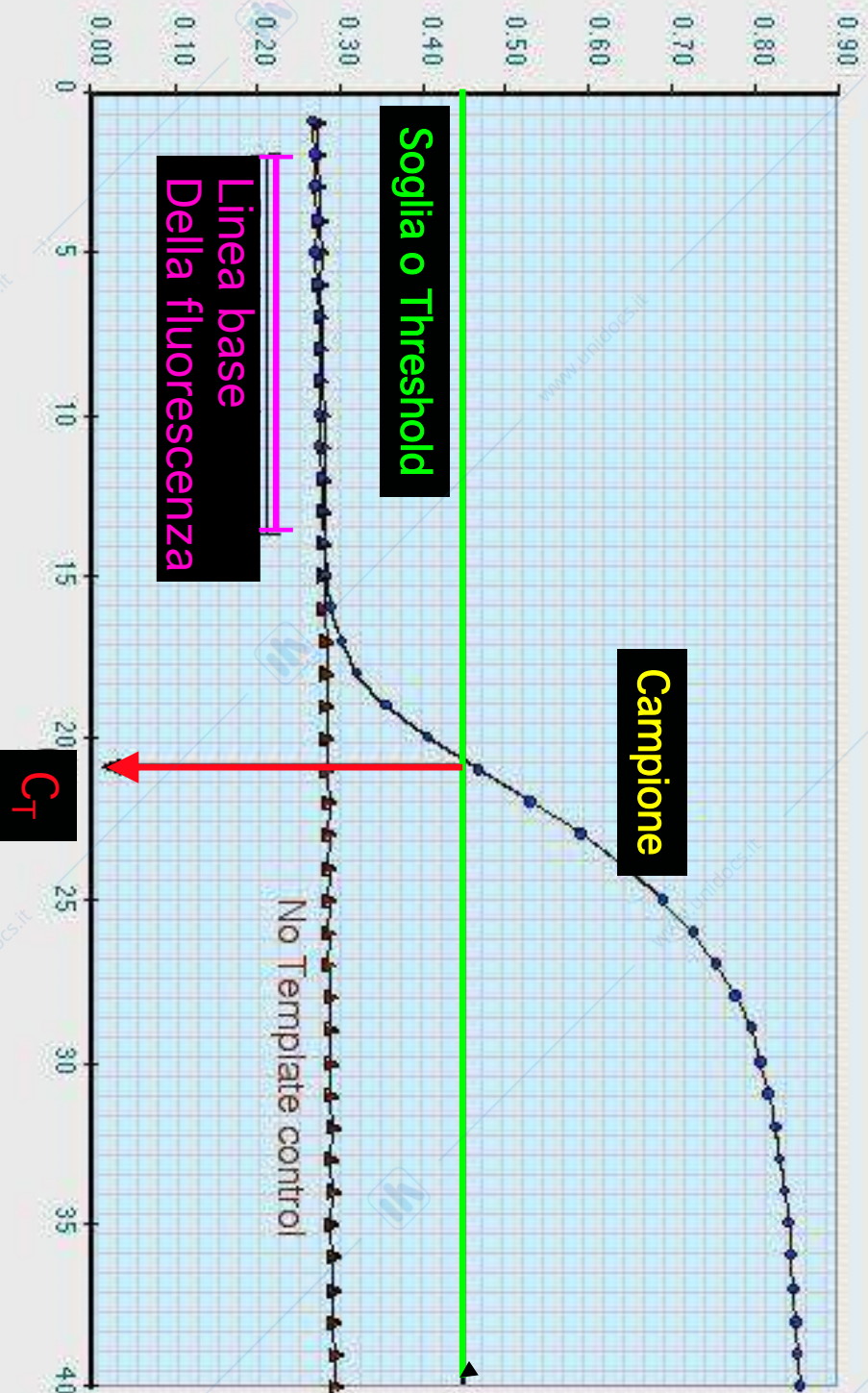


L'ATTIVITA' S'ESONUCLEASICA DIGERISCE LA SONDA



Nella curva di amplificazione si distinguono 3 parametri

Fluorescenza normalizzata del reporter (R_n)



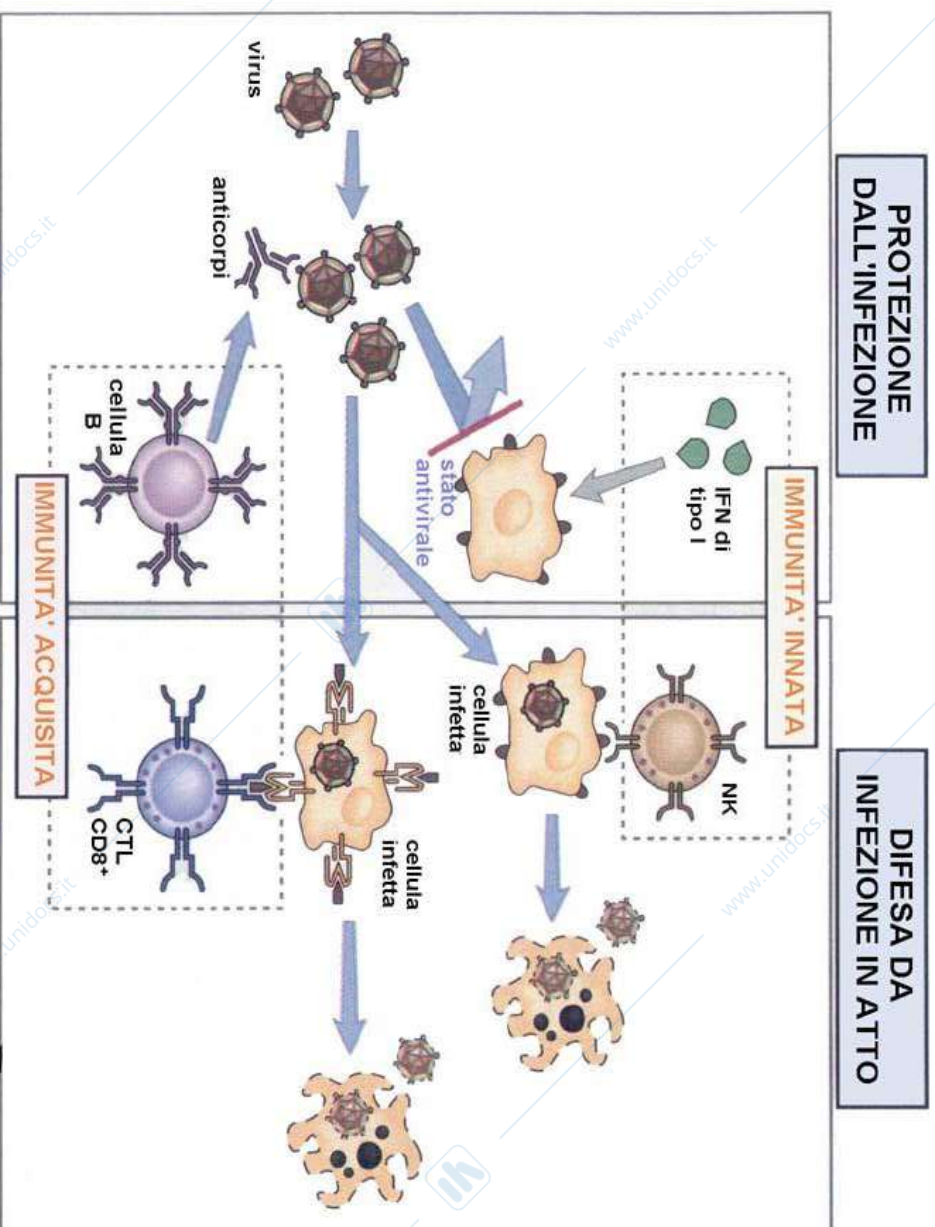
Numeri di cicli di PCR

5. SEQUENZIAMMENTO

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.

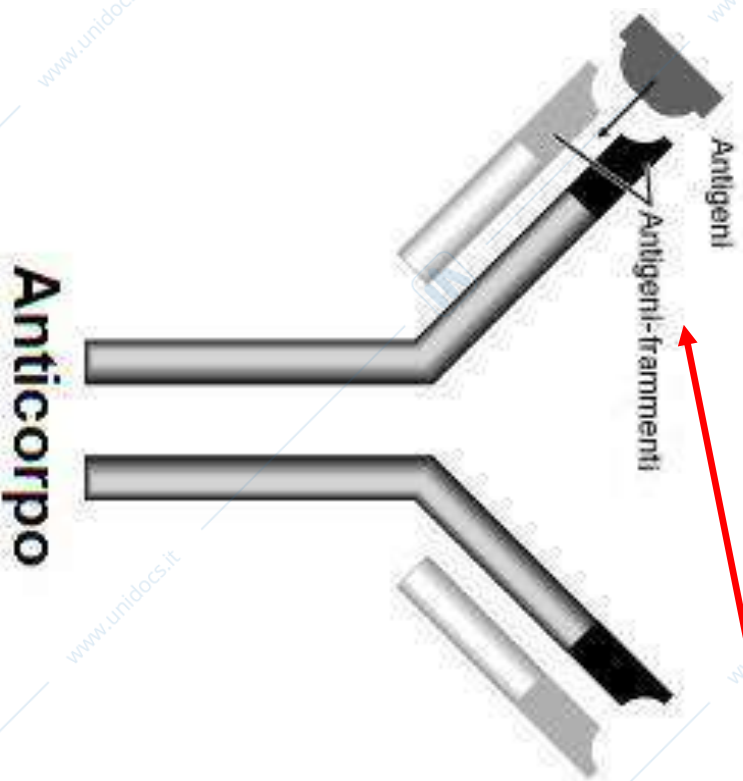
La sua principale applicazione nella diagnostica virale è il rilevamento del sottotipo virale (HBV, HCV, HPV, HIV) e della resistenza ai farmaci anti-HIV e anti-HBV da campioni di plasma da pazienti trattati in fallimento terapeutico.

LA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA ED ADATTATIVA AI VIRUS



Che cosa sono?

Le reazioni sierologiche



- Sono le reazioni antigene-anticorpo che avvengono in vitro.

Quando si eseguono?

Si eseguono quando:

- Si vuole ricercare la presenza di anticorpi nel siero di un paziente per diagnosticare una malattia infettiva;

Siero paziente (siero immune) + antigene corrispondente

- si vuole identificare un microrganismo in base agli antigeni che possiede.

Sospensione microbica (antigeni) + antisiero (anticorpi)

Sierologia

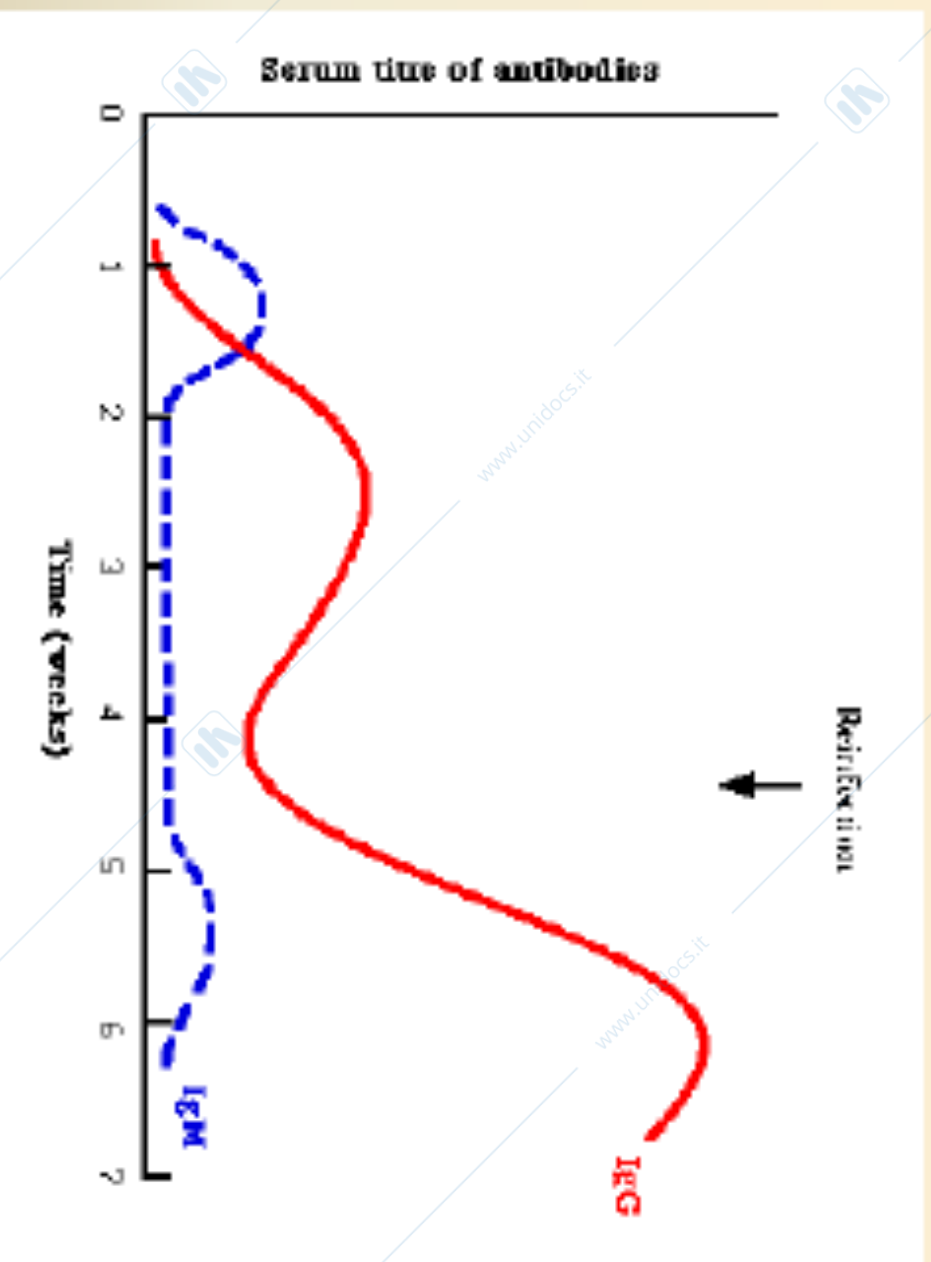
Criteria per diagnosticare una infezione primaria:

- **Presenza di IgM**
- **Sieroconversione**
- **Alti titoli di IgG raramente sono diagnostici**

Criteria per diagnosticare una reinfezione:

- **Aumento di almeno 1 volta delle IgG fra siero acuto e siero convalescente**
- **Aumento di almeno 4 volte del titolo di IgG**
- **Assenza o lieve aumento di IgM**

Tipico profilo sierologico dopo una infezione acuta



Nella reinfezione, le IgM sono assenti o a bassi livelli

Problemi della sierologia

- ❑ **Tempo necessario per avere siero acuto e siero convalescente.**
- ❑ **Infezioni subcliniche o lievi non sempre danno risposte umorali rilevabili.**
- ❑ **Virus fra loro correlati possono dare reazioni crociate (es HSV e VZV, encefalite giapponese e Dengue), dando falsi risultati positivi.**
- ❑ **Pazienti immunocompromessi spesso hanno risposte assenti o ridotte**
- ❑ **Pazienti che hanno ricevuto di recente trasfusioni possono dare false risposte positive, per il trasferimento passivo di anticorpi.**
- ❑ **Pazienti con mononucleosi infettiva, alcune malattie del connettivo ed autoimmuni possono dare falsi positivi**

Metodi INDIRETTI in diagnostica virologica

Sierologia

Rivelazione di aumenti di titolo anticorpale fra stato acuto e convalescente, o rivelazione di IgM durante l'infezione primaria.

Tecniche classiche	Tecniche recenti
1. Fissazione del complemento	1. Saggio radioimmunologico (RIA)
2. Inibizione dell'emoagglutinazione	2. Saggi immunoenzimatici (EIA, ELISA)
3. Immunofluorescenza (IFA)	3. Western Blot (WB)
4. Test di neutralizzazione	4. ELISPOT

Immunoenzimatica

E.L.I.S.A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay



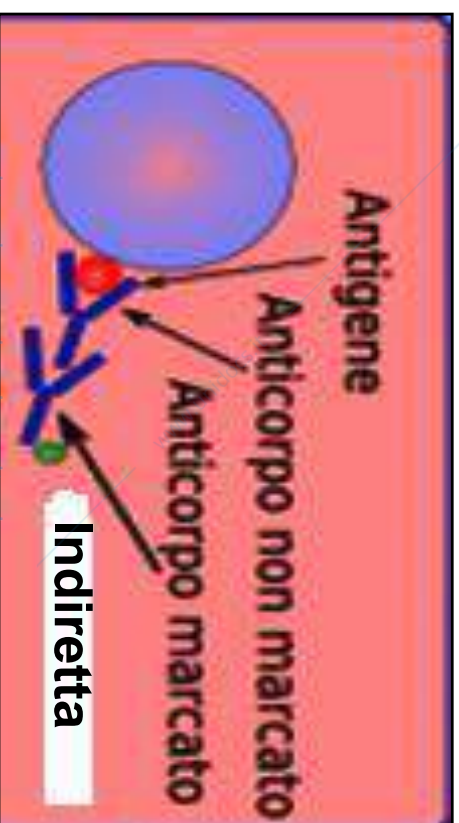
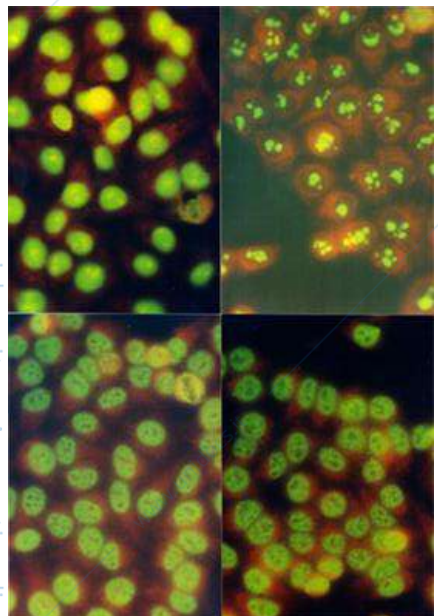
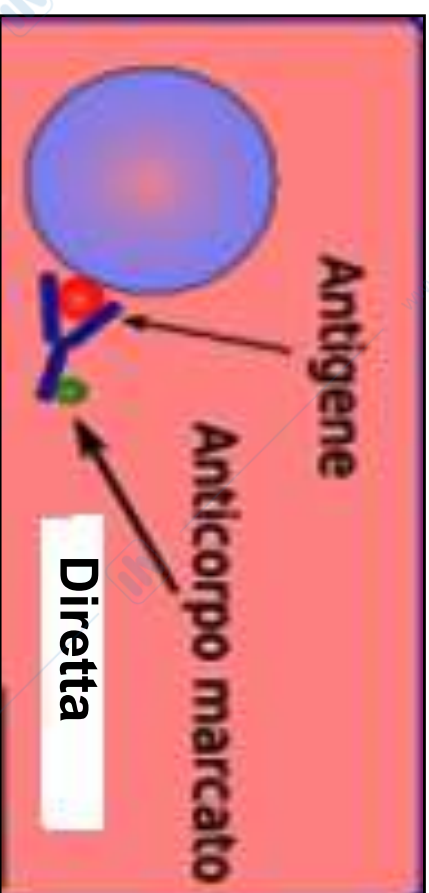
I pozzetti possono contenere l'antigene oppure l'anticorpo come nel filmato. Facciamo l'esempio che il pozzetto contenga l'antigene. Si aggiunge il siero campione che contiene l'anticorpo. Si incuba e si procede al lavaggio per eliminare gli anticorpi che non si sono legati. A questo punto si aggiungono **anticorpi anti-Ig** marcati con un **enzima**. Questi si fissano agli anticorpi. Si procede al lavaggio e si aggiunge poi uno specifico **substrato** per l'enzima. Se compare una **colorazione** significa che la reazione è **positiva**. L'intensità del colore viene misurata allo spettrofotometro.

Altri modi per evidenziare la reazione antigene-anticorpo

IMMUNOFLUORESCENZA

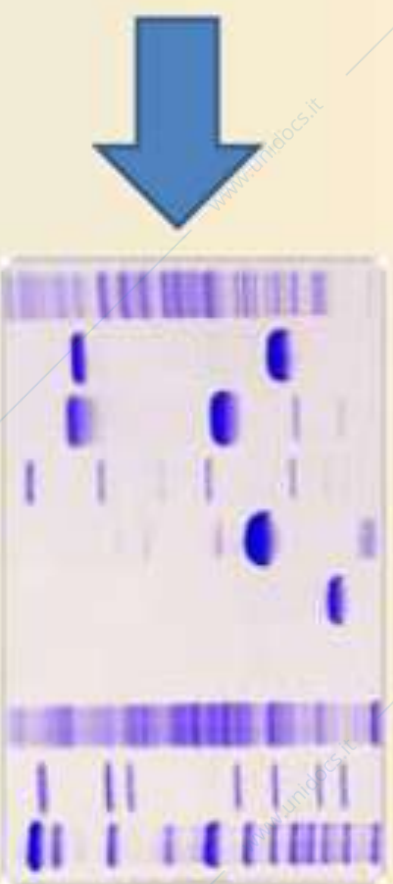
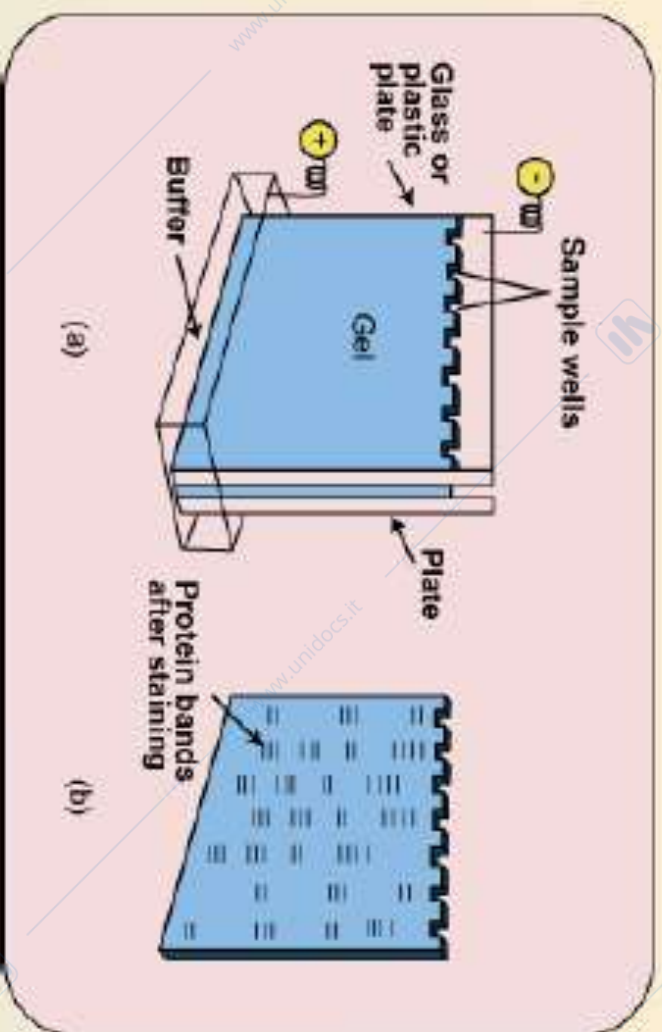
Gli Ab sono marcati con molecole **fluorescenti (fluorescina)**, sono molecole in grado di assorbire la luce **ultravioletta** emettendo poi radiazioni nel campo del visibile.

Per poter osservare la reazione si utilizza un **microscopio a fluorescenza**.

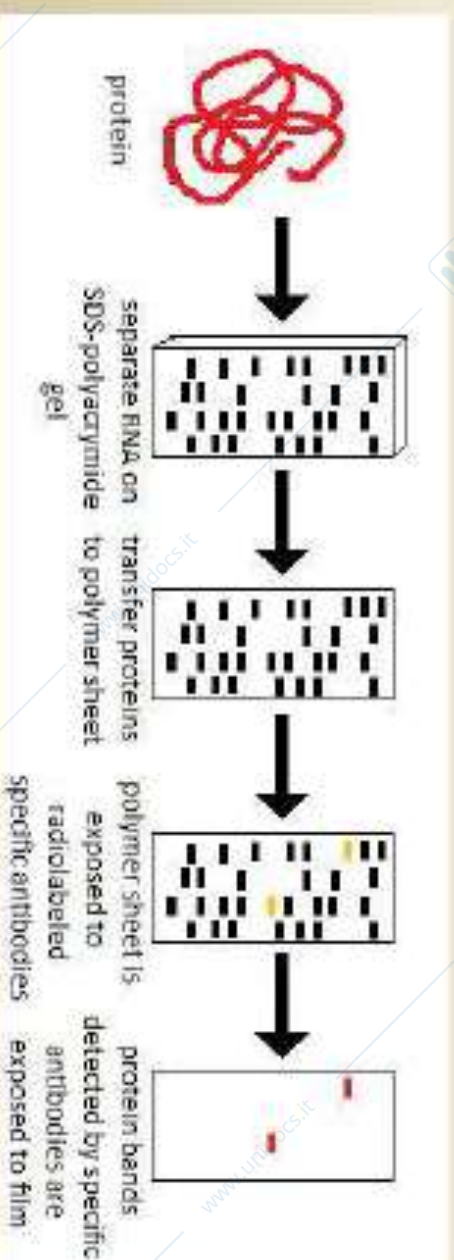


Siero

1. PROFILI PROTETICI: Elettroforesi di proteine

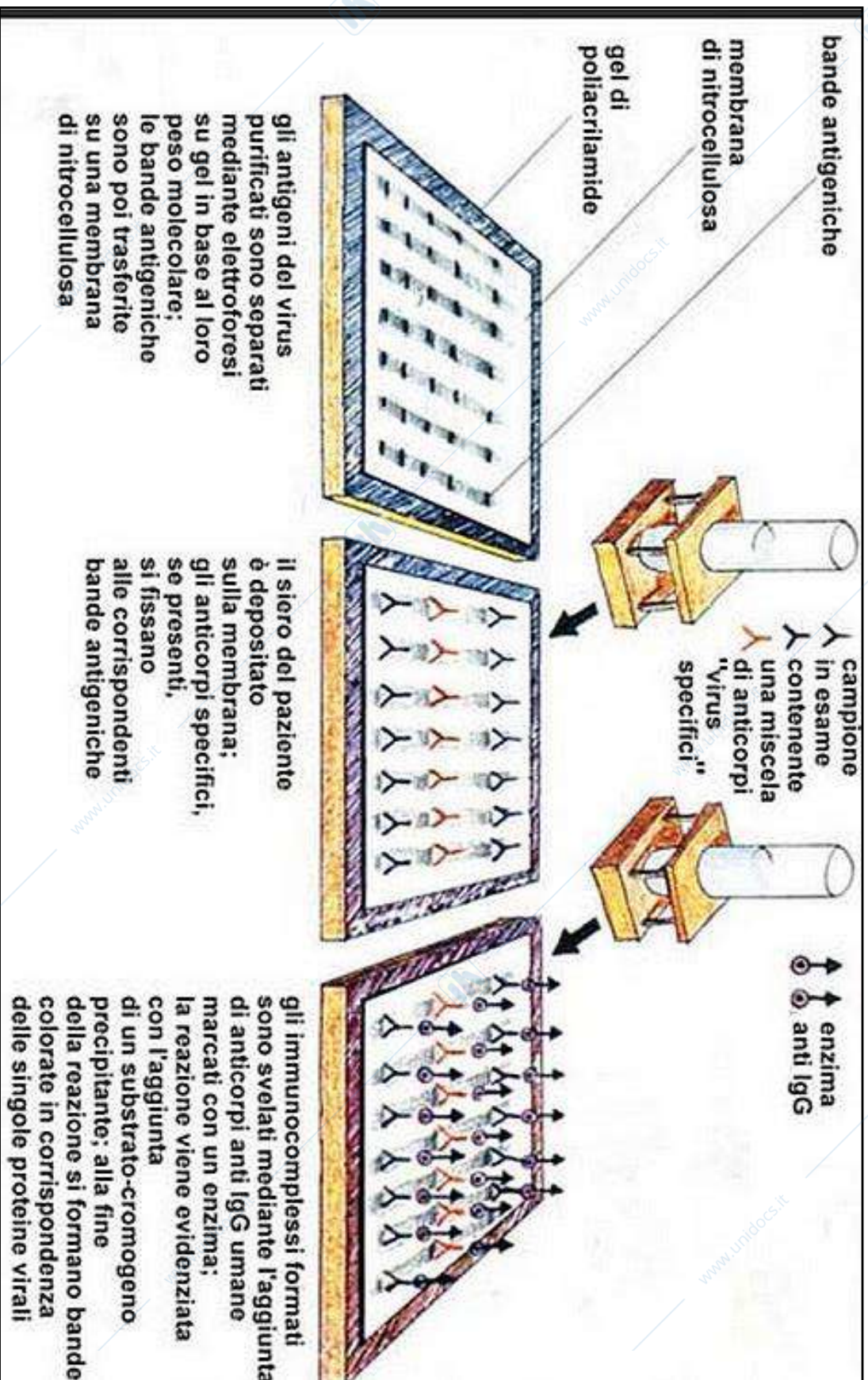


All'analisi elettroforetica pu0 essere abbinato il Western blot, per il riconoscimento specifico dell'antigene evidenziato.



Altro modo per evidenziare la reazione antigene - anticorpo

- **Western blot (immunofissazione)**
- Usata per identificare gli anticorpi contro il virus dell' AIDS

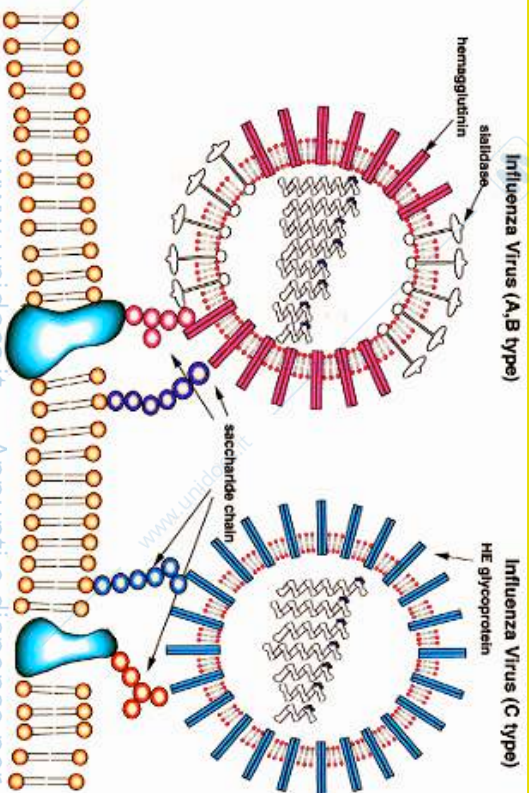




Famiglia: *Orthomyxoviridae*

3 tipi:

- Influenzavirus A
- Influenzavirus B
- Influenzavirus C



Tipo A

- Animali e uomo
- Epidemie e pandemie

Tipo B

- Solo l'uomo
- Piccole epidemie
- Principalmente bambini

Tipo C

- Solo l'uomo
- Non provoca epidemie
- Forme cliniche molto lievi

Caratteri generali

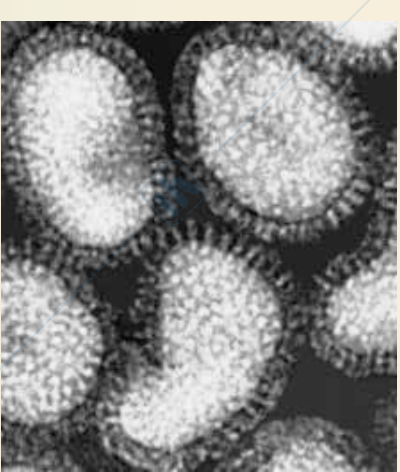


Dimensioni: 80-120nm (altamente pleomorfico)

Diametro del core: 9nm

Presenza di envelope

Simmetria: elicoidale



Replicazione: nucleare

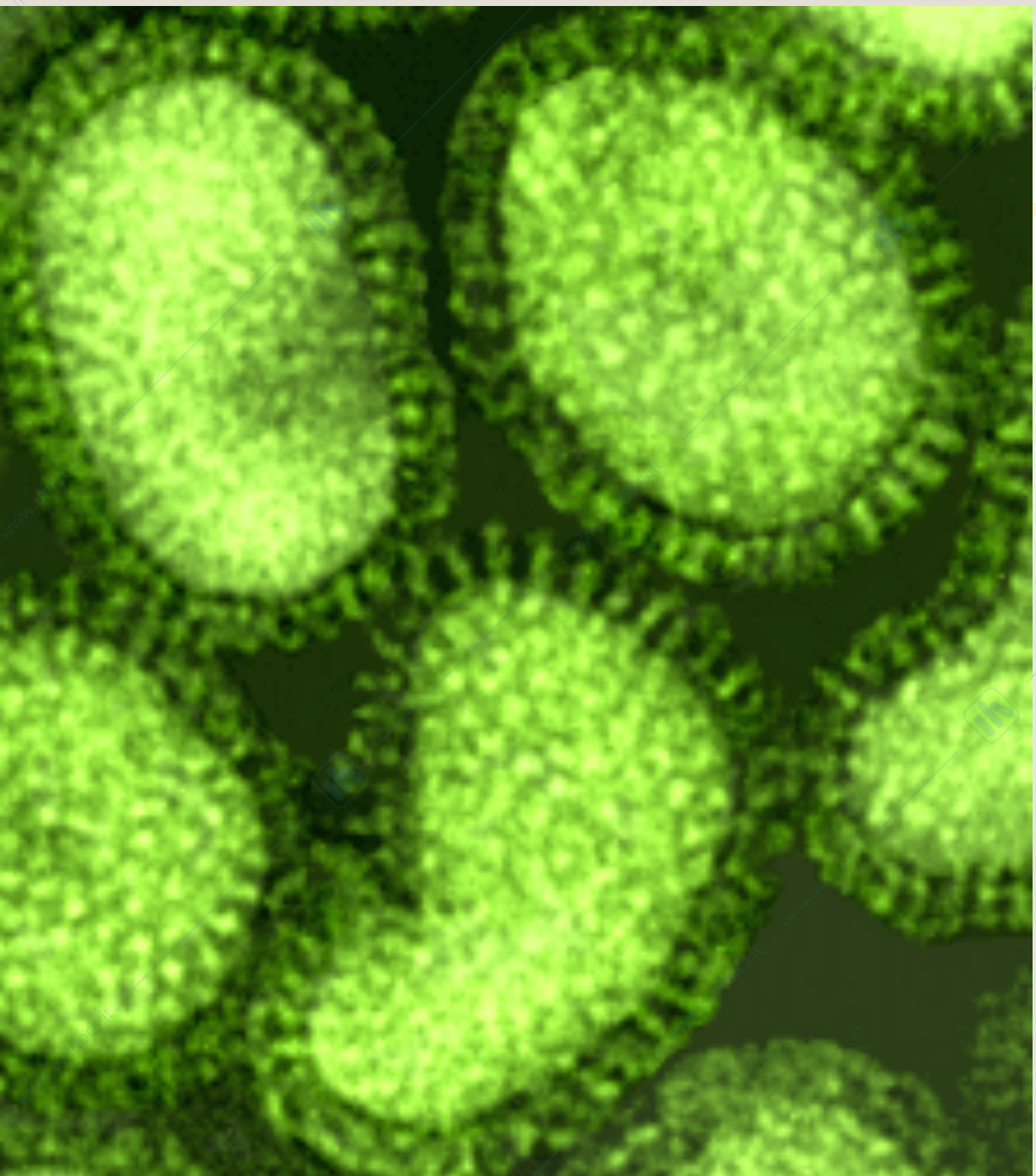
Genoma: RNA a polarit  negativa a unico filamento, segmentato (8 segmenti in A e B, 7 in C)

Segmento	Proteina	Funzione
1	PB2	RNA polimerasi
2	PB1	RNA polimerasi
3	PA	RNA polimerasi
4	HA	Emoagglutinina, sito di adsorbimento
5	NP	Nucleoproteina, trasporto nucleare/ citoplasmatico dell' RNA virale
6	NA	Neuraminidasi: rilascio e diffusione delle particelle
7	M1 e M2	M1 = proteina di matrice M2 = canale ionico
8	NS1 e NS2	NS1 = nucleo NS2 = nucleo/ citoplasma

Segmento 4: HA, emagglutinina, proteina di attacco (VAP), proteina di fusione, bersaglio degli Ab NT

Segmento 5: NP, nucleocapside

Segmento 6: NA, neuraminidasi (taglia l'acido sialico e promuove il rilascio del virus)



Evidenti
proiezioni
superficiali,
costituite da due
glicoproteine
transmembrana:

emoagglutinina
e
neuraminidasi

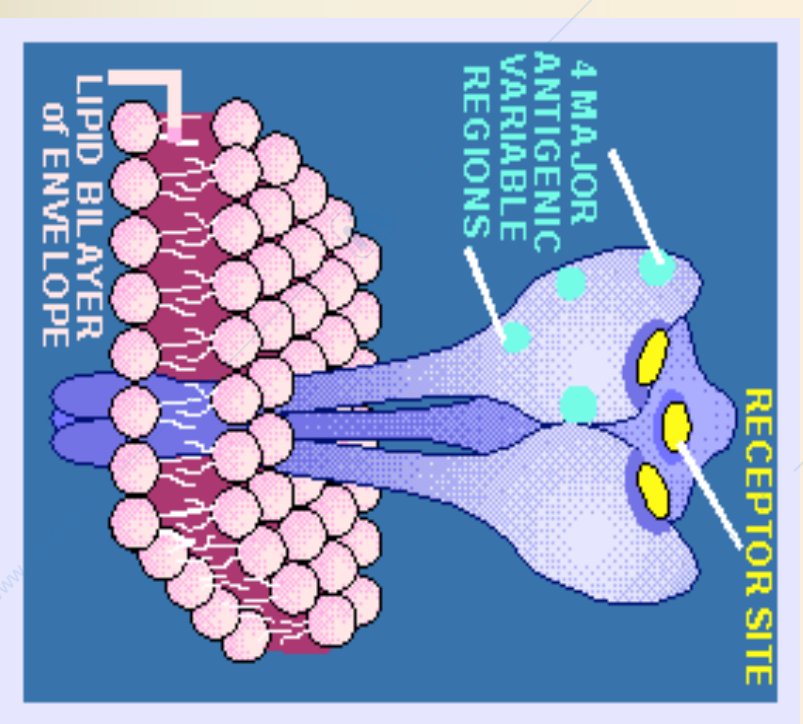


Funzioni dell'emagglutinina (HA)

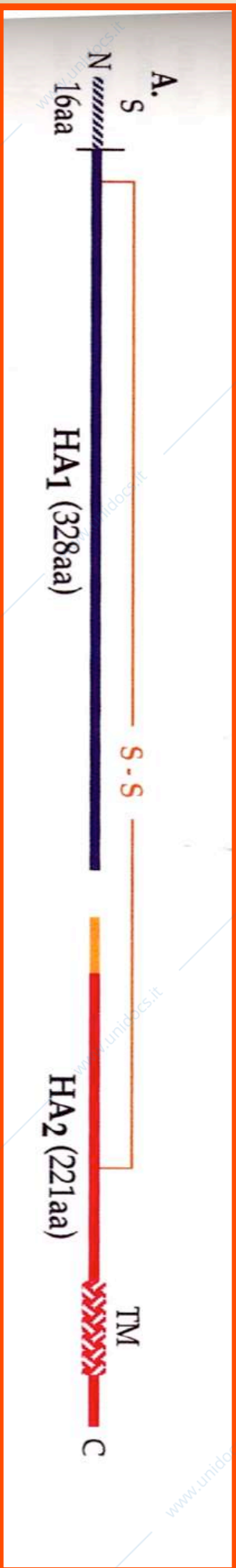
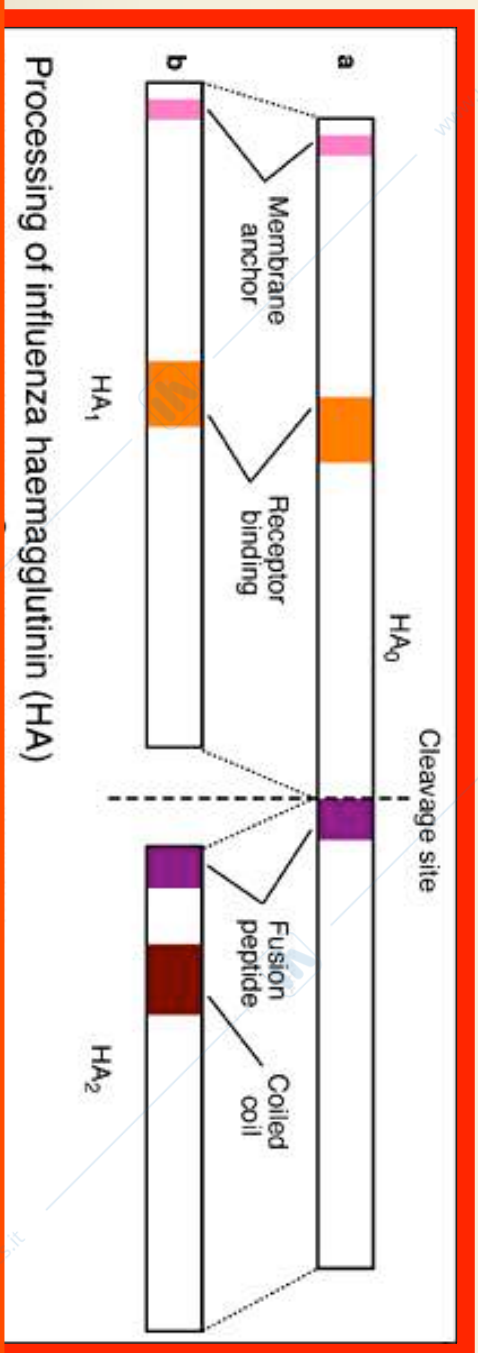
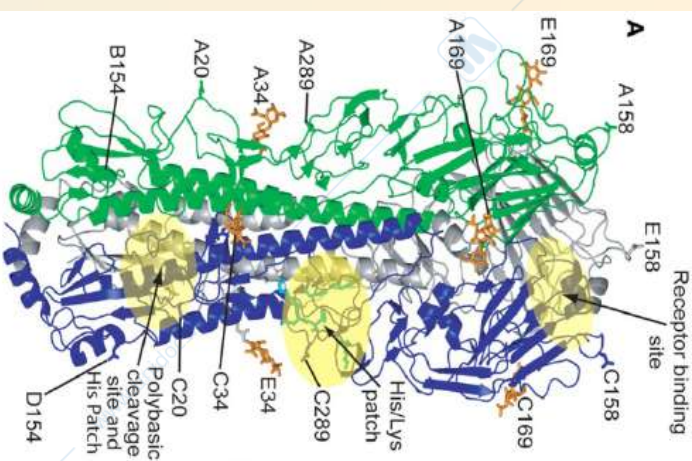
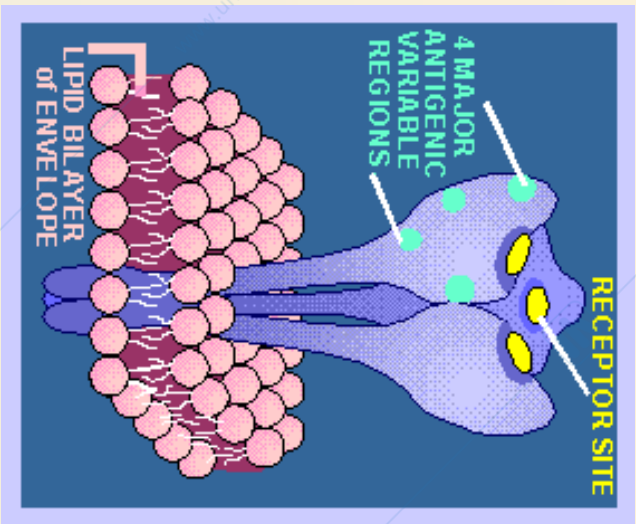


Forma trimerica bastoncellare

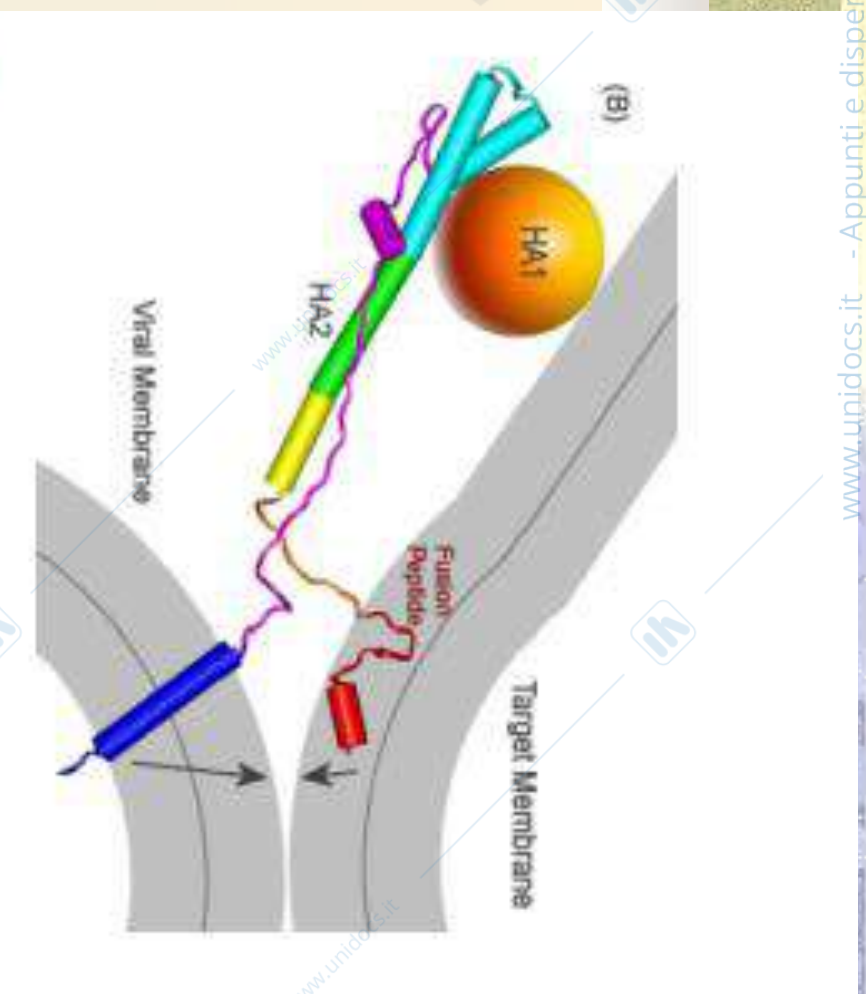
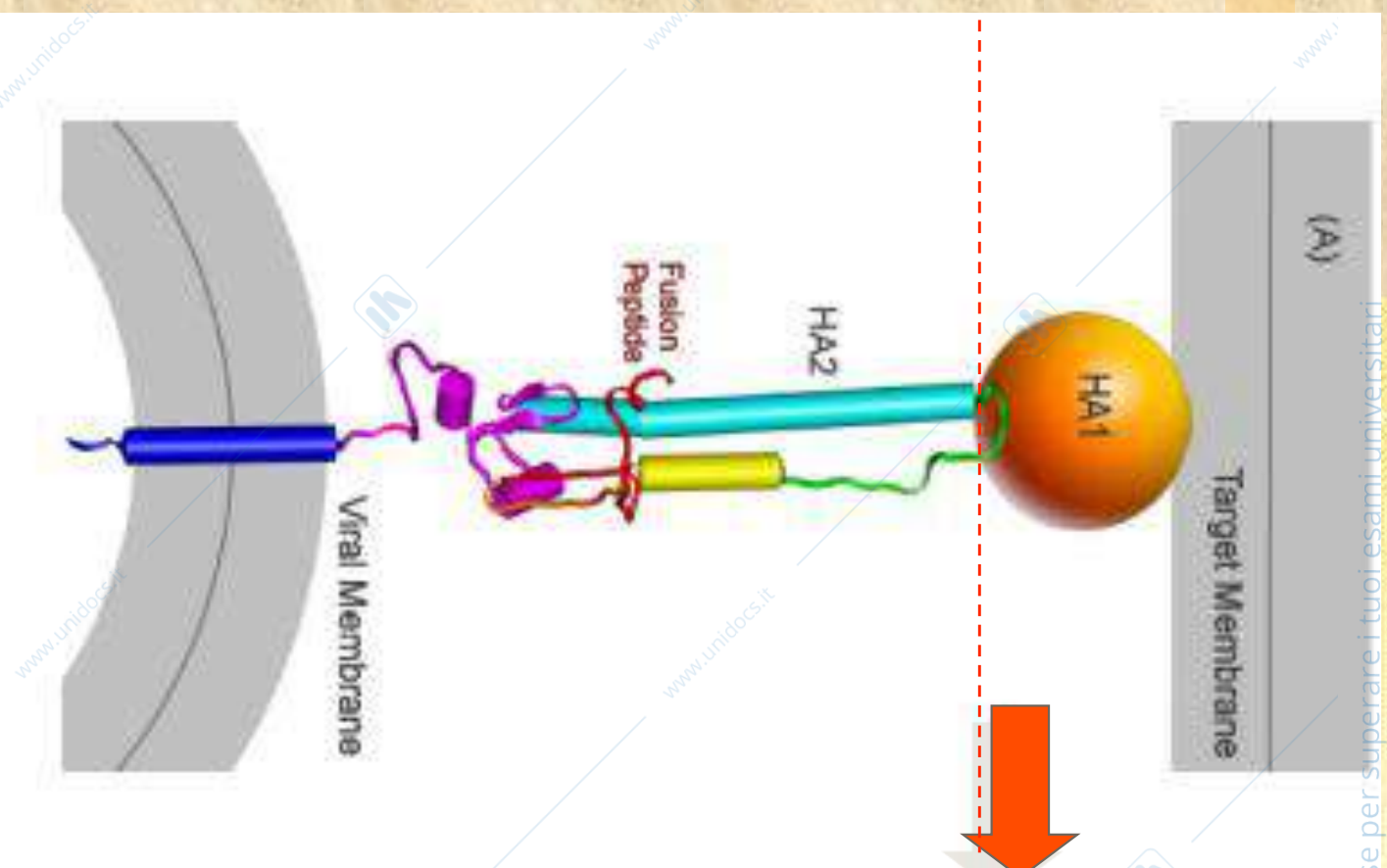
- **Proteina d'attacco virale (VAP)** si lega alle molecole di acido sialico (è il recettore!) presenti sulle cellule bersaglio
- Promuove la **fusione** mantello-membrana cellulare
- Agglutina le emazie
- Induce Ab proteggenti
- Cambiamenti dovuti a mutazioni causano variabilità Agg maggiori e minori (H1, H2...etc)



L'EMAGGLUTININA (HA)



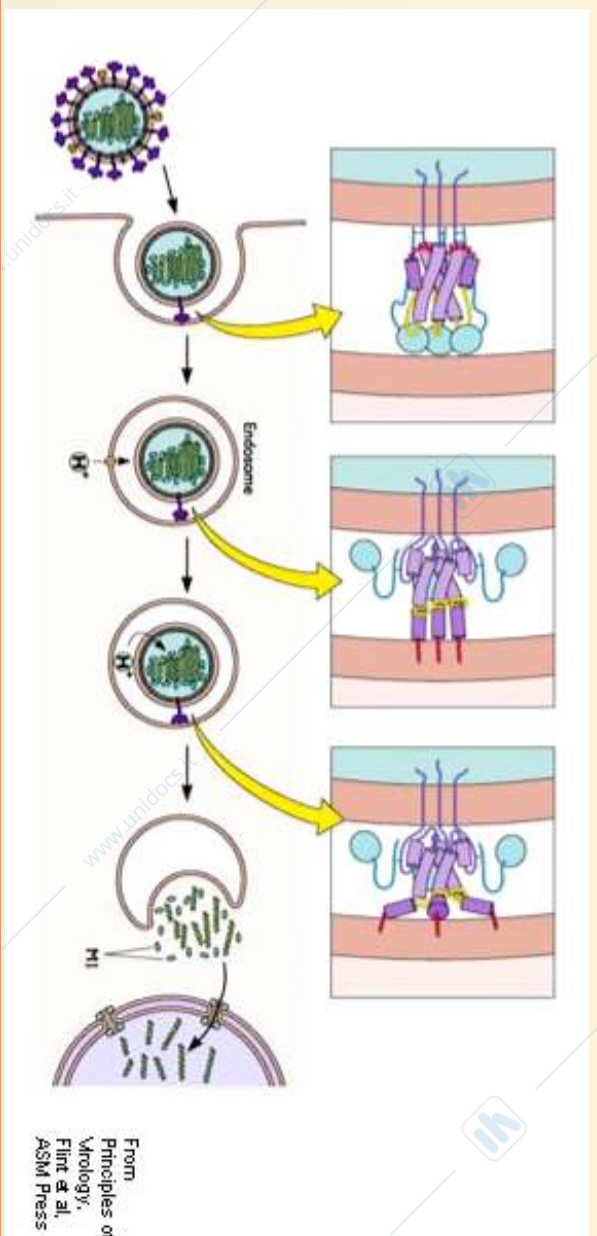
L'HA deve essere attivata enzimaticamente in 2 subunità: H1 e H2



HA0, in seguito a clivaggio enzimatico (proteasi del muco, dei fluidi extracellulari, del siero e batteriche), dà luogo a

- HA1** → adsorbimento, seguito da endocitosi
- HA2** → fusione dell' *envelope* con la membrana dell' endosoma

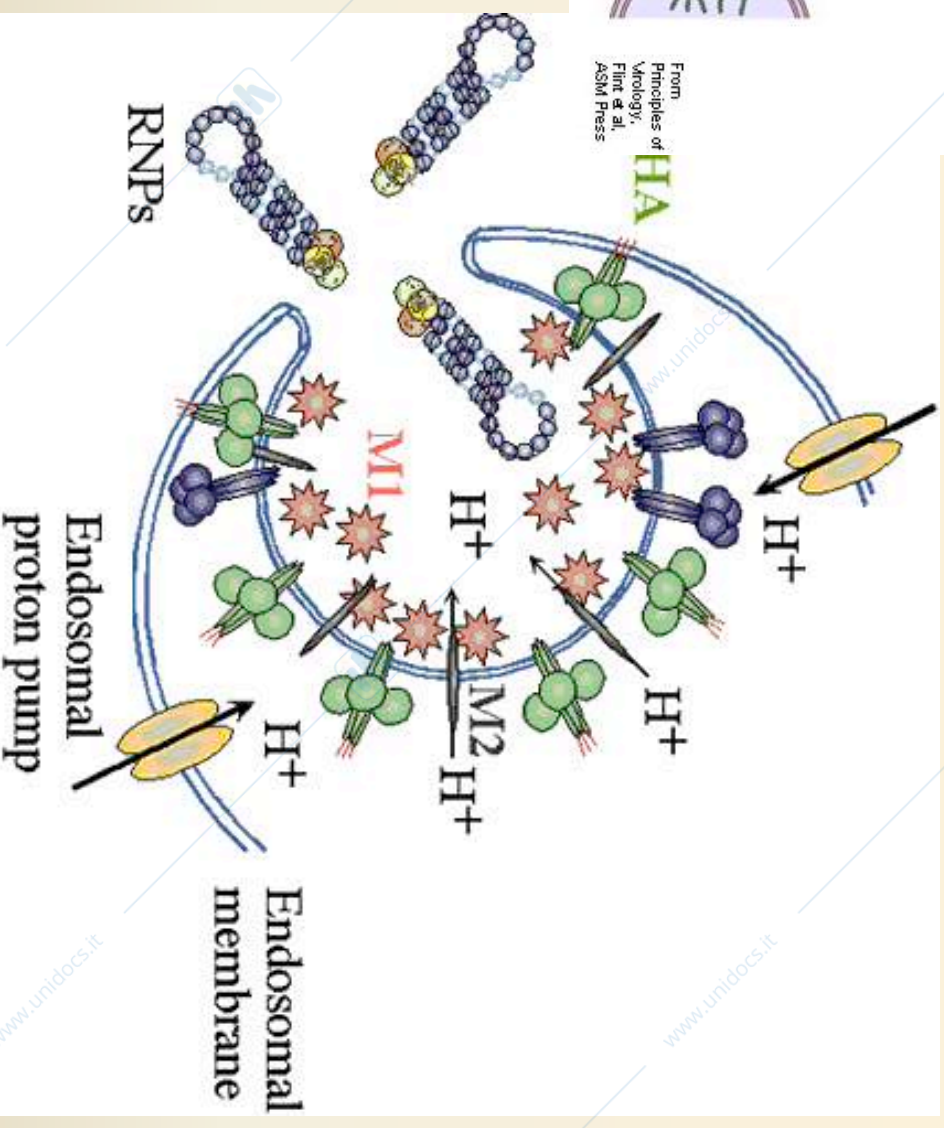
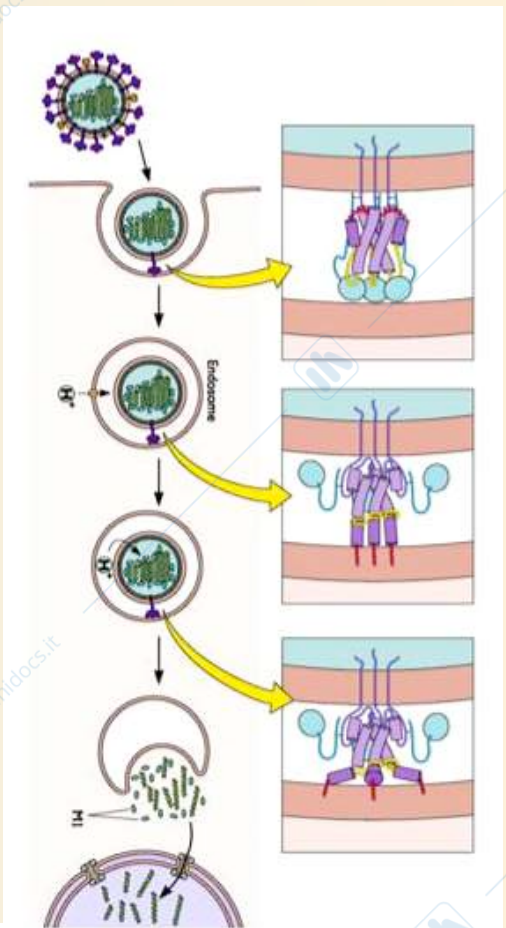
UNCOATING DEL VIRUS INFLUENZALE



La diminuzione del pH lungo la via endocitica ha tre conseguenze fondamentali:

1. Il cambiamento conformazionale di HA1+HA2 con conseguente esposizione del peptide di fusione all' esterno e inserimento nella membrana endosomiale
2. L' attivazione della proteina-canale M2 che pompa ioni H^+ all' interno della particella virale promuovendo la dissociazione del complesso M1/RNPs (ribonucleoproteine) e la liberazione del genoma nel citoplasma.
3. I foglietti delle due membrane giustapposte si fondono aprendo un foro di fusione che si dilata fino a creare una singola membrana a doppio strato

UNCOATING DEL VIRUS INFLUENZALE

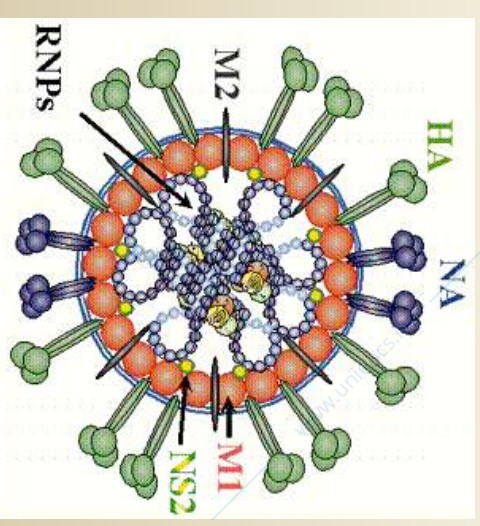
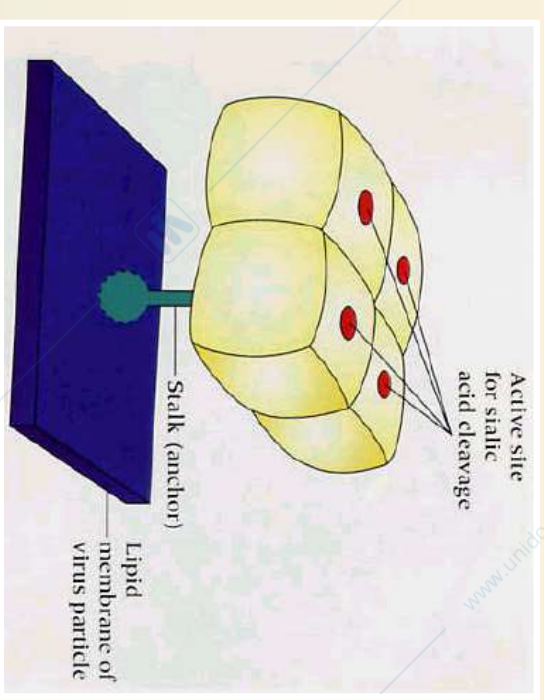


M2 è UNA POMPA PROTONICA

L'AMANTADINA blocca specificamente la pompa M2 ed è pertanto un inibitore della replicazione del virus influenzale

Funzioni della neuraminidasi (NA)

- tetramero ad attività enzimatica
- scinde l'acido sialico delle glicoproteine
- facilita il rilascio del virus da cellule infette
- è il bersaglio dei farmaci **oseltamivir (Tamiflu)** e **zanamivir (Relenza)**
- cambiamenti mutazionali causano variabilità (N1, N2...etc)



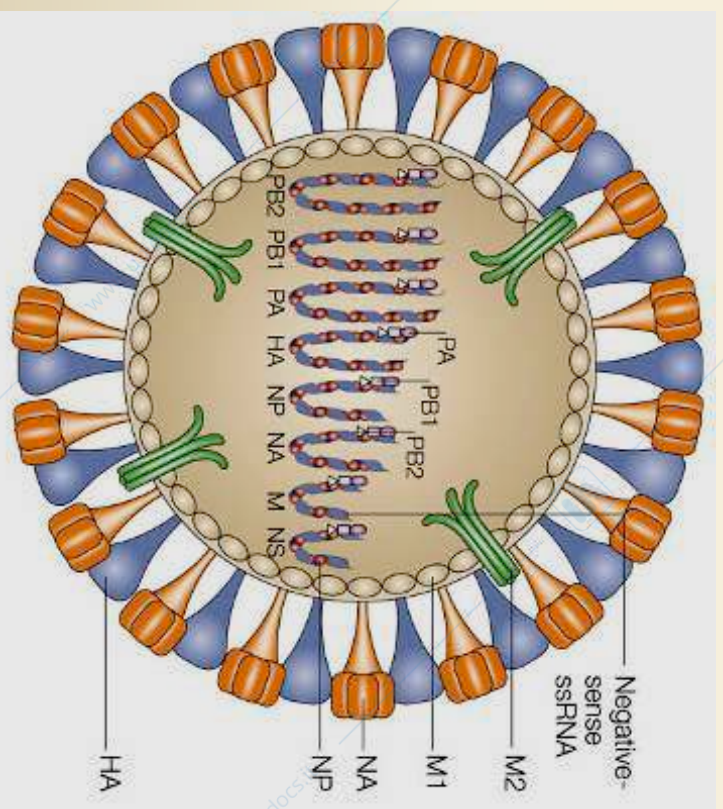
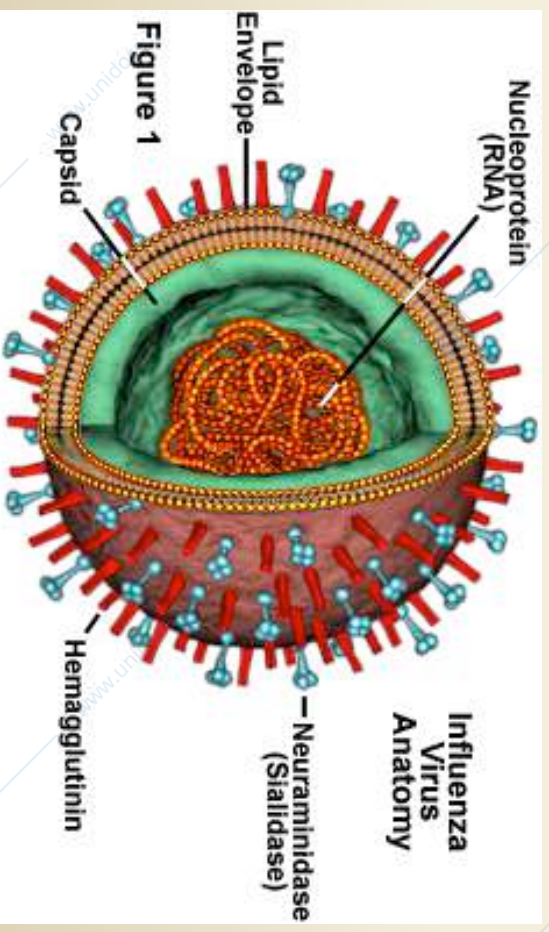
PRODOTTI DEI SEGMENTI GENICI

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

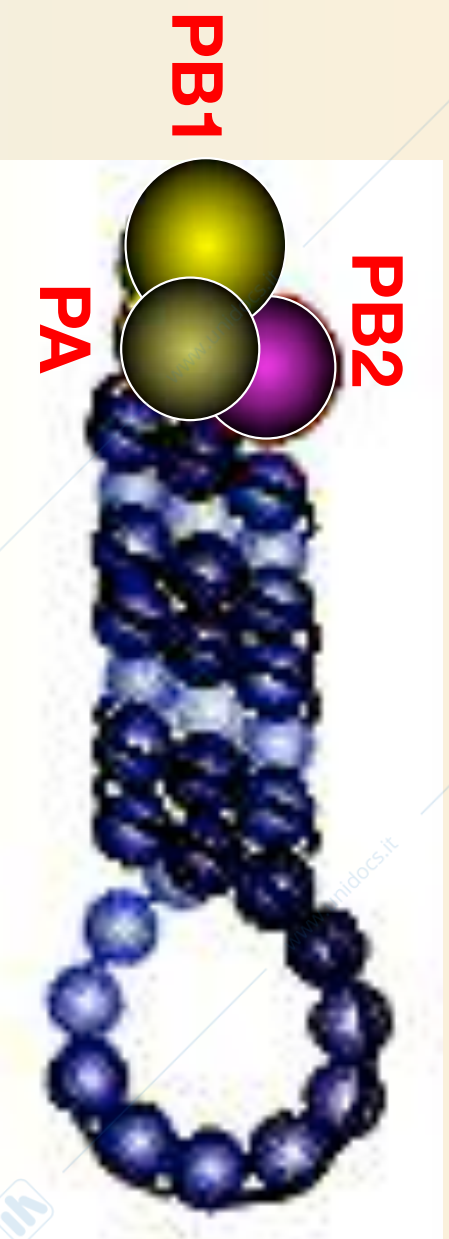
Segmento 1: PB2, componente della polimerasi

Segmento 2: PB1, componente della polimerasi

Segmento 3: PA, componente della polimerasi



Organizzazione strutturale dei complessi RNP del virus influenzale



Modello di RNP.

Le sfere blu rappresentano i monomeri di proteina NP associati al vRNA (linea nera). Il singolo filamento di vRNA è ripiegato e forma una struttura "hairpin" a doppia elica (sequenze 5' e 3' complementari) che costituisce il sito di legame per il complesso eterotrimerico della RNA polimerasi RNA-dipendente (**PB1-PB2-PA**).

Segmento 7:

- **M1** proteina della matrice, proteina strutturale (interagisce con nucleocapside e mantello, promuove assemblaggio)
- **M2**: proteina della membrana (forma canali protonici sulla membrana, è bersaglio per l'amantadina), favorisce il denudamento e la produzione di HA

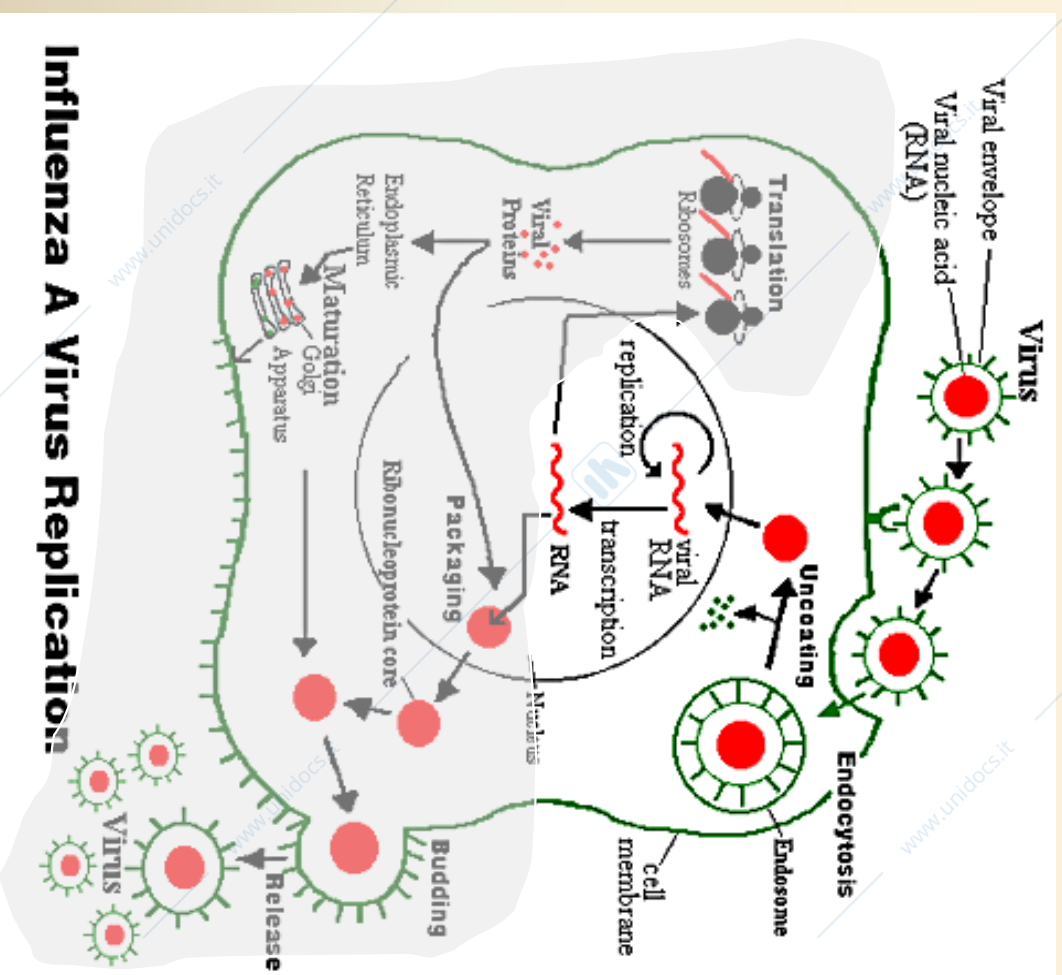
Segmento 8:

- **NS1**, proteina non strutturale (inibisce produzione IFN beta)
- **NS2**: proteina non strutturale

Le proteine M1, M2 e NP definiscono il TIPO (A, B o C)

REPLICA DEGLI ORTHOMYXOVIRUS

- interazione con il recettore (acido sialico)
- internalizzazione (endocitosi in coated vesicles)
- acidificazione dell' endosoma: HA promuove la fusione dell' envelope con l'endosoma
- il canale protonico formato da M2 provoca acidificazione e promuove la dissociazione del complesso M1/NP con la liberazione del genoma nel citoplasma
- liberazione del nucleocapside

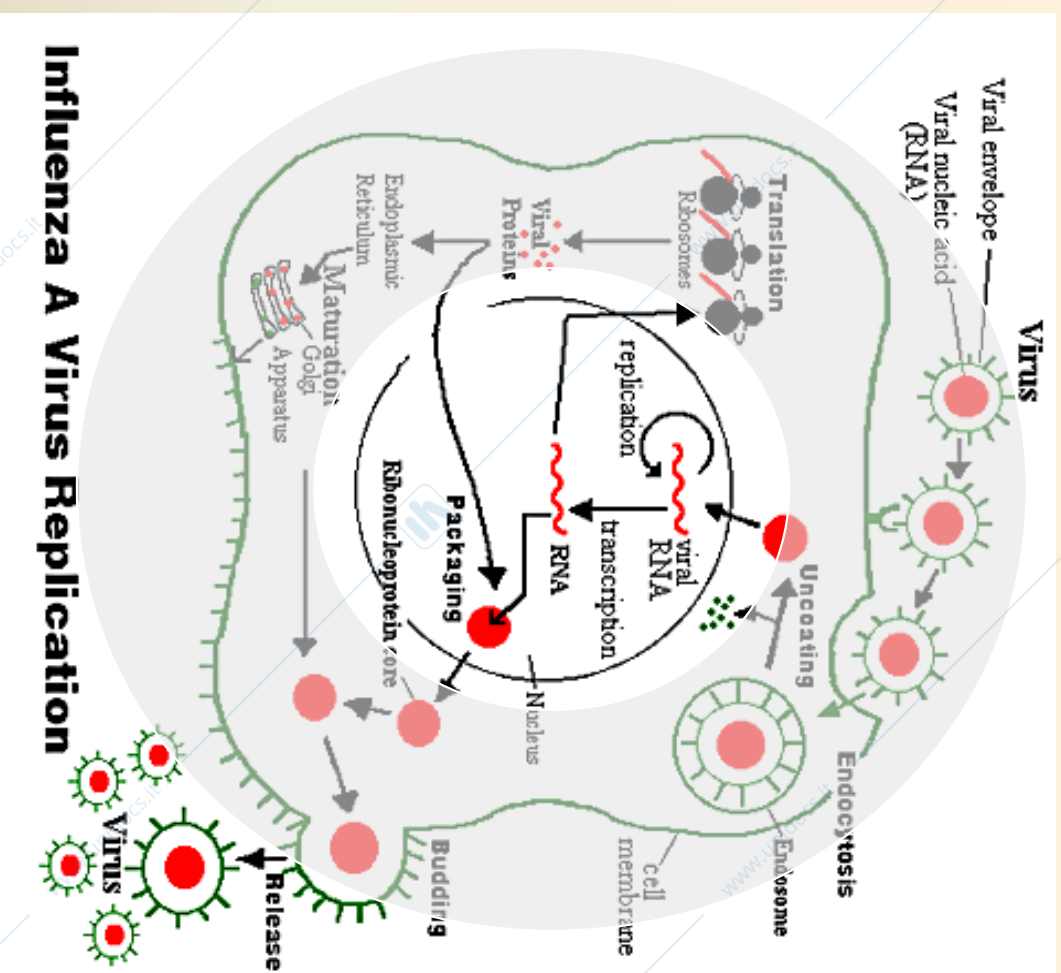


Influenza A Virus Replication:

Il nucleocapside si localizza nel nucleo

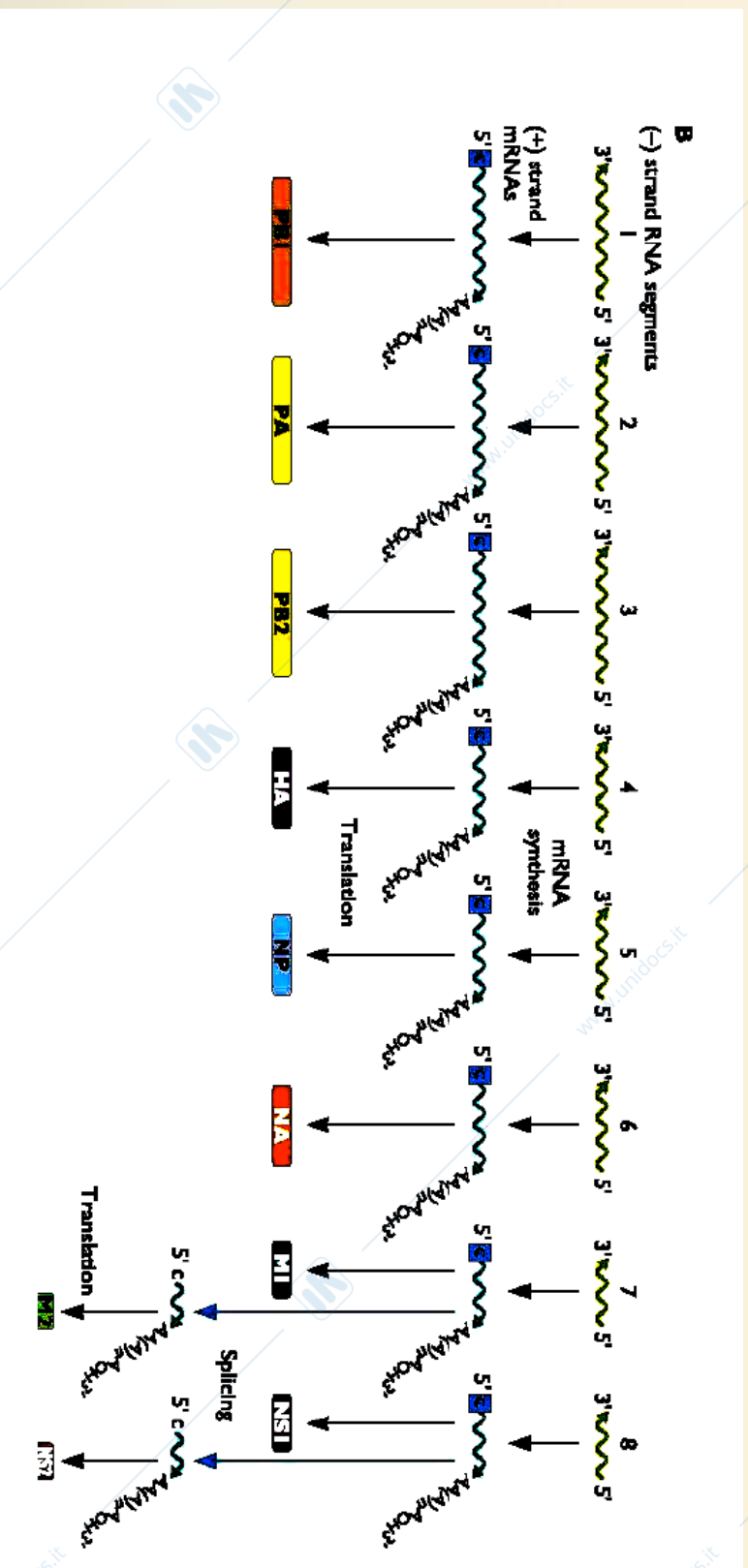
Trascrizione degli mRNA

NB: la TRASCRIZIONE e la REPLICAZIONE del genoma avvengono nel nucleo; la trascrittasi virale (PB1, PB2, PA) utilizza mRNA della cellula come primer per la sintesi di mRNA virale



Influenza A Virus Replication

Virus dell'Influenza: Strategia di un virus a RNA(-) segmentato

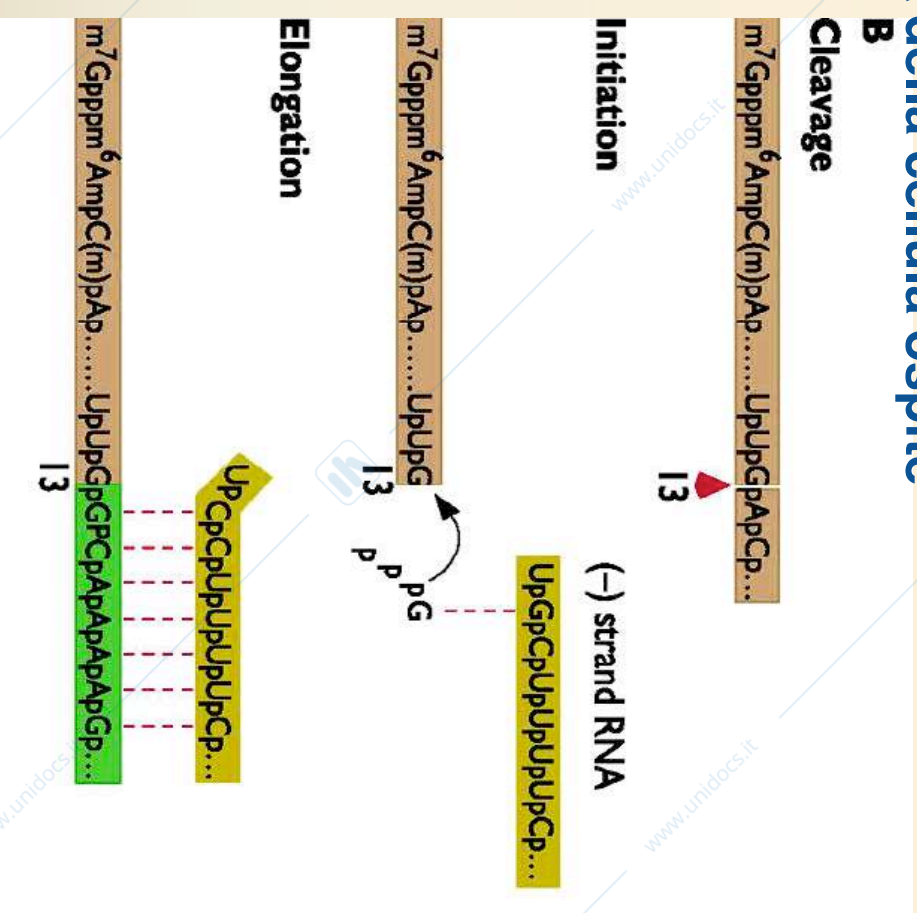


Replica nel nucleo

Utilizza i meccanismi di splicing della cellula ospite

Il complesso della RNA polimerasi RNA-dipendente del virus dell'Influenza A
il complesso RppRd non ha attività di metiltransferasi per la sintesi del cap
PB2 “*rub*a” le sequenze 5'-cap agli mRNA della cellula ospite

La sequenza cap rappresenta il primer per la sintesi degli mRNA virali da parte di PB1



Ulteriore vantaggio : Inibizione della sintesi degli mRNA cellulari

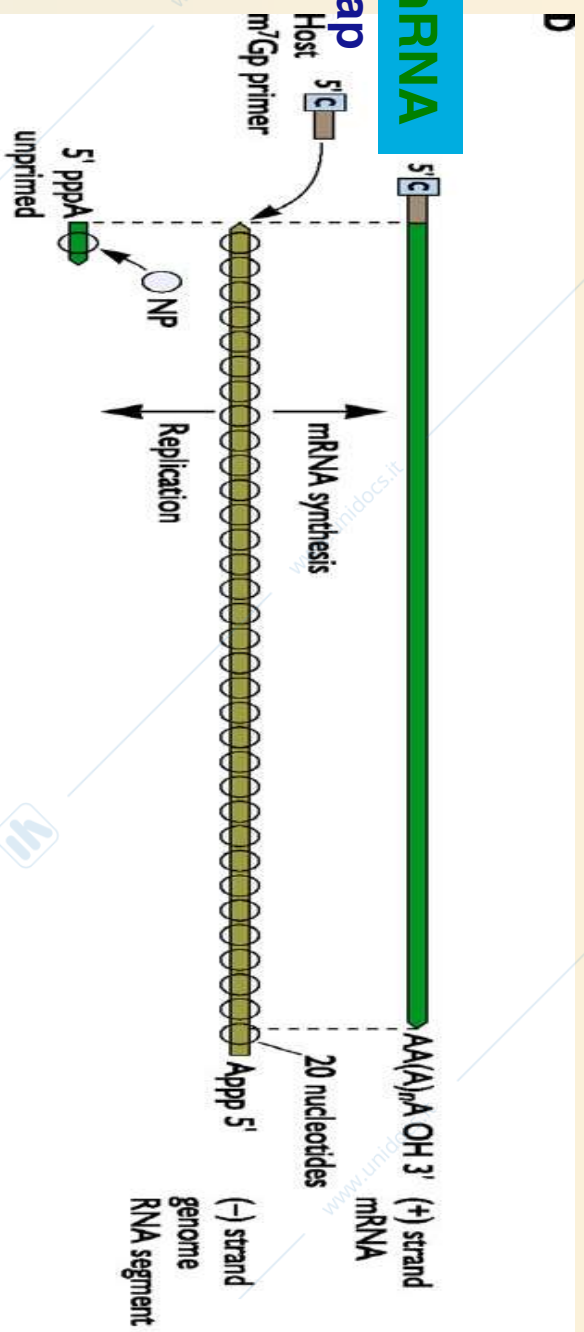
Virus Influenzale: passaggio dalla trascrizione degli mRNA alla replicazione del genoma

I livelli di NP neosintetizzata determinano la transizione della fase

Bassi livelli di NP, sintesi di mRNA

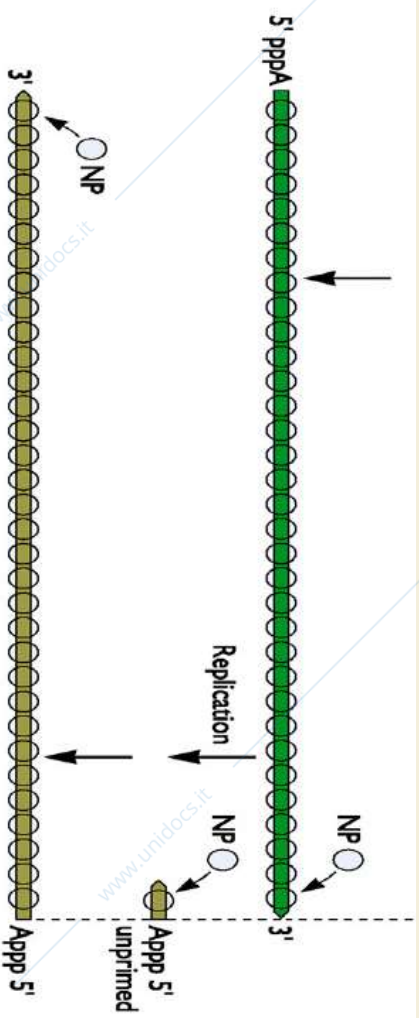
Richiesta di PB2 per legare il cap

Assenza di funzione di PA

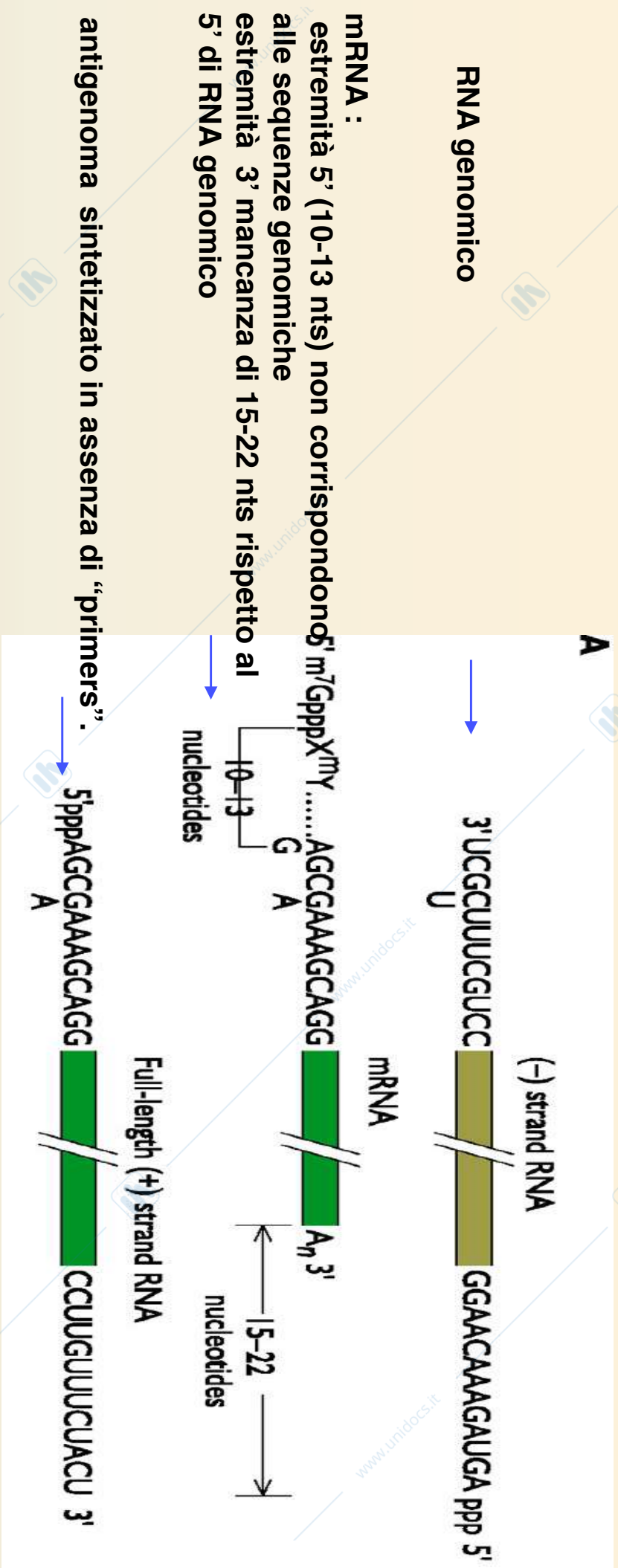


Alti livelli di NP, replicazione del genoma

La polimerasi virale acquisisce la capacità di iniziare la sintesi di RNA senza "primer"



I segmenti genomici e gli mRNAs differiscono per le estremità



mRNA :
estremità 5' (10-13 nts) non corrispondono alle sequenze genomiche
estremità 3' mancanza di 15-22 nts rispetto al 5' di RNA genomico

antigenoma sintetizzato in assenza di "primers".

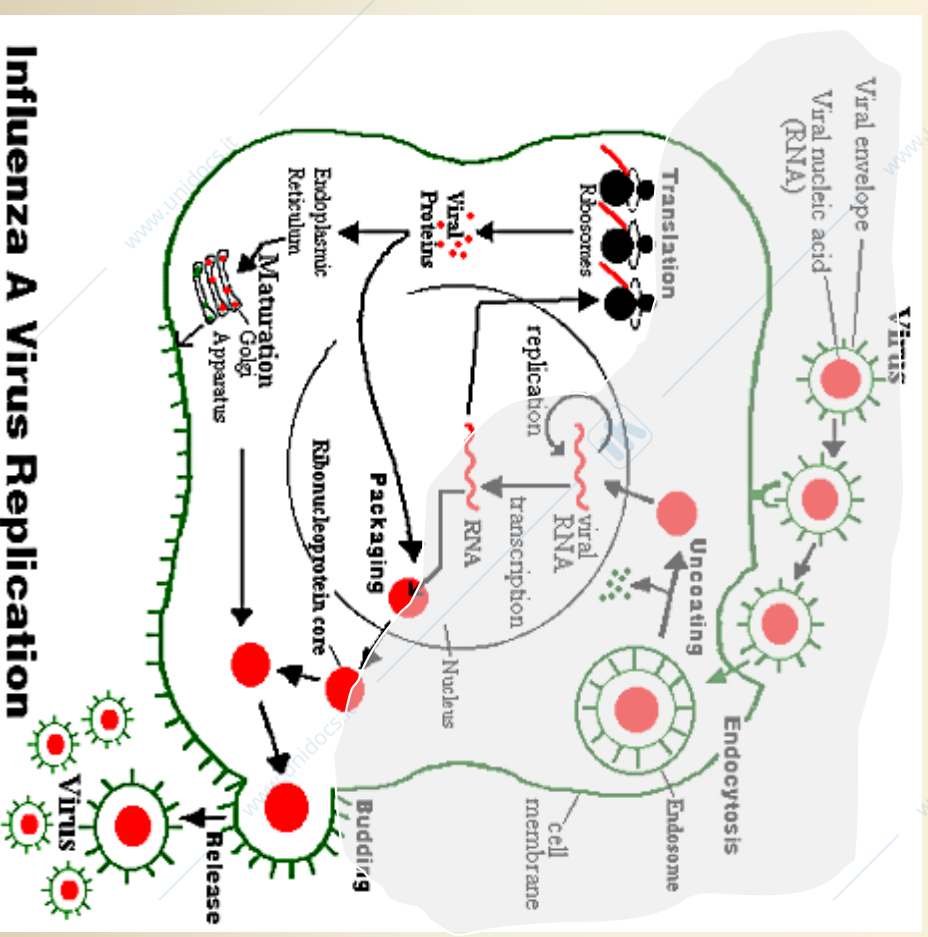
- Tutti i segmenti genomici sono trascritti in RNA dotati di “cap” in 5’, poliadeniati in 3’ (poliA), che rappresentano i messaggeri per le singole proteine.

- Traduzione degli mRNA in proteine (HA, NA, GP) nel citoplasma.

- In seguito: produzione di RNA+ complementare all’RNA genomico che viene replicato nel nucleo.

- Assemblaggio

- Liberazione per gemmazione



Influenza A Virus Replication

l' envelope contiene due glicoproteine:

- 1) emagglutinina (HA)**
- 2) neuraminidasi (NA)**

Presentano instabilità genetica che è responsabile di

EPIDEMIE

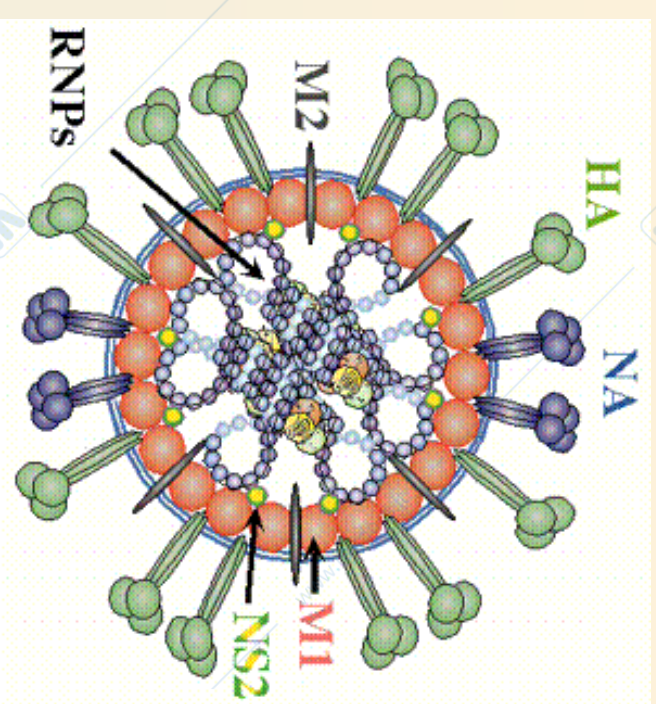
(mutazioni minori o DRIFT)

e

PANDEMIE

(riassortimento o mutazioni maggiori o SHIFT)

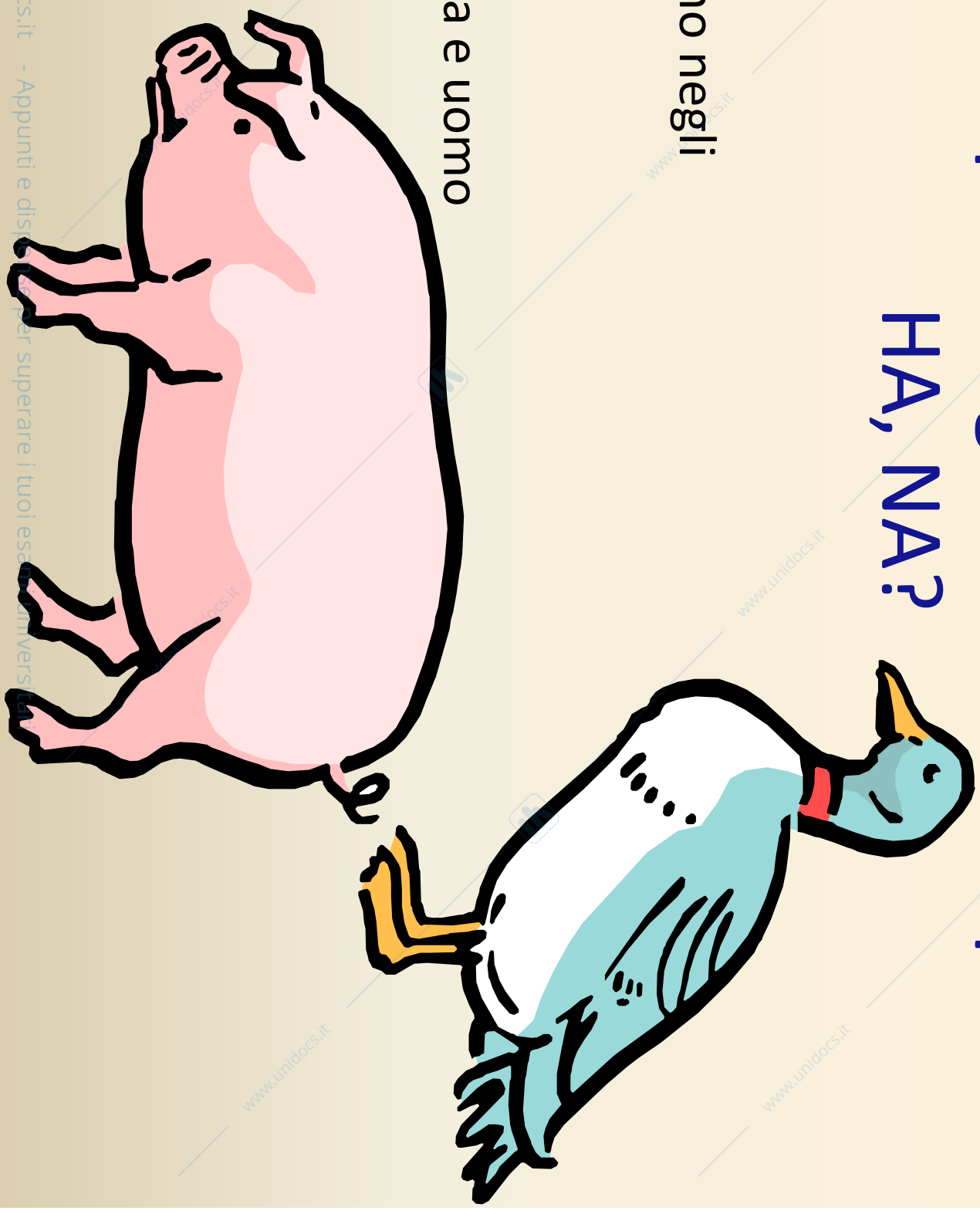
(rapporto HA/NA circa 4-5 a 1)



Da dove provengono i nuovi tipi di

HA, NA?

- 16 tipi HA
- 9 tipi NA
 - Tutti circolano negli uccelli
- maiali
 - Specie aviaria e uomo





16 tipi di HA

Siti di adsorbimento ai recettori cellulari: mucoproteine e glicolipidi contenenti gruppi terminali costituiti da acido N-acetil neuraminico

(NANA = **acidi sialici**)

Molto diffusi su diversi tipi cellulari e nel muco



Differenze nei recettori

acidi sialici legati a una molecola di galattosio
con un legame α 2,6 (NeuAc α -2,6Gal)

acidi sialici legati a una molecola di galattosio
con un legame α 2,3 (NeuAc α -2,3Gal)

presenti entrambi i tipi di acidi sialici

Uomo

Volatili

Suino

Determinanti sierotipo-specifici

Molte possibili combinazioni

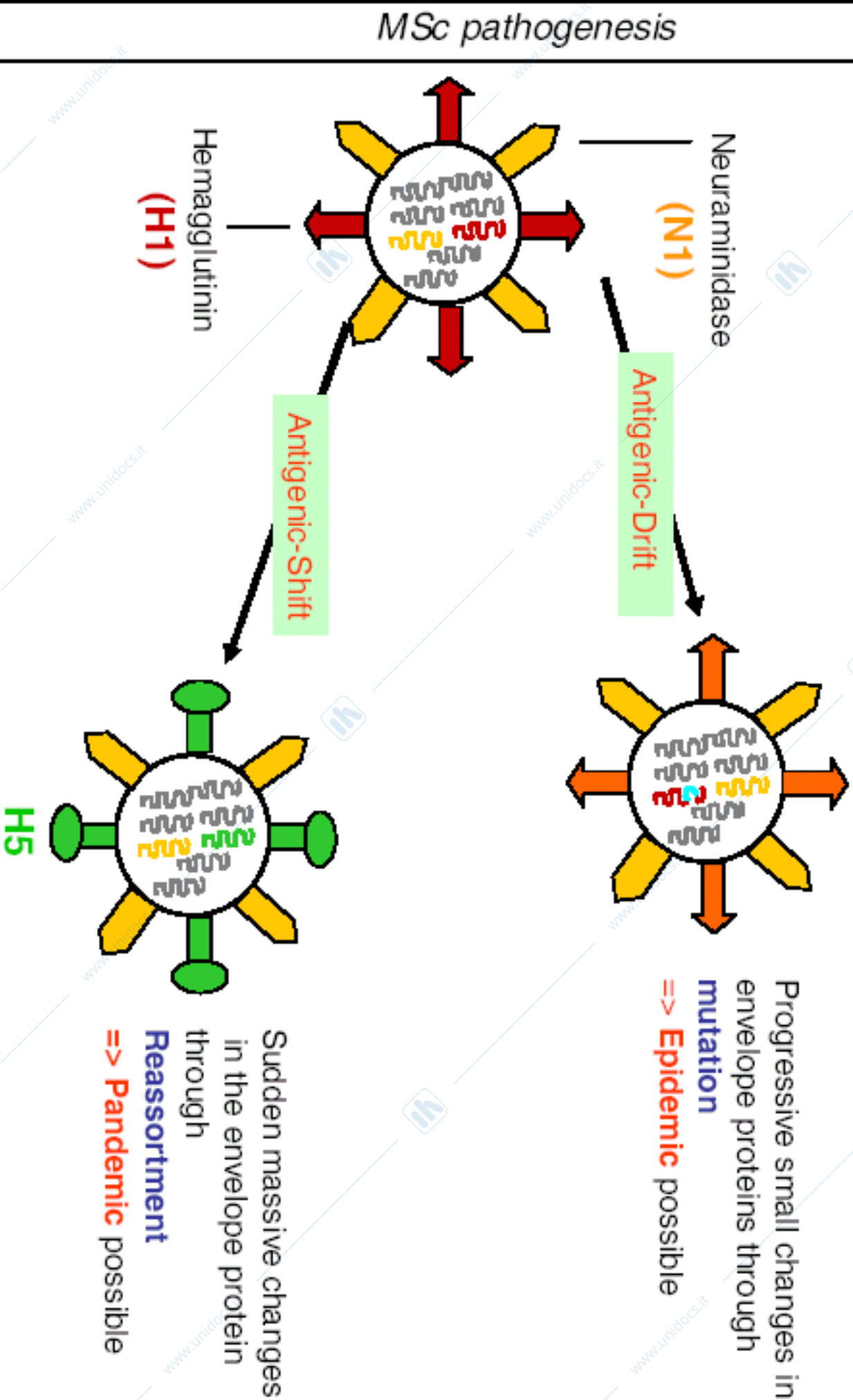
H1N1 – H2N2 – H3N2-H7N1-H7N7-H3N8-H9N2
H5N1

Nomenclatura (WHO)

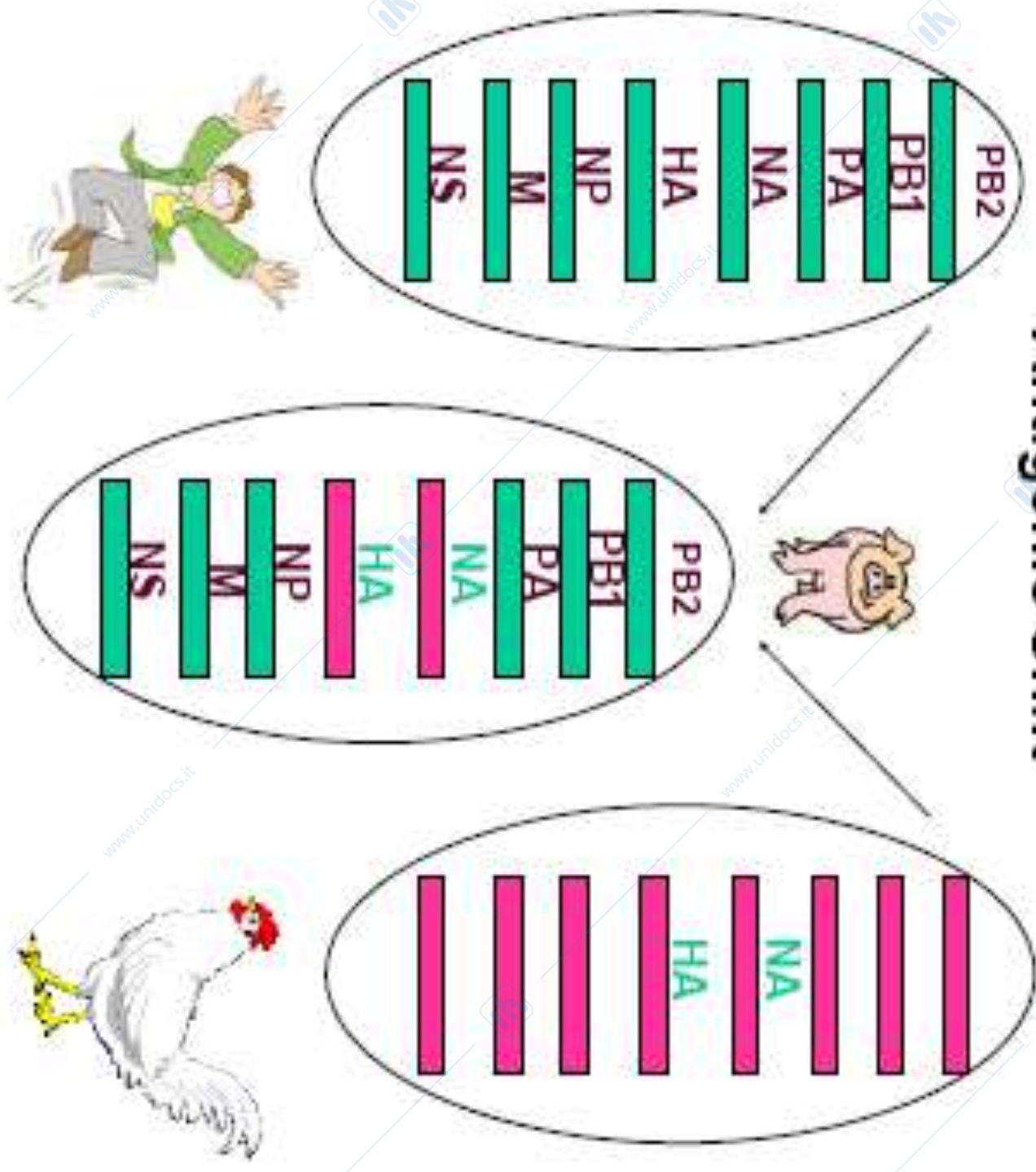
A/Scotland/42/89 (H3N2)

A/swine/Iowa/3/70 (H1N1)

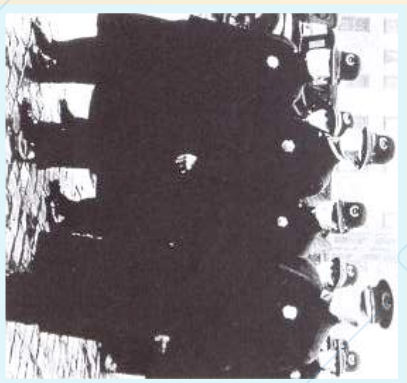
Influenza – a variable goal for the immune system



Antigenic Shift



Circulating Influenza Strains and Pandemics in The 20th Century



1918: “Spanish Flu”

20-40 million deaths



1957: “Asian Flu”

1-4 million deaths



1968: “Hong Kong Flu”

1-4 million deaths



1920

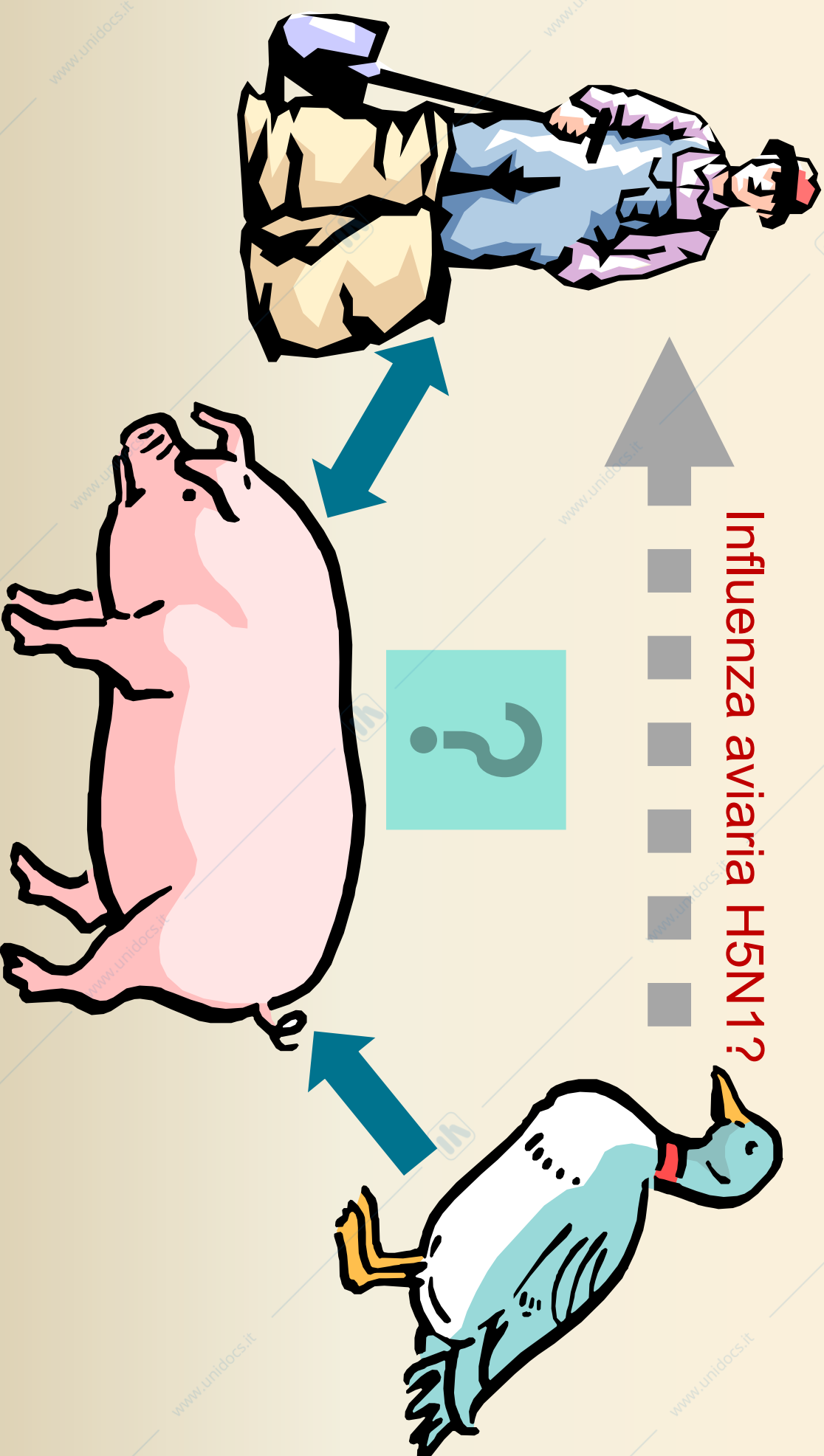
1940

1960

1980

2000

Il virus influenzale aviario può infettare direttamente l'uomo?

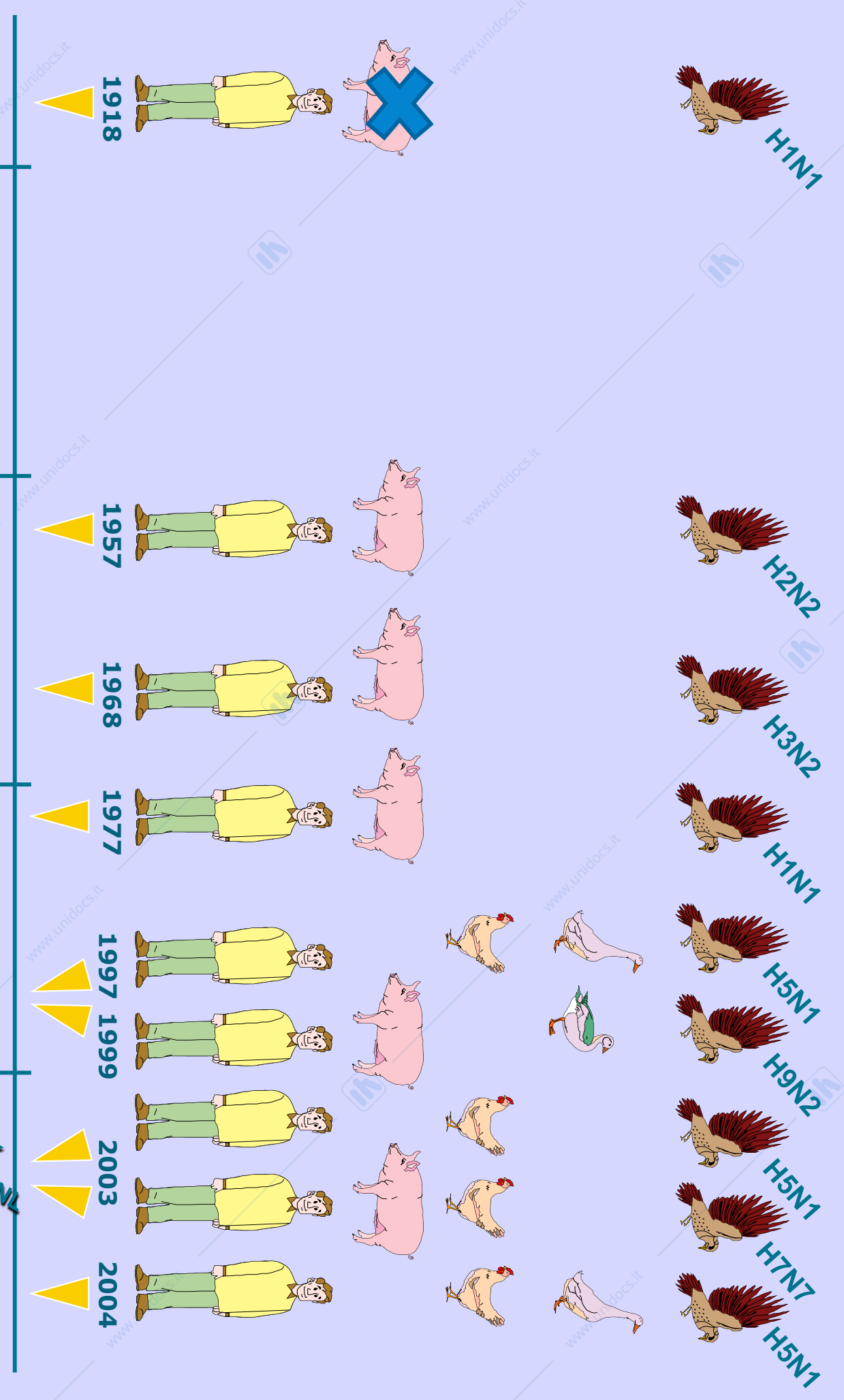


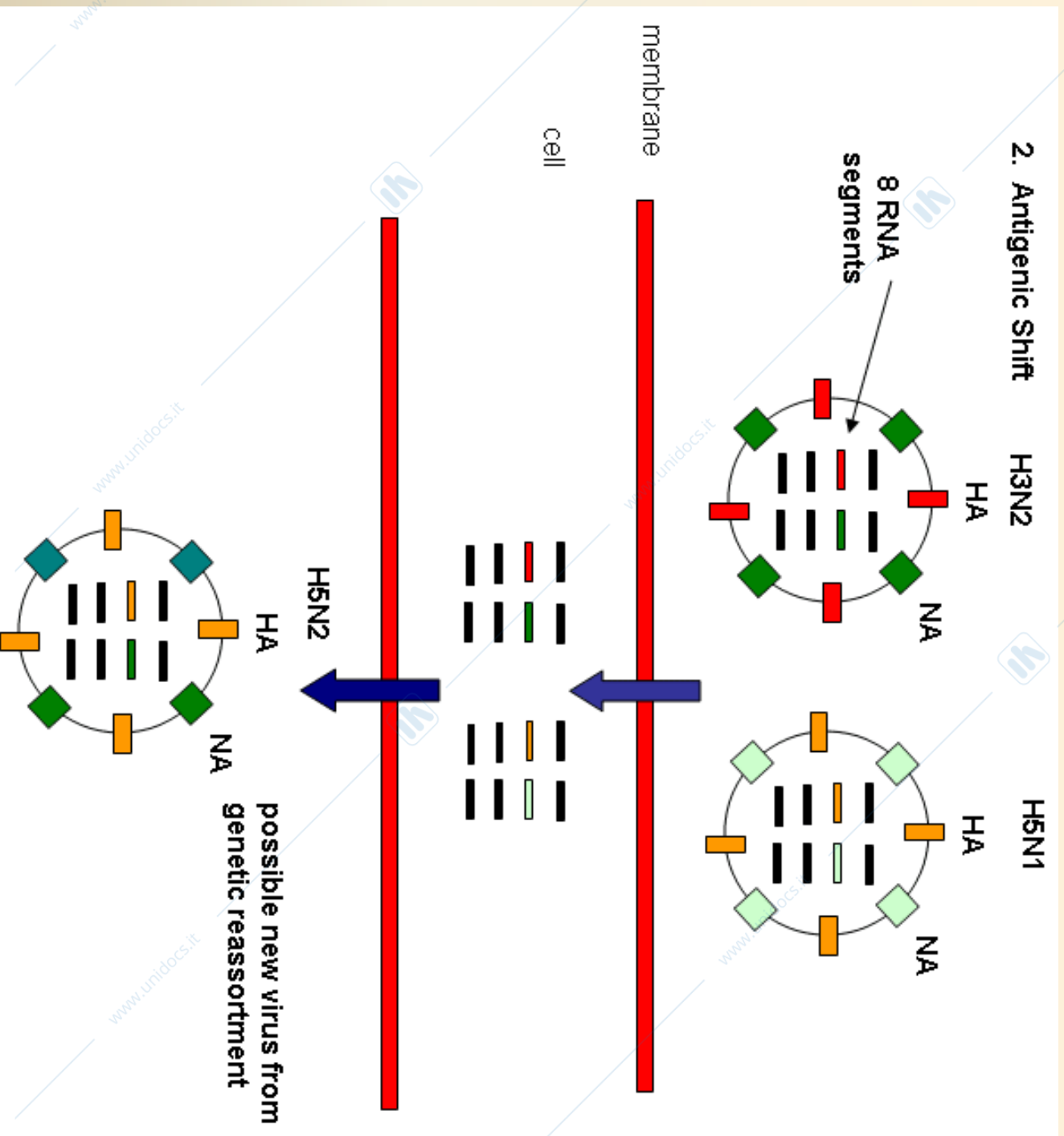
L' influenza negli ultimi 100 anni

R. G. Webster* et al., Science 2003; 302

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

Feb HK
March NL





Quello che si teme possa succedere

VIRUS INFLUENZALE H5N1

- H5N1 ha infettato l'uomo
- In Asia and Africa
 - 256 casi(12-1-03 10-16-06)
 - 151 (59%) fatali
- Pochissimi casi di infezione uomo-uomo
- La sorveglianza continua

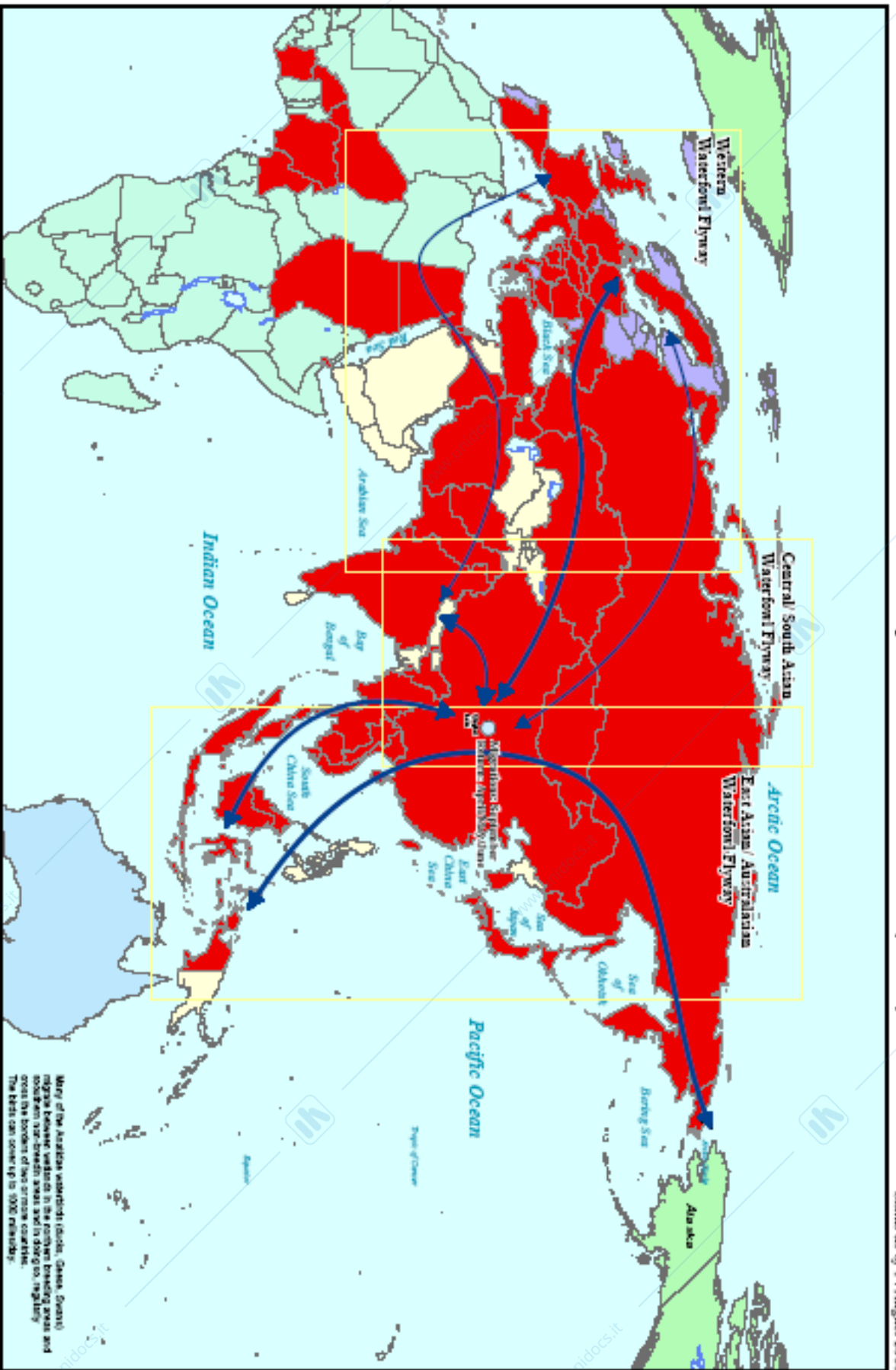
Variazioni nella sequenza aminoacidica del sito di legame col recettore e del sito di clivaggio della HA possono influire sul tropismo del virus e sulla sua patogenicità
(diversa sensibilità alle proteasi presenti nei tessuti)

Evidente nei ceppi aviari ad alta (HPAI) e bassa patogenicità (LPAI) del sierotipo H7N1

Variazioni nella sequenza aminoacidica del sito attivo della neuraminidasi possono influire sia sulla patogenicità, sia sulla sensibilità del virus ai farmaci antivirali

Countries with Confirmed Poultry and Wild Birds Cases (H5N1) Since 2003

Status as of 14 August 2005



Many of the Australian waterbirds (ducks, geese, swans) migrate between wetlands in the northern breeding areas and southern foraging areas with little stop to migrating. The birds can cover up to 5000 km/day.

Potential Migratory Routes for Avian Influenza (H5N1)

via Waterfowl Flyways from Current Areas of Concern in SE Asia.

Legend

	Africa		South America
	Antarctica		Europe
	Asia		North America
	Countries with H5N1 Cases		

Source:
 World Organisation for Animal Health
 World Health Organization
 World Food Programme

Created in ArcGIS 9 using ArcMap
 Created by Animal Health Branch



Ryan Pyle for The New York Times

Tearns vaccinating birds in China against avian flu walked door to door recently in a county in Anhui Province.

Pandemia influenzale

La comparsa di un virus influenzale completamente diverso da quelli precedenti non è di per sé sufficiente a determinare una pandemia. Occorre che il nuovo virus sia capace di trasmettersi da uomo a uomo in modo efficace.

Perché si generi una pandemia è necessario che:

- emerga un nuovo sottotipo virale nei confronti del quale la popolazione non abbia un adeguato patrimonio anticorpale.**
- il nuovo virus sia in grado di replicarsi nell'uomo.**
- il nuovo virus sia in grado di trasmettersi efficacemente da uomo a uomo, ovvero di creare una catena di trasmissione.**

Vol. 459 | 8 June 2009 | doi:10.1038/nature08157

nature

REVIEWS

Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus

Gabriele Neumann¹, Takeshi Noda² & Yoshihiro Kawaoka^{1,2,3,4}

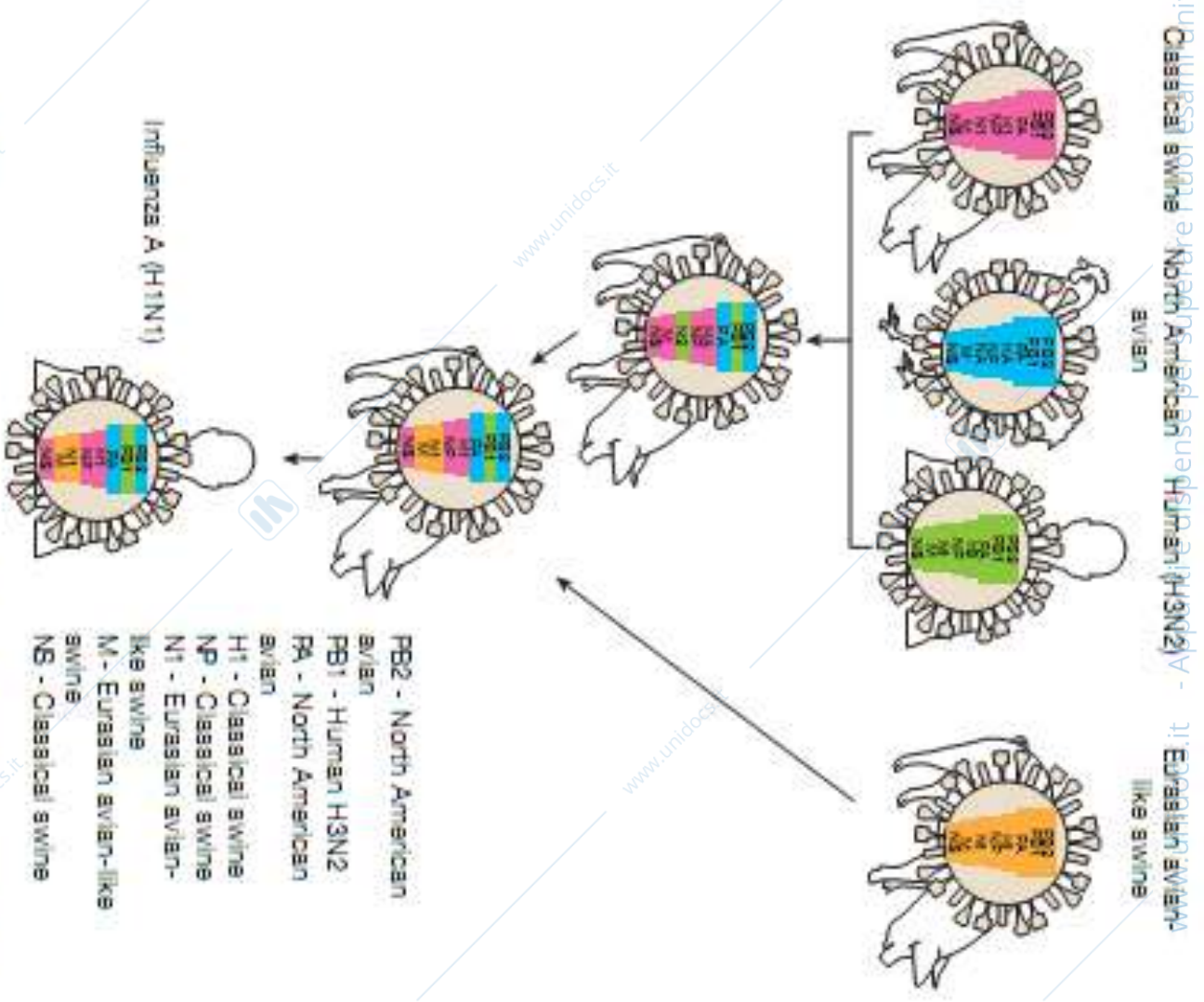


Figure 4 | Genesis of swine-origin H1N1 influenza viruses. In the late 1990s, reassortment between human H3N2, North American avian, and classical swine viruses resulted in triple reassortant H3N2 and H1N2 swine viruses that have since circulated in North American pig populations. A triple reassortant swine virus reassorted with a Eurasian avian-like swine virus, resulting in the S-OIVs that are now circulating in humans

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

Pigs infect Humans

- Pigs can pass mutated viruses back to humans, and these can be passed from human to human.
- Transmission among humans is thought to occur in the same way as with seasonal flu.



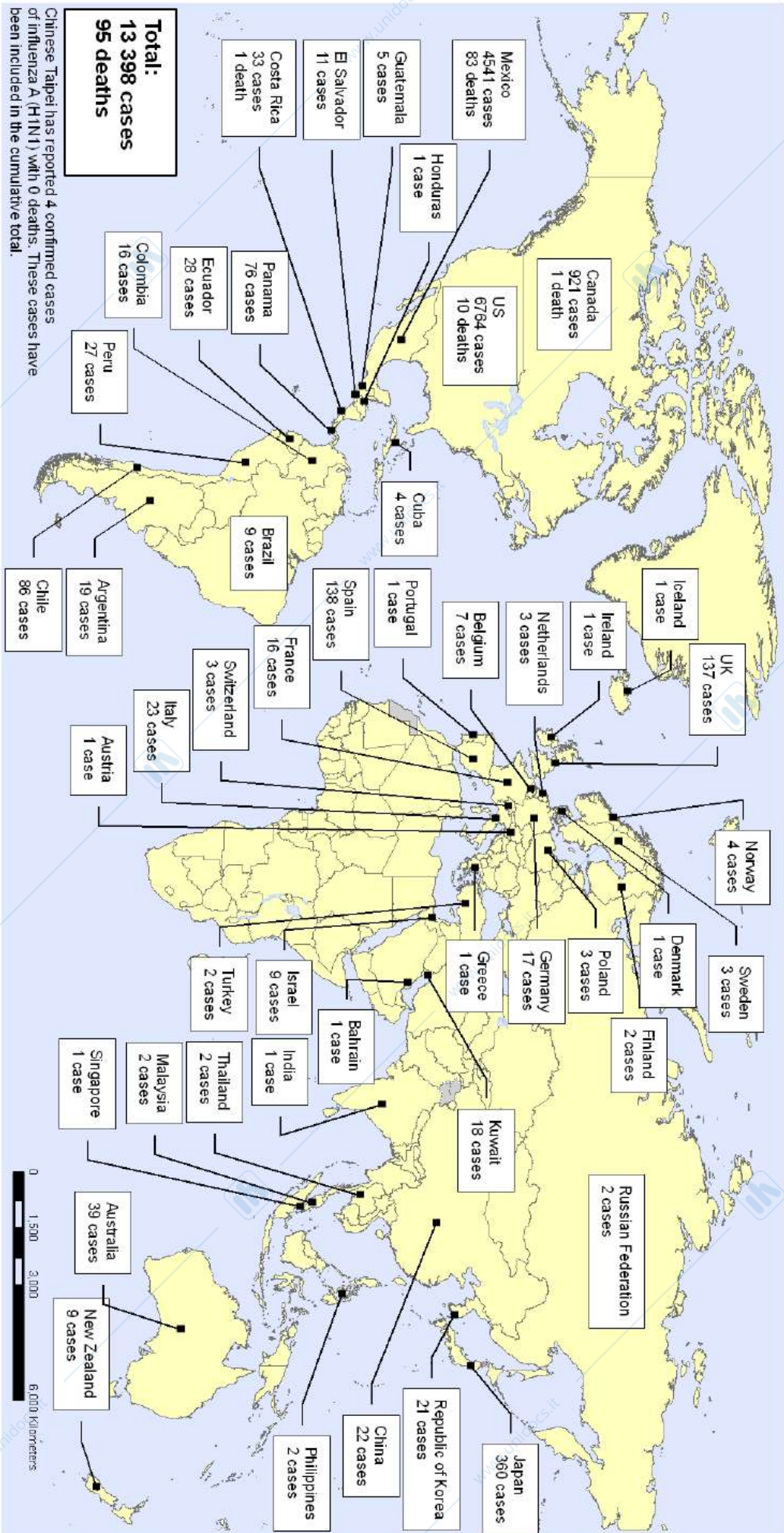


Transmission of swine influenza virus to human



New Influenza A (H1N1), Number of laboratory confirmed cases and deaths as reported to WHO

Status as of 27 May 2009
06:00 GMT



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Map produced: 27 May 2009 06:30 GMT

Data Source: World Health Organization
Map Production: Public Health Information and Geographic Information Systems (GIS)
World Health Organization



© WHO 2009. All rights reserved

FASI E LIVELLI DI RISCHIO DI UNA EVENTUALE PANDEMIA

FASE 1-2
INFEZIONI A PREVALENZA ANIMALE

PERIODO
INTERPANDEMICO

FASE 3
INFEZIONE NELL'UOMO
MA ASSENZA DI TRASMISSIONE INTERUMANA
(DA UOMO A UOMO)

FASE 4
POCHI CASI - LIMITATA TRASMISSIONE INTERUMANA
IL VIRUS NON E' BEN ADATTATO ALL'UOMO

PERIODO
DI ALLERTA
PANDEMICO

FASE 5
DIFFUSIONE INTERUMANA ANCORA LOCALIZZATA
IL VIRUS MIGLIORA IL SUO ADATTAMENTO ALL'UOMO
IL VIRUS NON E' ANCORA PIENAMENTE TRASMISSIBILE

FASE 6
AUMENTATA E PROLUNGATA TRASMISSIONE
NELLA POPOLAZIONE GENERALE

PERIODO
PANDEMICO

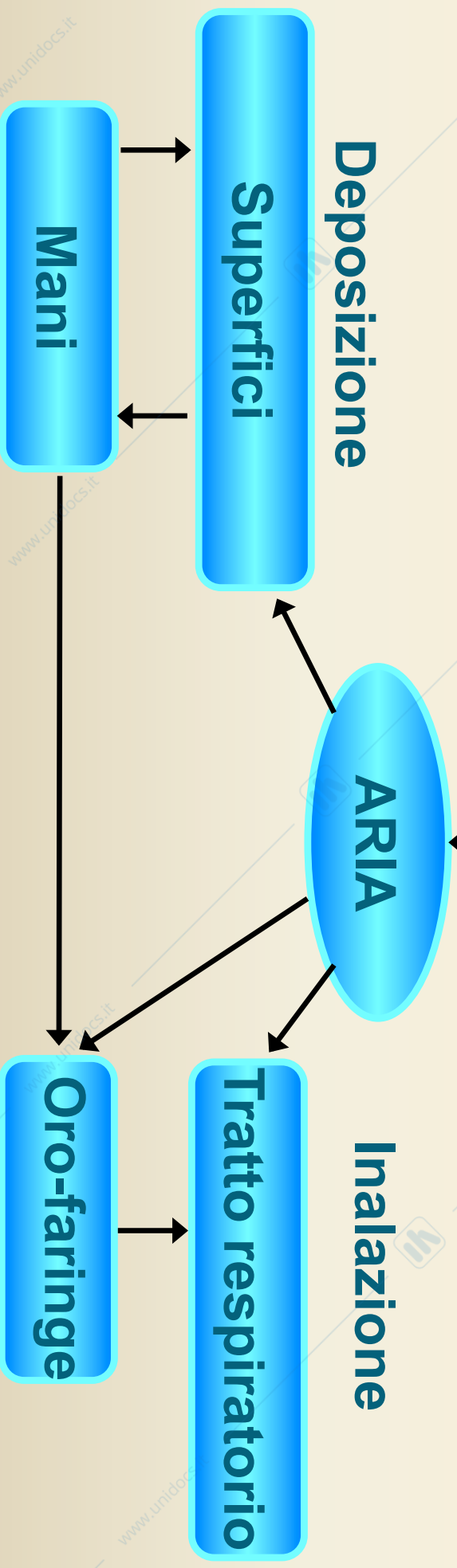
Fonte: CDC e Ministero Lavoro, Salute e Politiche Sociali - Direzione generale Prevenzione sanitaria

TRANSMISSIONE DA UOMO A UOMO

Semidiretta tramite goccioline di Flügge
o aerosol da soggetti infetti



da 100,000 a 1,000,000
virioni per gocciolina



PATOGENESI ED IMMUNITÀ:

- Contagio per via respiratoria, aerosol
- Sindrome influenzale (febbre, malessere, mialgia, mal di testa).
- Complicazioni: infezioni batteriche secondarie (polmoniti !)
- Polmonite virale primaria (rara), implicazioni dei muscoli e SNC.
- Il recupero è associato all'IFN e alla CMI
- Le IgAs prevenngono l'infezione perché bloccano l'attacco
- Le IgG bloccano la viremia e l' IFN

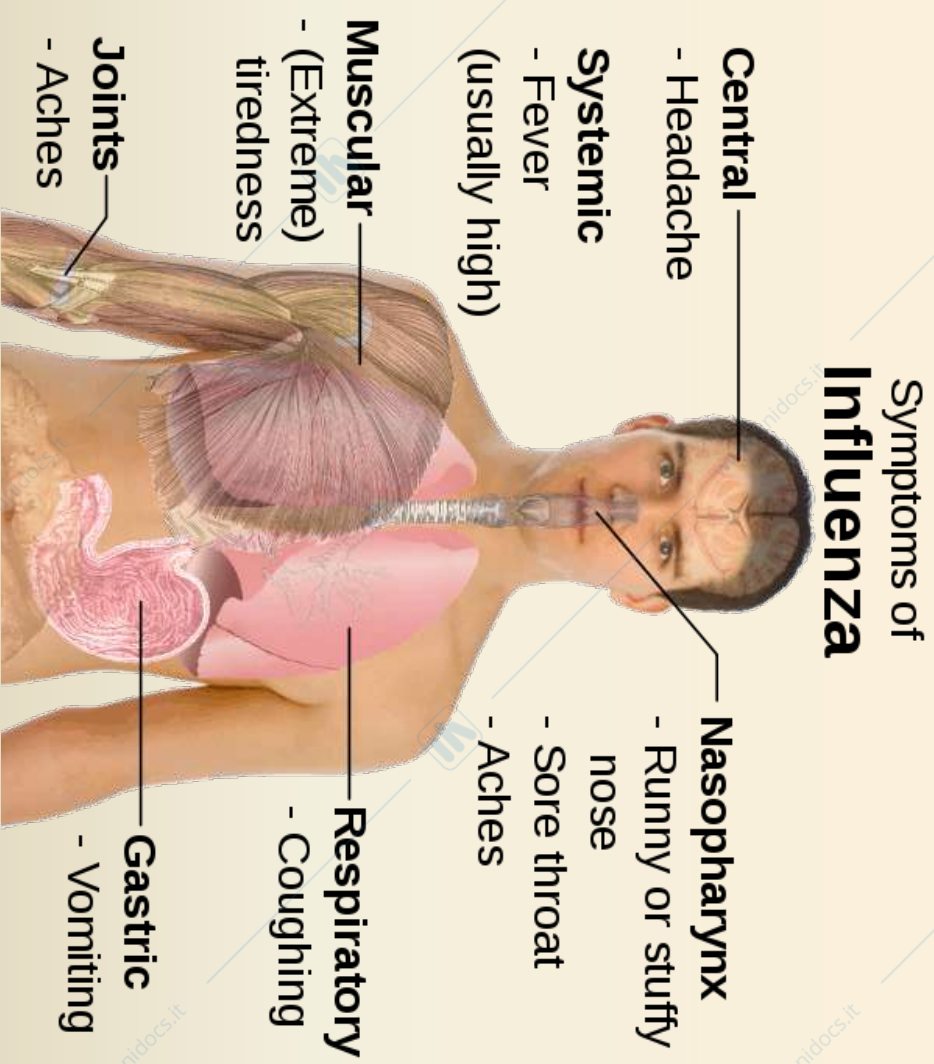


I sintomi dell'influenza

**Periodo d'incubazione da
1 a 4 giorni**

Sintomi più comuni

- Febbre (39-40°C)
- Mialgia
- Gola infiammata
- Brividi
- Perdita d'appetito
- Tosse secca
- Mal di testa
- Astenia



Meccanismi patogenetici

Il virus stabilisce infezione del tratto respiratorio superiore

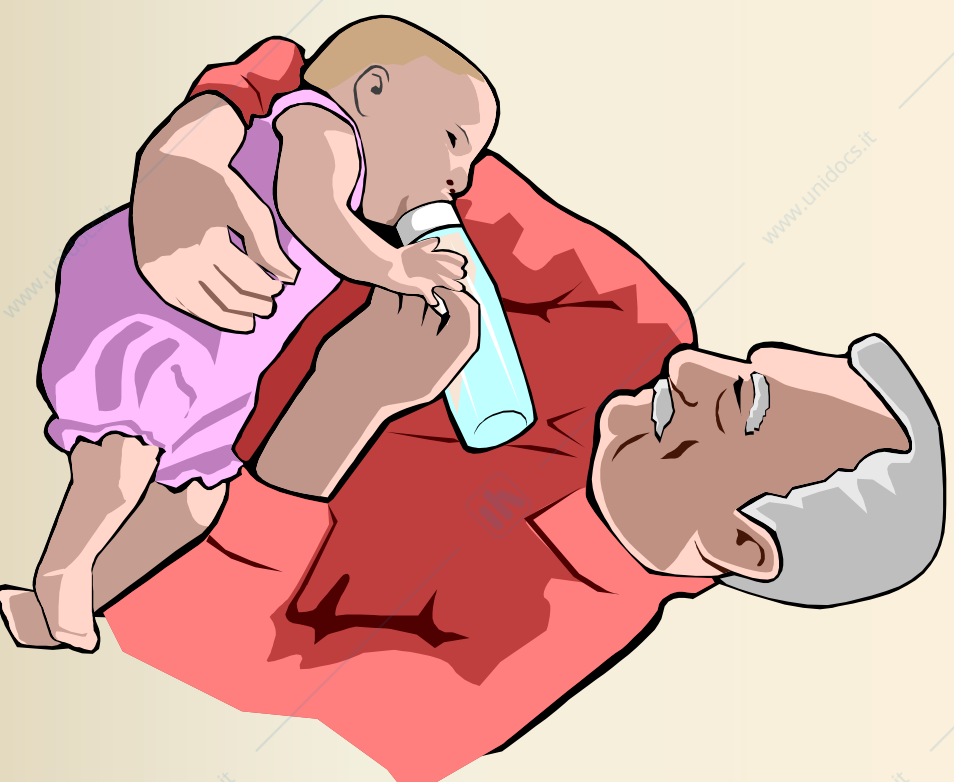
- **NA facilita la infezione scindendo l'acido sialico del muco ed esponendo le cellule epiteliali**
- **Le difese locali (ciglia e produzione di muco) vengono compromesse**
- **Forte RISPOSTA INFIAMMATORIA LOCALE A LIVELLO DELLA MUCOSA con linfociti e monociti (pochi PMN)**
- **Edema della sottomucosa**

- **i sintomi locali si debbono al**
DANNO CELLULARE a livello epiteliale
- **i sintomi sistemici sono dovuti alla**
RISPOSTA IMMUNE verso il virus (soprattutto
IFN- γ e citochine prodotte dalle cellule infette)
- **Quindi: IFN- γ e CMI (linfociti T) sono importanti sia**
per la risoluzione che per la immunopatogenesi
- **Gli Ab sono importanti per la protezione contro**
epitopi HA e NA, ma sono specifici per ciascun
ceppo virale
- **La HA e la NA del tipo A subiscono modificazioni**
genetiche che rendono più suscettibile l'uomo.
- **Il tipo B ha solo minori cambiamenti antigenici**

DATI CLINICI

■ GRAVITA'

- NEONATI
- ANZIANI
- IMMUNO-COMPROMESSI
- PAZIENTI CON PATOLOGIE AL CUORE O AL POLMONE



COMPLICAZIONI POLMONARI

- FARINGITE (INFANTI, ADOLESCENTI)
- POLMONITE PRIMARIA
- INFEZIONE BATTERICA SECONDARIA
- *Streptococcus pneumoniae*
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Hemophilus influenzae*

COMPLICAZIONI NON-POLMONARI

- Miosite (rara, > in bambini, > con tipo B)
- complicazioni cardiache
- encefalopatia
- fegato and CNS
 - Reye's syndrome
- sistema periferico nervoso
 - Guillian-Barré syndrome

PROTEZIONE CONTRO la RE-INFEZIONE

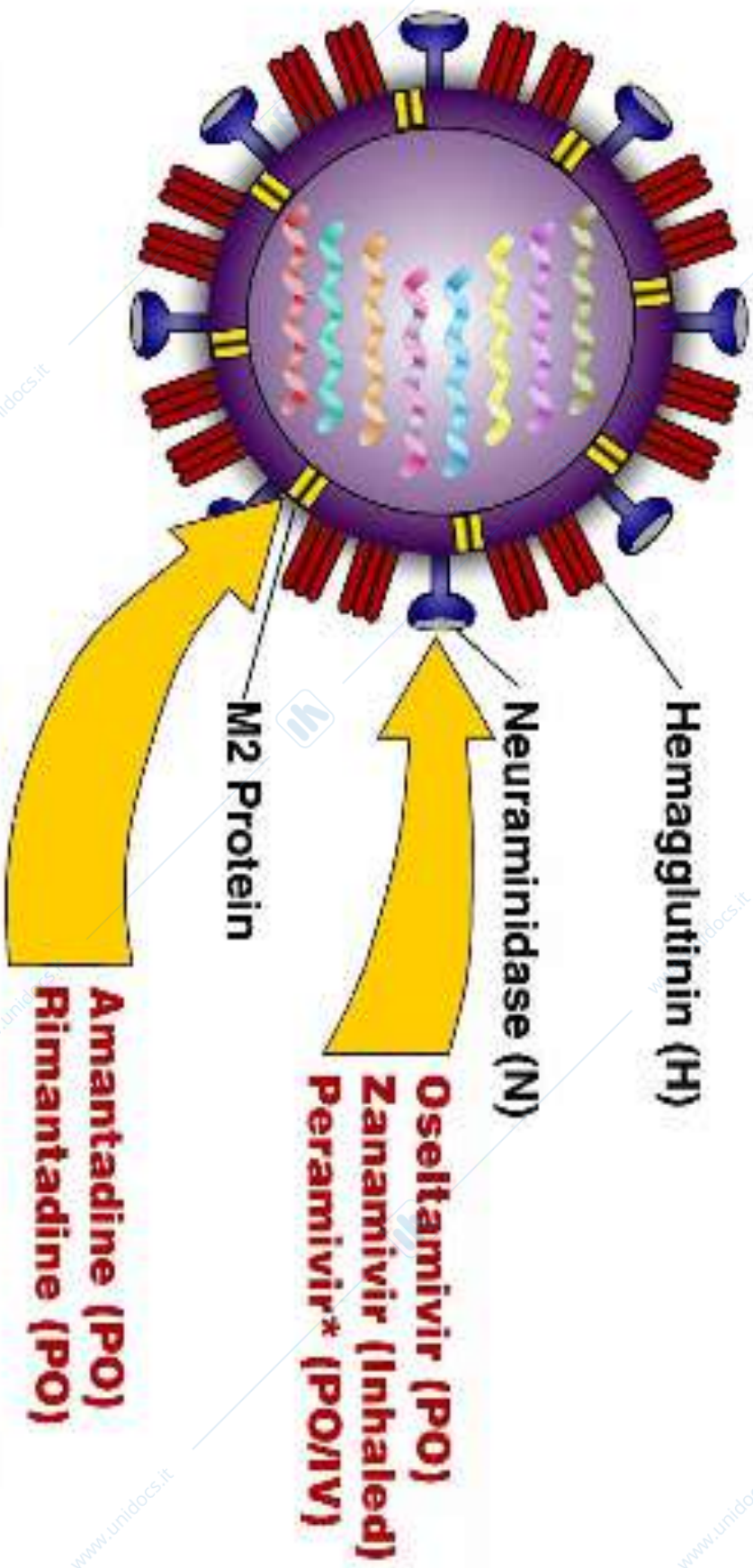
- IgG and IgA
 - IgG meno efficienti MA più durature
- Anticorpi verso HA ed NA importanti
 - Anticorpi verso HA più importanti (possono neutralizzare il virus)

DIAGNOSI

- ISOLAMENTO
- SIEROLOGIA
- PCR



Antiviral Therapies for Influenza

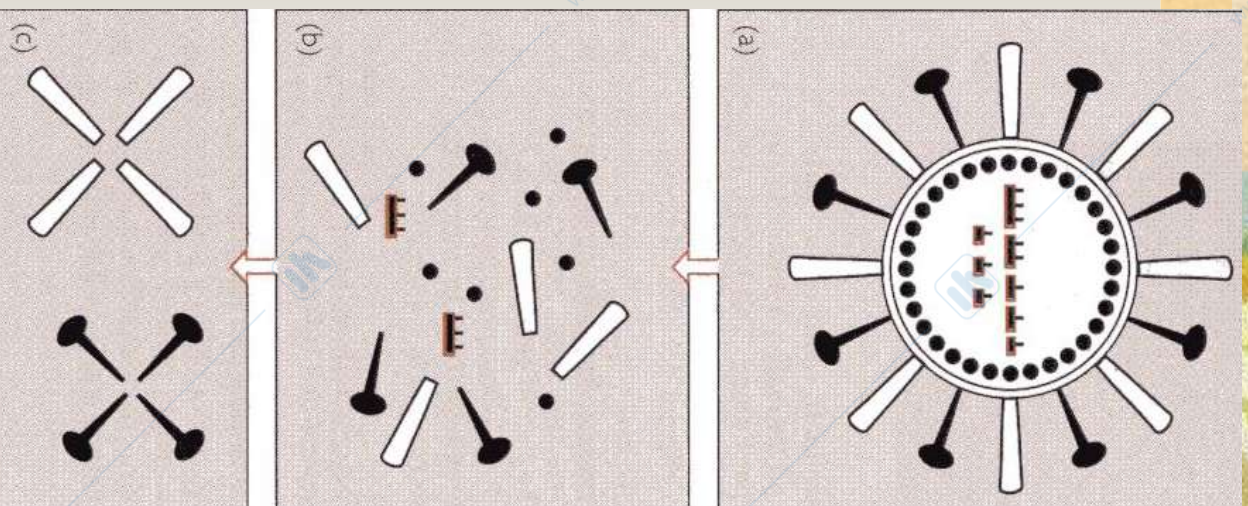




VACCINO

(la cui composizione antigenica viene prevista da un comitato di sorveglianza diversi mesi prima della circolazione virale)

- Inattivato
- Cresciuto su uova embrionate di pollo
- Vaccino riassortante vivo approvato 2003



TIPDI VACCINI INATTIVATI

- **Vaccini a base di virus intero (1945)**

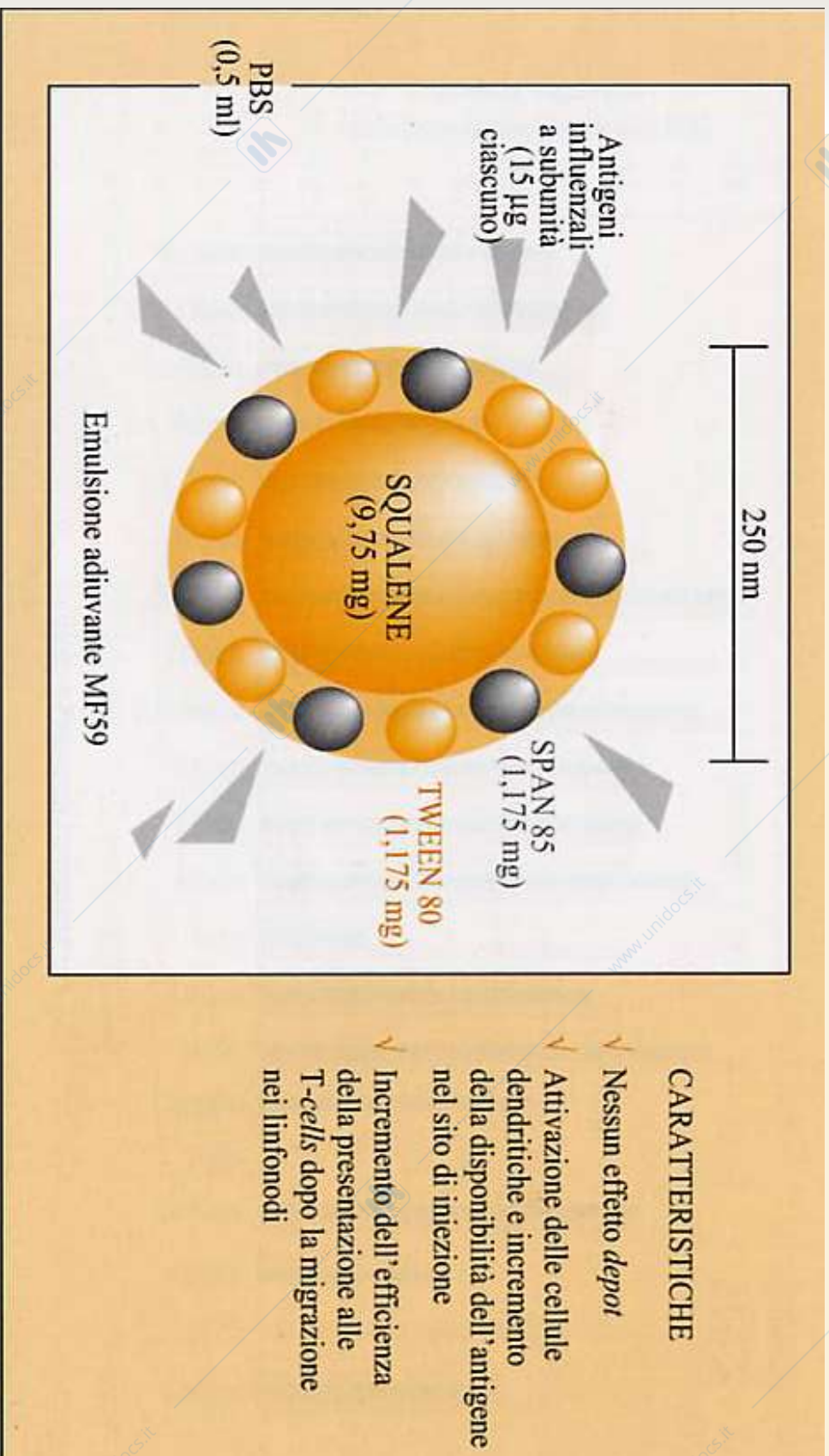
- **Vaccini sub-virionici**

Split: virus frammentati con detergente (glicoproteine superficiali e frammenti di altri costituenti virali) (1964)

Subunità: glicoproteine superficiali (HA e NA) purificate (1976)

(L. Collier, J. Oxford, VIROLOGIA MEDICA Zanichelli 1996)

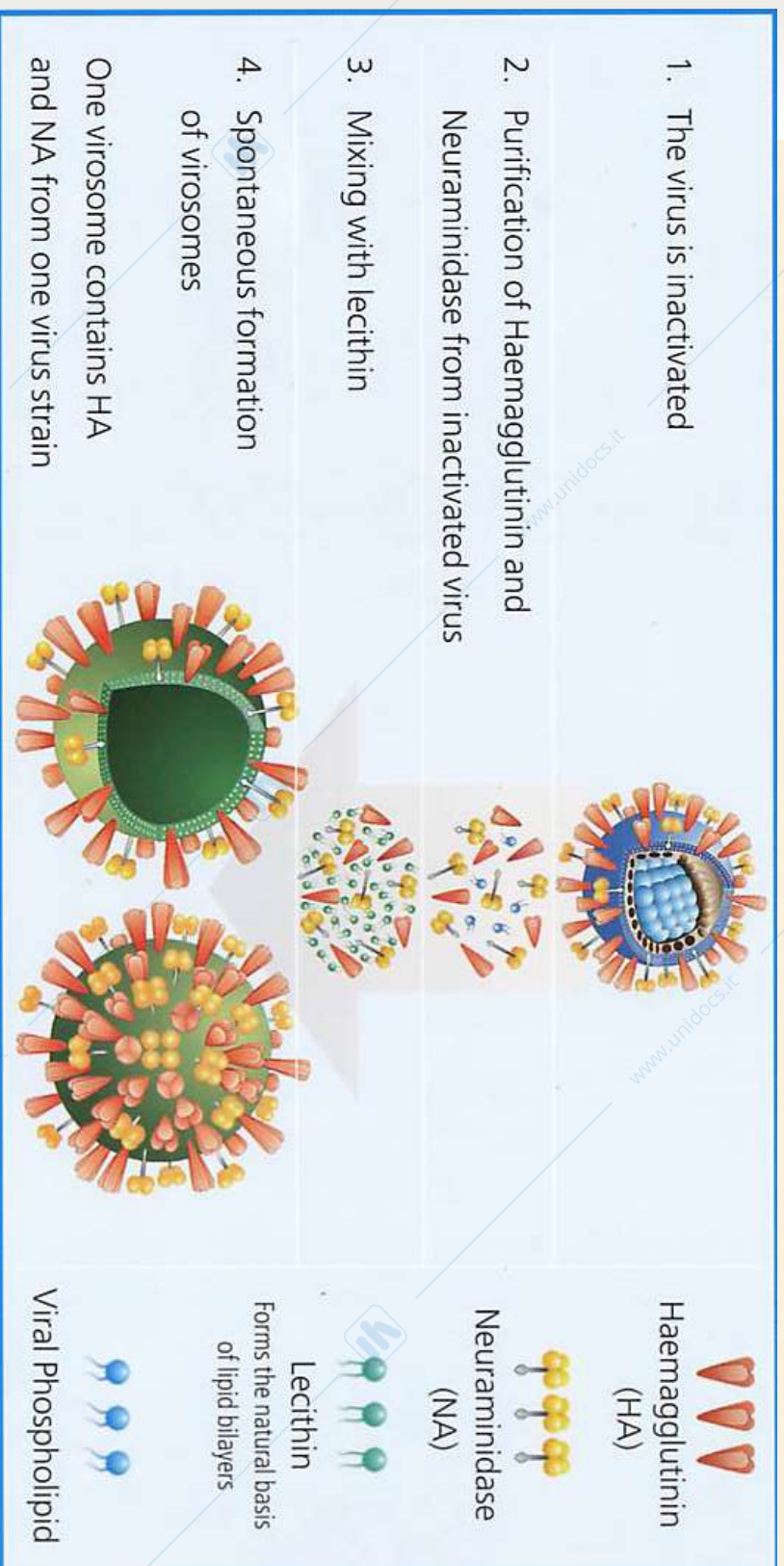
■ Vaccino a subunità con adiuvante MF-59 (emulsione olio-acqua contenente squalene, Tween 80 e Trioleato di sorbitano)



(M. Dupuis et al. Eur. J. Immunol. 2001)

Vaccino con virosomi

Virosomi: vescicole formate da un doppio strato di lipidi nel quale sono incorporate HA e NA. Manca l'acido nucleico virale



(Jr. Cysz, R. Gluck Dev. Biol. Stand. 1998)

Perché è importante



➤ Evoluzione dei virus

- Nuovi virus emergenti (TOSV; H1N1 2009)
- Farmacoresistenza (HIV, HCV)

➤ Management delle infezioni virali

- Patogenesi
- Vaccini
- Terapia genica

Capire complessivamente l'organizzazione funzionale del genoma virale



VIROLOGIA SPERIMENTALE

Fields Virology, 6th Edition, 2014; Volume 1, Chapter 2

CENNI STORICI

1940-1960

Batteriofagi T7-T4

Studi di:
complementazione,
ricombinazione e analisi
fenotipica di mutanti

1950-1970

Colture cellulari

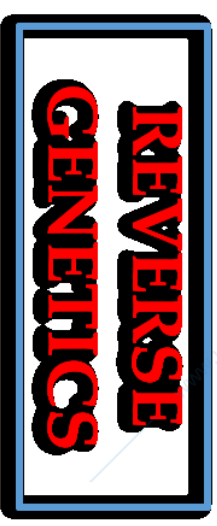
Studio della maggioranza
delle famiglie virali

1970

Tecnologie degli ac.
nucleici

Studio dei genomi virali
mediante mappatura
genomica con uso di
enzimi di restrizione e
tecniche di
sequenziamento del DNA

POST GENOMIC AREA

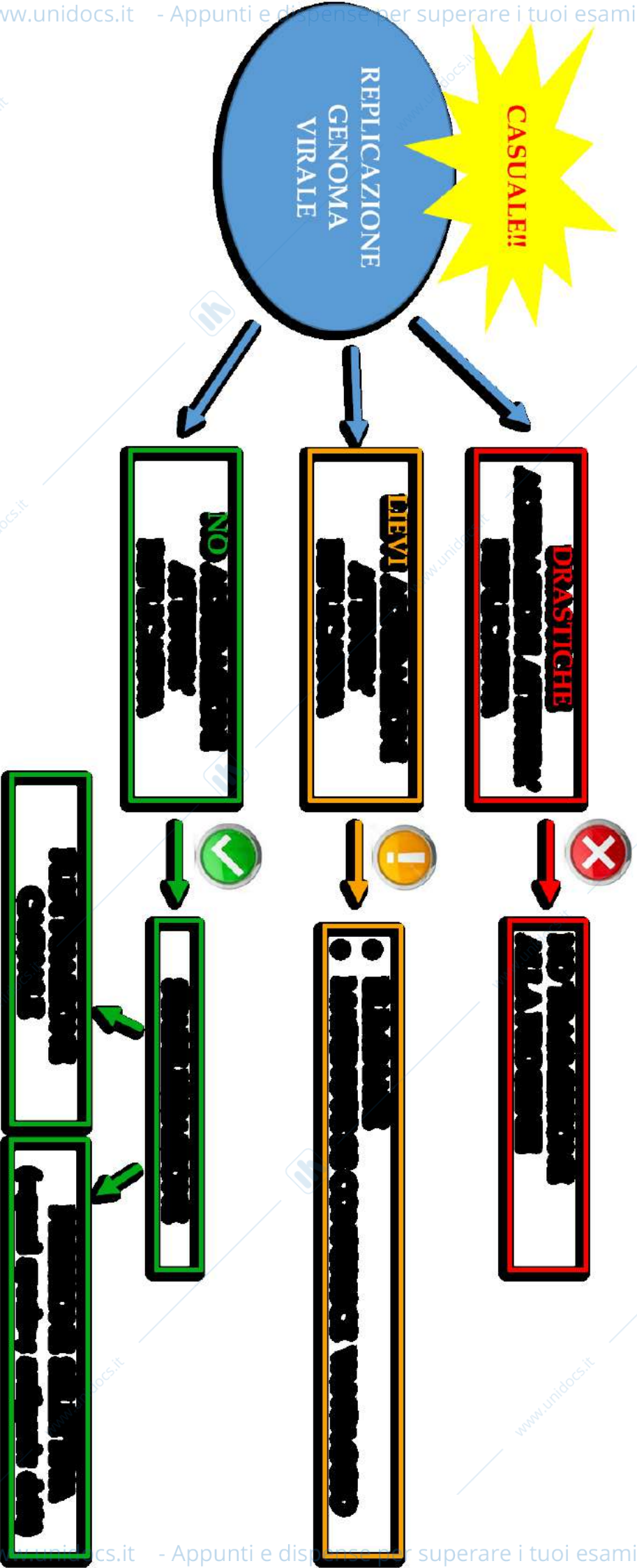


“Reverse genetics is a
discipline that involves the use
of genetic manipulation to
study an organism’s altered
phenotype»

Kibrnyesfa Bayou. International Journal
of Genetics 7(2): 31-37, 2017

-terapia genica
-studio di nuovi vaccini

QUANDO AVVENGONO QUESTI CAMBIAMENTI?



Evoluzione 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:

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

quando il cambiamento genetico **NON ALTERA** LA

CAPACITA' RIPRODUTTIVA del virus esso si trasmetterà **alla progenie**

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

Coevoluzione

- La coevoluzione viene definita come "il cambiamento evolutivo che avviene in due o più popolazioni o specie, che esercitano una influenza selettiva reciproca".
- Ciascuna delle specie coinvolte *influenza la fitness* dell'altra, di conseguenza esse evolvono insieme.

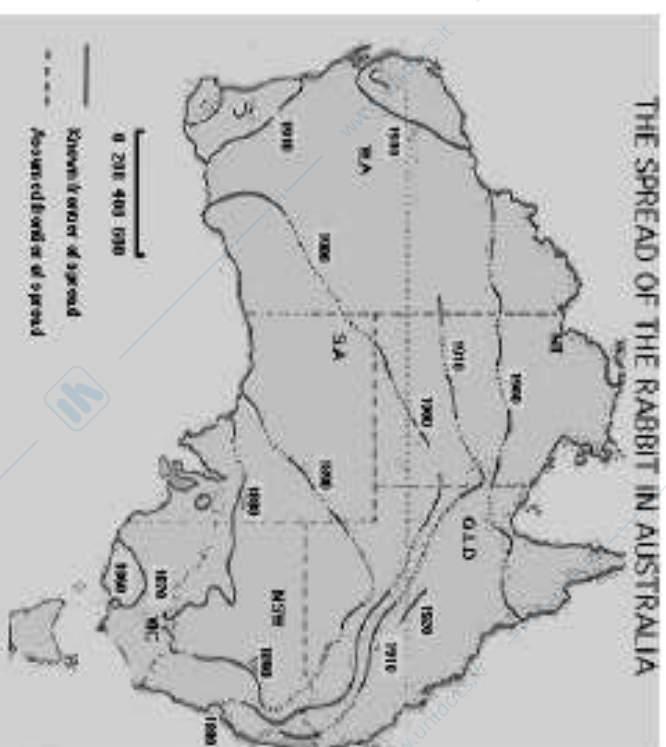
Il termine "coevoluzione" è stato coniato da Charles Mode, un ecologo matematico che studiava le interazione pianta-patogeno, ma fu reso popolare da Paul Erlich e Peter Raven in un famoso articolo del 1964: "Butterflies and plants: a study in coevolution" (Evolution, 18: 586-608), in cui dimostrarono come specie di farfalle strettamente affini dipendessero per il cibo da specie di piante a loro volta strettamente affini.

Coniglio Europeo vs Myxoma virus

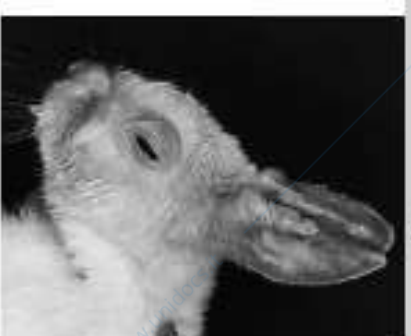
(un sistema ospite-parassita)

• Il coniglio europeo venne introdotto in Australia nel 1859

• Per controllare l'invasione dei conigli in Australia, negli anni '50 vennero liberati esemplari infetti da mixomatosi: il numero dei conigli diminuì bruscamente



Dittero che trasmette il virus
Donatella Cesaroni – Riproduzione vietata



Coniglio

virus del
Myxoma

Coniglio Europeo vs Myxoma virus

• La prima ondata di infezione da mixomatosi uccise il 99.8% di conigli infetti. La seconda e la terza ondata uccisero soltanto il 90% e il 40-60% rispettivamente della popolazione di conigli.

• Dagli anni '60, l'effetto del virus si attenuò parecchio e il tasso di mortalità dei conigli diminuì drasticamente.

Cosa ha causato il declino della letalità della mixomatosi nei conigli in Australia?

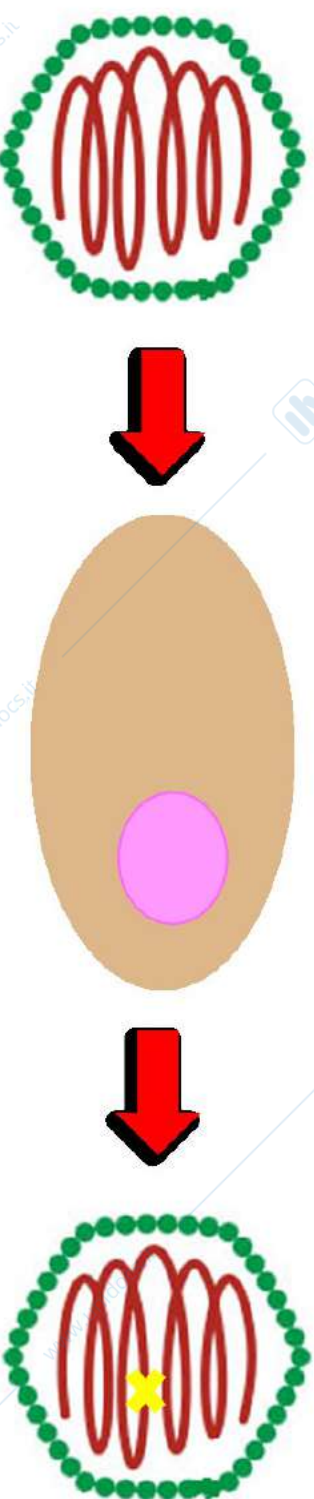


Coniglio Europeo vs Myxoma virus

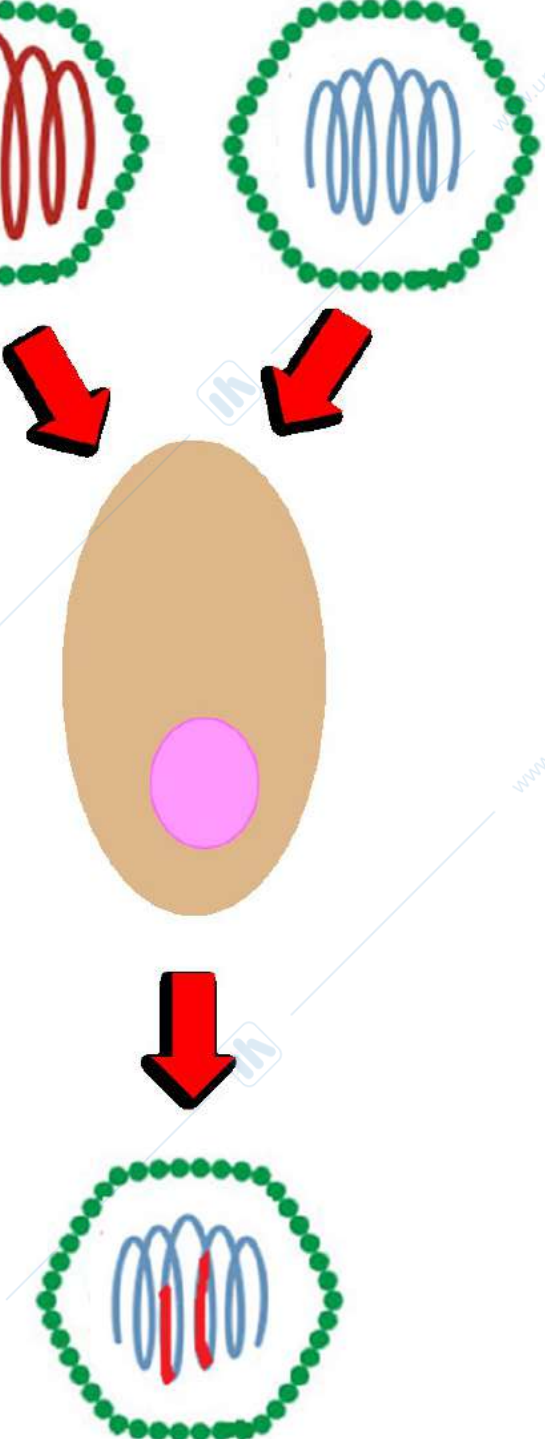
Risposte evolutive

- Esperimenti con ceppi controllati di ospite (coniglio) e parassita (mixoma) hanno dimostrato che
- A) dopo un certo numero di generazioni, i conigli evolvono rapidamente una resistenza all'infezione dovuta allo stesso ceppo, che provoca effetti molto minori (> 10 anni, mortalità cala dal 100% al 67%)
- B) Il virus evolve una bassa virulenza (la selezione per una virulenza minore favorisce la trasmissione a nuovi ospiti) e l'infezione in linee non selezionate di conigli provoca minor mortalità

CAMBIAMENTI NEI VIRUS



Un virus infetta una cellula e si replica commettendo un errore, generando così un **MUTANTE**



Due virus infettano la stessa cellula e si replicano scambiandosi parti del genoma, generando un **RICOMBINANTE**

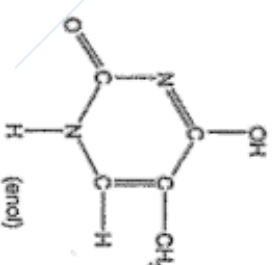
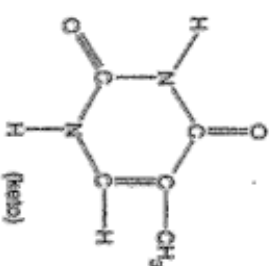
ORIGINE DI MUTAZIONI

- SPONTANEE
- INDOTTE FISICAMENTE
 - UV
 - X-rays
- INDOTTE CHIMICAMENTE

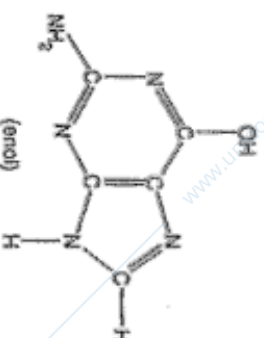
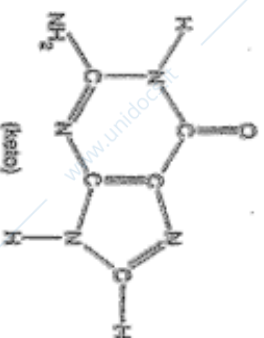
ORIGINE DI MUTAZIONI

- SPONTANEA
 - FORME TAUTOMERICHE DI BASI
- ERRORI DELLA POLIMERASI

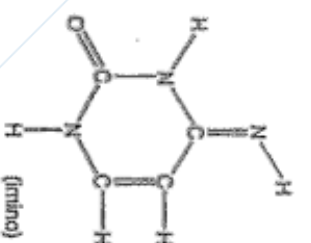
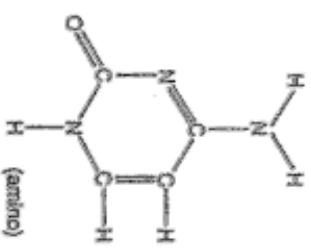
Forme Tautomeriche di basi



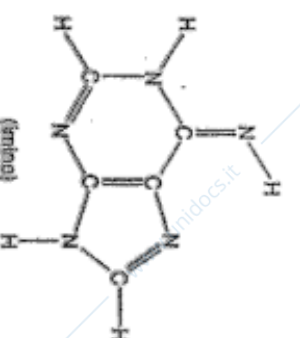
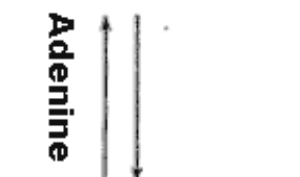
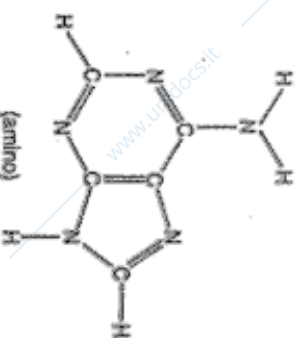
Thymine



Guanine



Cytosine



Adenine

most of time

rarely

Mutazioni puntiformi

- Sono i più frequenti eventi genetici responsabili di alterazioni ereditarie delle caratteristiche virali
 - indotte da mutageni fisici o chimici (raggi X, UV)
 - 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^{-11} per nucleotide per 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 a errori di copiatura

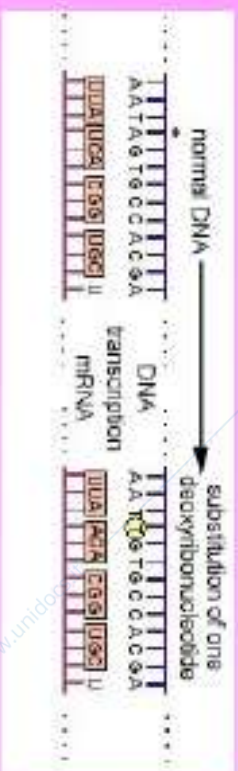
Le **trascrittasi inverse (DNA-polimerasi-RNA-dipendenti)** di HBV e dei

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

Mutazioni

Mutazioni puntiformi

Sostituzione di un Nucleotide



Mutazione silente



Mutazione non senso



Mutazione conservativa non conservativa



Mutazioni Frame-Shift

Delezione di un Nucleotide



Inserzione di un Nucleotide



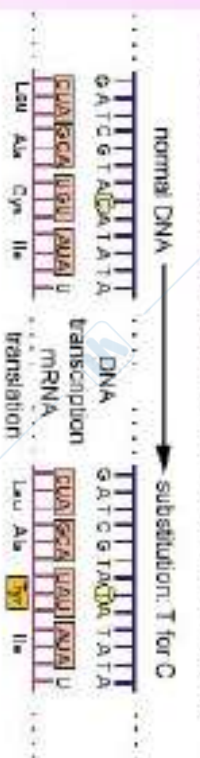
Stesso aminoacido, stessa proteina



Prematuro arresto della proteina



Diverso aminoacido, proteina mutata



Diversa proteina



Mutazioni

- 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)

Es: Una modificazione di una proteina del capside o del peplio di un virus può riflettersi in modificazioni delle proprietà antigeniche e/o delle proprietà emagoglutinanti e/o della capacità di infettare determinate cellule, ecc.

- Le mutazioni raramente sono vantaggiose, nella maggioranza dei casi sono indifferenti, parzialmente deleterie o letali.

mutazioni indifferenti sono quando l'aminoacido sostituito è simile all'aminoacido 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.

Mutazioni

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

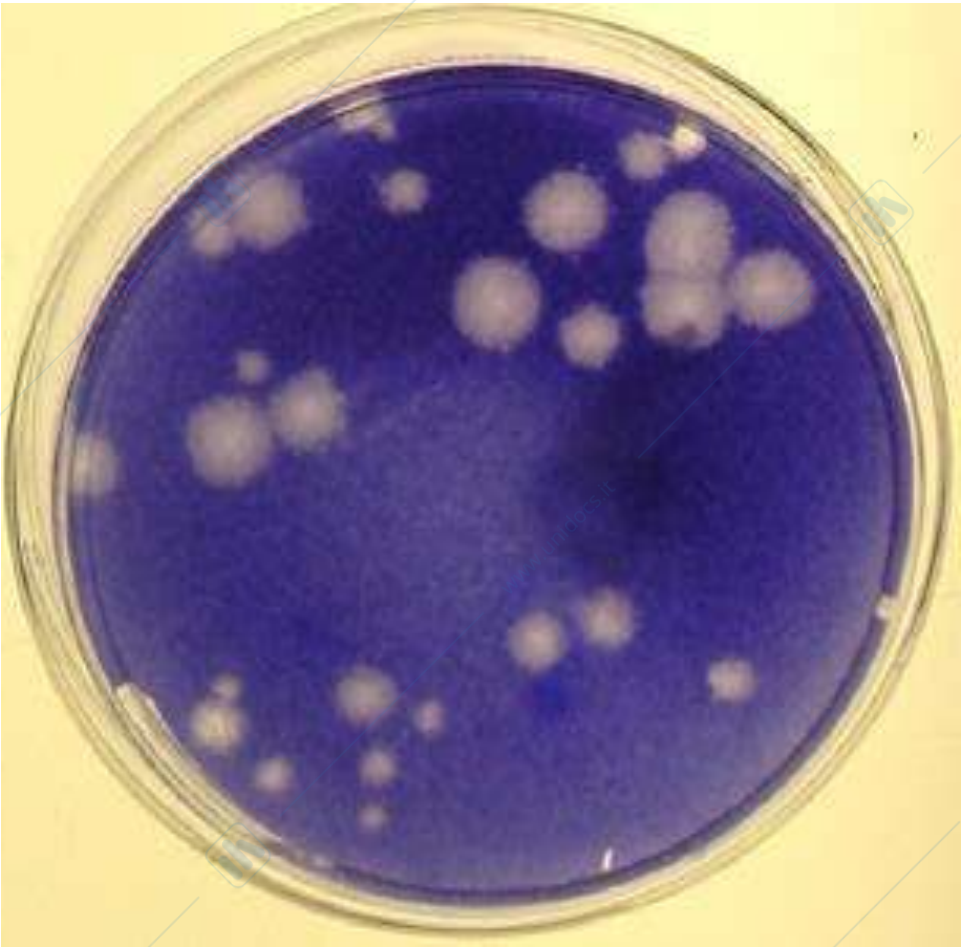
deriva antigenica: progressivo e continuo cambiamento delle caratteristiche antigeniche virali

mutanti farmaco resistenti con acquisizione del ceppo virale di resistenza farmacologia nei confronti di uno o più farmaci inibenti la funzione della proteina virale mutata

Es: Mutanti di 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).

FENOTIPI

- CARATTERISTICHE DI UN ORGANISMO



•Mutante di placca

CAMBI FENOTIPICI

- **CONDIZIONALE LETALE** - Moltiplica in particolari condizioni, ma non altre
- Mutanti temperatura-sensibili (ts); non crescono ad alte temperature
- Mutanti d'ospite non crescono in tutti i tipi cellulari come ad es. il "wild type".

CAMBI FENOTIPICI

- **DIMENSIONE DI PLACCA**
 - Può mostrare alterata patogenicità
- **RESISTENZA AI FARMACI**
- **MUTANTI DEFICIENTI DI ENZIMA**

LE INTERAZIONI TRA VIRUS DIFFERENTI IN
INFEZIONI MISTE HANNO FACILITATO

L'ANALISI GENETICA DI VIRUS.



● RICOMBINAZIONE INTRAMOLECOLARE (x notturna e inibizione) {virus a DNA}

● RICOMBINAZIONE PER SCELTA DI COPIA {virus a RNA
Retrovirus}

● RICOMBINAZIONE PER RIASSORTIMENTO (virus a genome segmentato: Orthomyxov., Reov., Bunyov.)

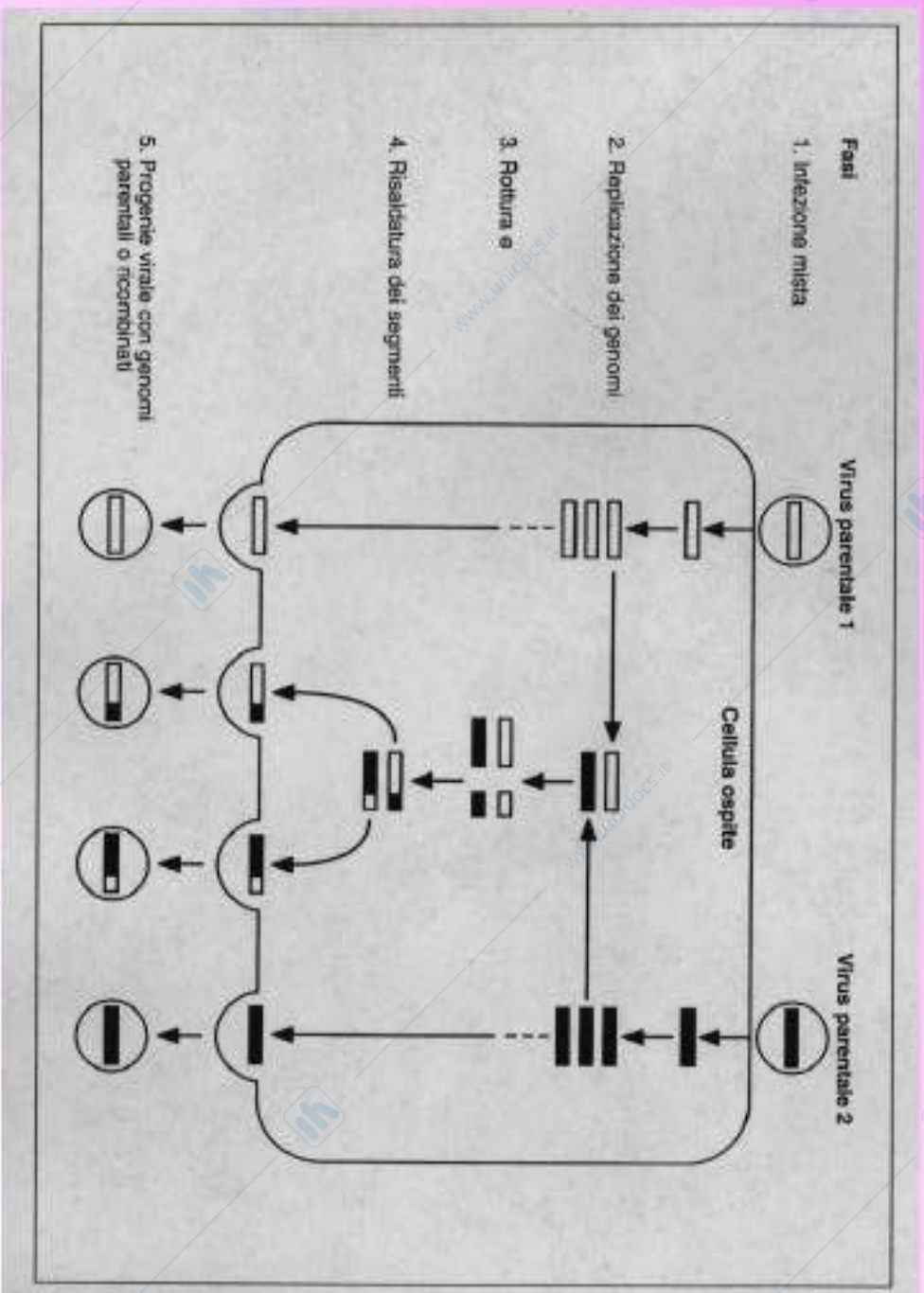
● RIATTIVAZIONE GENETICA (spesso in caso speciale di ricombinazione)

(Vaccini prodotti con virus UV inattivati)
o ricombinazione

RICOMBINAZIONE

Scambio di informazione tra due genomi

Ricombinazione nei virus a DNA



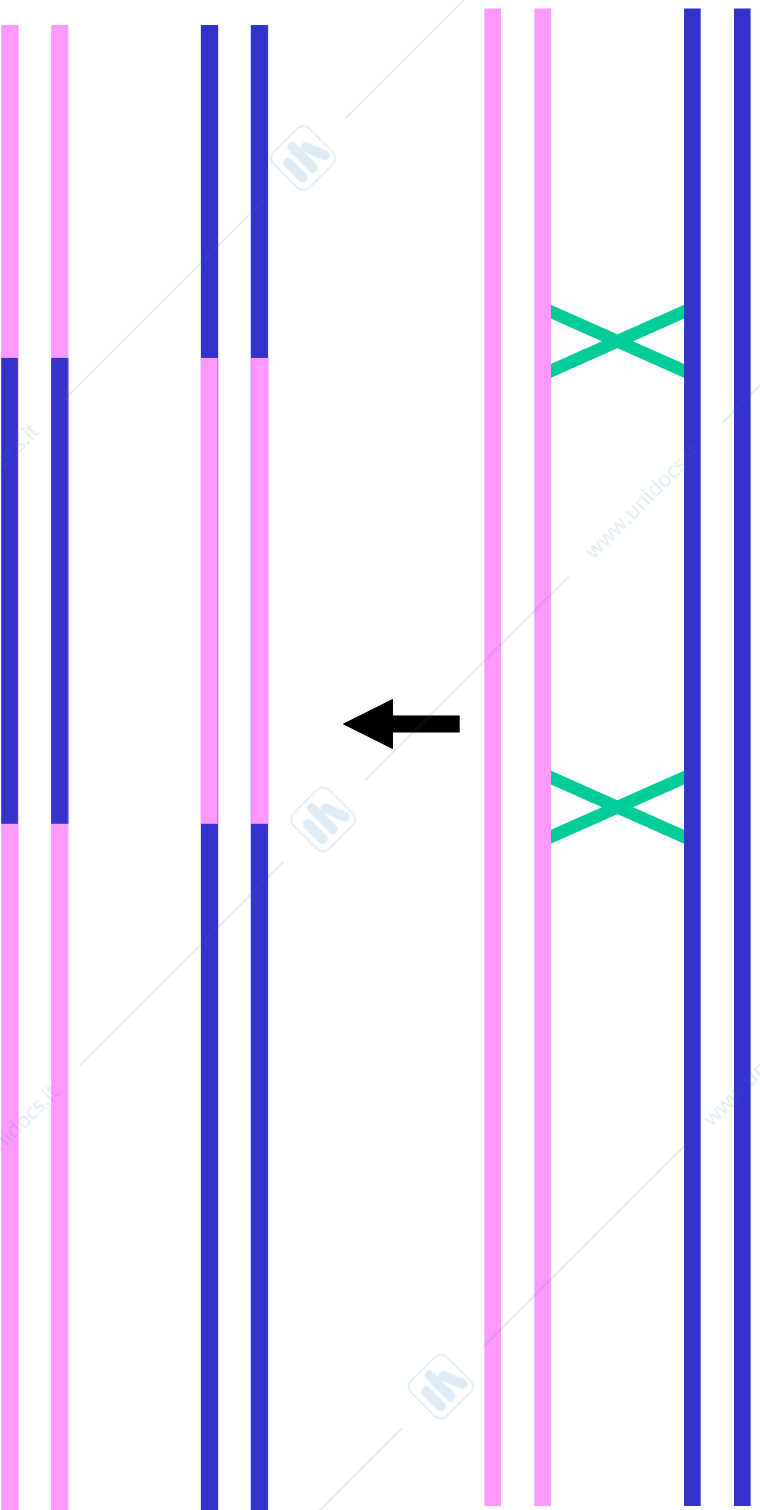
Ricombinazione virale per rottura e ricongiungimento di filamenti genomici neosintetizzati.

La frequenza degli eventi di ricombinazione è tanto più alta quanto maggiore è la distanza tra i geni interessati

RICOMBINAZIONE

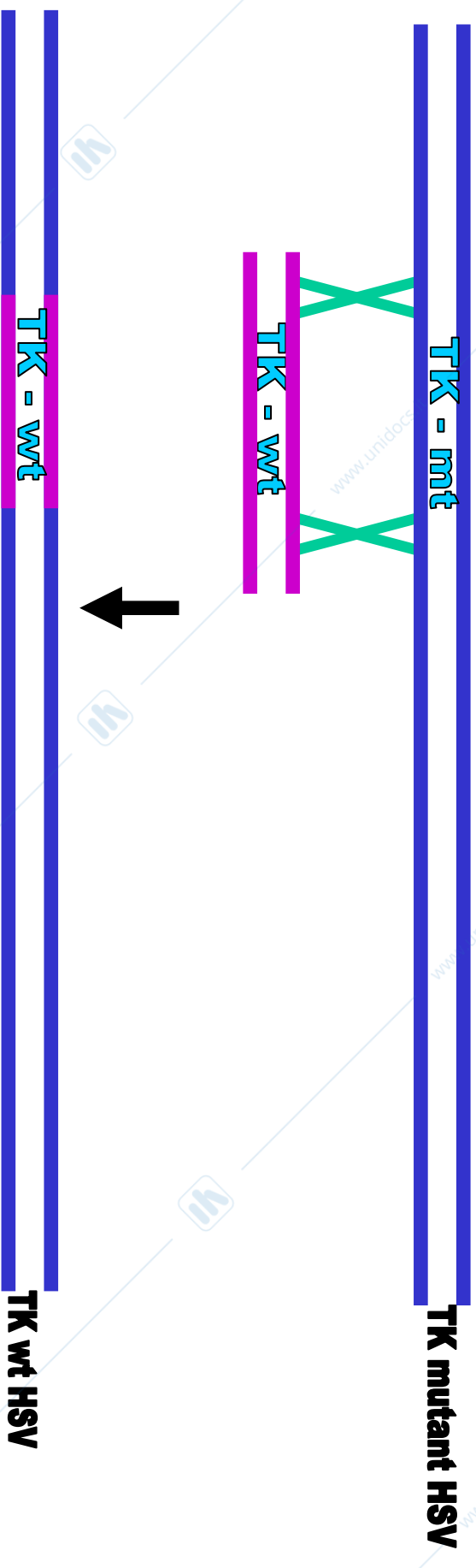
'classic' recombination

common in DNA viruses

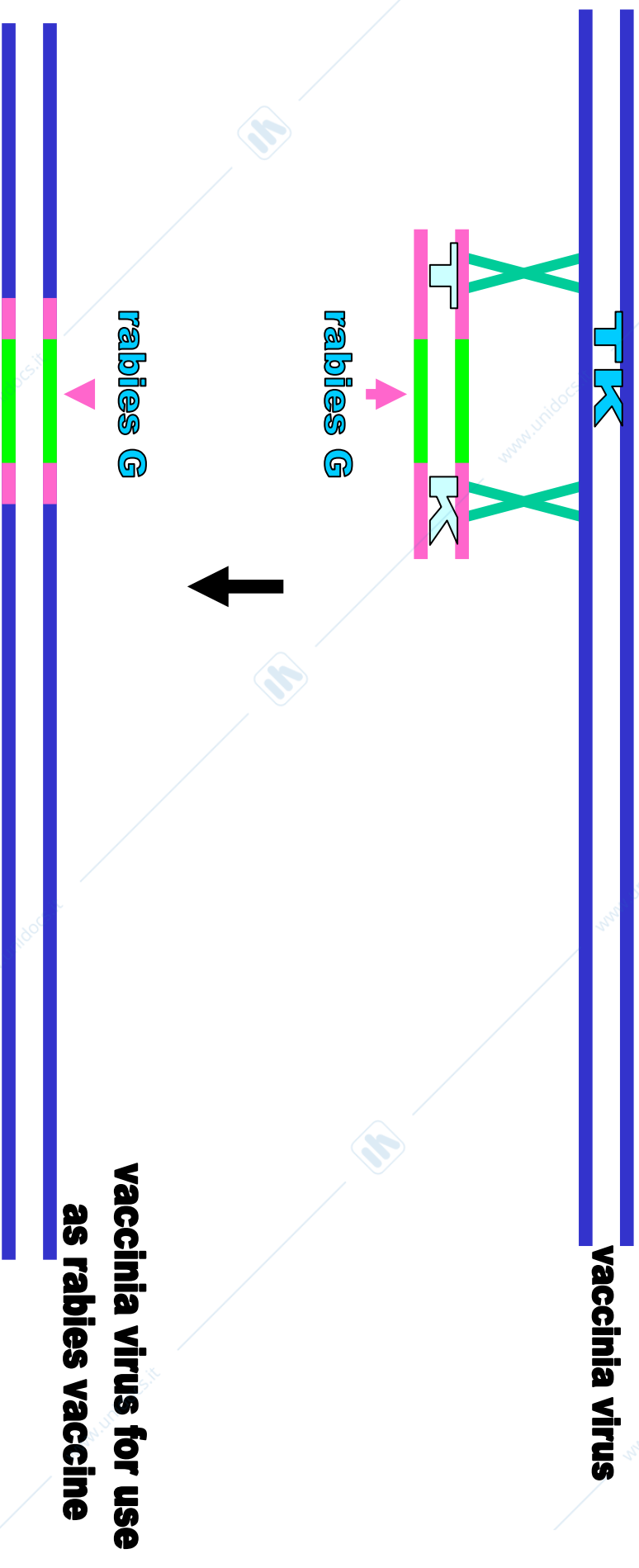


RECOMBINATION - SOME USES

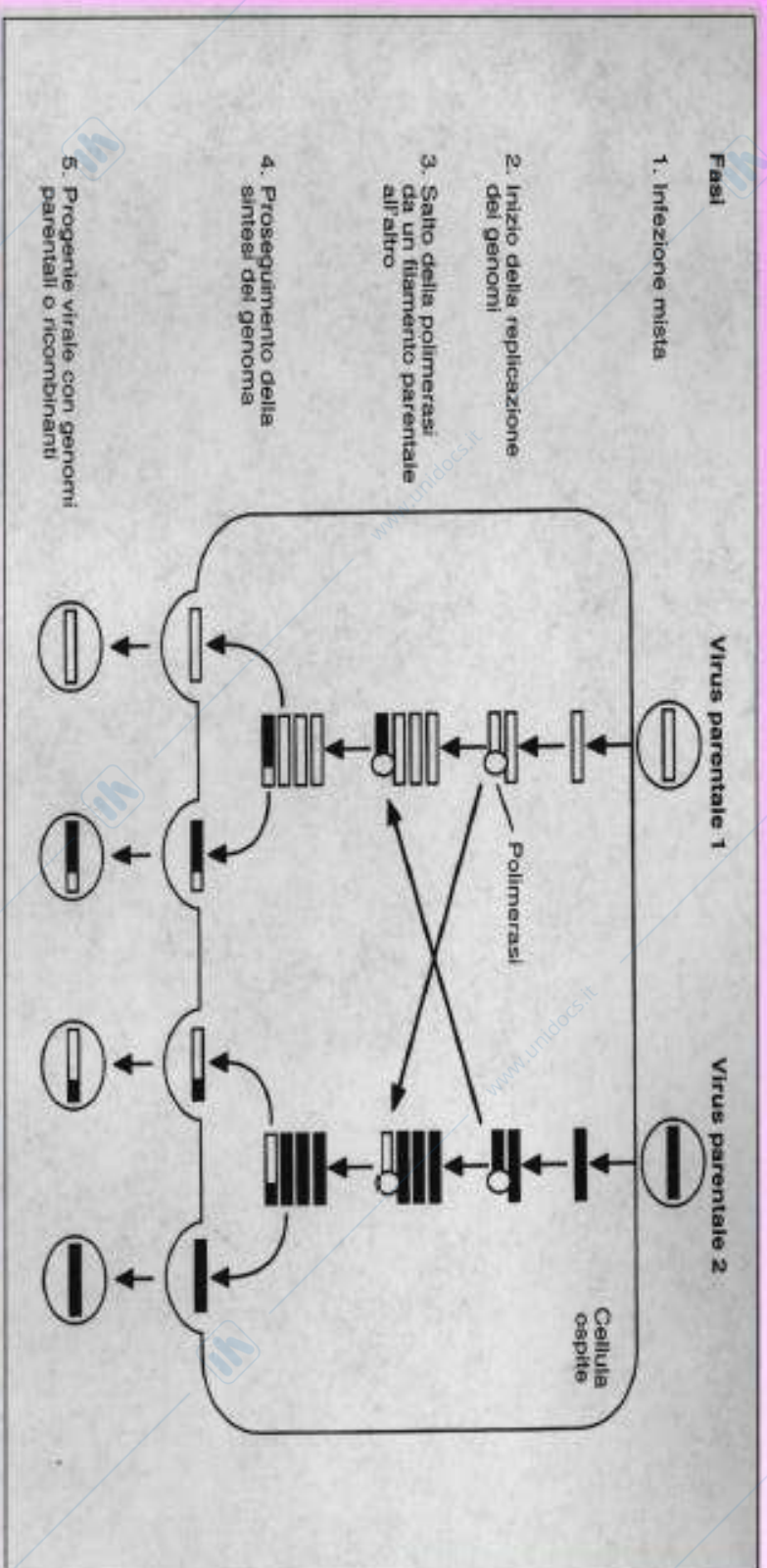
marker rescue



RECOMBINATION - SOME USES



Ricombinazione nei virus ad RNA



Ricombinazione per scelta di copia durante la sintesi del genoma dei virus a RNA.

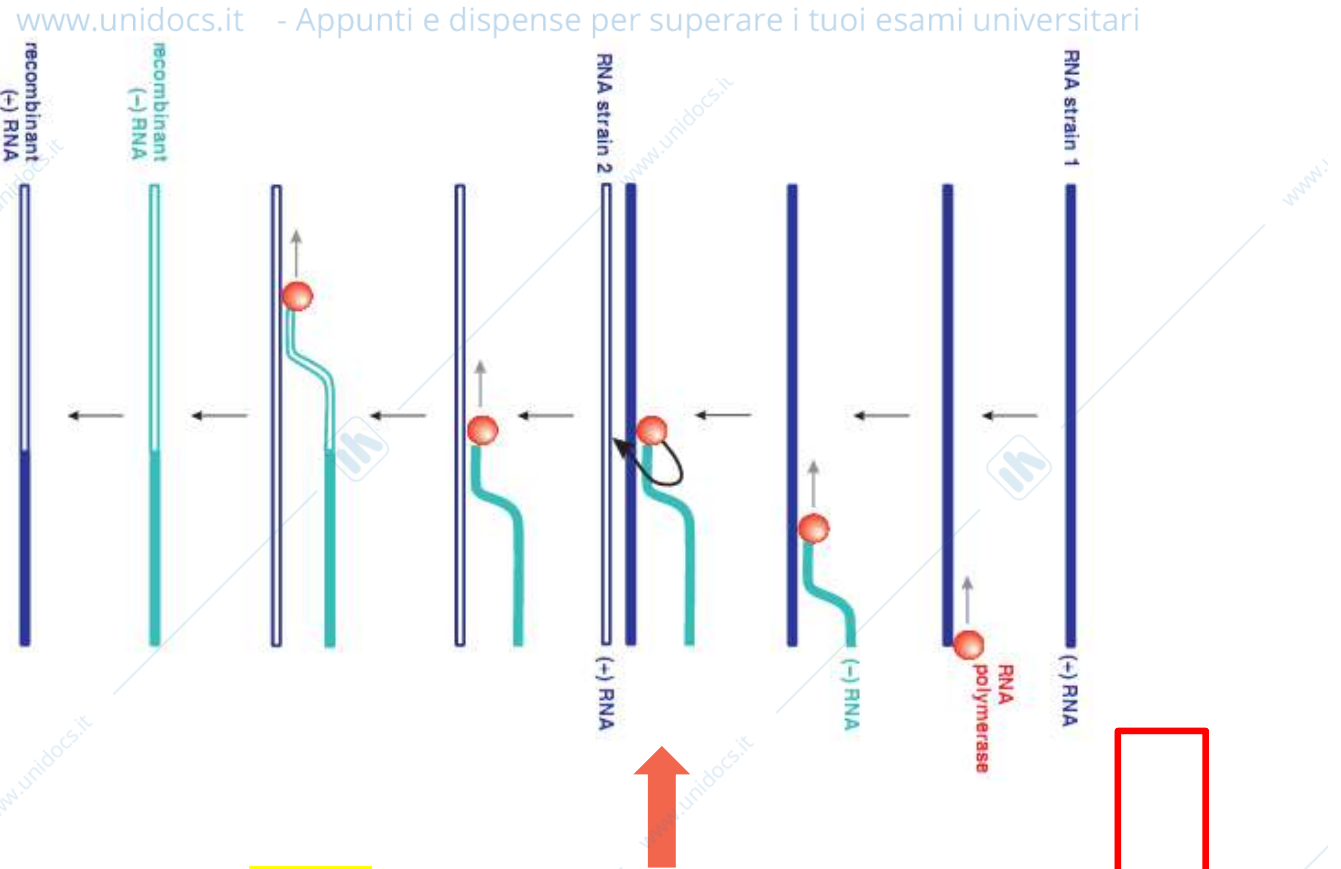
La polimerasi virale durante la sintesi del genoma si sposta da uno stampo di RNA parentale all'altro, con il risultato che la progenie contiene sequenza copiate in parte da un virus parentale ed in parte dall'altro.

RICOMBINAZIONI

2. RICOMBINAZIONE PER SCELTA DI COPIA: virus a RNA

Può avvenire sia durante la sintesi di RNA es. Coronavirus, che di DNA es Reovirus

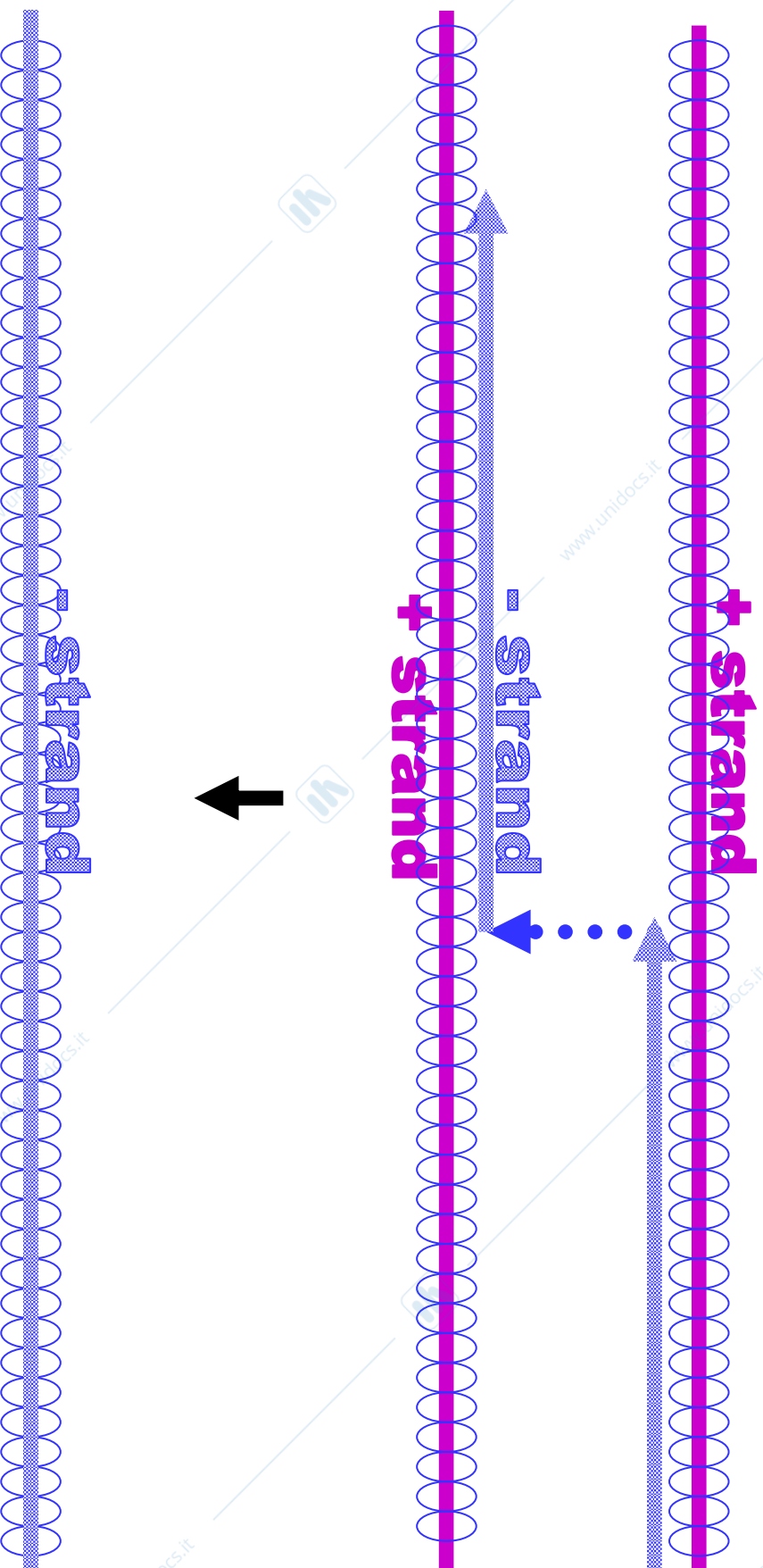
Le **RNA-pol RNA-dip** sono poco processive (si fermano dopo poche addizioni di basi)



LA FREQUENZA

di ricombinazione rispecchia le caratteristiche dell'enzima replicativo

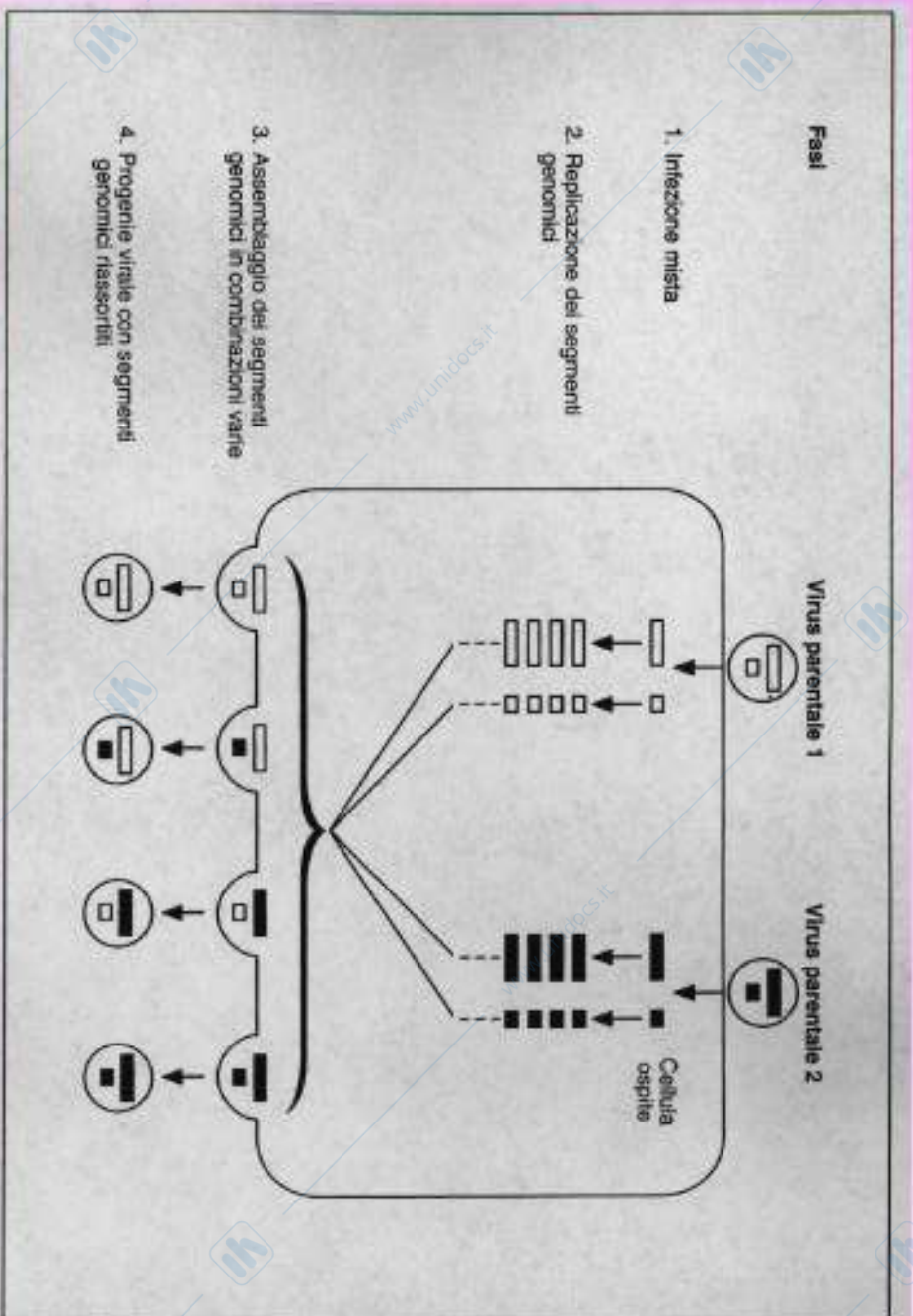
SCELTA DI COPIA RICOMBINAZIONE



RIASSORTIMENTO

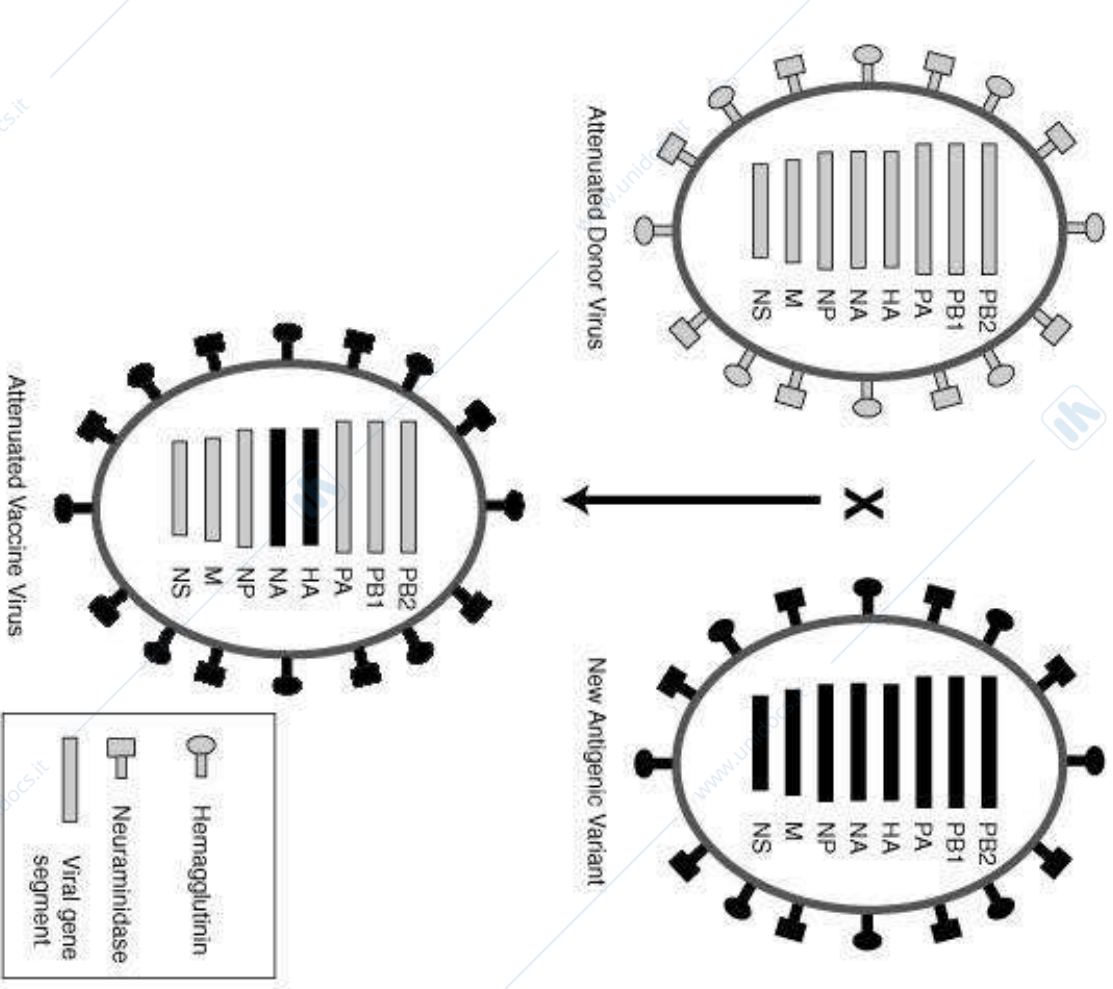
- Molto efficiente
- solo tra virus a genoma segmentato
- utilizzato per alcuni nuovi vaccini

Riassortimento nei virus a genoma segmentato



Riassortimento di segmenti genomici durante un'infezione mista.

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

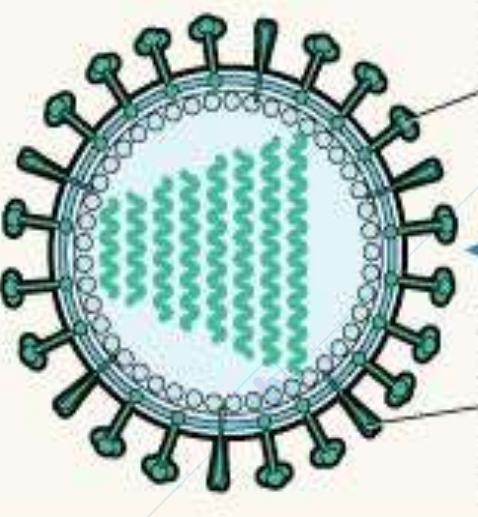
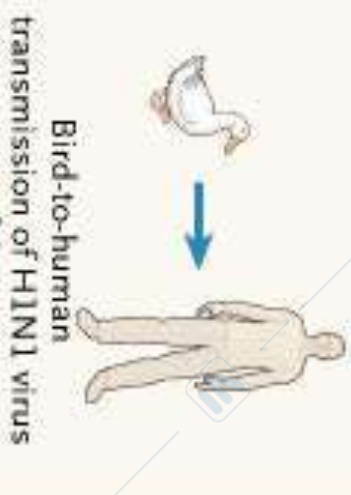


Medscape © <http://www.medscape.com>

adapted from
Treatnor JJ Infect. Med. 15:714

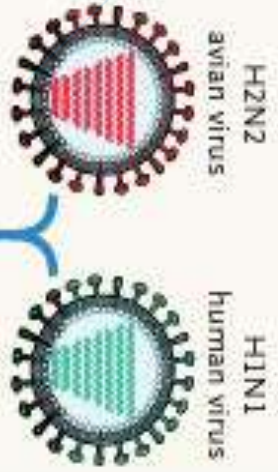
1918 "Spanish influenza" → 1957 "Asian influenza" → 1968 "Hong Kong influenza" → Next pandemic influenza

H1N1 influenza virus

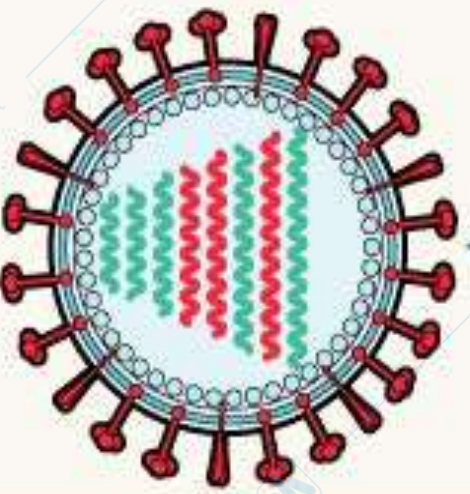


All 8 genetic segments thought to have originated from avian influenza virus

H2N2 influenza virus

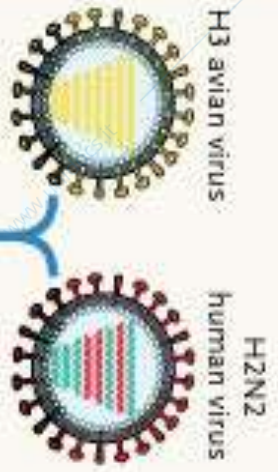


Reassortment

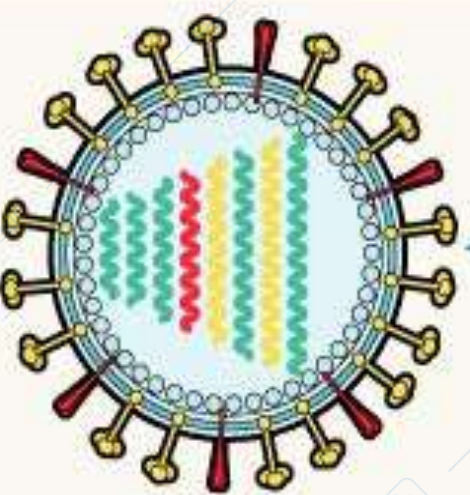


3 new genetic segments from avian influenza virus introduced (HA, NA, PB1); contained 5 RNA segments from 1918

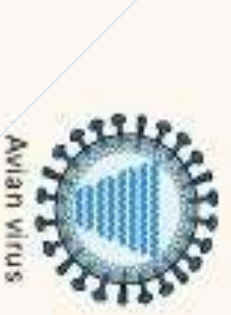
H3N2 influenza virus



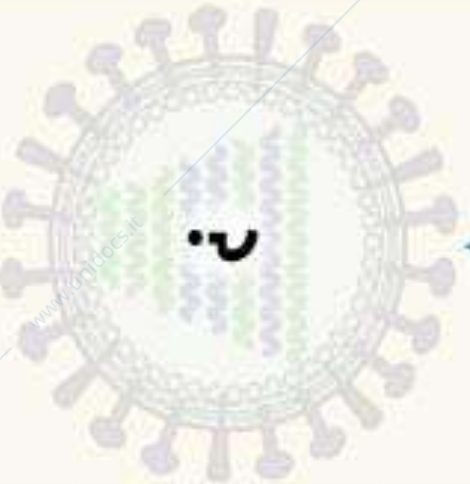
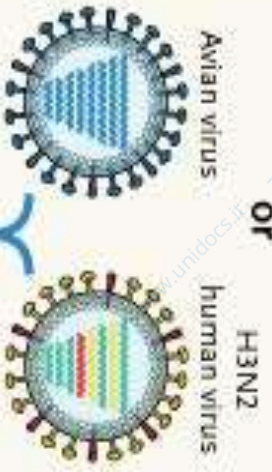
Reassortment



2 new genetic segments from avian influenza virus introduced (HA, PB1); contained 5 RNA segments from 1918



OR



All 8 genes new or further derivative of 1918 virus

Interazioni non genetiche

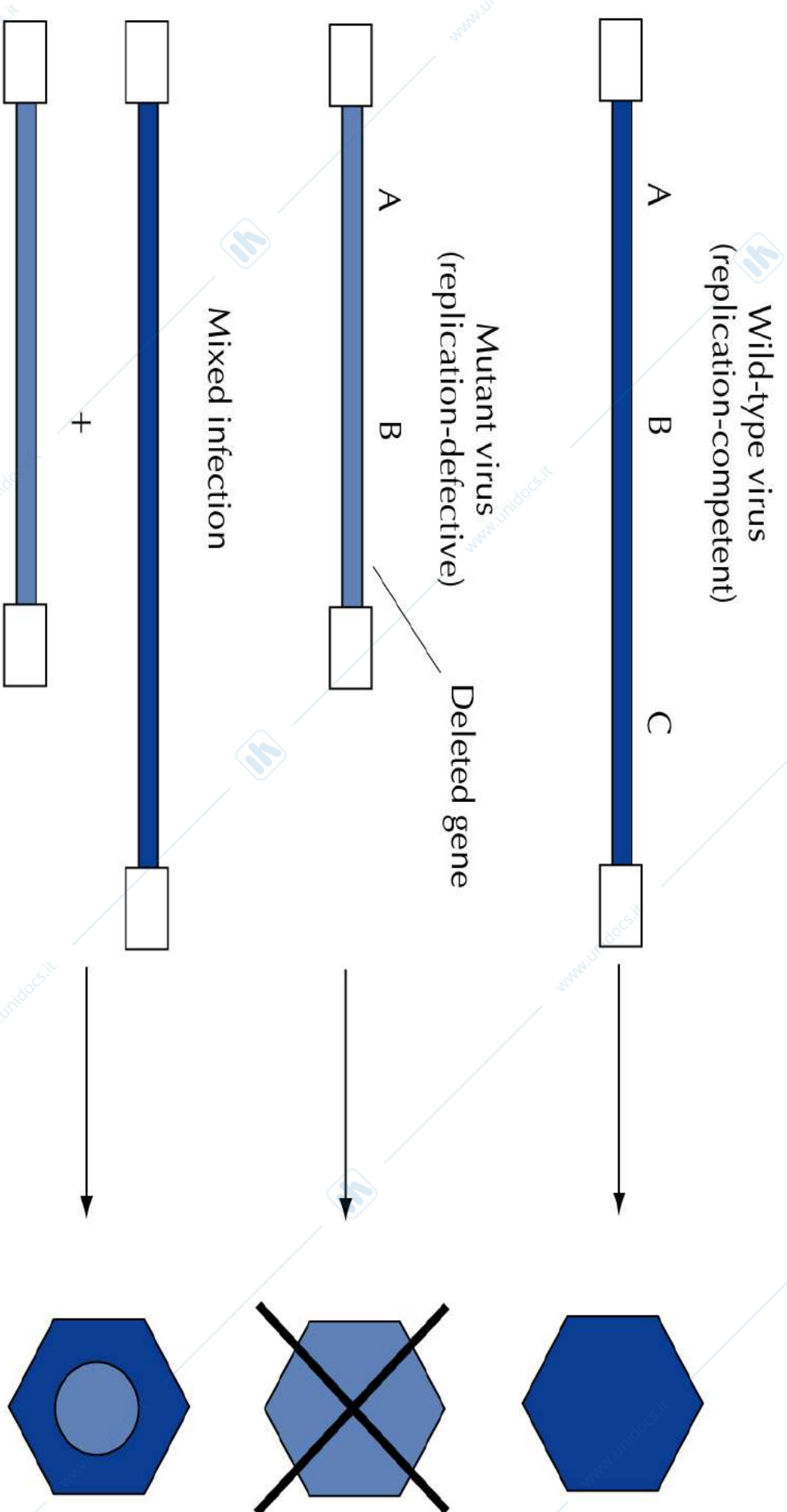
Cambiamenti NON GENETICI: NON SI GENERA UN NUOVO GENOMA

COMPLEMENTAZIONE (INTERAZIONE di tipo NON GENETICO: scambio di proteine fra più virus che coinfettano la stessa cellula; non vengono interessati i genomi)

- 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

Complementation



Interazioni non genetiche

- **Virus satelliti:** alcuni virus 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 capaci di moltiplicazione solo in presenza di adenovirus.

VIRUS DEFETTIVI

- Sono virus defettivi nel genoma e, quindi, hanno bisogno di un sistema helper per potersi esprimere o replicare. Es:
 - Alcuni retrovirus
 - hepatitis delta virus
 - Alcuni parvovirus

DEFECTIVE INTERFERING (DI) VIRUSES (PARTICLES)

Diminuiscono la replica dei virus helper

- Competono per i precursori virali, etc.
- Possono modulare le infezioni da virus
- Es. **DI** del virus del morbillo nella panencefalite sclerosante subacuta - SSPE

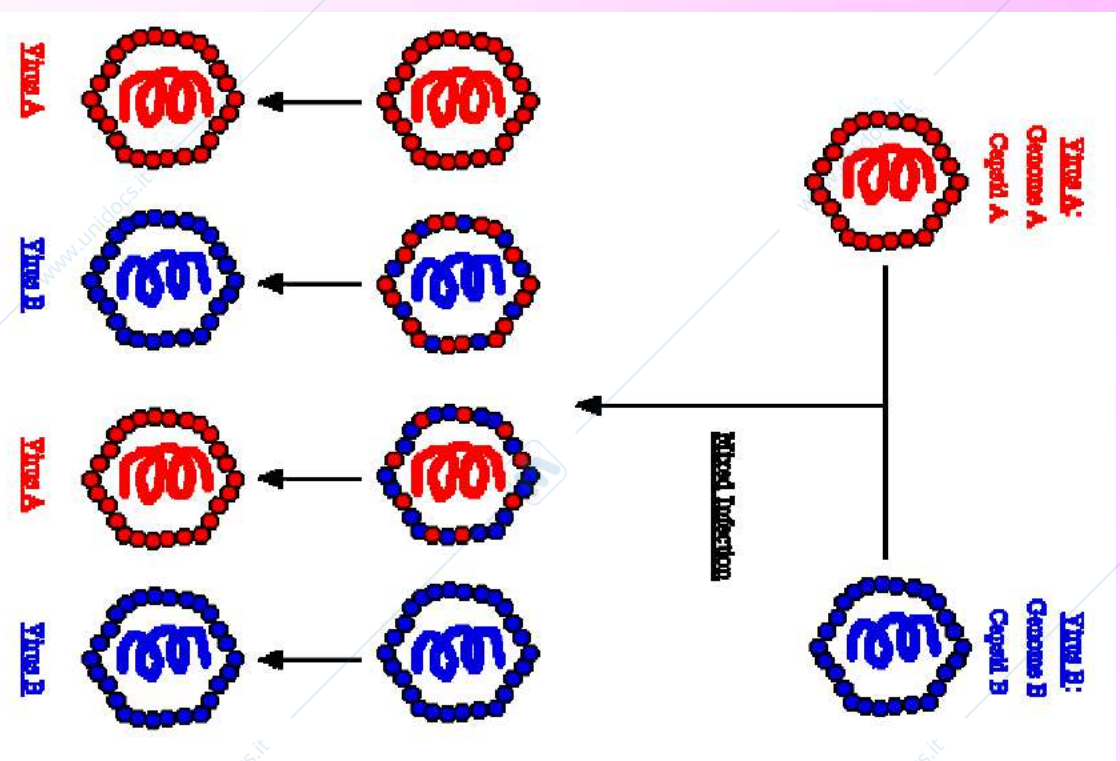
Interazioni non genetiche

○ Mescolamento fenotipico:

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 capside dell'altro virus della stessa specie (**transcapsidazione**) oppure quando il nucleo-capside di un virus provvisto di peploma venga incorporato nell'involucro lipoproteico di un altro virus correlato.

Le caratteristiche fenotipiche miste vengono perse nei cicli di infezione successivi.



Interazioni non genetiche

○ **Interferenza:** E' 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.

Le ragioni di tale comportamento sono in parte legate alla produzione di interferone, o al blocco di fattori cellulari necessari alla replicazione dell'altro virus.

INTERAZIONI FRA VIRUS

«VANTAGGIOSE»

MESCOLAMENTO FENOTIPICO PER COMPLEMENTAZIONE

- Pericapside con mix di proteine dei due virus
- Può cambiare il tropismo (fenotipo) ma si tratta di complementazione (interazione non genetica)
- Alla successiva generazione si produce di nuovo il virus originario

INTERAZIONI FRA VIRUS
«SVANTAGGIOSE»:
Interferenza virale
L'infezione da parte di un virus rende la cellula ospite resistente ad una seconda infezione da parte dello stesso virus o di un virus diverso

VIRUS SATELLITI

- Rapporto di parassitismo stabile con altri virus, non necessariamente affini
- coinfezione: Virus Epatite D + Virus Epatite B//
- superinfezione: pz con infezione cronica da Virus epatite B
- Alla successiva generazione si produce di nuovo il virus originario

PRODUZIONE PSEUDOTIPO PER COMPLEMENTAZIONE

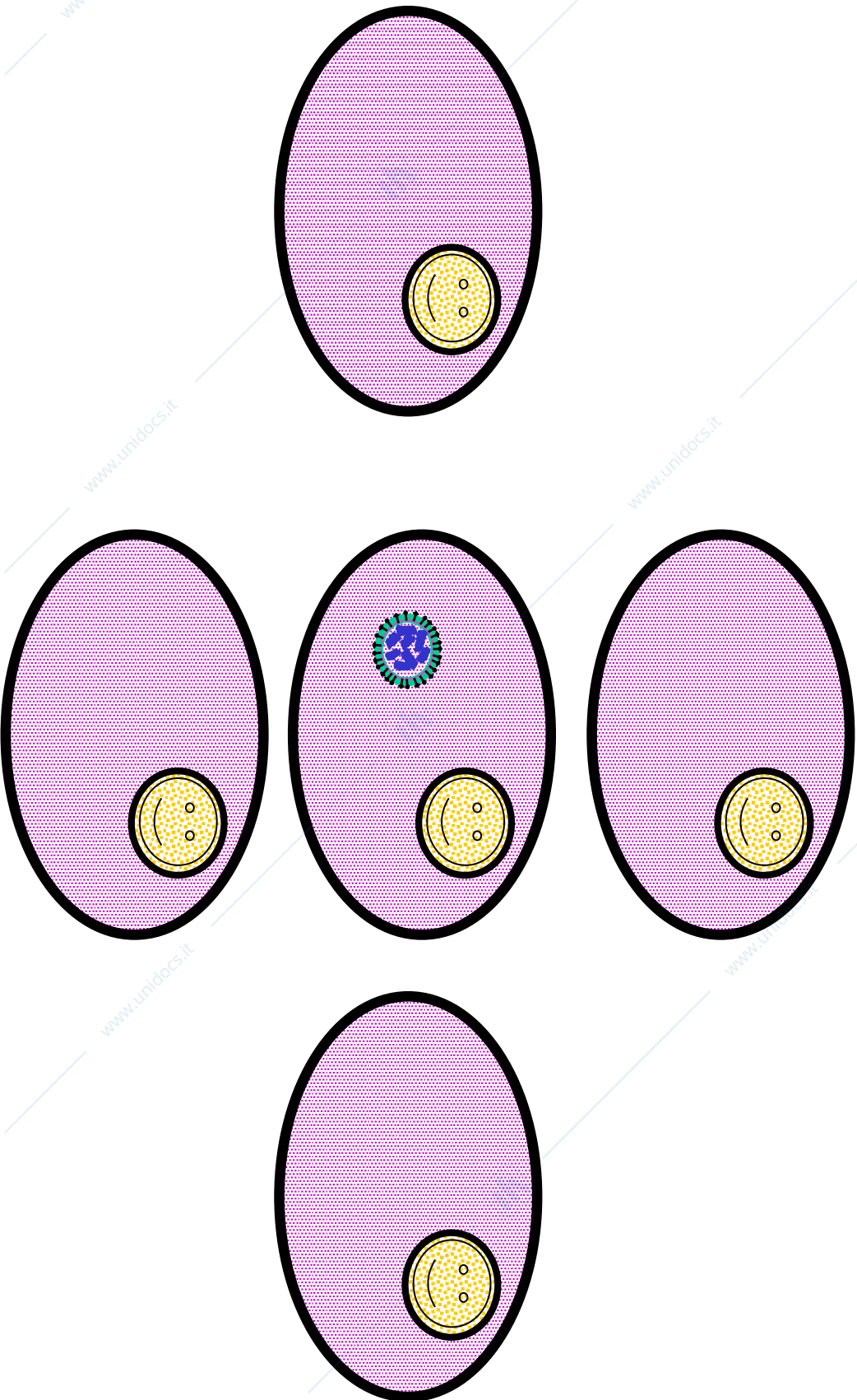
- Si può produrre un virus in grado infettare cellule normalmente non sensibili rivestendolo per complementazione delle proteine di membrana di un altro virus a cui le cellule sono sensibili (pseudotipo)
- Possibilità di ampliare lo spettro d'ospite

INTERFERONE

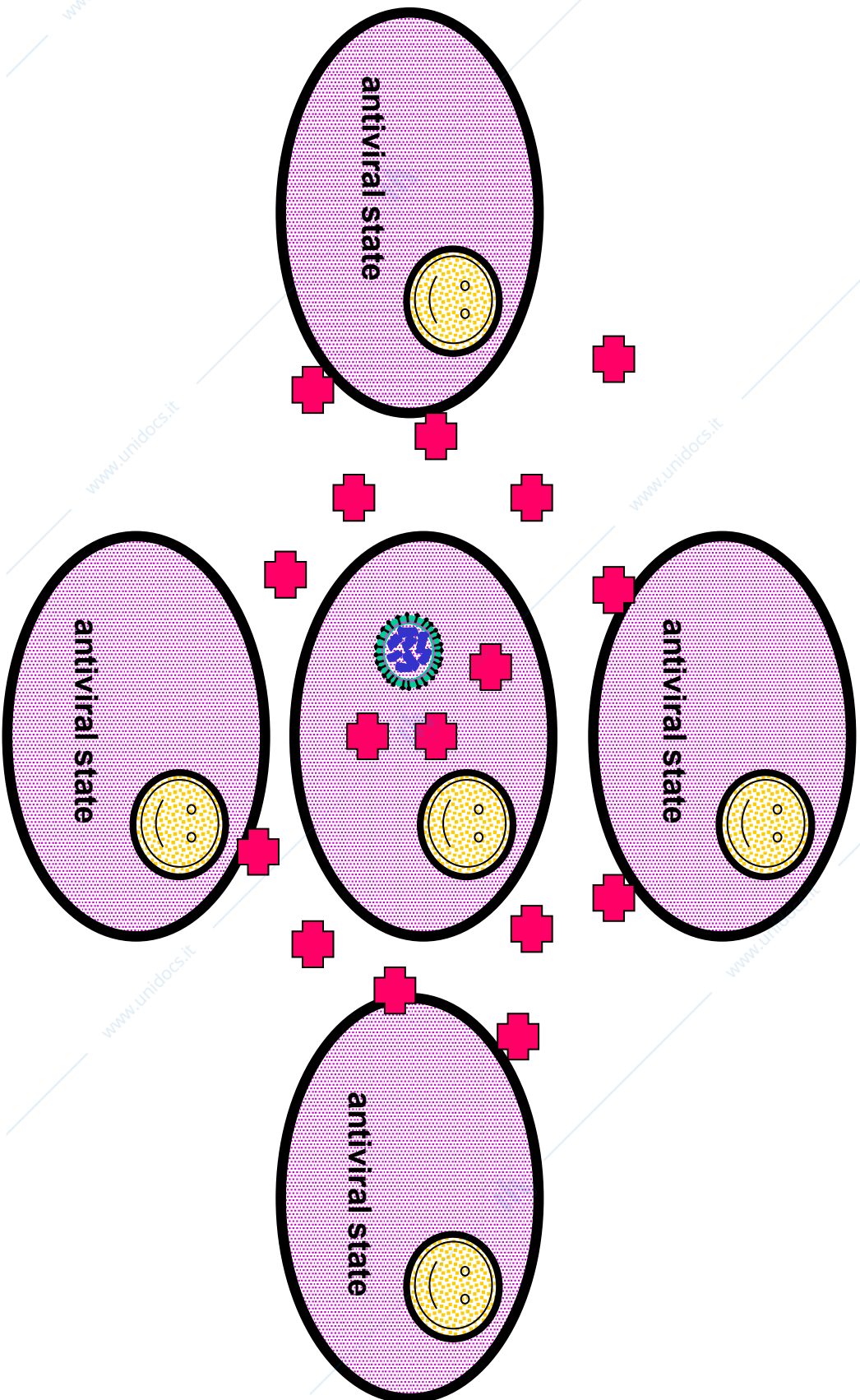
Principali caratteristiche dei tre tipi di Interferone (IFN)

	Interferon	Alfa	Beta	Gamma
Caratteristiche				
Derivazione cellulare		Linfociti, monociti	Fibroblasti, cellule epiteliali	Linfociti T, cellule NK
Attività antivirale		rapida	rapida	lenta
Struttura e peso molecolare		proteina 19-26 KD	Glicoproteina 20KD	Glicoproteina 20KD
Numero aminoacidi		165	177	166
Induttori		Virus (RNA>DNA) dsRNA	Viruses(RNA>DNA) dsRNA	Antigeni, Mitogeni
Stabilità a pH2		Stabile	Stabile	Labile

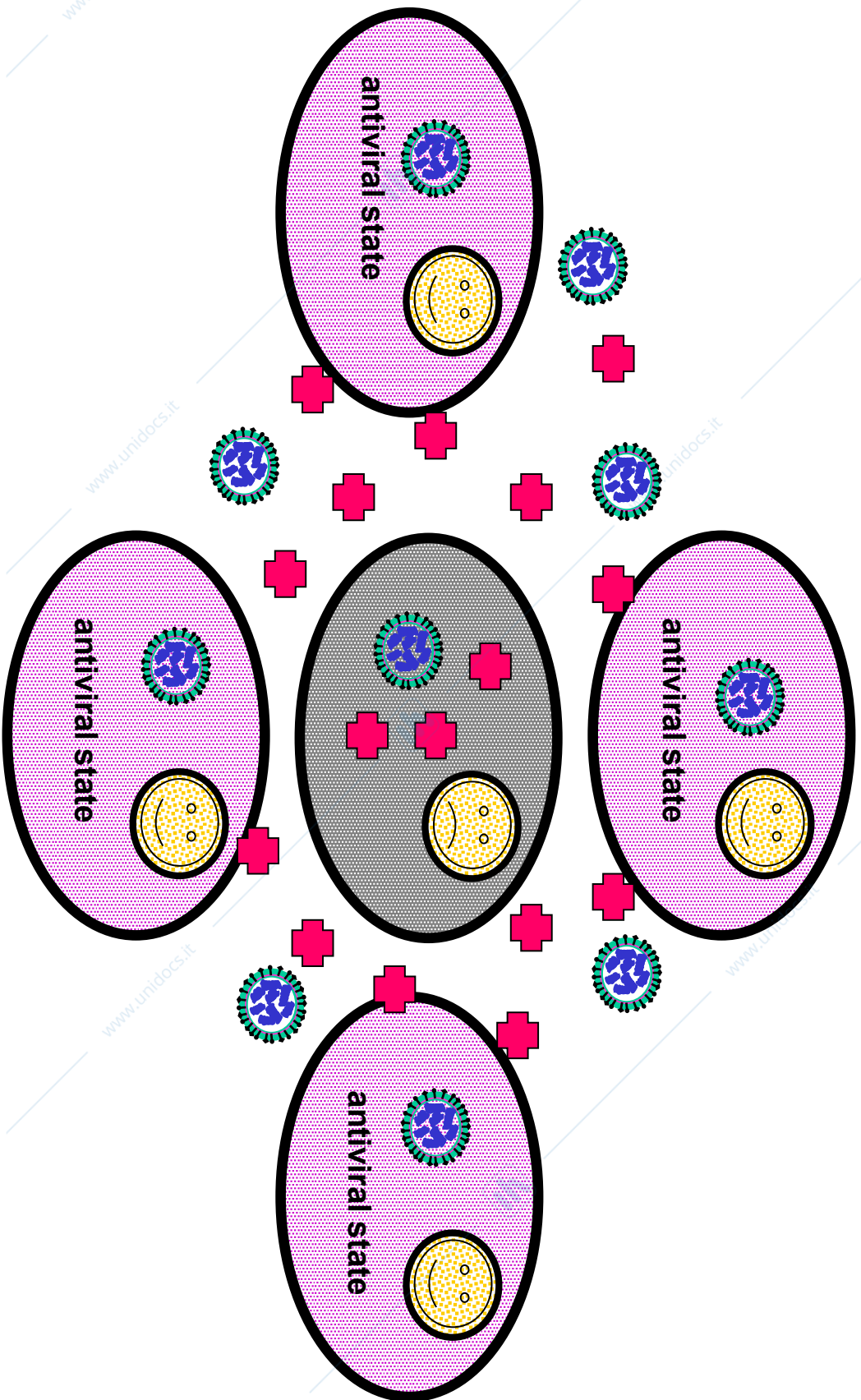
INTERFERON



INTERFERON



INTERFERON



INDUZIONE DI INTERFERON

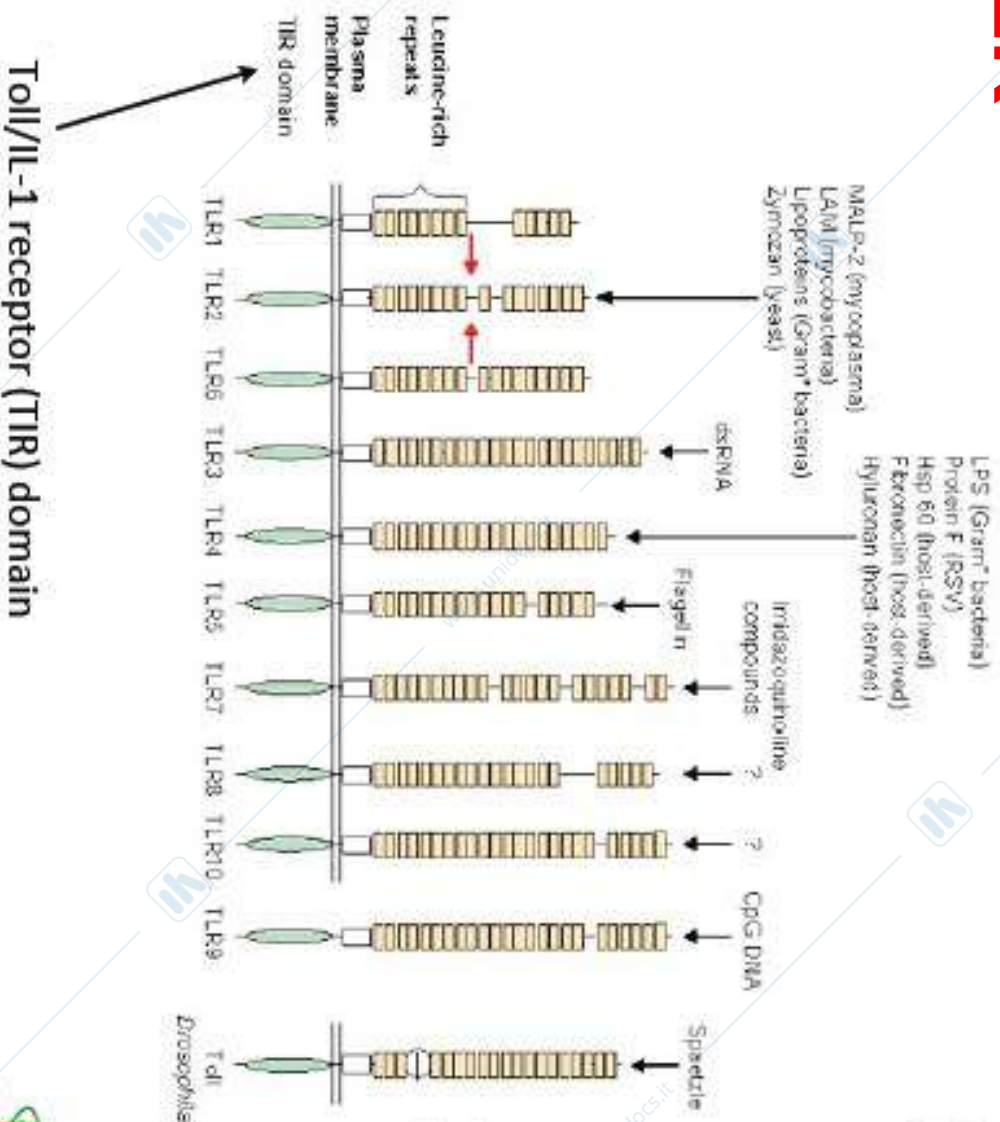
- **interferon-alpha and interferon-beta**

- infezione virale (specialmente virus a RNA), double stranded RNA, certe componenti batteriche
- Forti proprietà anti-virali

- **interferon-gamma**

- antigeni, mitogeni per cellule T

TLR



TLR3-ECD

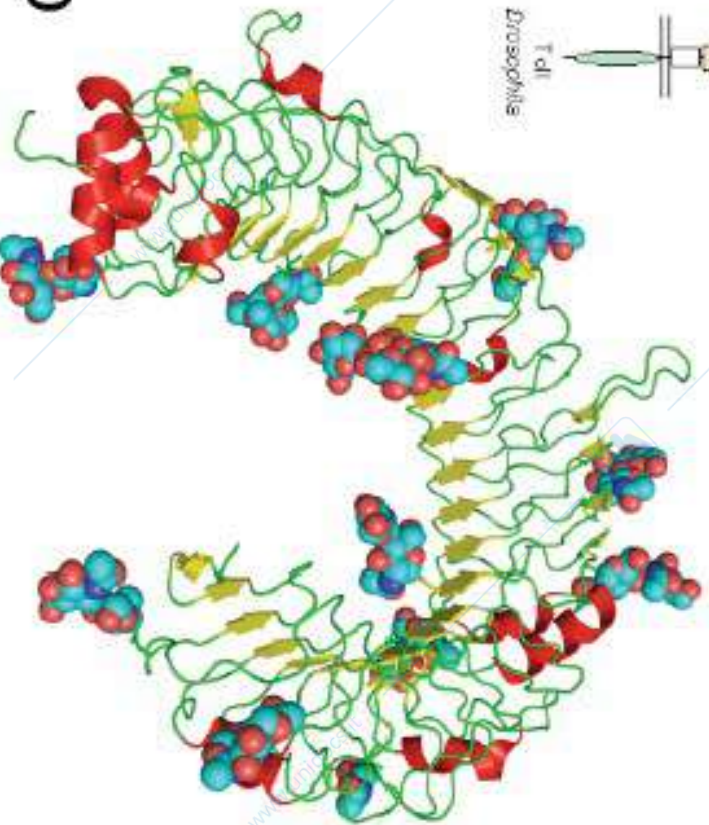
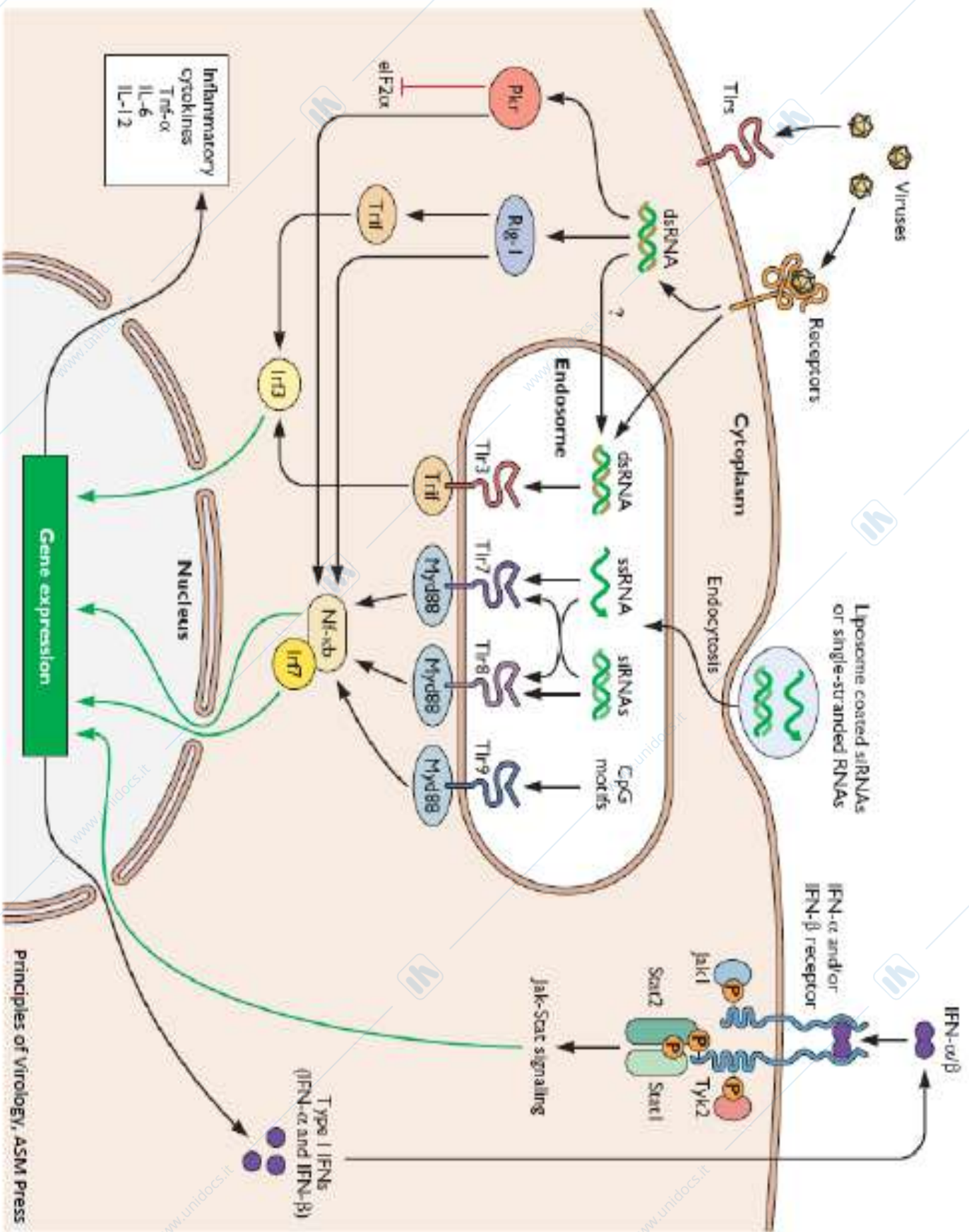


Table 3.4 Toll-like receptors recognize microbial macromolecular patterns^a

Toll-like receptor	Pattern recognized
TLR1	Triacyl lipopeptides
TLR2	Lipopeptides; viral glycoproteins; gram-positive peptidoglycan
TLR3	Double-stranded RNA
TLR4	Lipopolysaccharide; viral glycoproteins
TLR5	Flagellin
TLR6	Diacyl lipopeptides
TLR7	Single-stranded RNA
TLR8	Single-stranded RNA
TLR9	CpG DNA; unmethylated CpG oligonucleotides
TLR10	Unknown
TLR11	Profilin

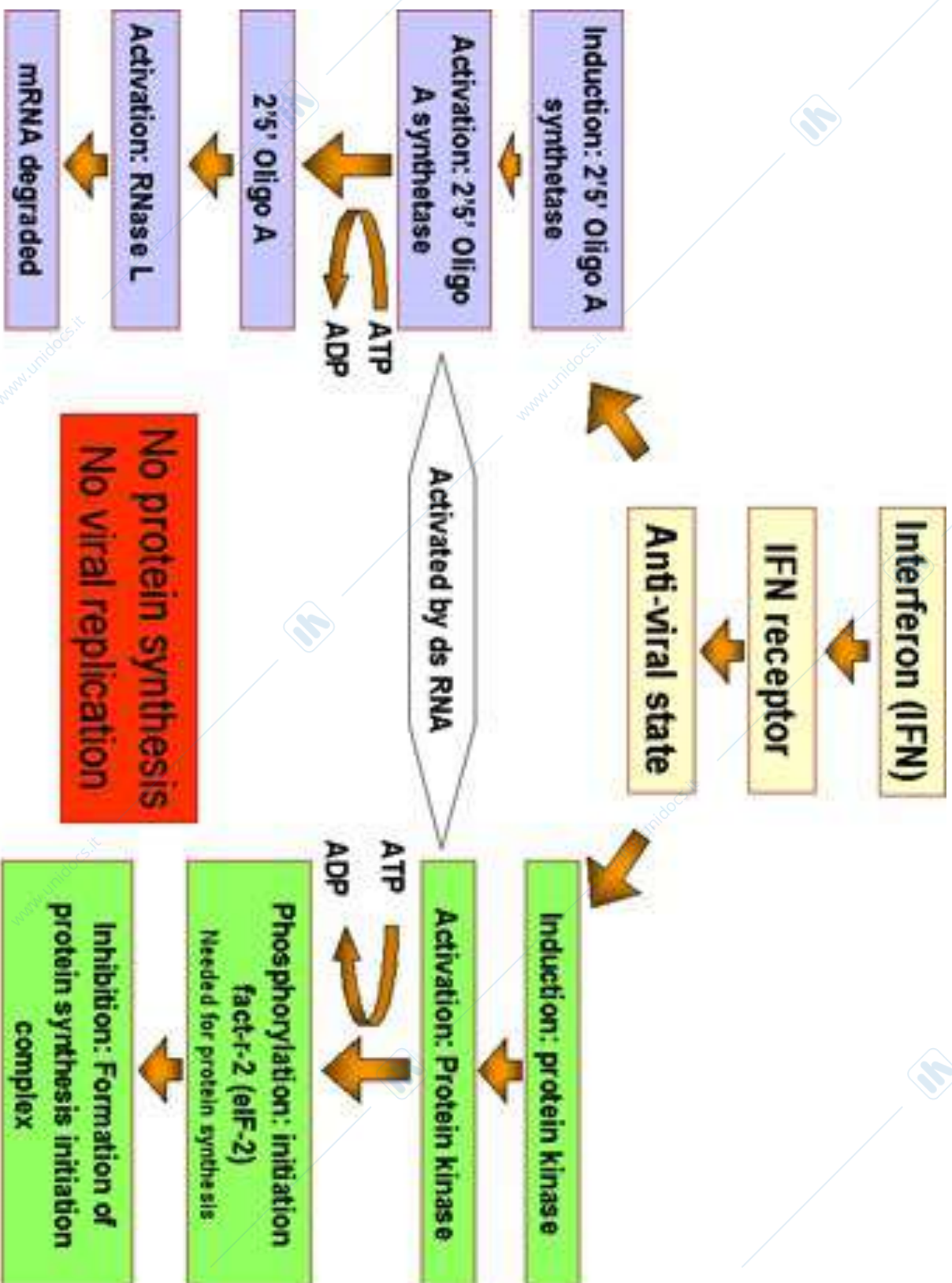
^aData from G. Barton and R. Medhison, *Curr. Opin. Biol. Sci.* 14:380-383, 2003; S. Akira and K. Takeda, *Nat. Rev. Immunol.* 4:499-511, 2004.

RIG-I like helicases



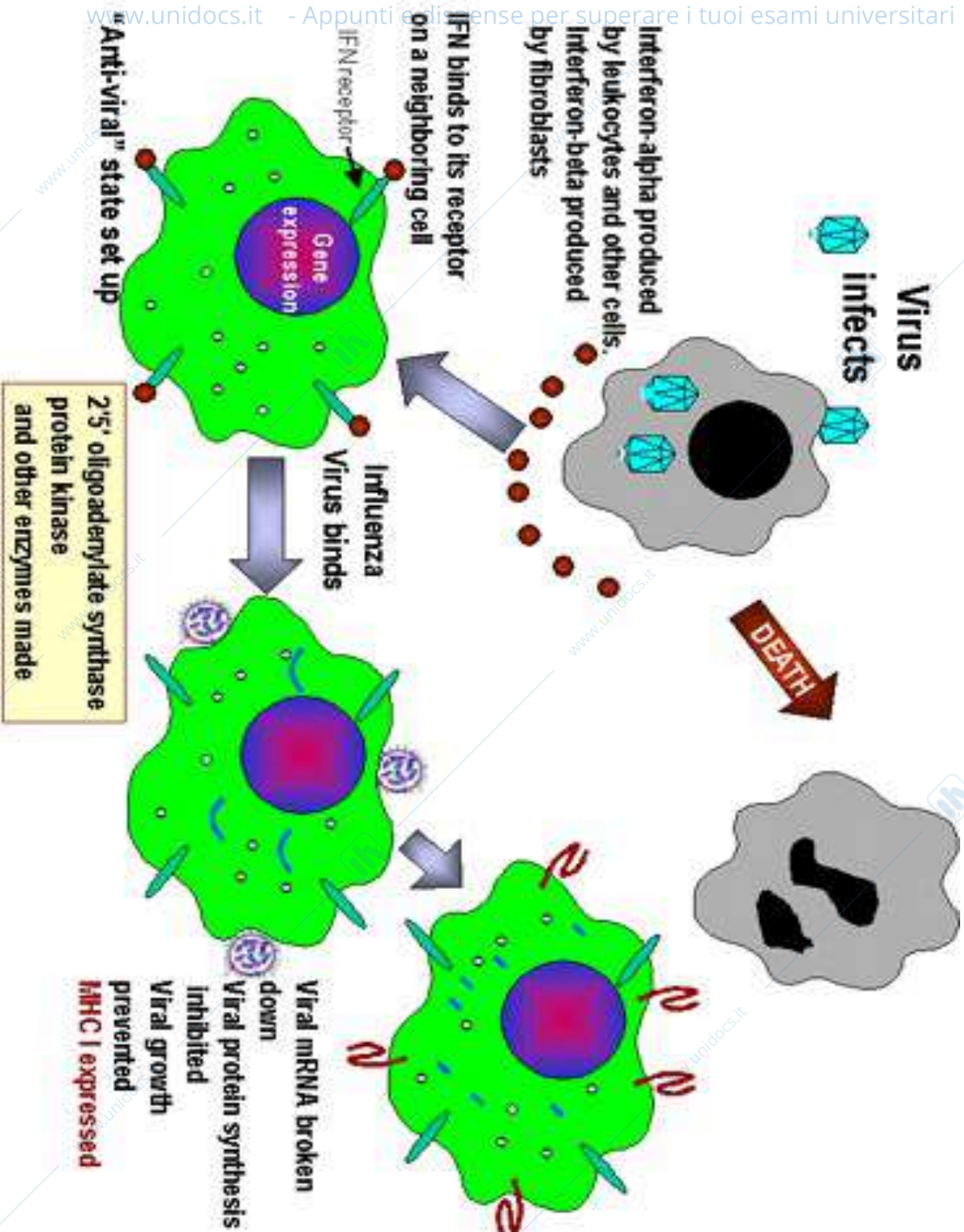
Principles of Virology, ASM Press

Meccanismo d'azione dell'Interferone



ribonucleasi

Meccanismo d'azione dell'Interferone



2'-5' oligoadenilato-sintetasi

endoribonucleasasi

DEGRADAZIONE mRNA virali

chinasi

Fosforilazione eIF

INIBIZIONE SINTESI PROTEICA

Mappe salienti dell'epidemia..... (1)

- 1981 – CDC i primi cluster epidemici PCP KS
- 1982 – primi casi di AIDS in Italia
- 1983 – viene coniato il termine AIDS
- 1984 – primo semestre 15 casi identificati
- 1984 - crescita esponenziale: assenza di un test sierologico (introdotto nell'85)
- 1985 – identificazione del virus da parte di Luc Montagnier
- enorme diffusione dell'epidemia nell'Africa subsahariana
- negli anni successivi..... prima causa di morte nei soggetti 25-29 aa

Che cos' è l' AIDS ?

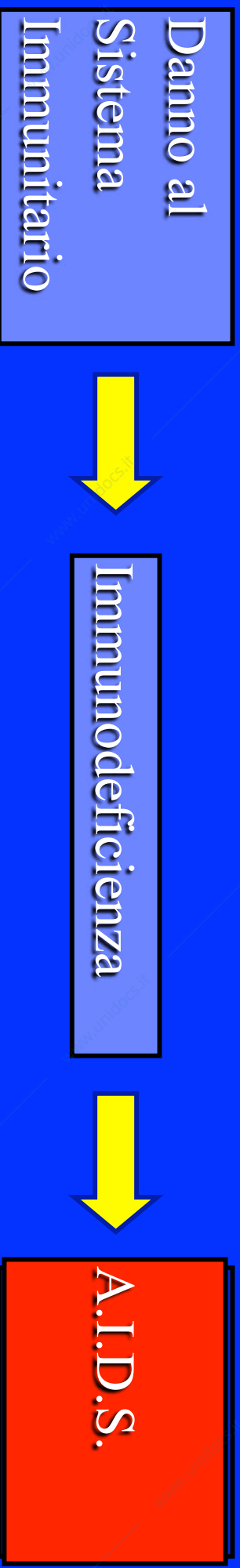
È uno stato patologico in cui si ha la riduzione delle funzioni del sistema immunitario la cui causa non è congenita ma dipende da cause esterne.

Il virus HIV è la causa dell' immunodeficienza acquisita

Sindrome (da) : insieme di segni e sintomi di malattia

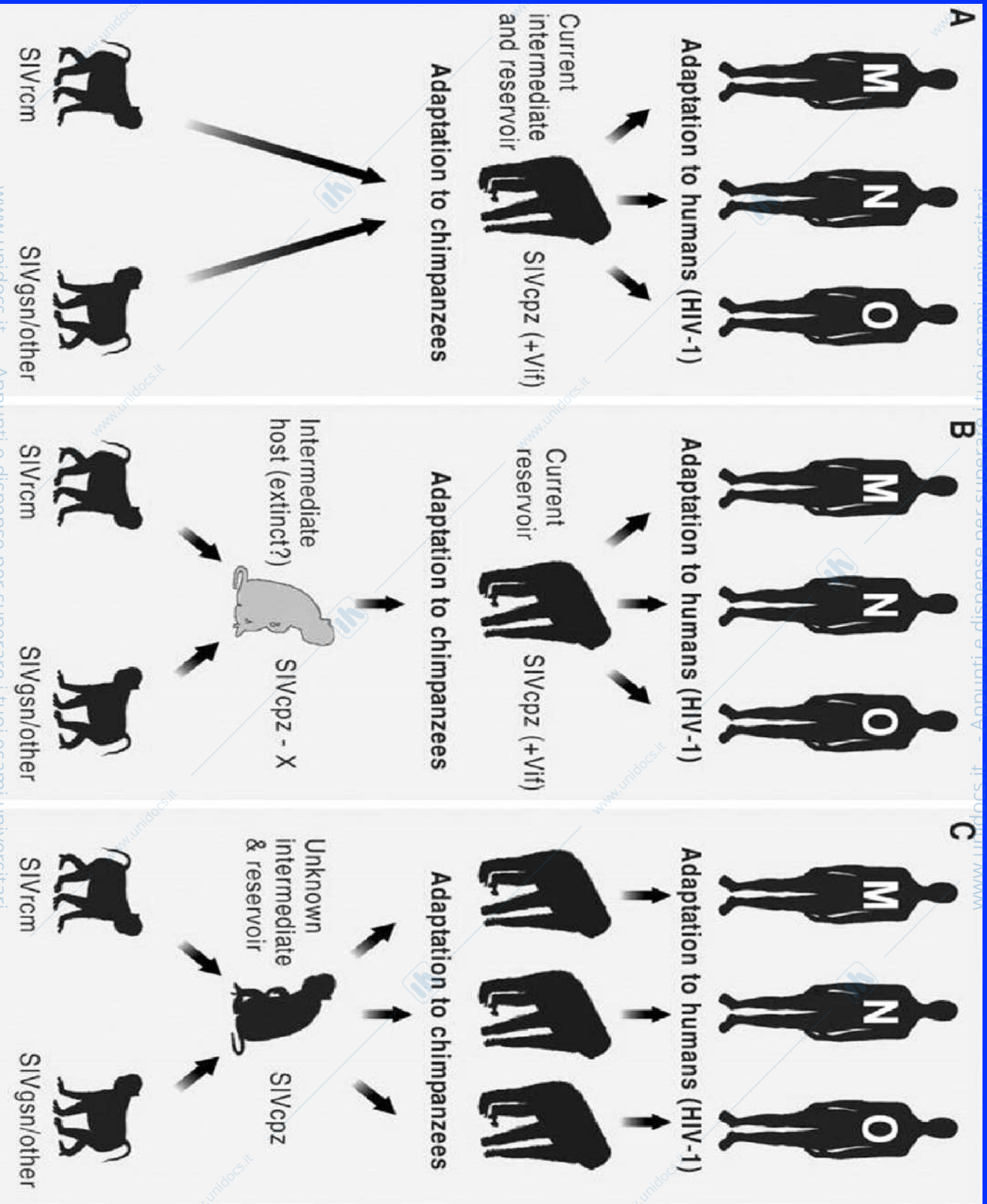
ImmunoDeficienza : danno al sistema immunitario, che diventa incapace di difendersi dalle infezioni

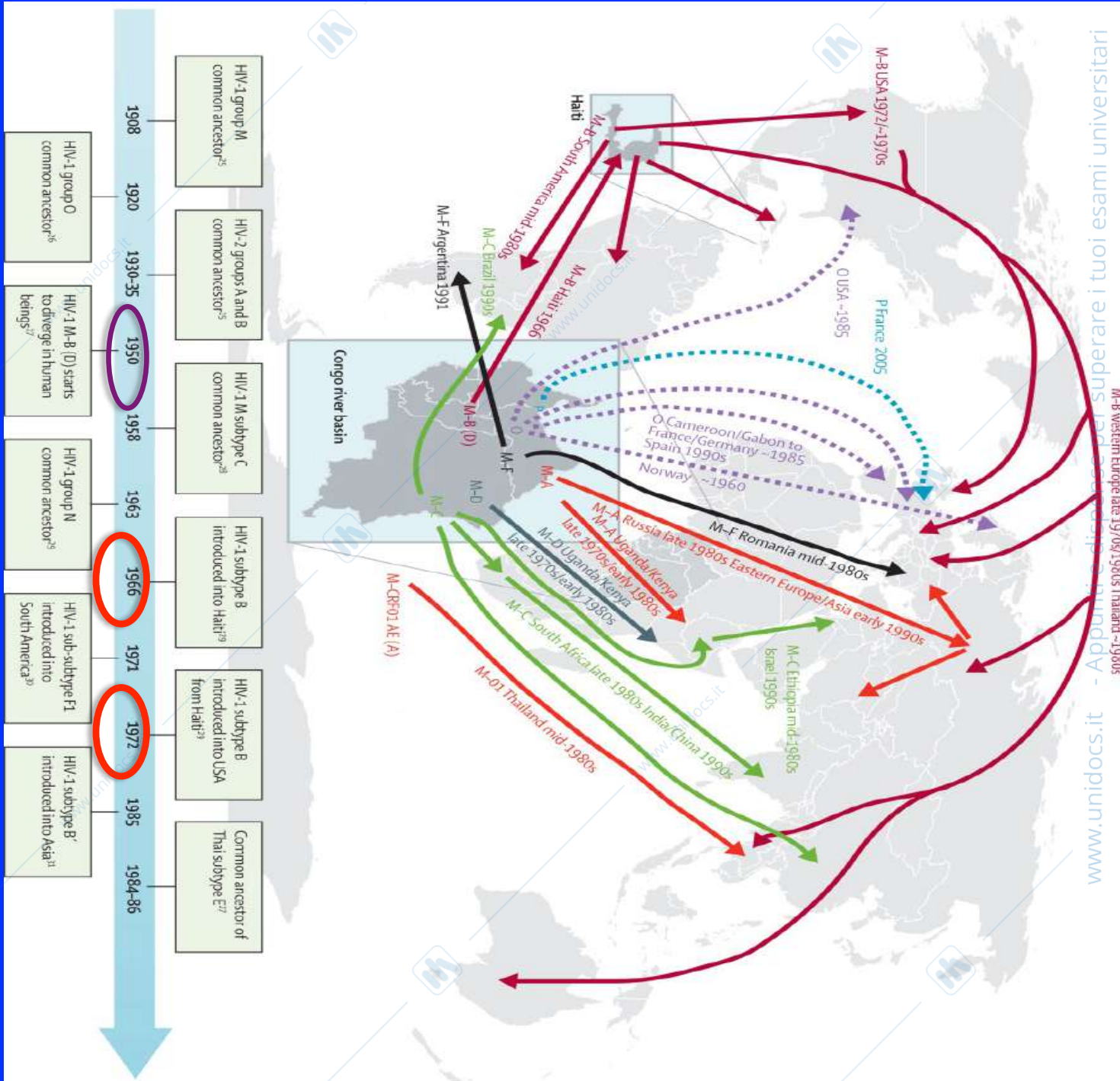
Acquisita : per distinguerla dalle I.D. congenite



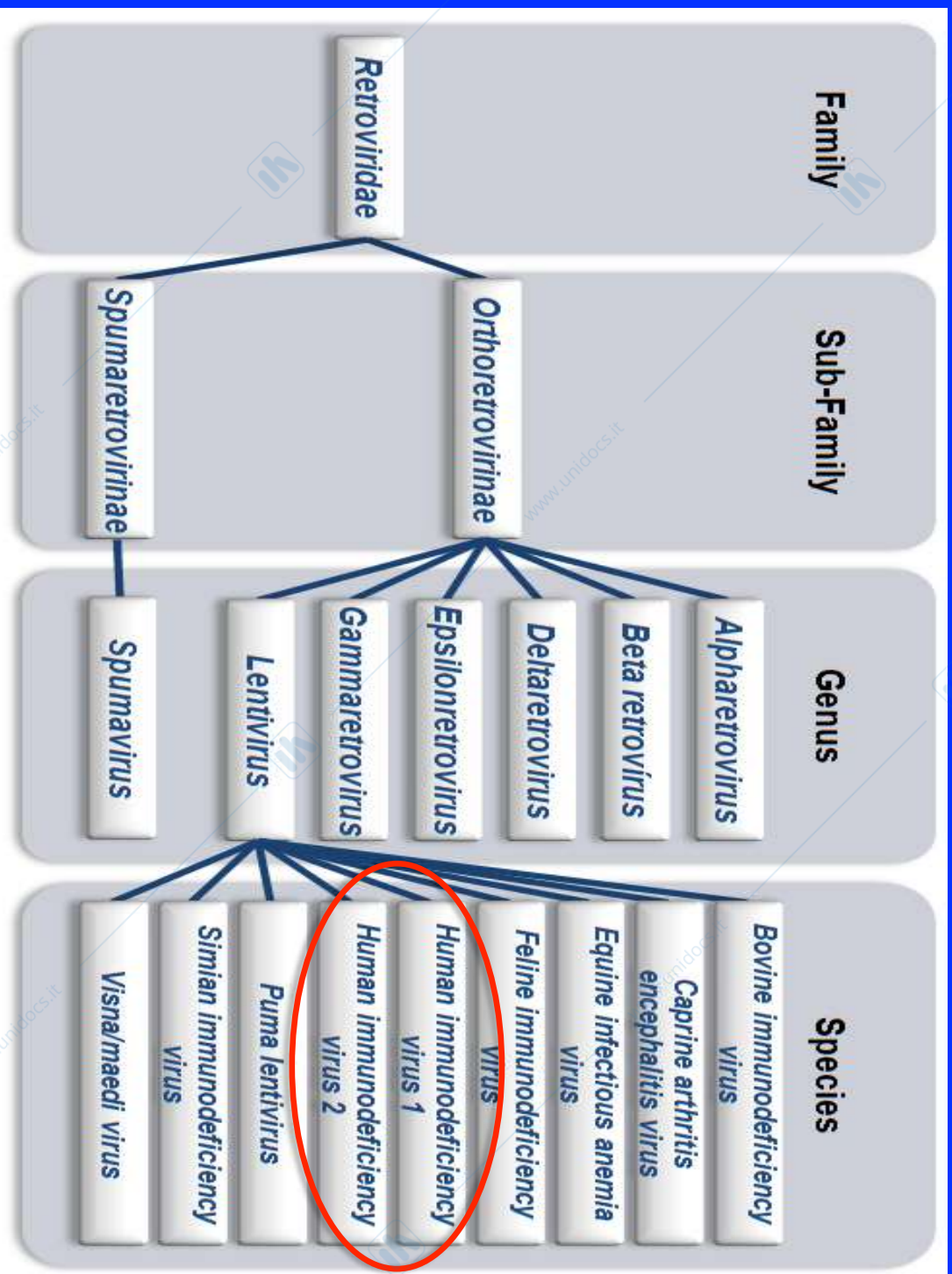
Le origini dell' HIV

- È stato ormai stabilito con certezza che l'HIV è originato da un processo di evoluzione naturale, mediante mutazioni genetiche di un virus, il SIV, che colpisce alcune specie di primati africani, e che sarebbe passato dal serbatoio animale a quello umano tramite contatti tra l'uomo ed il sangue degli animali.
- Analisi molecolari di ceppi virali isolati da persone decedute molti anni fa hanno portato a ritenere che l'origine dell'HIV sia avvenuta all'incirca verso la fine degli anni '30.

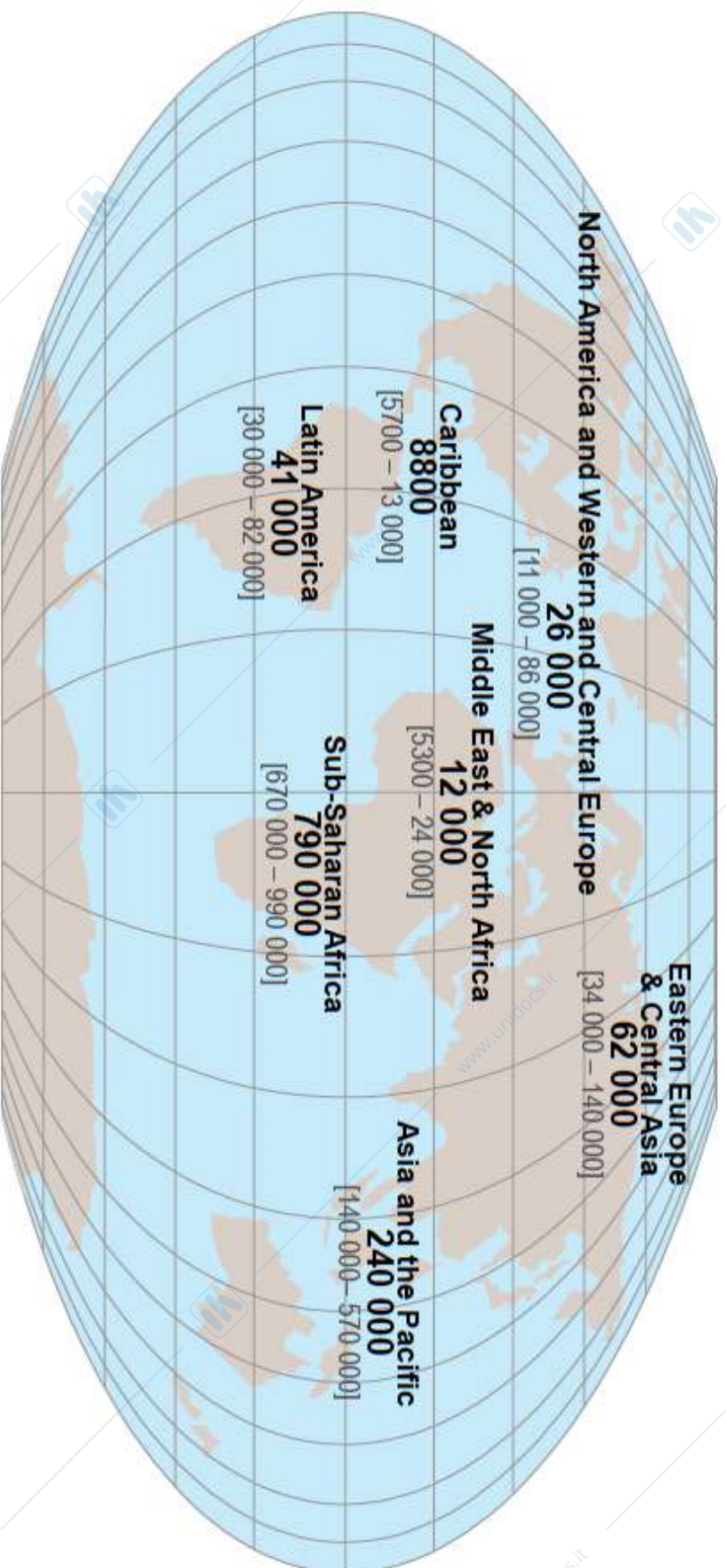




RETROVIRIDAE



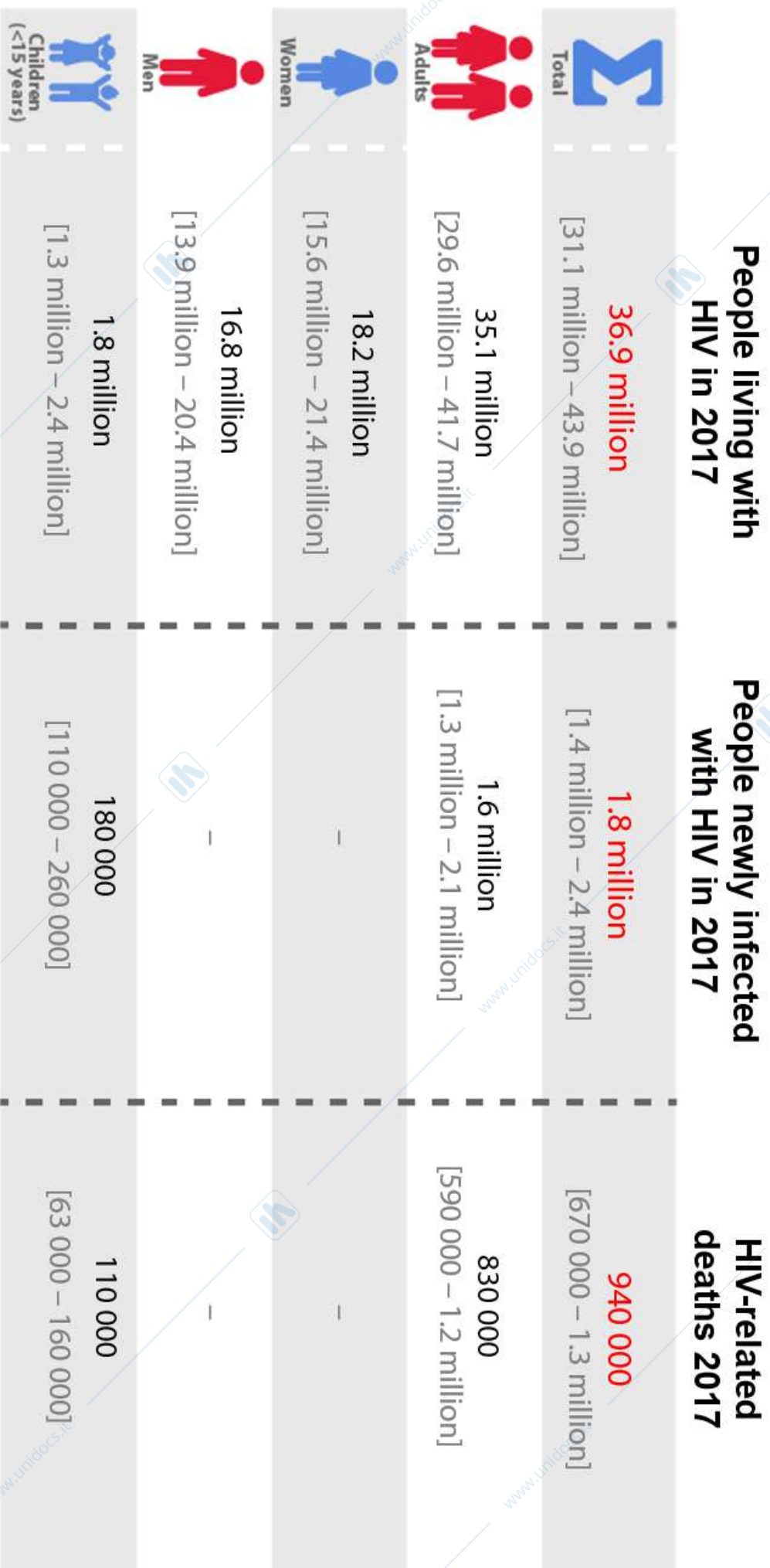
Estimated adult and child deaths from AIDS | 2014



Total: 1.2 million [980 000 – 1.6 million]

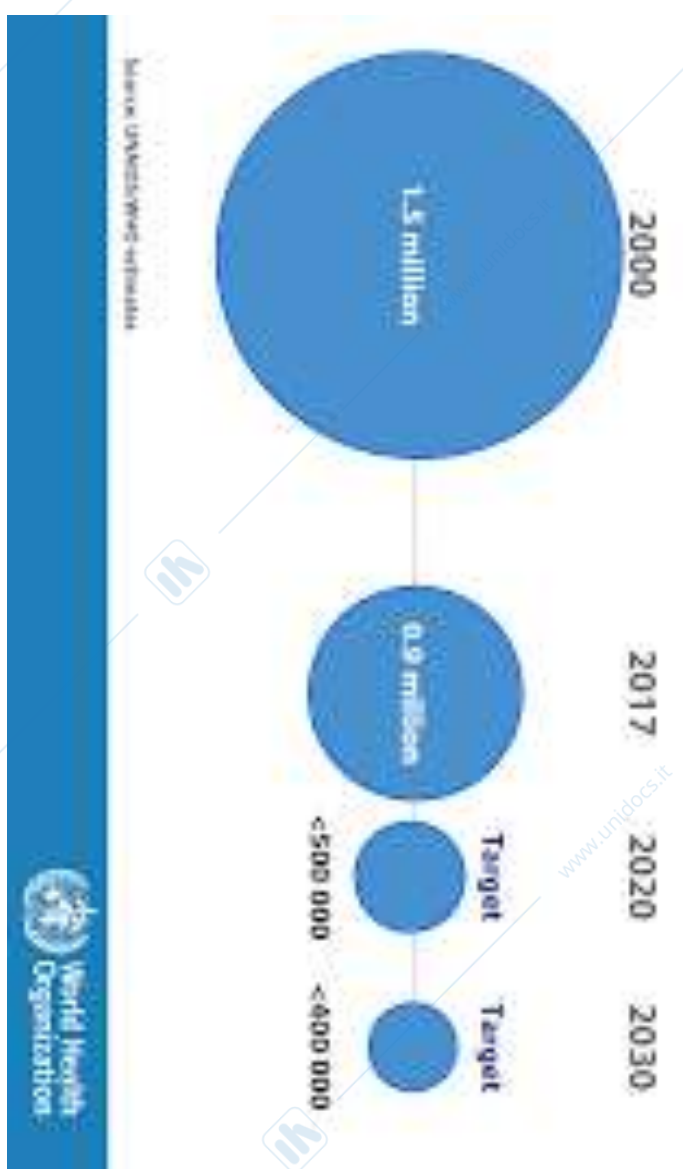


Summary of the global HIV epidemic (2017)



Source: UNAIDS/WHO estimates

Number of HIV-related deaths



www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

DISTRIBUZIONE geografica di SOTTOTIPI HIV-1 gruppo M



Medscape®

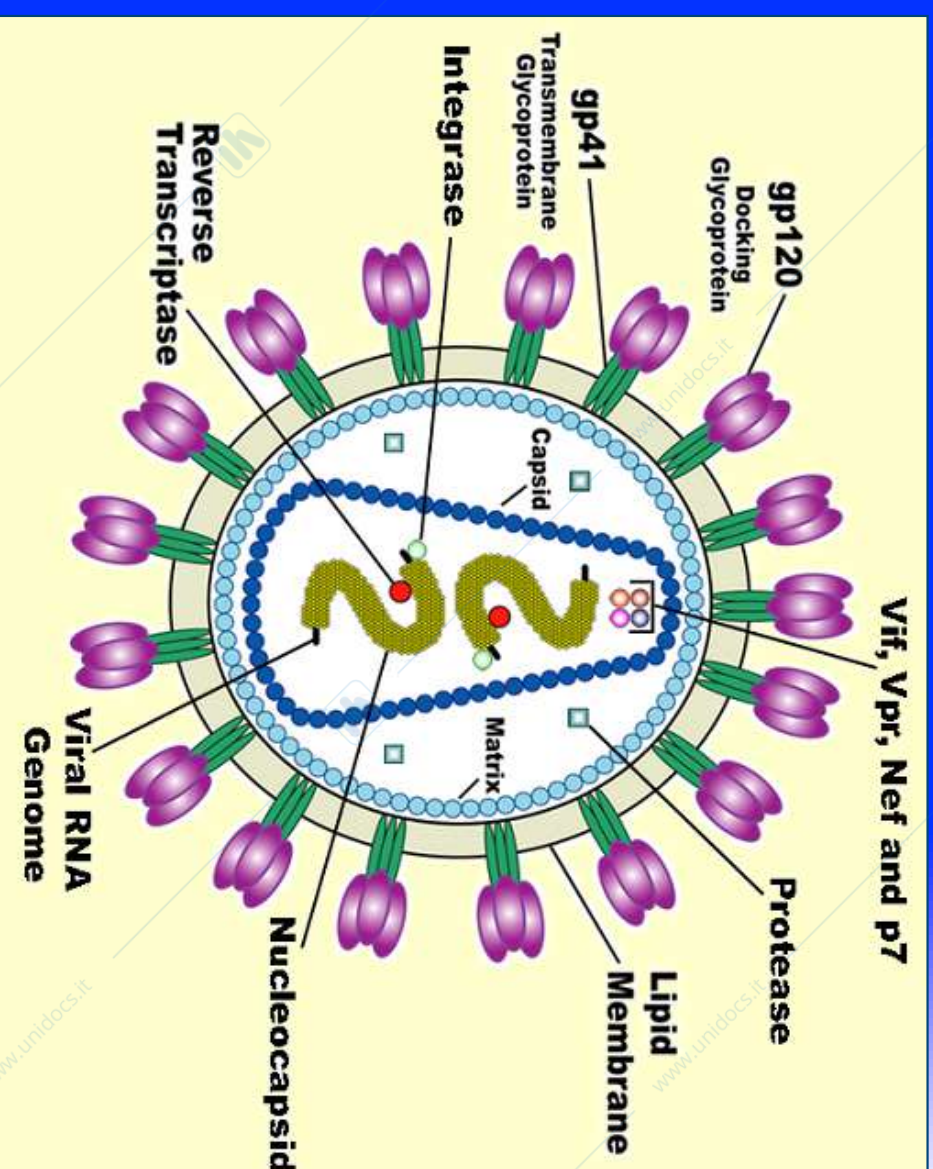
www.medscape.com

Source: Future HIV Ther © 2008 Future Medicine Ltd

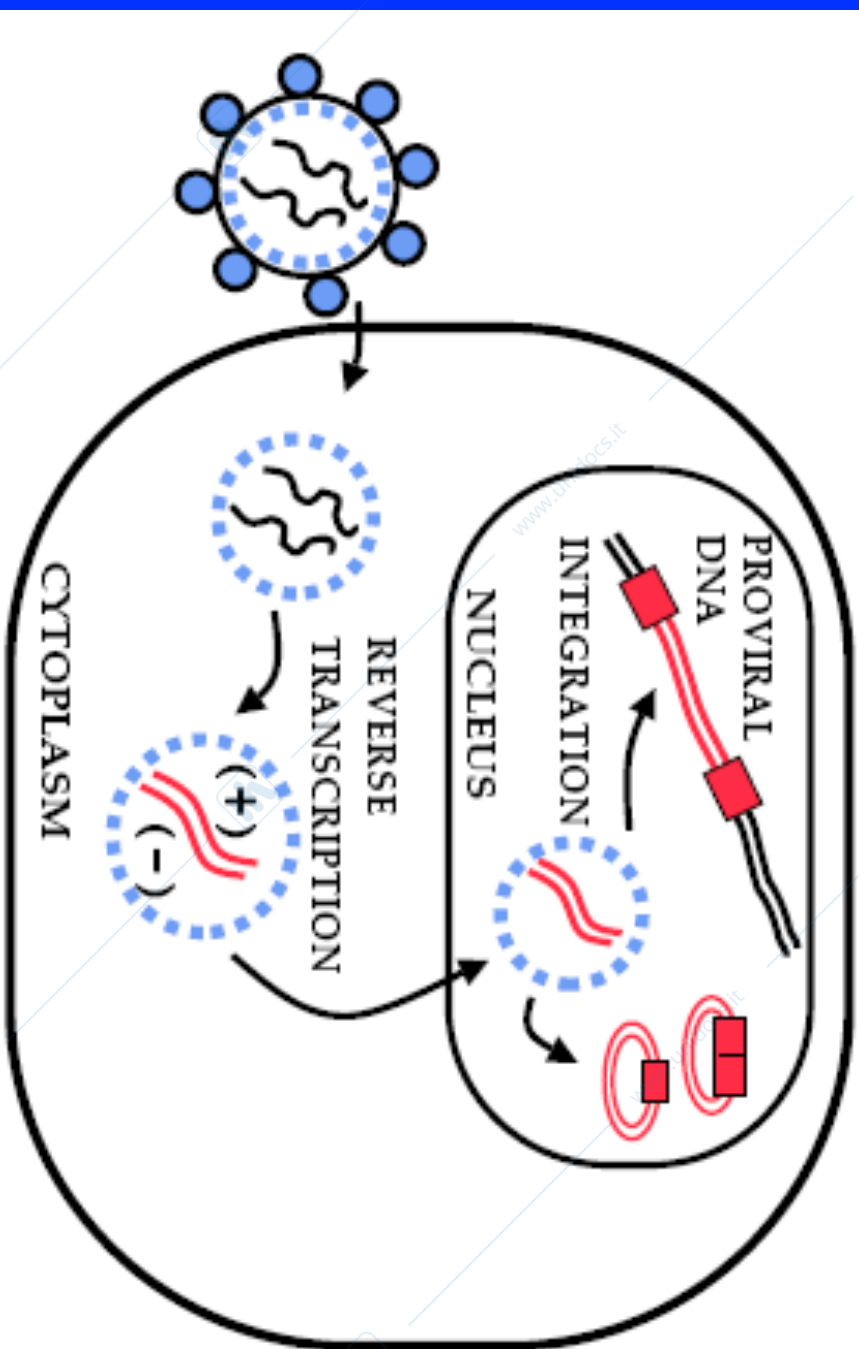
HIV & AIDS

Diametro: 110 nm

- envelope
 - transmembrane gp41
 - surface gp120
 - matrix protein (MA) p17
- core
 - capsid proteins (CA) p24
 - nucleocapsid protein (NC) p7 and p6
 - protease (PR) p10
 - reverse transcriptase (RT) p66/p51
 - integrase (IN) p32
 - 2 (+)ssRNA molecules

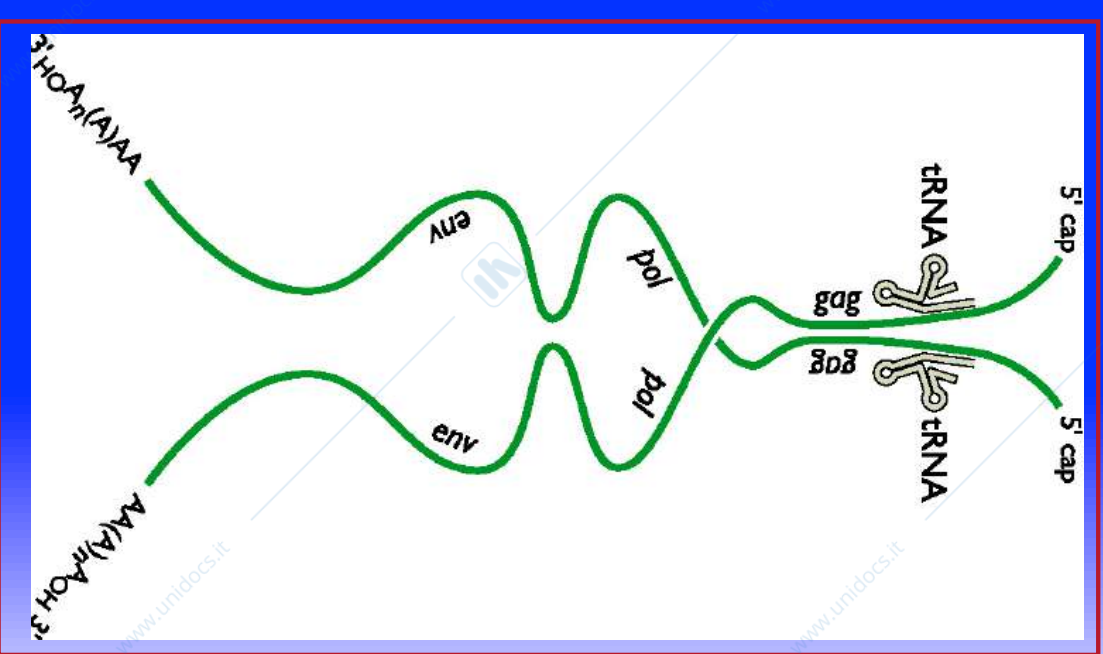


The Early Phase of the Life Cycle: Production of the Provirus

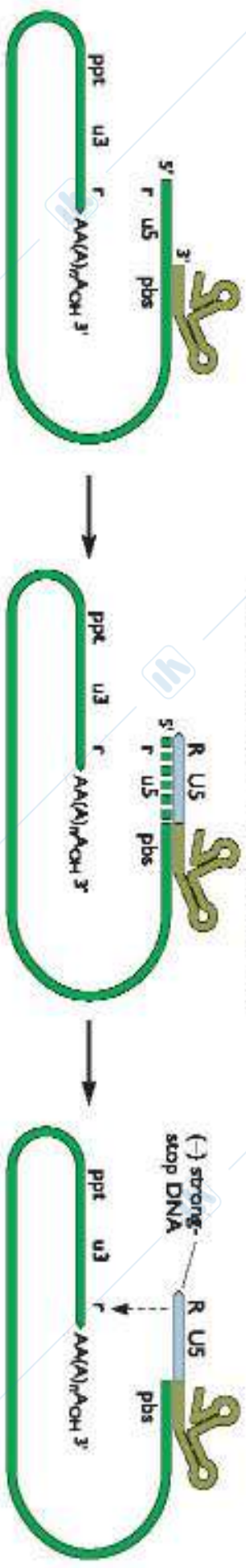


Genoma dei Retrovirus

- ◆ il genoma dei Retrovirus: RNA(+)
- ◆ 7-10 kb/copia
- ◆ Diploide: 2 copie/virione
- ◆ alto grado di ricombinazione

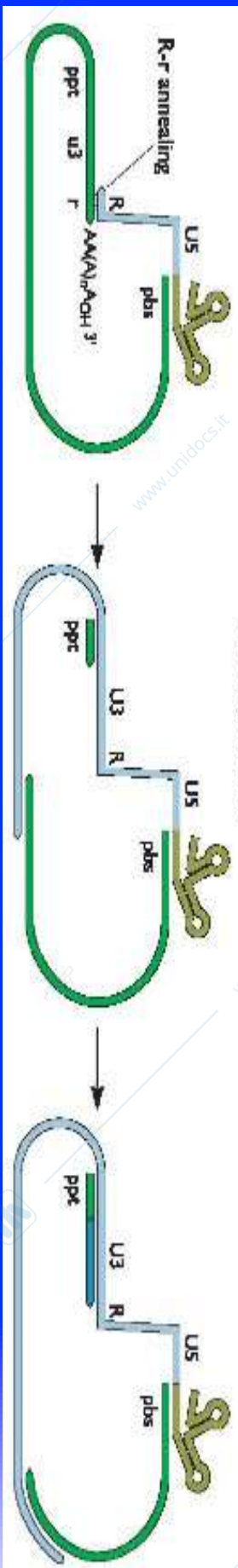


Initiation of (-) strand DNA synthesis



The 5' end of the viral RNA genome is degraded by the RNase H activity of RT as the (-) strand DNA is synthesized.

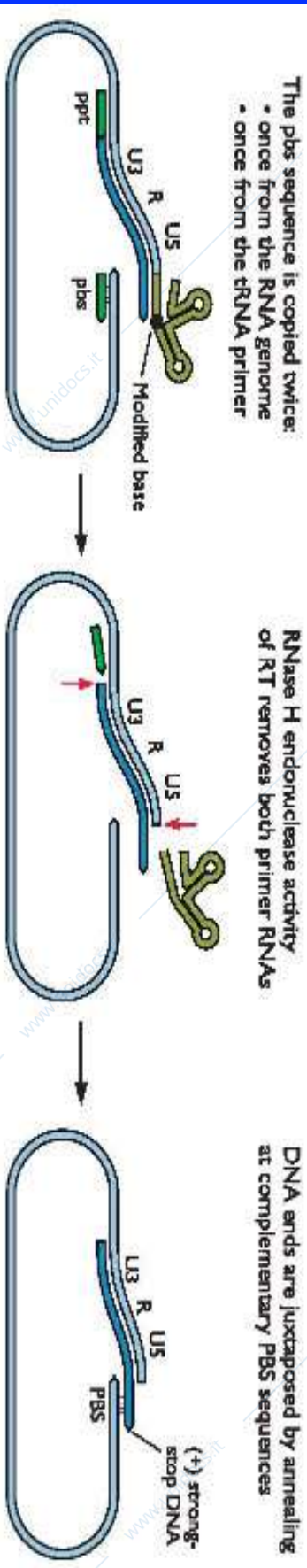
First template exchange



The RNA genome continues to be degraded as (-) strand DNA is synthesized

(+) strand DNA synthesis begins, primed by the ppts RNA

(+) strand DNA synthesis



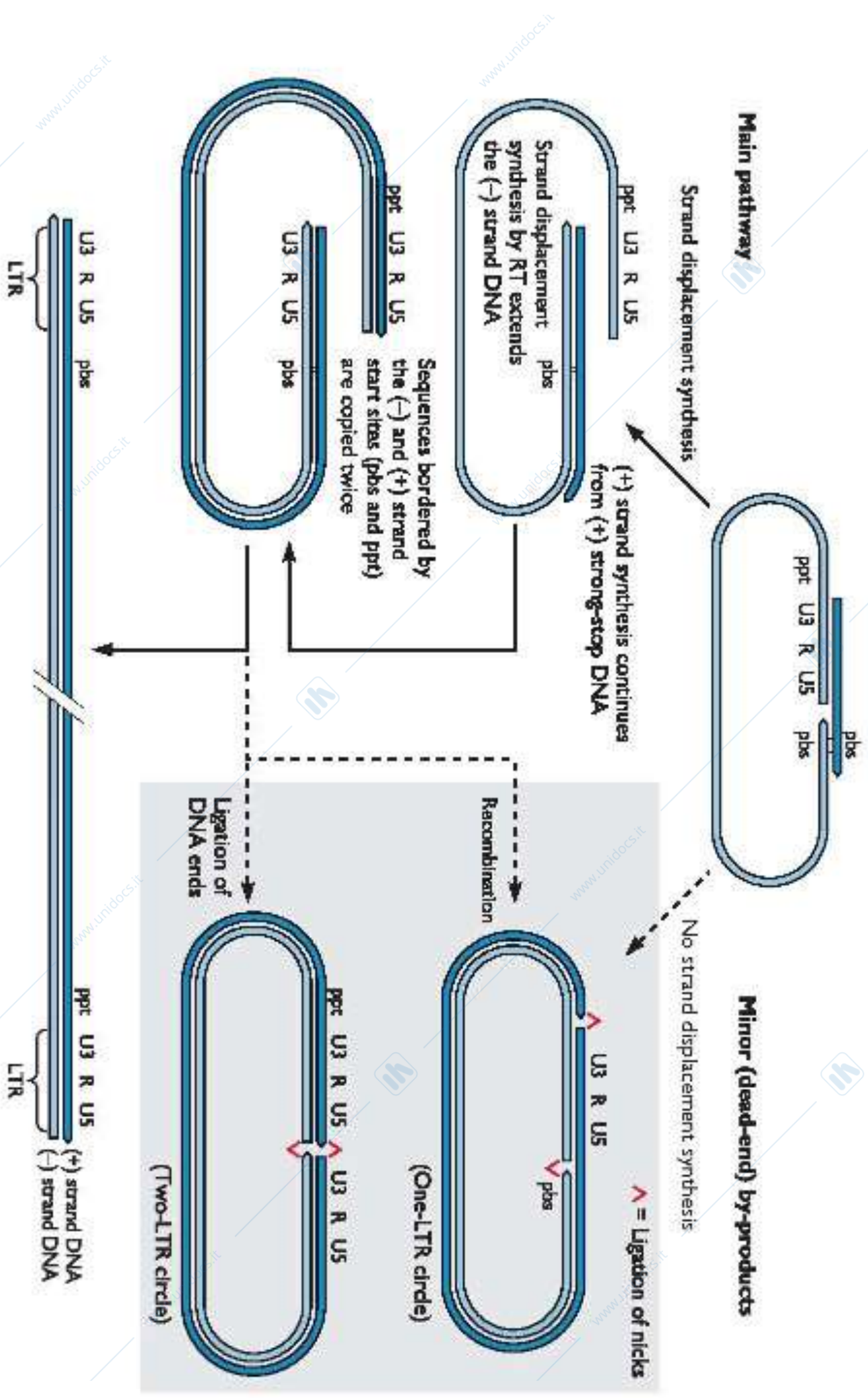
The pbs sequence is copied twice:
 • once from the RNA genome
 • once from the tRNA primer

RNase H endonuclease activity of RT removes both primer RNAs

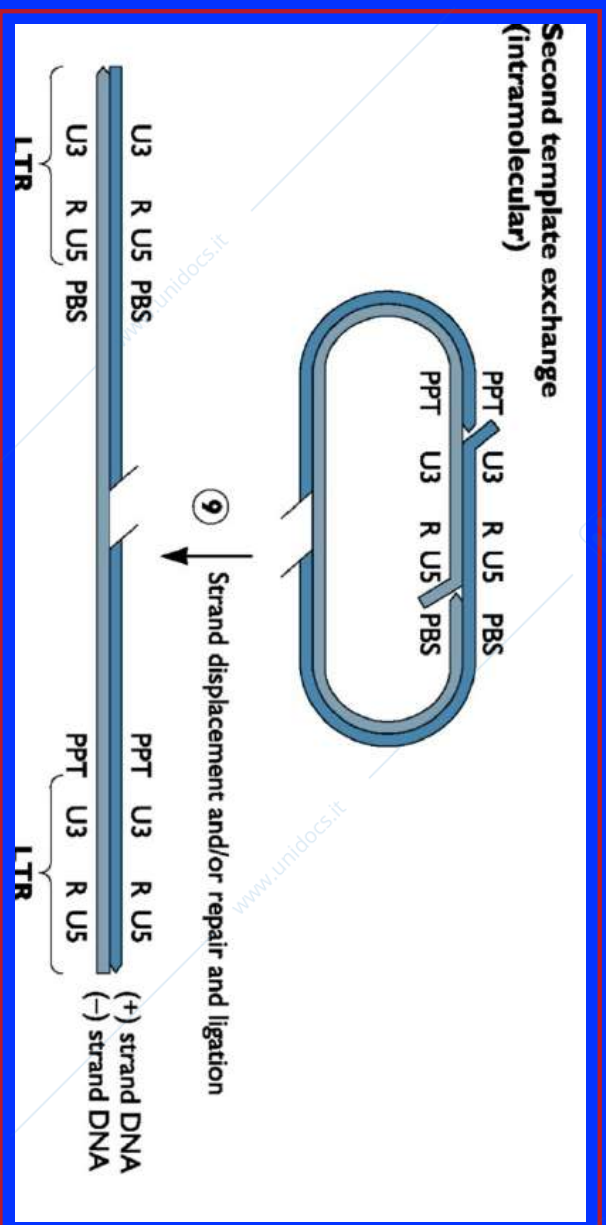
DNA ends are juxtaposed by annealing at complementary PBS sequences

(+) strong-stop DNA

Second template exchange is facilitated by annealing of PBS sequences



La stupefacente azione della RT: 2° scambio di template



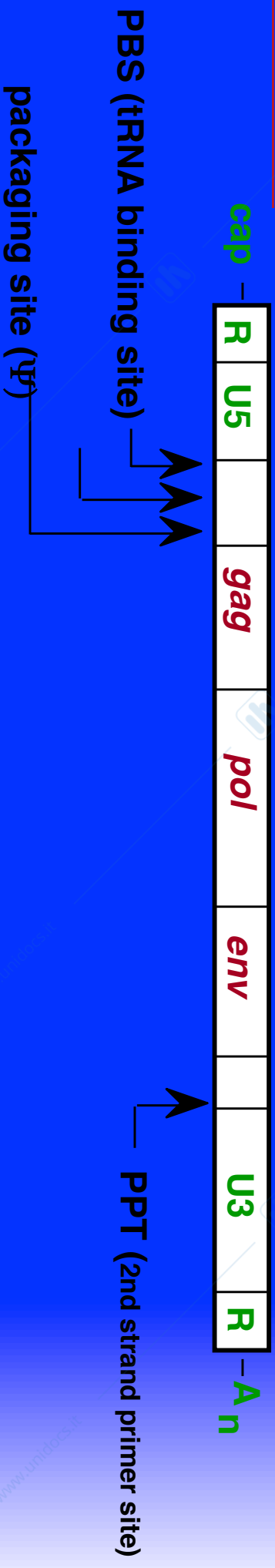
- ◆ DNA circolare con estremità 5' (U3-R-U5) appaiate
- ◆ RT (attività di elicasi?) svolge il DNA appaiato e continua la sintesi fino alle due estremità 3'

RT ha scarsa attività di proof-reading

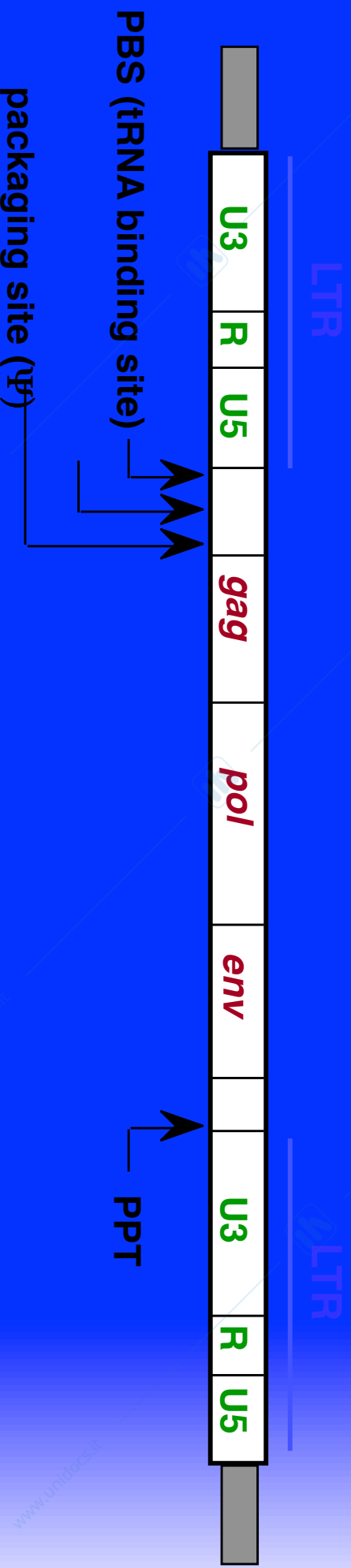
- ◆ alto grado di mutazioni (10^{-4} – 10^{-6})
- ◆ 1 mutazione/genoma/ciclo di replicazione

Replicazione dei Retrovirus

HIV-1 RNA

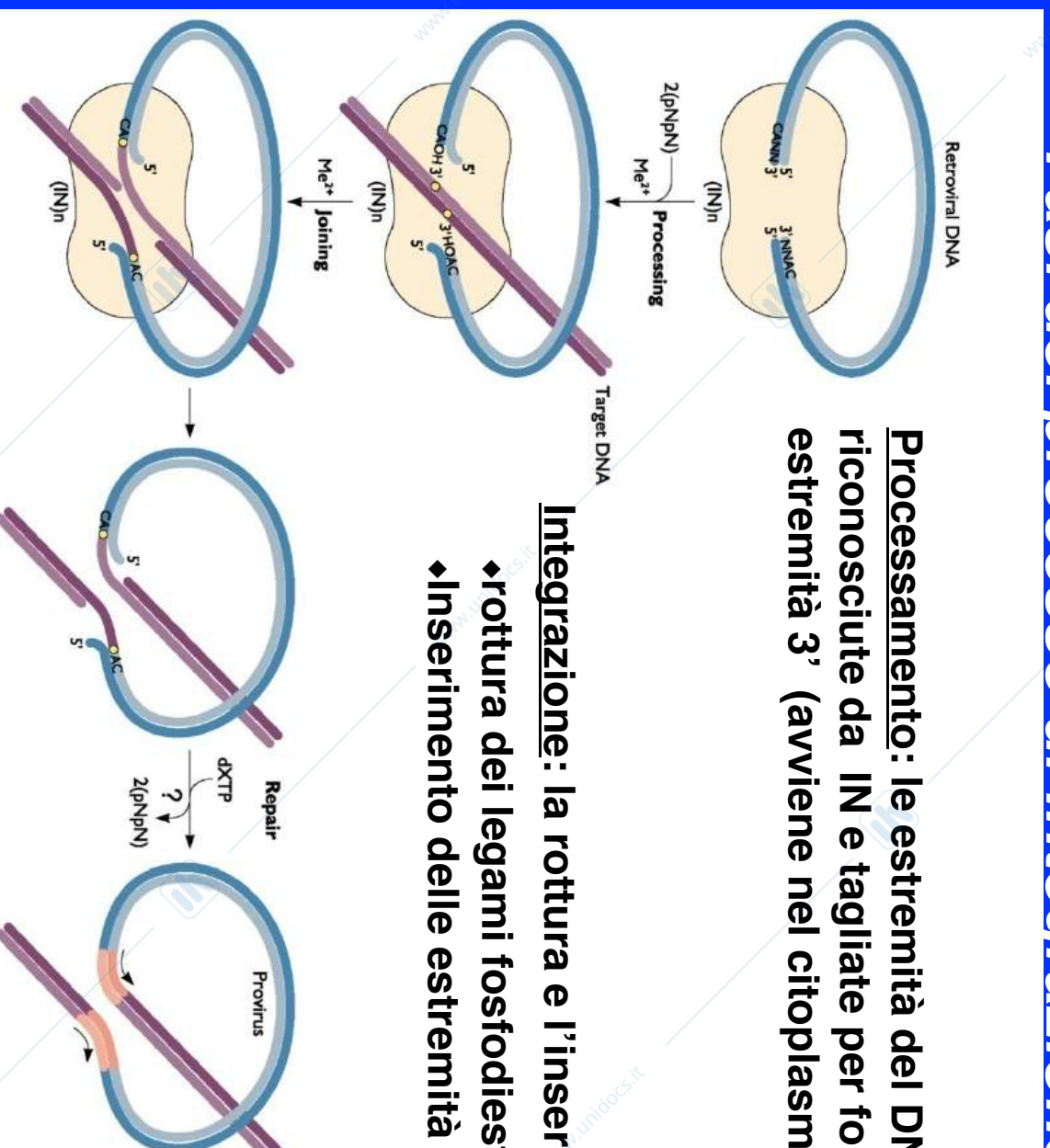


HIV-1 DNA



Fasi del processo di integrazione del DNA retrovirale

Processamento: le estremità del DNA virale vengono riconosciute da IN e tagliate per formare idonee estremità 3' (avviene nel citoplasma).



Integrazione: la rottura e l’inserimento sono coordinati

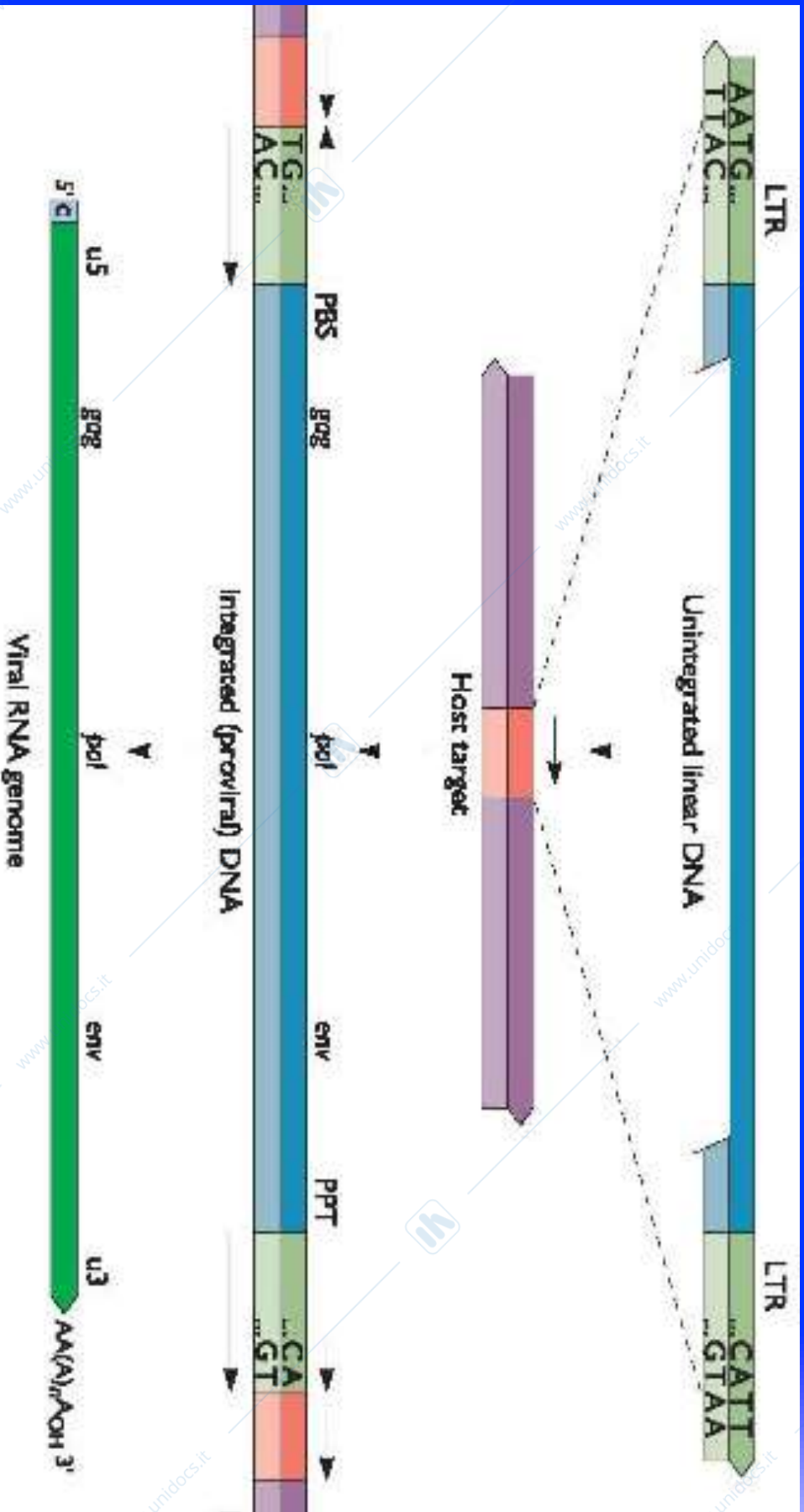
- ◆ rottura dei legami fosfodiestereici nel DNA dell’ospite (4-6 bp)
- ◆ inserimento delle estremità 3’ virali (clivate)

Formazione di intermedi “gapped”

Sintesi di riparo (enzimi dell’ospite)

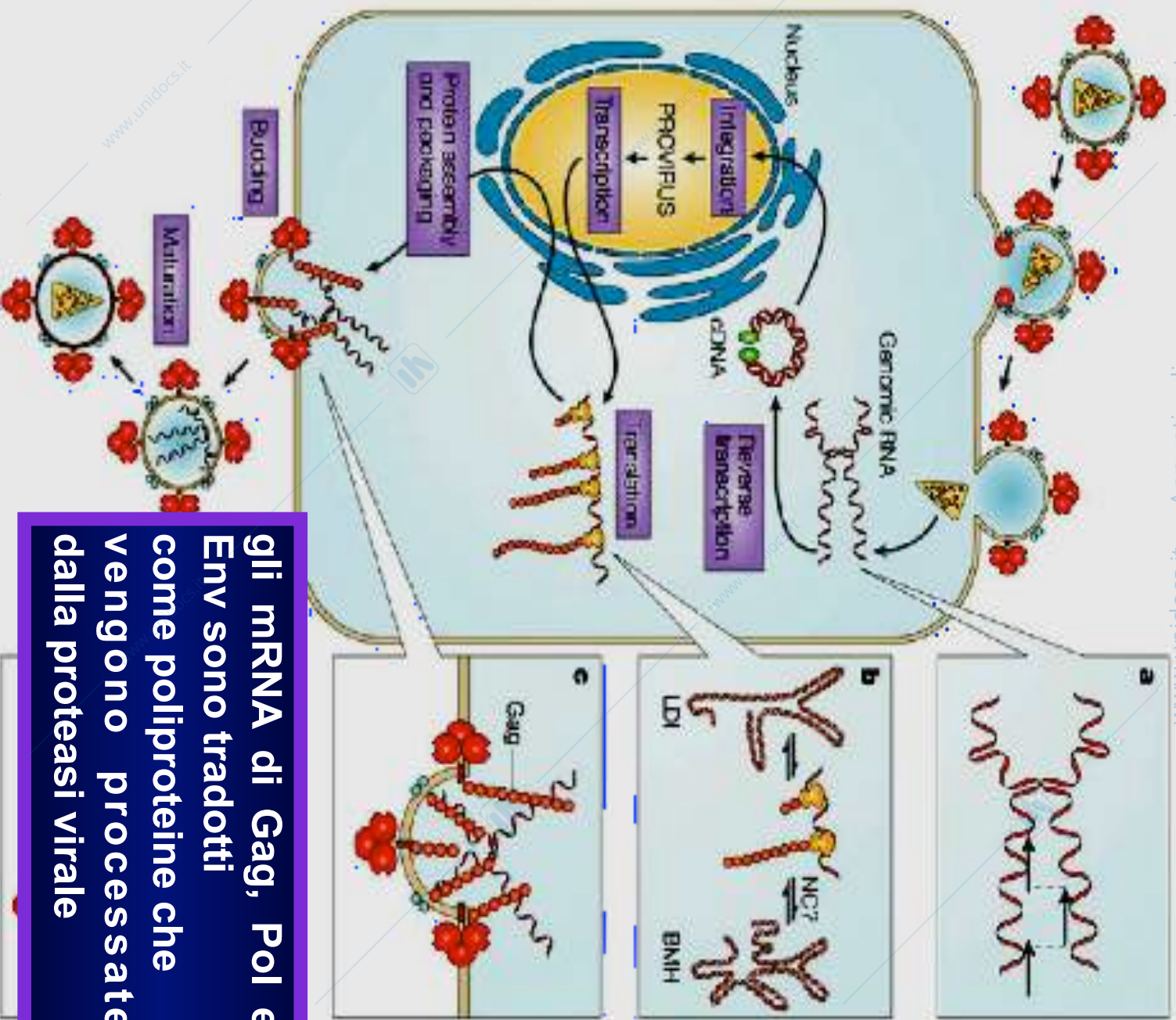
L’integrazione è sito specifica per il genoma virale (estremità), ma casuale nel genoma della cellula ospite

INTEGRATION

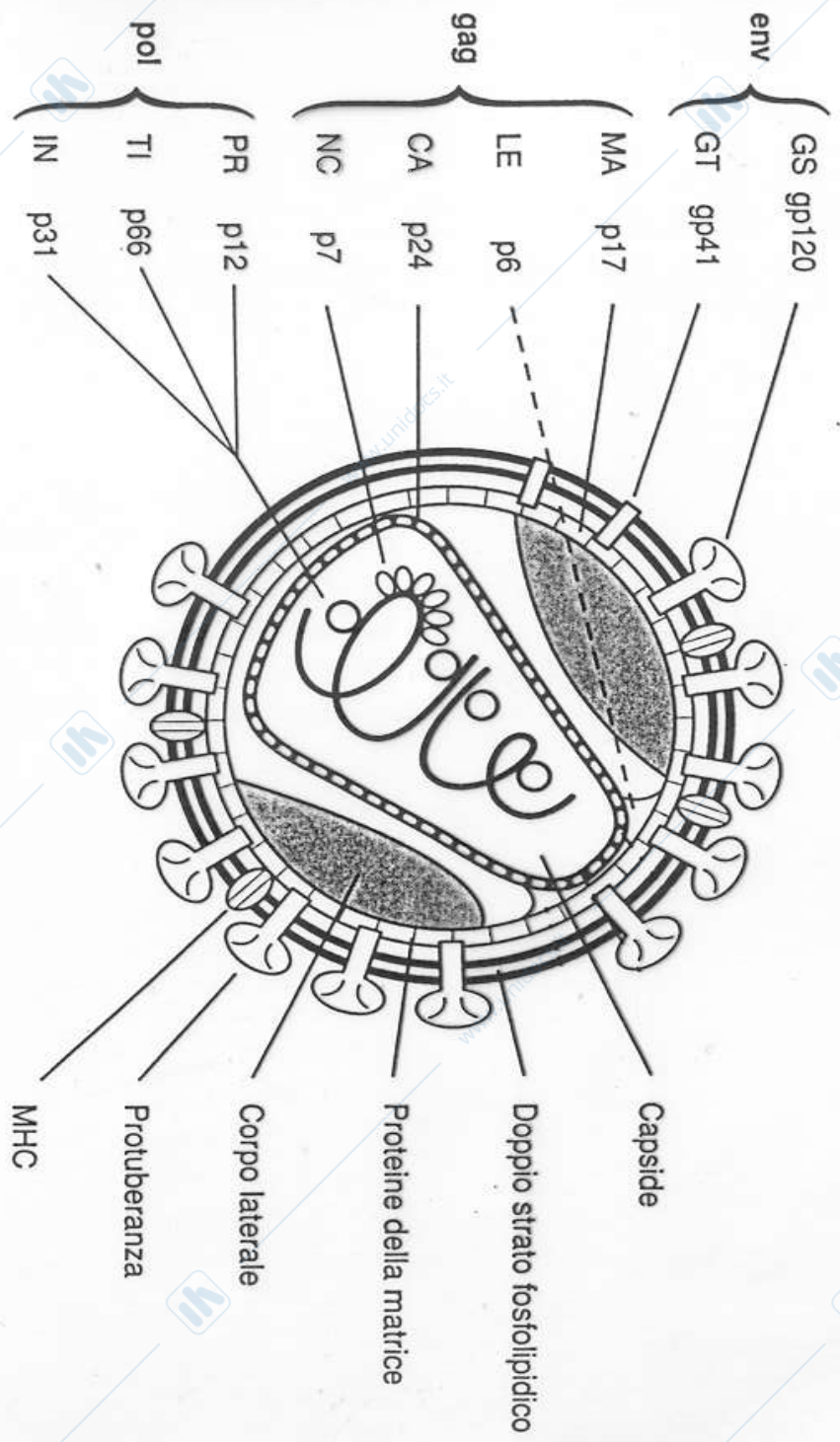


Integrasi virale (IN)
↓
**taglia DNA virale
e cellulare**

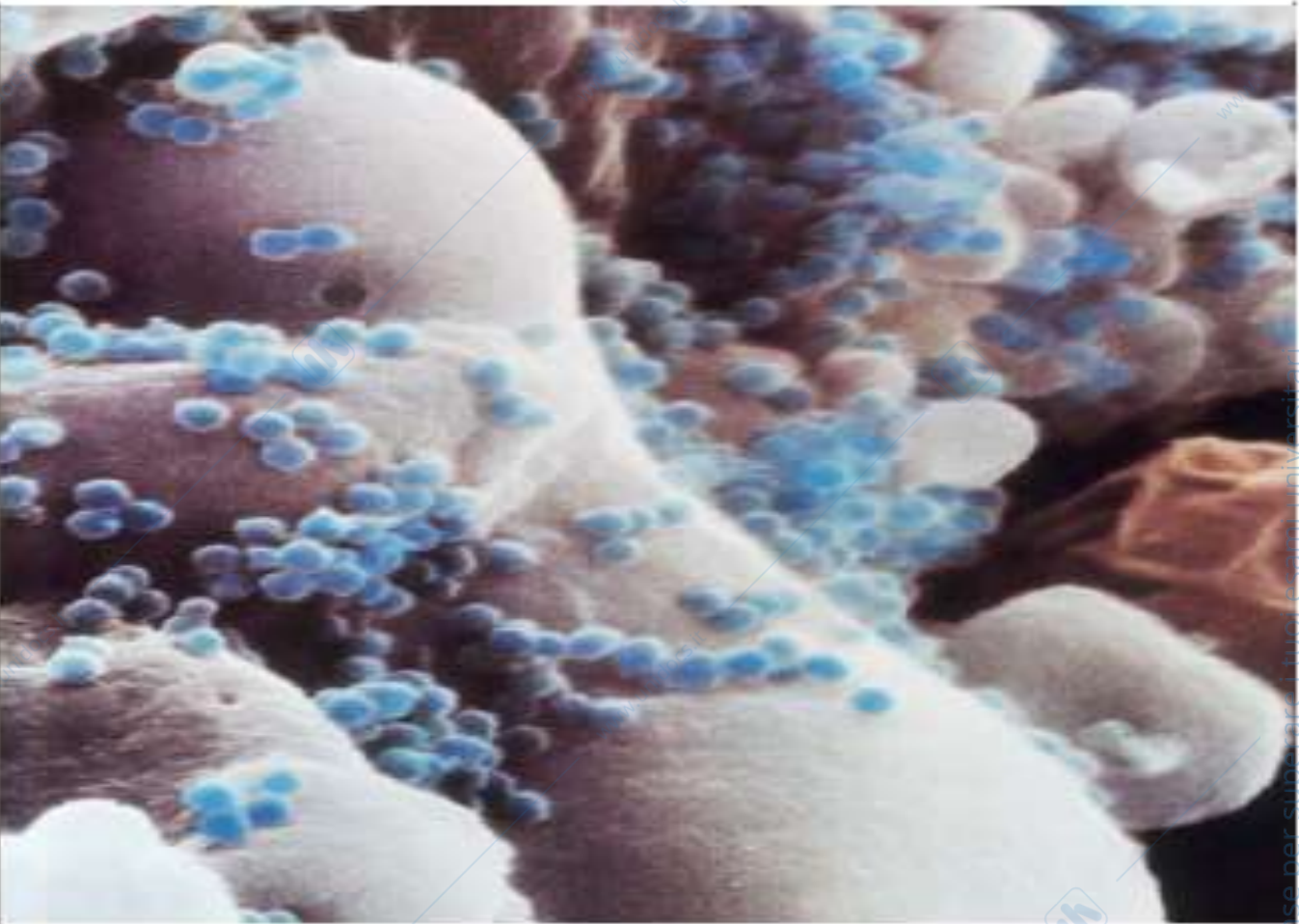
DNA virale integrato
(provirus) 4 coppie
di basi piu' corto del
**DNA circolare non
integrato**



**gli mRNA di Gag, Pol e
Env sono tradotti
come poliproteine che
vengono processate
dalla proteasi virale**



18.1 Struttura dell'HIV. GS, glicoproteina di superficie; GT, glicoproteina transmembranacea; MA, matrice; LE, proteina di legame; CA, proteina del capside; NC, proteine del nucleocapside; PR, proteasi, TI, trascrittasi inversa; IN, integrasi; MHC, antigeni di istocompatibilità. (Da Baron S. [ed.]: *Medical microbiology*, 4^a ed., UTMB, Galveston, 1996.)

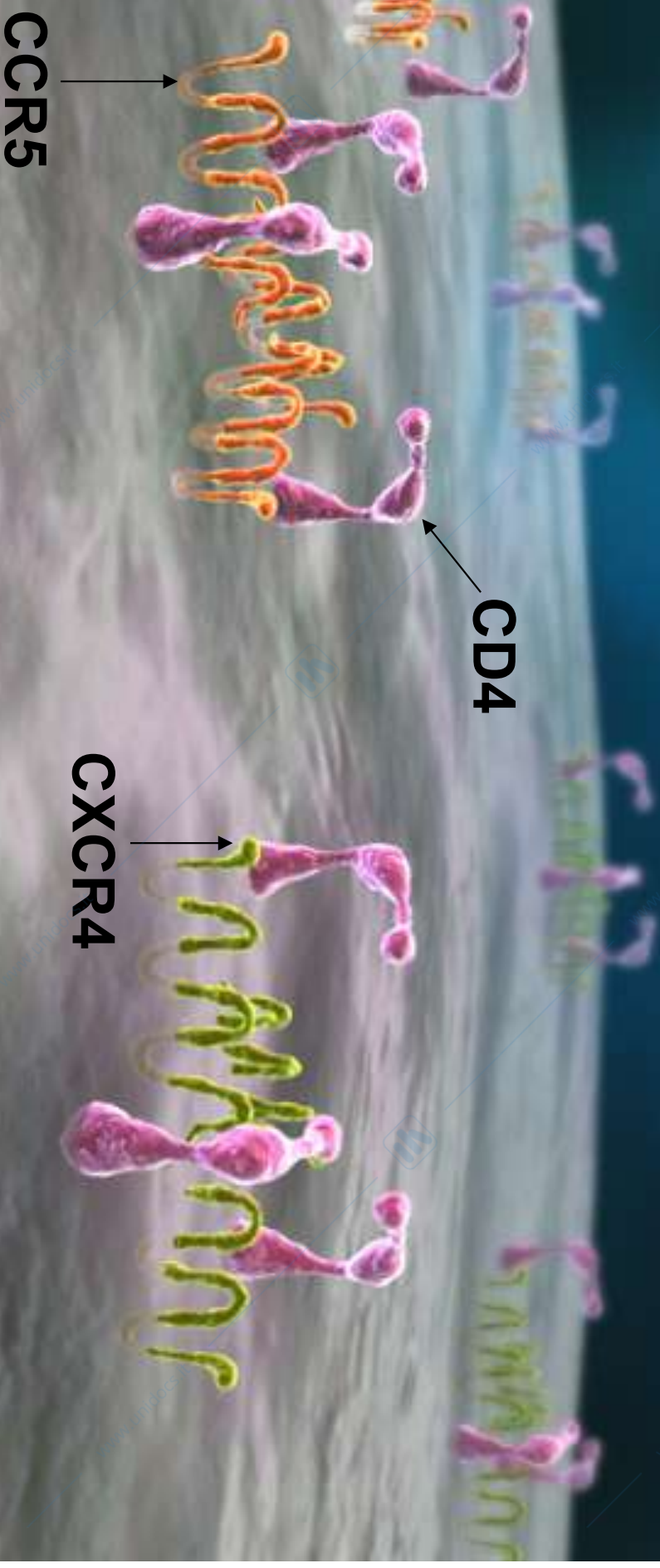


Surface of a T Lymphocyte Infected by HIV.
Photograph by Lennart Nilsson, M.D., Stockholm, Sweden, 1985.

CELLULE INFETTATE:

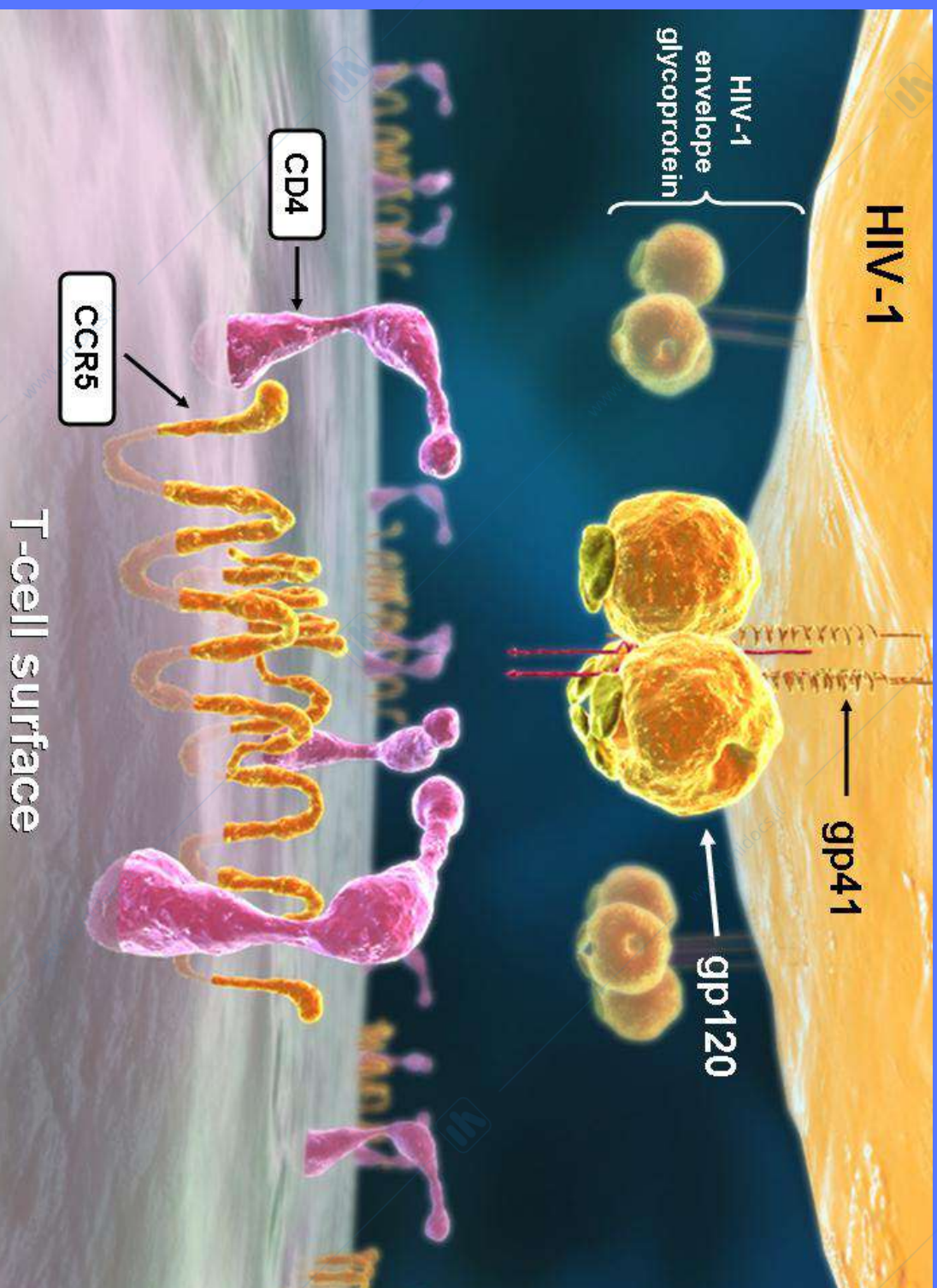
- **Linfociti T CD4+**
- **Linfociti T CD8+**
- **Linfociti B**
- **Monociti-macrofagi**
- **Cell. dendritiche**
- **Fibroblasti**
- **Cell. gliali**
- **Cell. endoteliali**
- **Precursori emopoietici**

CCR5 e CXCR4 agiscono da co-recettori per il legame e l'ingresso di HIV



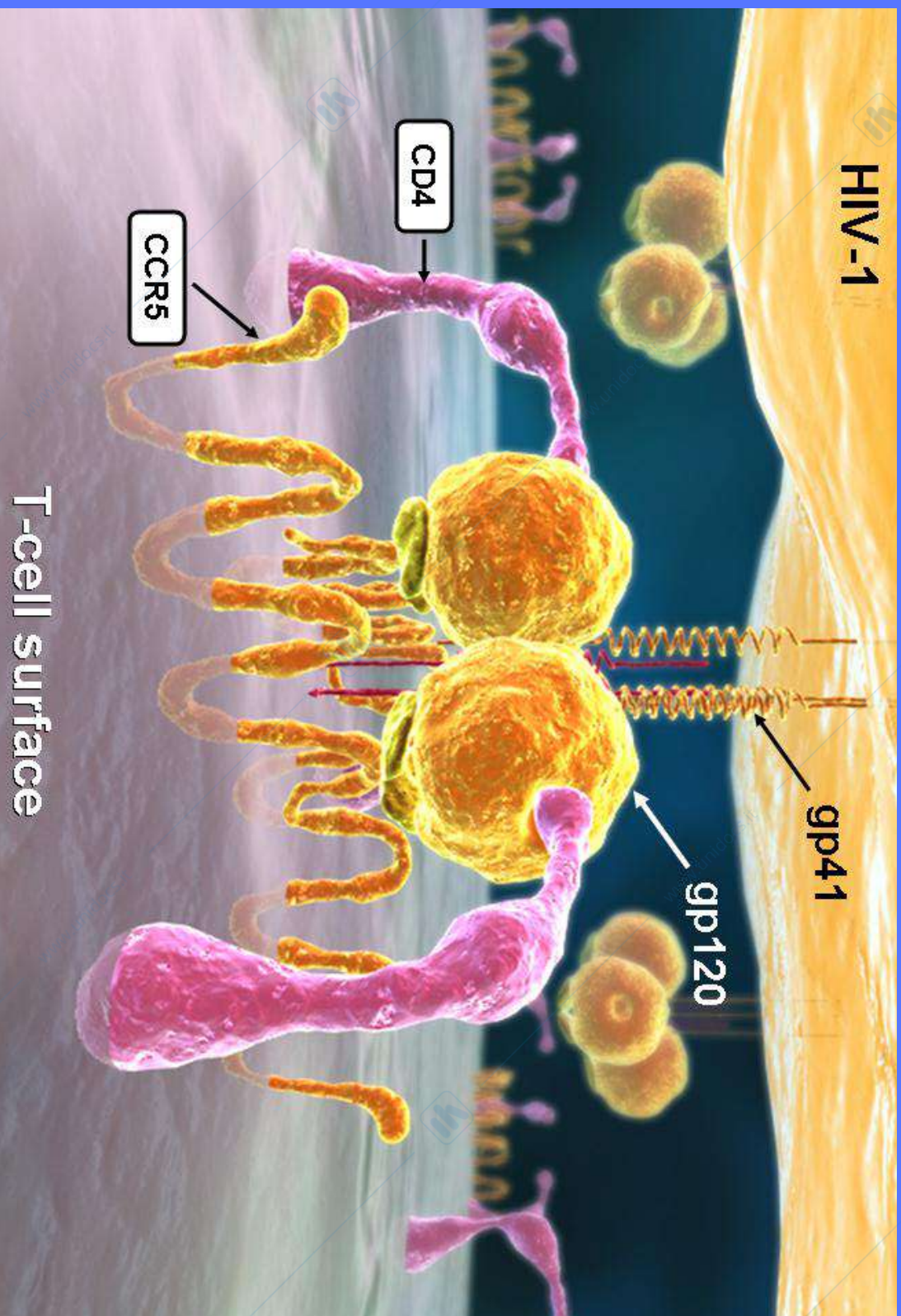
Superficie del linfocita T

Structure of the HIV-1 Envelope Glycoprotein



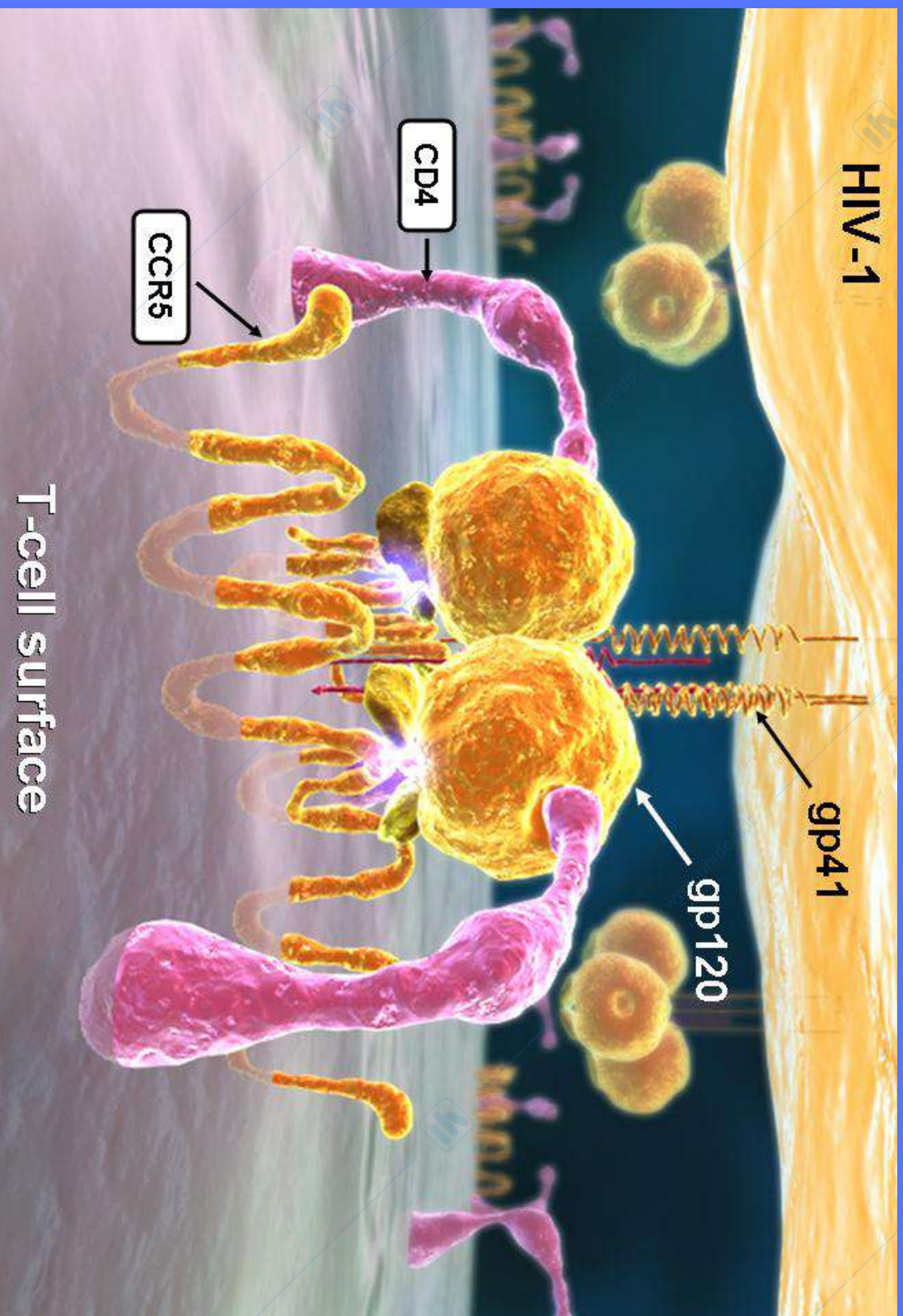
Copyright © 2002-2008 Pfizer Inc. All rights reserved. Reprinted with permission.

Binding of the gp120 Subunit to CD4



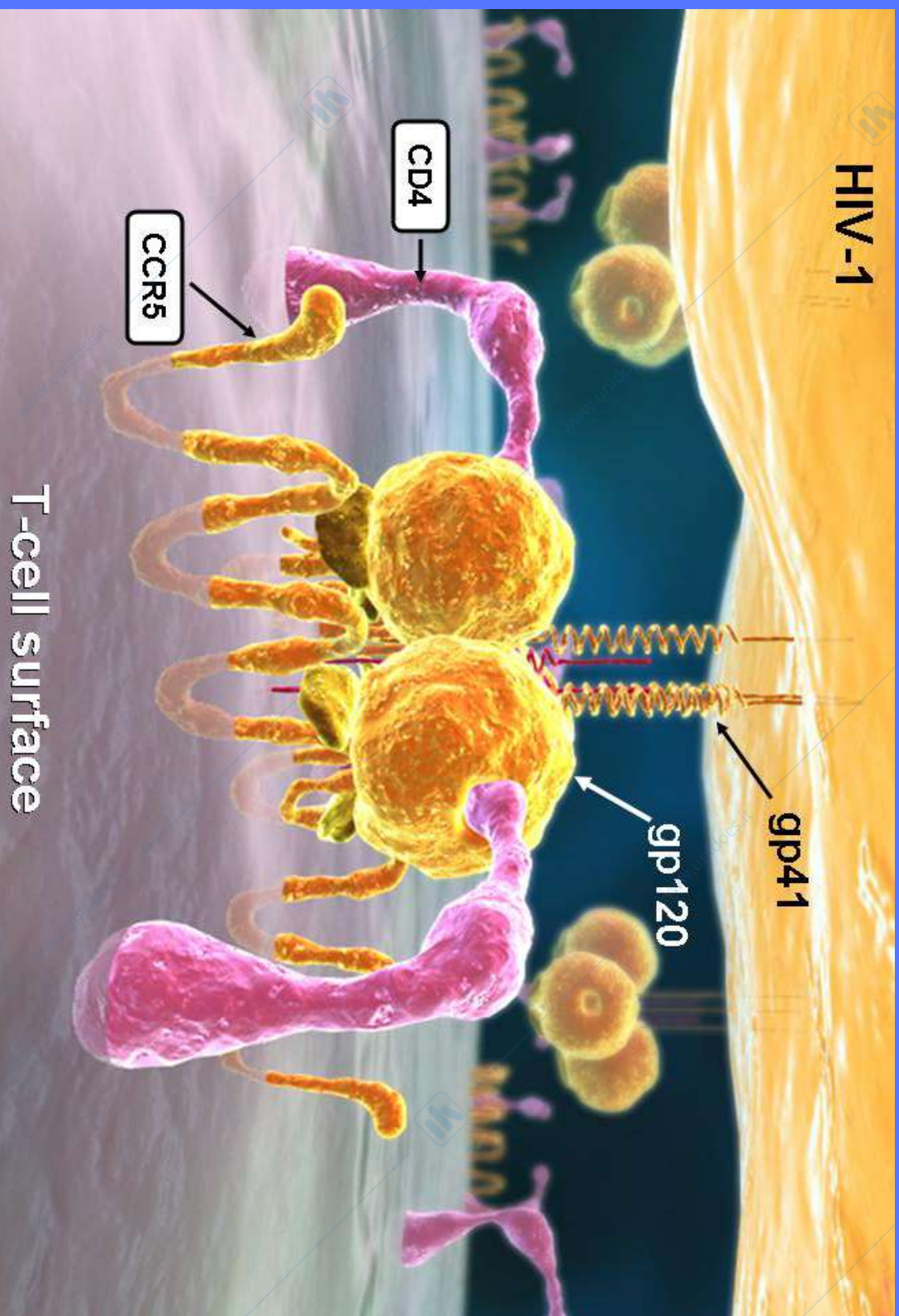
Copyright © 2002-2008 Pfizer Inc. All rights reserved. Reprinted with permission.

Conformational Change



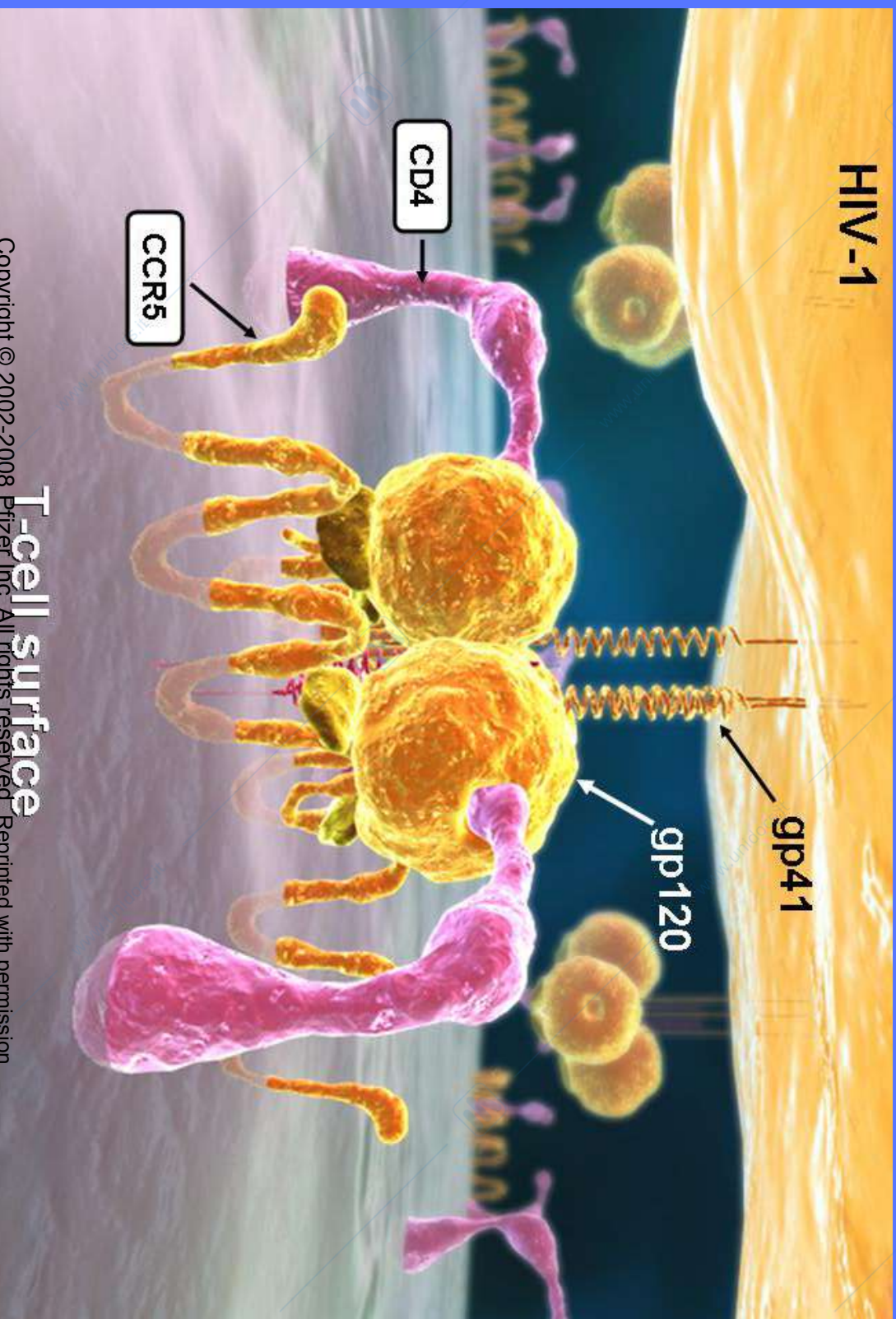
Copyright © 2002-2008 Pfizer Inc. All rights reserved. Reprinted with permission.

gp120 Binds to the Coreceptor, CCR5

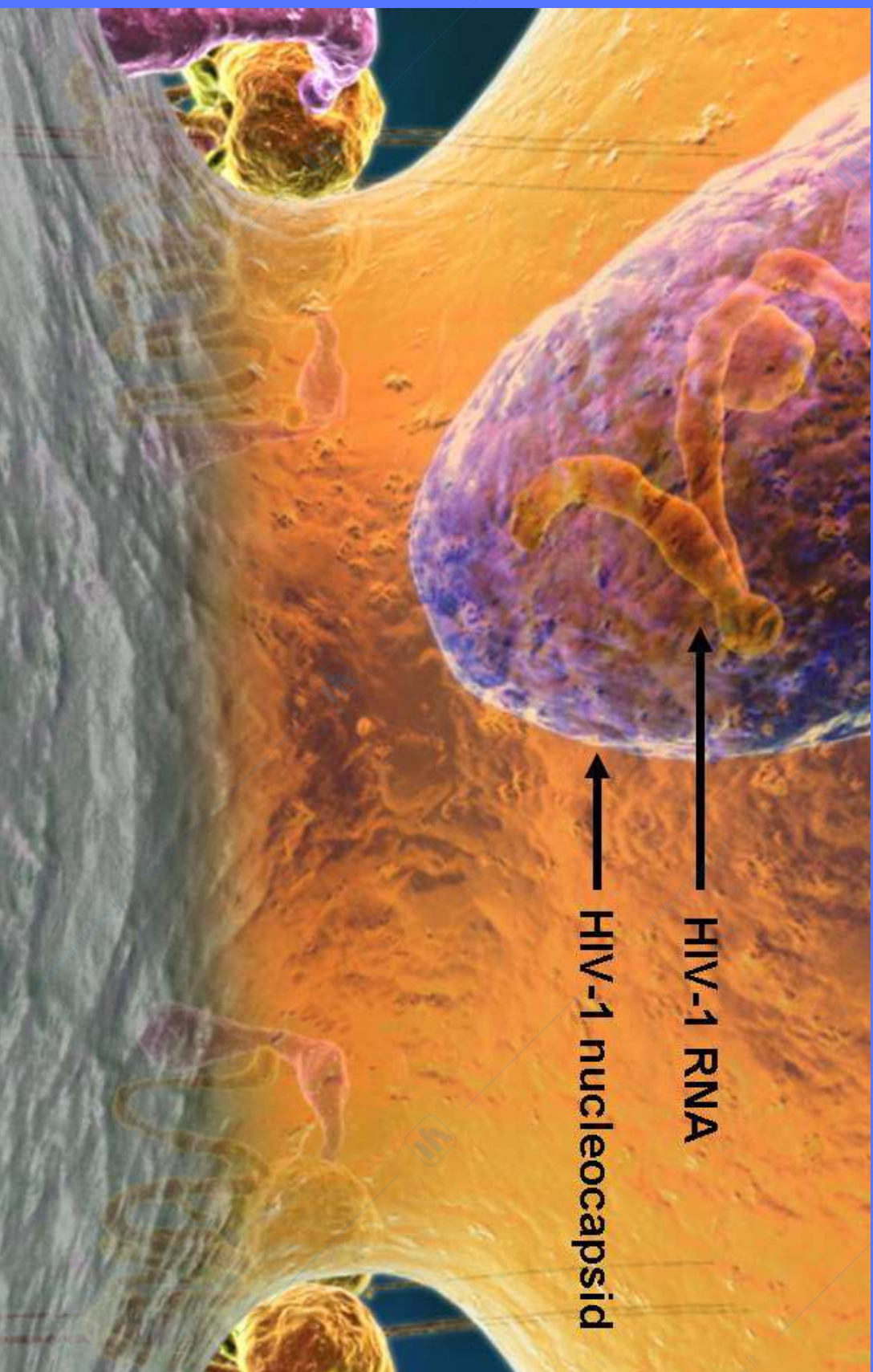


Copyright © 2002-2008 Pfizer Inc. All rights reserved. Reprinted with permission.

Conformational Changes in the gp41 Subunit

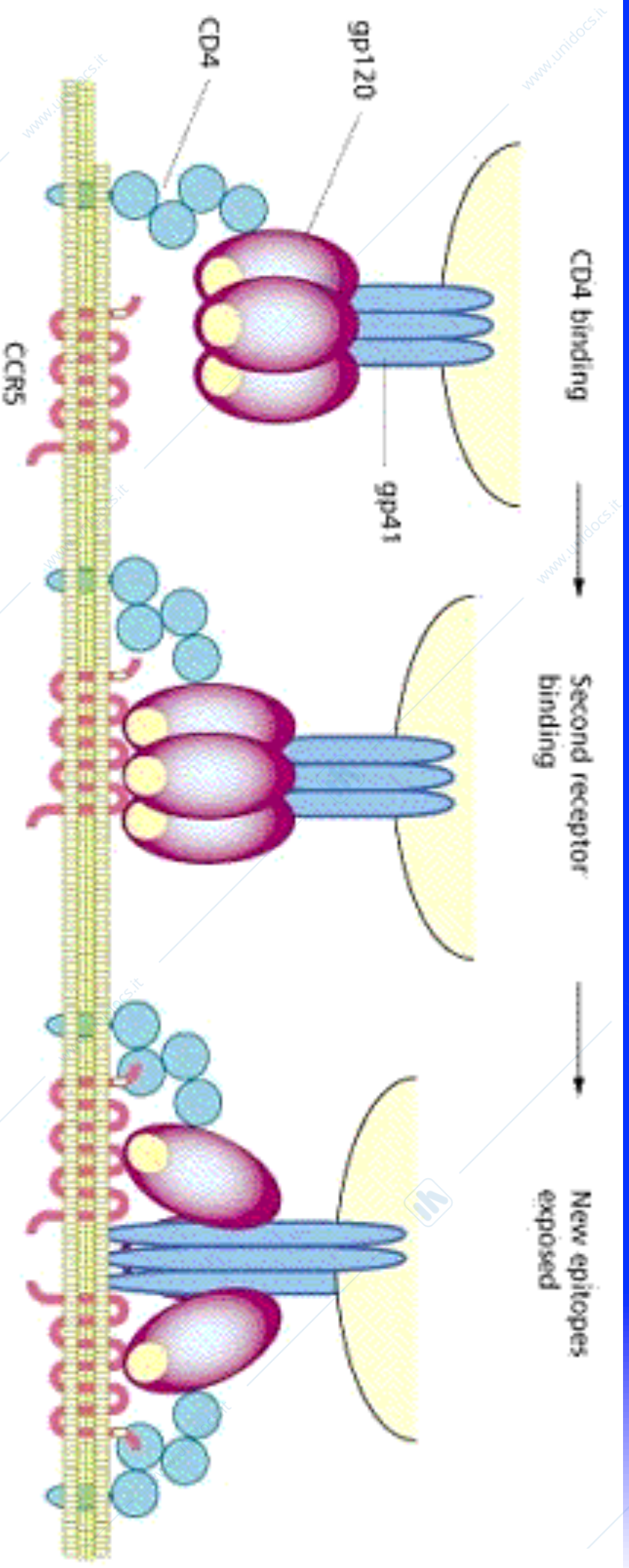


Fusion of the Viral and Cell Membranes



Copyright © 2002-2008 Pfizer Inc. All rights reserved. Reprinted with permission.

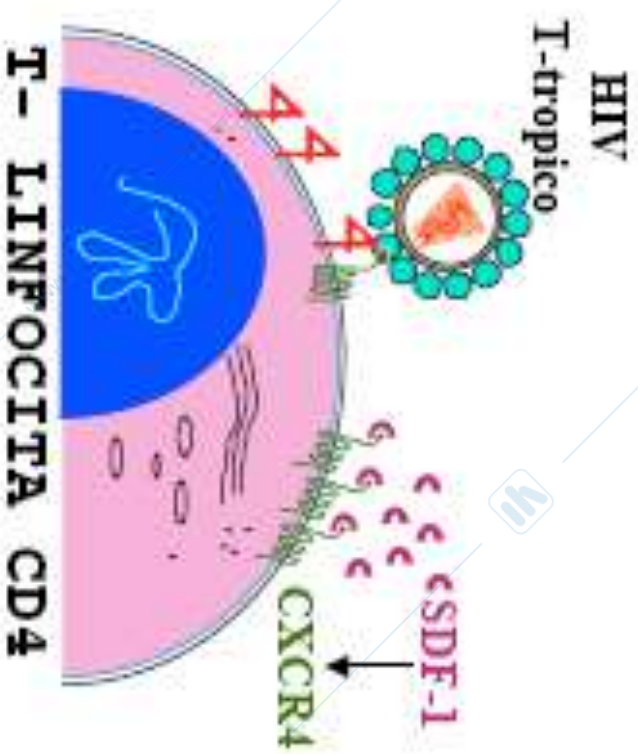
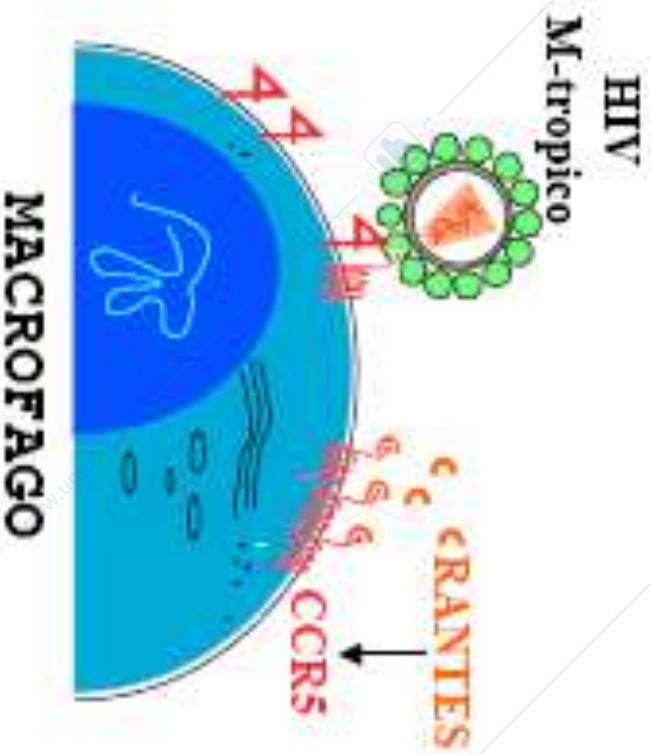
- HIV infetta le cellule che co-esprimono CD4 e CCR5 o CXCR4, recettori per chemokine.
- Ciò porta alla infezione sia di macrofagi, che esprimono bassi livelli di CD4 e CCR5, sia di T helper, che esprimono alti livelli di CD4 e CXCR4.



ESISTONO CEPPI DIVERSI DI HIV CHE USANO DUE CO-RECEPTORI DIVERSI

- I CEPPI M-TROPICI USANO CCR5 (IL RECEPTORE DI RANTES)

- I CEPPI T-TROPICI USANO CXCR4 (IL RECEPTORE DI SDF-1)



www.unidocs.it

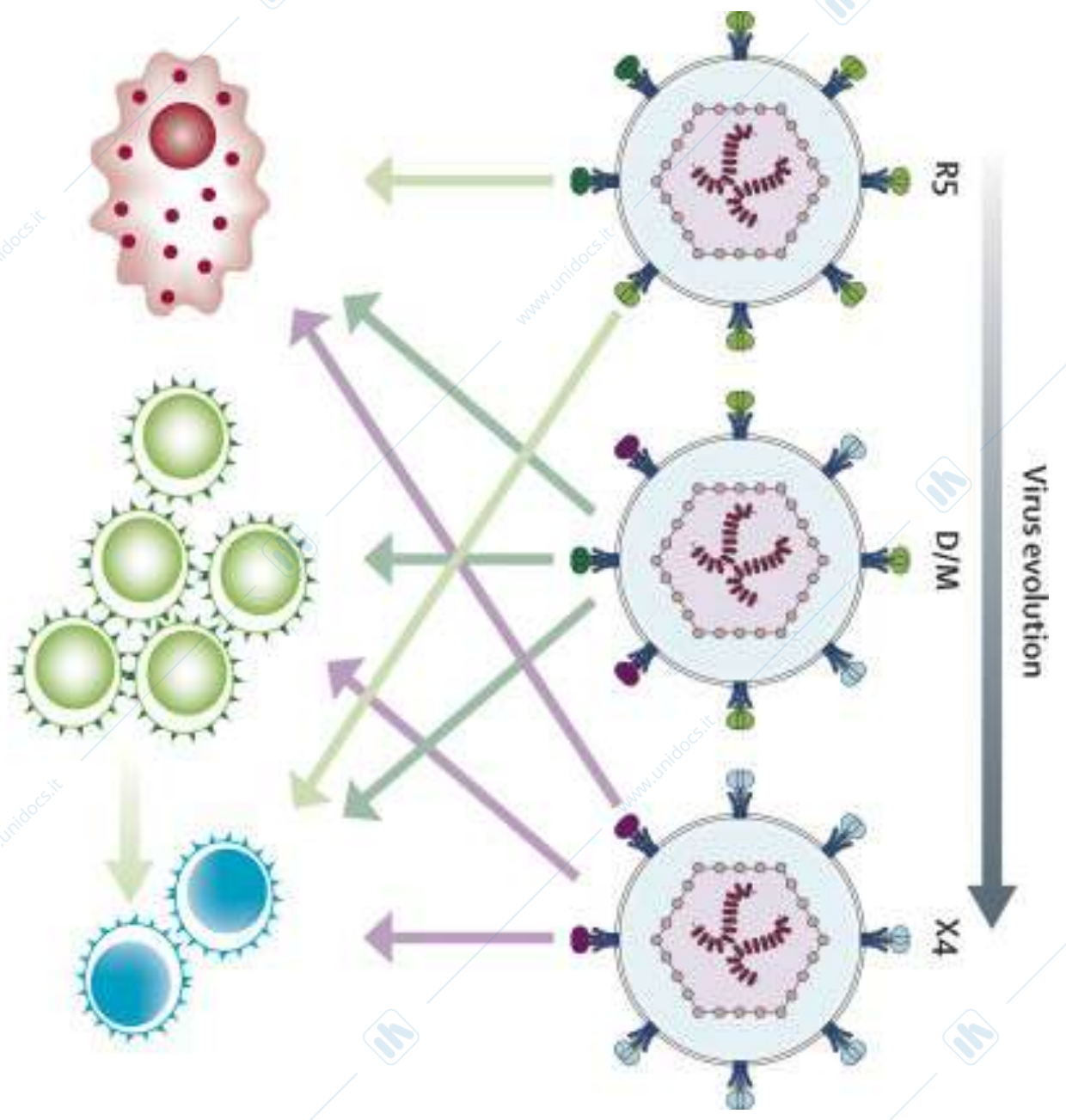
www.unidocs.it

www.unidocs.it

Macrophages
CCR5+/CXCR4+

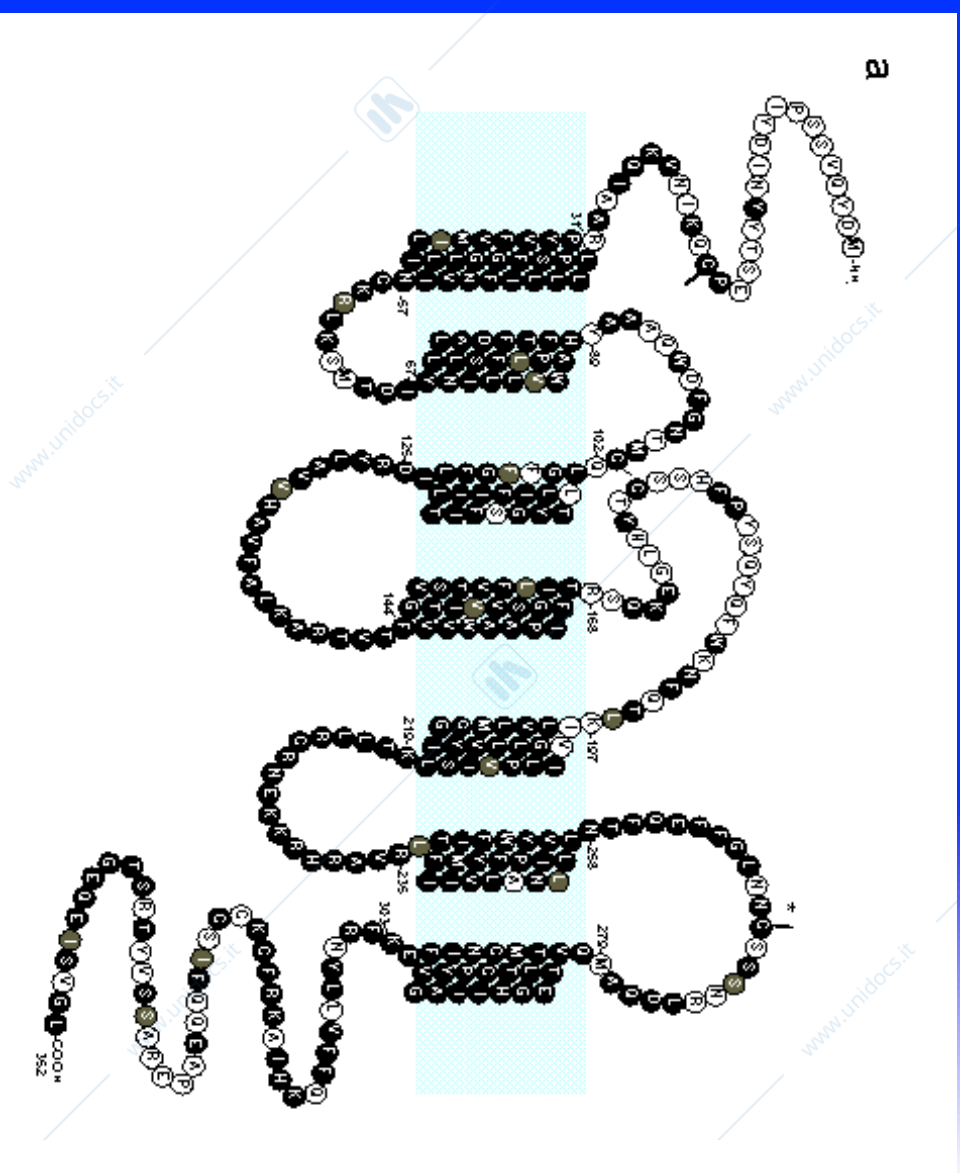
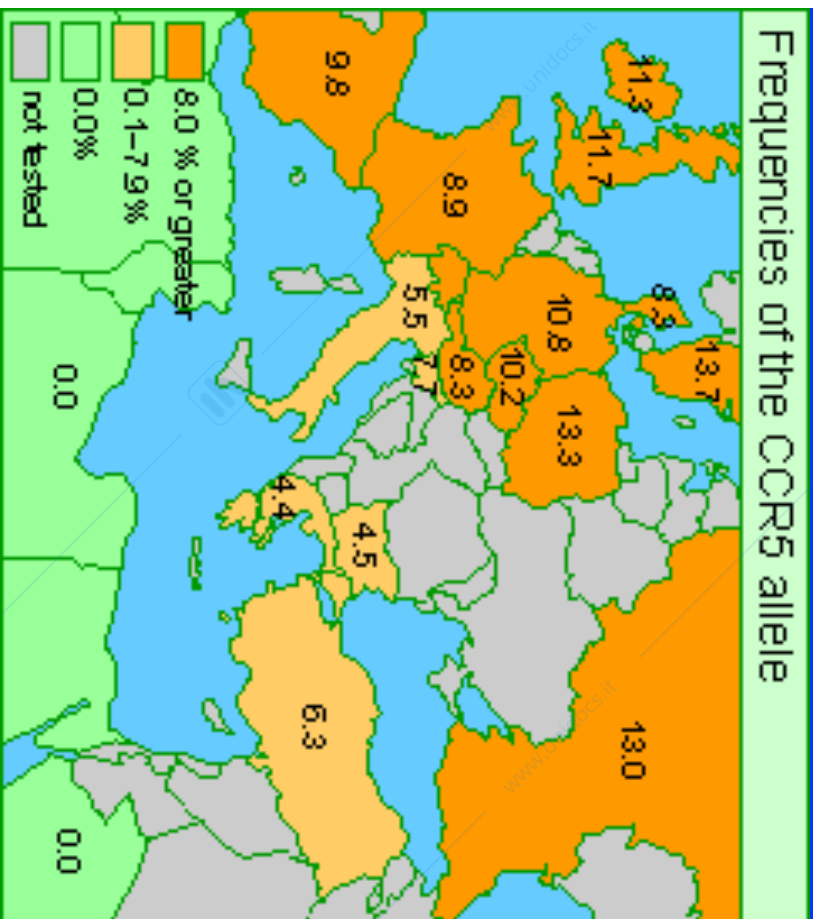
Naive CD4+ T cells
CCR5-/CXCR4+

Memory CD4+ T cells
CCR5+/CXCR4+

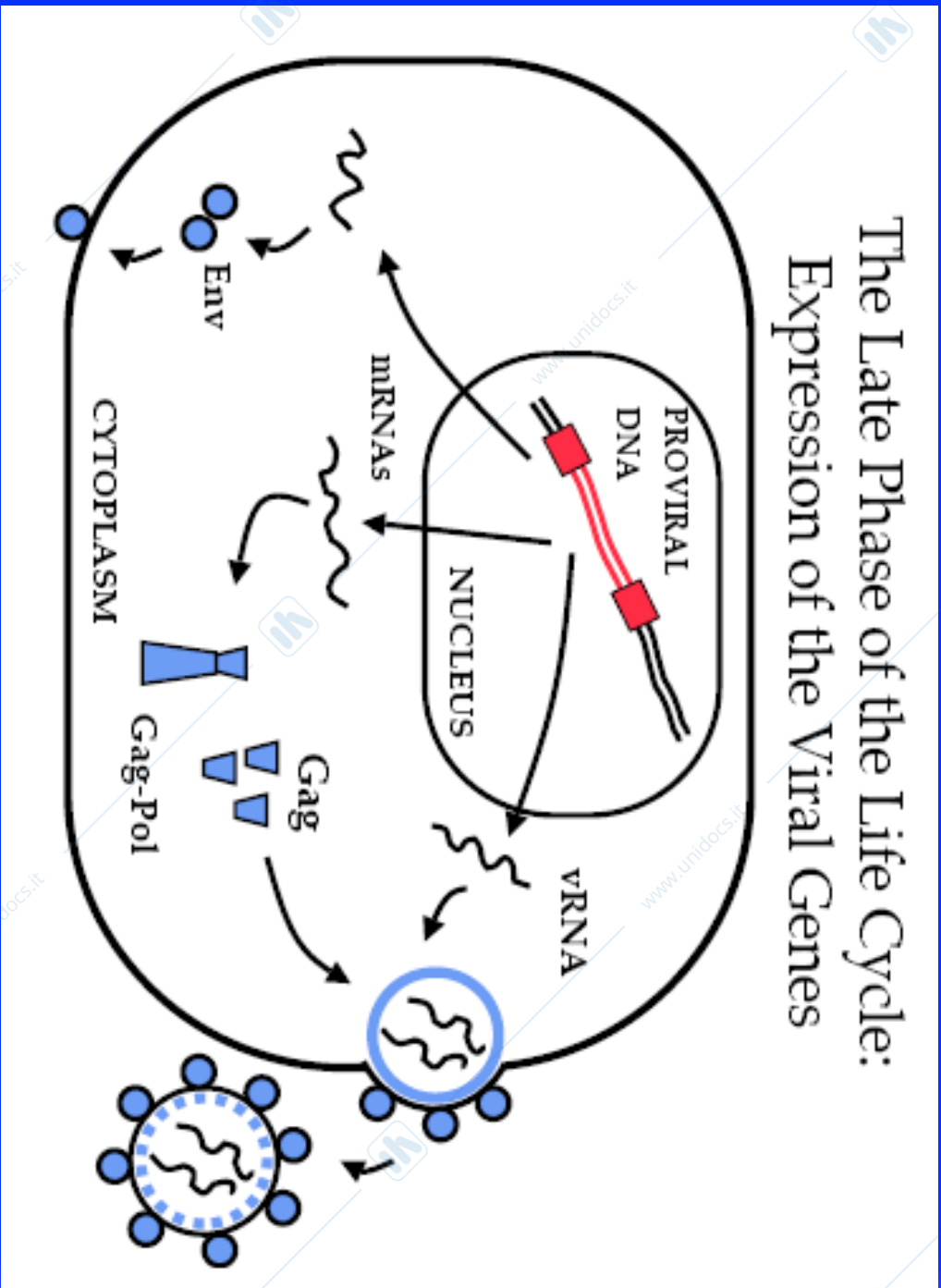


www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

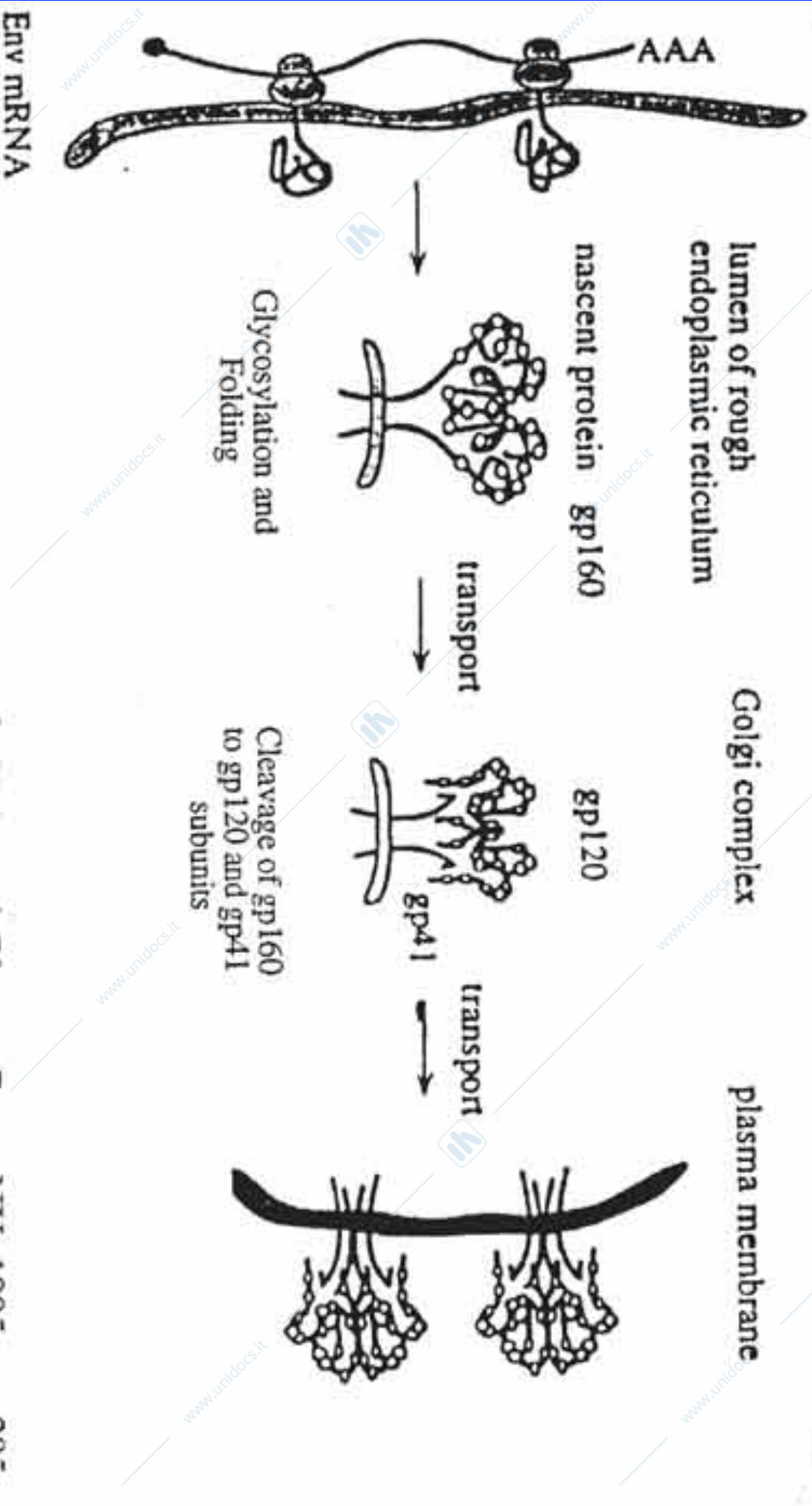
Alcuni soggetti HIV positivi non “progressors” hanno una mutazione recessiva in CCR5



The Late Phase of the Life Cycle: Expression of the Viral Genes



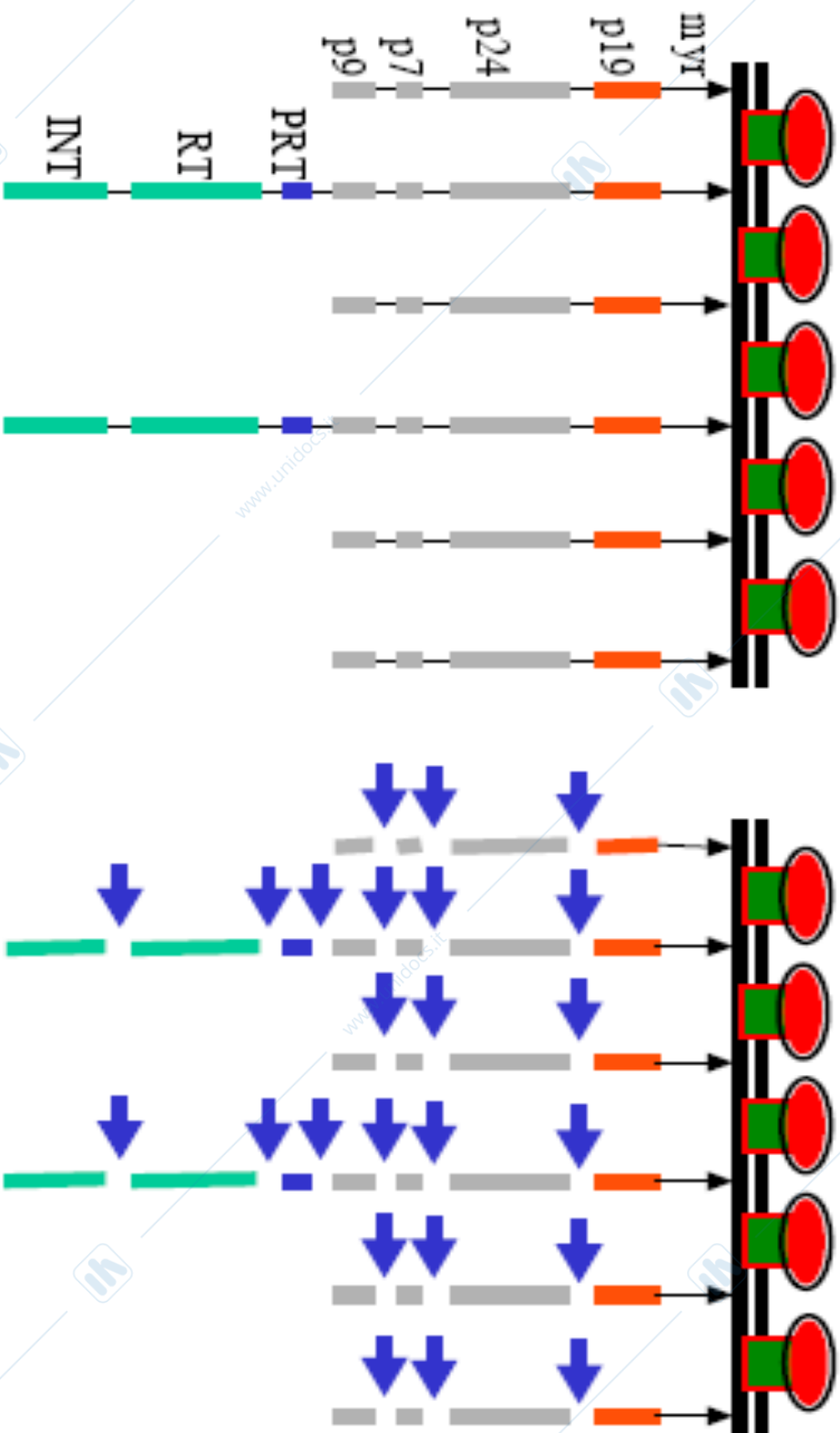
Maturazione delle proteine dell'envelope di HIV grazie alla proteasi



Reprinted from *The Retroviridae* Volume 4, Plenum Press, NY. 1995, pg. 205.

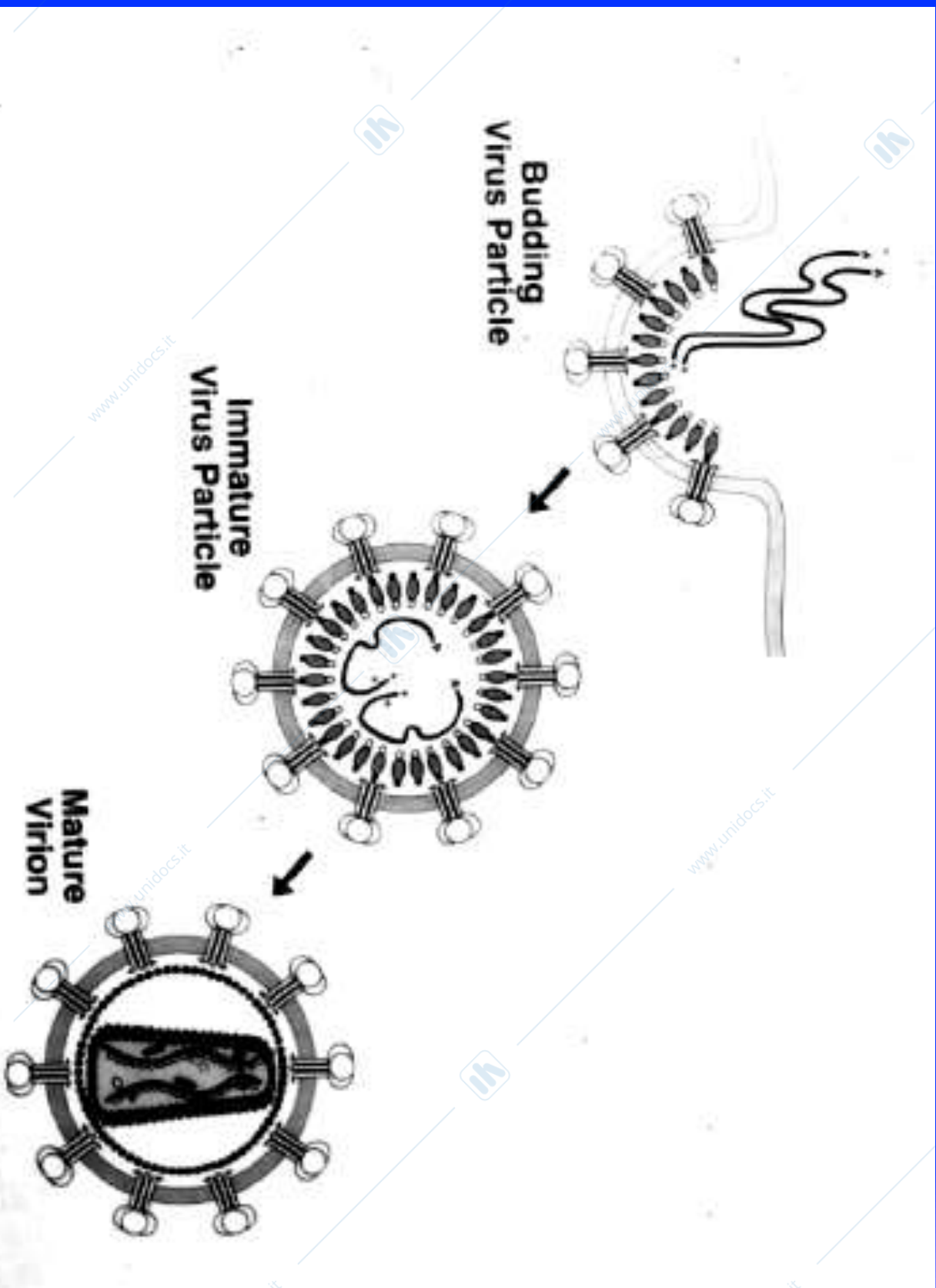


Le proteine gag-pol sono ancora unite

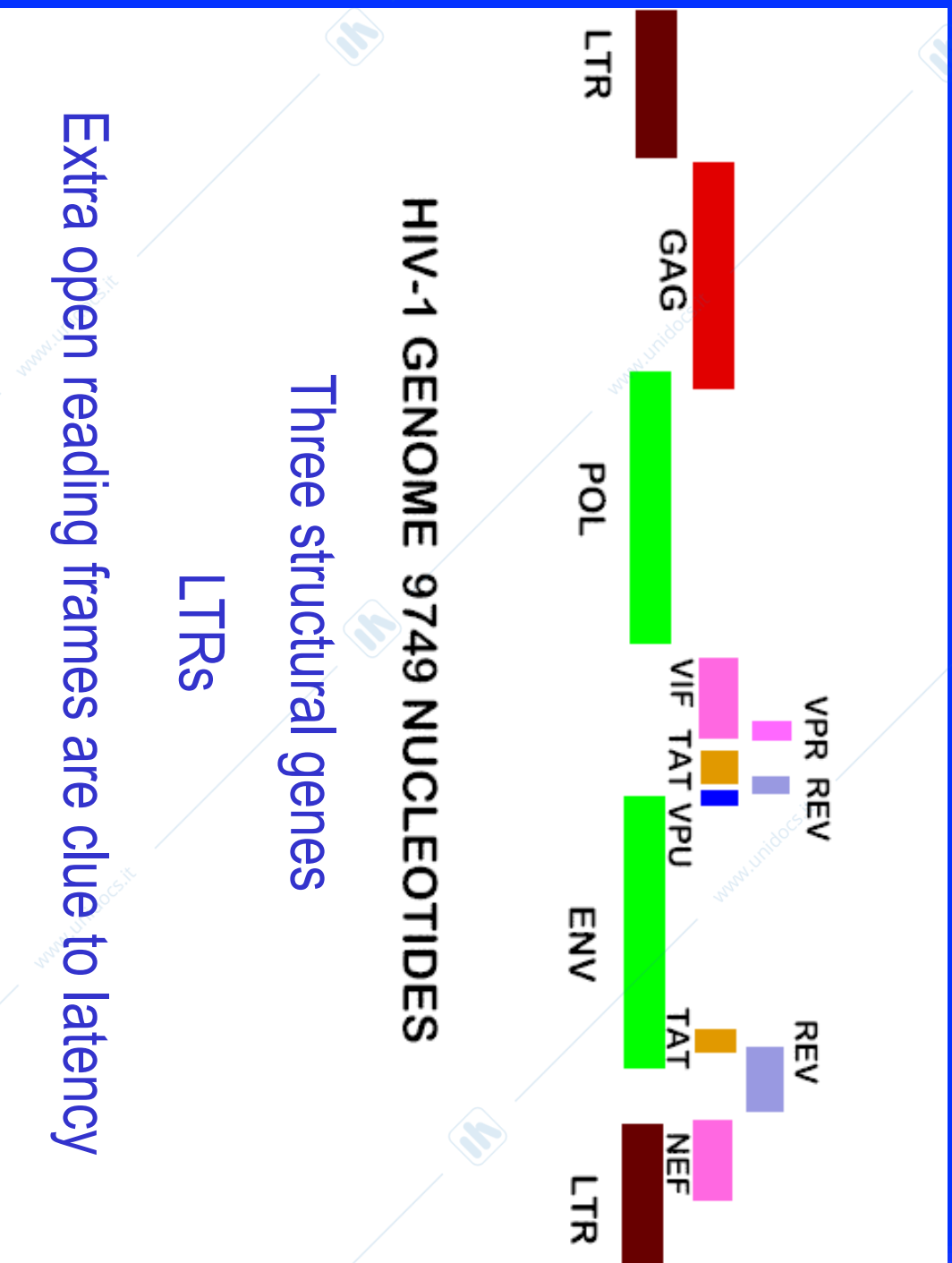


Le poliproteine gag e gag-pol, miristilate, si ancorano alla membrana. La proteasi si auto-attiva → , e taglia le poliproteine nelle proteine mature

Maturazione del virione HIV

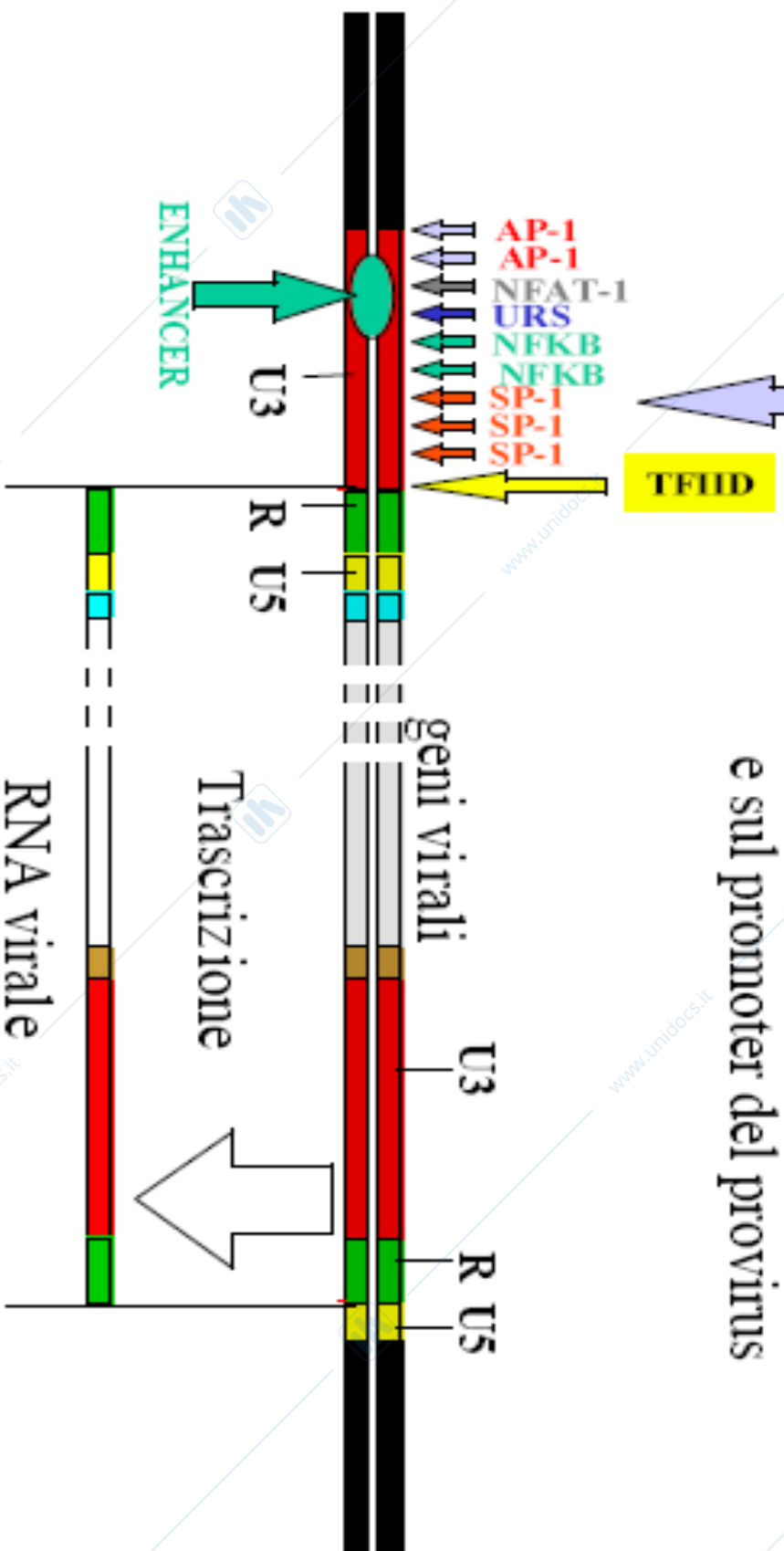


The Genome of HIV



PROMOTER

La trascrizione di HIV è regolata da fattori cellulari che agiscono sull'enhancer e sul promoter del provirus



Funzioni delle proteine regolatrici di HIV

Proteine precoci o regolatorie

Tat funziona come proteina transattivante inducendo la fosforilazione di RNA Pol II e promuove la fase di allungamento di trascrizione di HIV

Rev promuove l' esportazione di "unspliced" o parzialmente "spliced" mRNA di HIV dal nucleo al citoplasma cellulare

Nef down- regola il recettore CD4 e MHCI

Proteine tardive

Vif aumenta l' infettività del virus, completa la sintesi di dsDNA dopo l' entrata del virus

Vpr promuove l' entrata del DNA virale nel nucleo

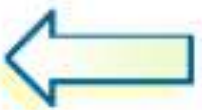
Vpu è necessaria per la maturazione e rilascio dei virioni, inoltre induce la degradazione di CD4

Perchè gli anticorpi anti-HIV e i CTL HIV-specifici non riescono ad eradicare il virus?

- i) iper-variabilità antigenica
(continua emergenza di mutanti)**
- ii) down-regolazione di HLA
classe I nelle cellule infette
(difetto di presentazione ai CTL)**
- iii) down-regolazione della catena
zeta del TCR (inefficienza dei CTL)**
- iv) infezione "latente" in cellule
che non presentano antigeni o sequestrate
in "santuari" irraggiungibili**

Durante il corso dell'infezione si stabiliscono due diversi "compartimenti virologici", tra i quali vi è una comunicazione continua:

Compartimento attivo



È costituito dal virus libero nel sangue e da quello contenuto nei linfociti e monociti dove si replica attivamente e determina gravi danni al S.I.



Compartimento di riserva (reservoirs)



responsabile della persistenza dell'infezione

È costituito dal virus che non si replica attivamente, ma che si trova in una fase di latenza all'interno di organi quali (cervello e gonadi) e (cellule dendritiche follicolari, macrofagi, linfociti T CD4+ di

Modalità di trasmissione dell' HIV

- L'HIV è stato isolato in tutti i tessuti ed i liquidi biologici di un soggetto sieropositivo.
- Tuttavia la semplice presenza del virus non significa che il contatto con il materiale rappresenti un evento efficace per la trasmissione
- Perché ciò avvenga è importante soprattutto la quantità di virus presente.

Presenza di HIV

Sangue

Liquido seminale

Secreto vaginale

Latte materno

Urine

Lacrime

Saliva

Sudore

Feci

Trasmissione accertata

Si

Si

Si

Si

No

No

No

No

No

HIV: come **NON** si trasmette

- I **comuni contatti sociali NON** sono idonei alla trasmissione del virus; se così fosse le caratteristiche epidemiologiche dell'infezione sarebbero completamente diverse da quelle attuali.
- Un **semplice bacio NON** è a rischio per la trasmissione dell'HIV. L'unico ipotetico rischio è riferito al bacio profondo in presenza di lesioni sanguinanti del cavo orale.
- Una persona sieropositiva che ha dei colpi di **tosse** o degli **starnuti NON** è in grado di trasmettere l'infezione.
- Gli oggetti casalinghi quali le **stoviglie NON** sono idonei alla trasmissione del virus.
- **NON** c'è rischio di contrarre l'infezione frequentando **piscine** o **bagni comuni**. Il cloro uccide l'HIV, e la diluizione rende estremamente bassa la concentrazione del virus.
- Gli **animali domestici NON** trasmettono l'HIV; questo infatti è un virus che colpisce solo la specie umana.
- Le **zanzare NON** possono trasmettere il virus; se così fosse l'andamento dell'epidemia sarebbe stato molto diverso. L'HIV non è in poi grado di sopravvivere all'interno dell'insetto, ed inoltre la zanzara succhia il sangue, non lo inietta.



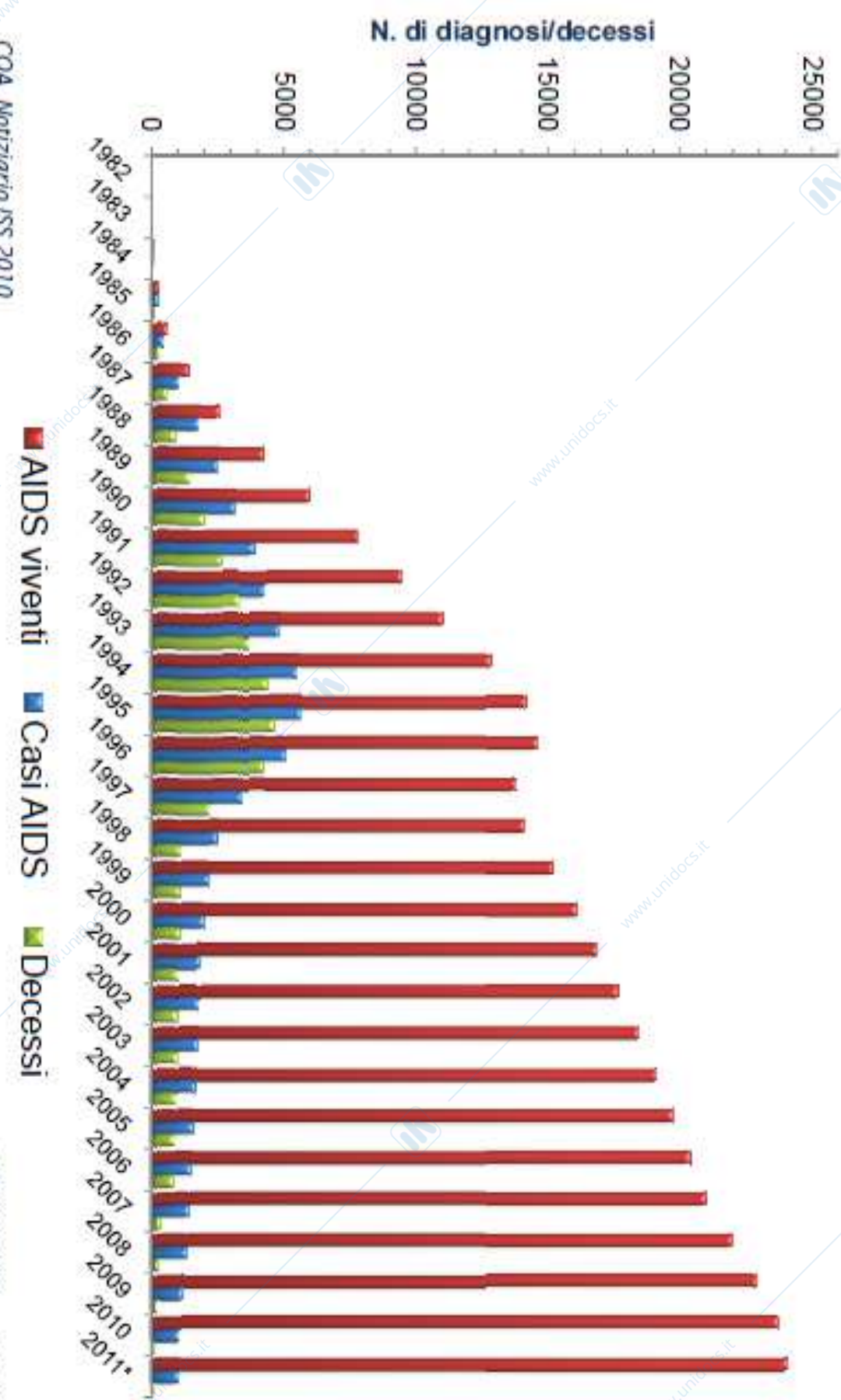
Caratteristiche delle persone con una nuova diagnosi di HIV: confronto 2000* vs 2010



	Anno 2000*	Anno 2010
contatti eterosessuali	39,5	49,8
contatti omosessuali	17,8	30,9
consumatori di sostanze per via iniettiva	17,3	6,8
stranieri	23,7	29,1
donne	32,7	23,7
persone \geq 50 anni	12,5	16,2
persone $<$ 25 anni	7,0	8,3



Diagnosi di AIDS, decessi AIDS-correlati e persone viventi con AIDS in Italia

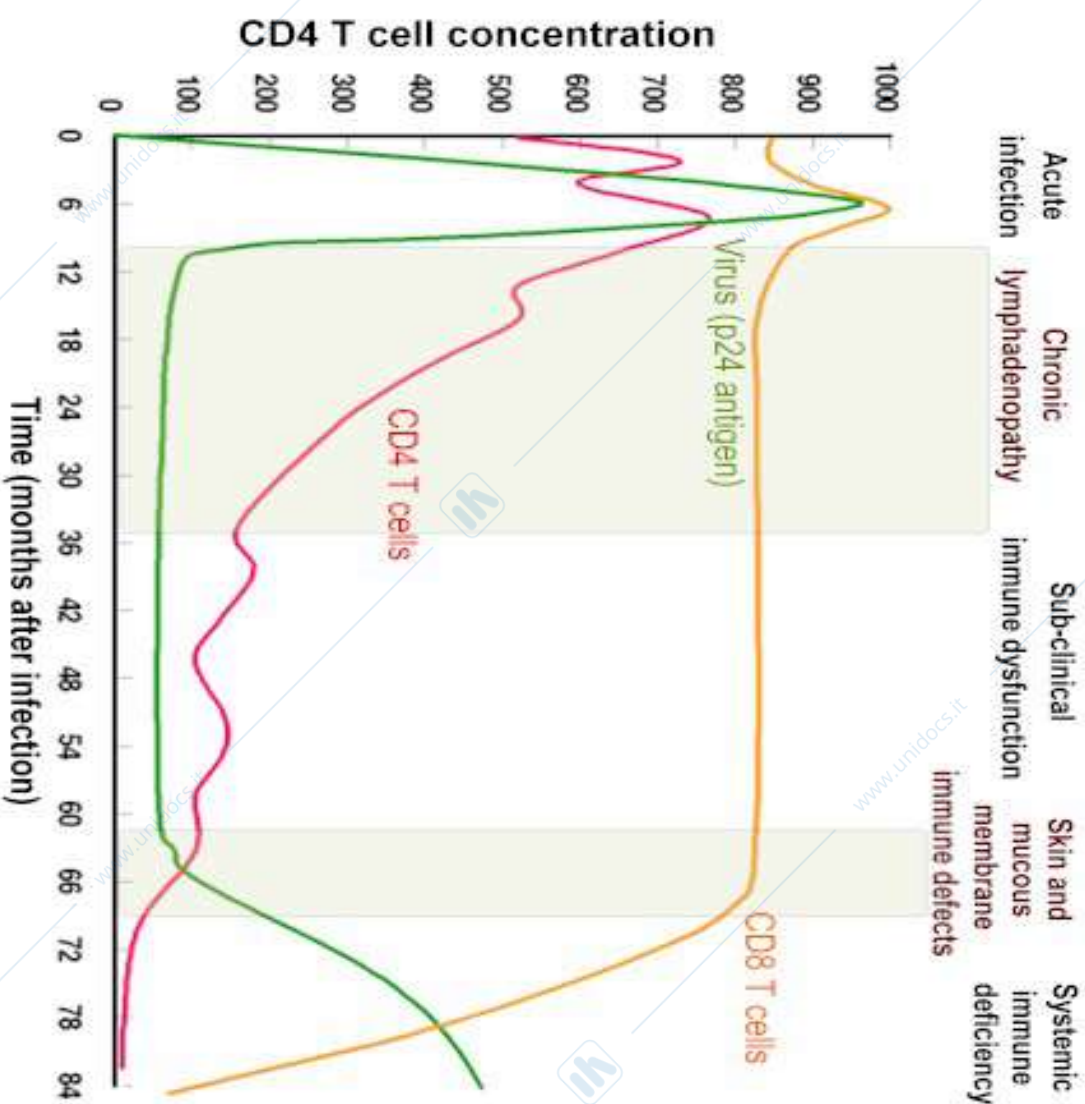


COA, Notiziario ISS 2010
www.iss.it/coa

* Dati stimati Fig. 10

HIV e AIDS

corso naturale della malattia



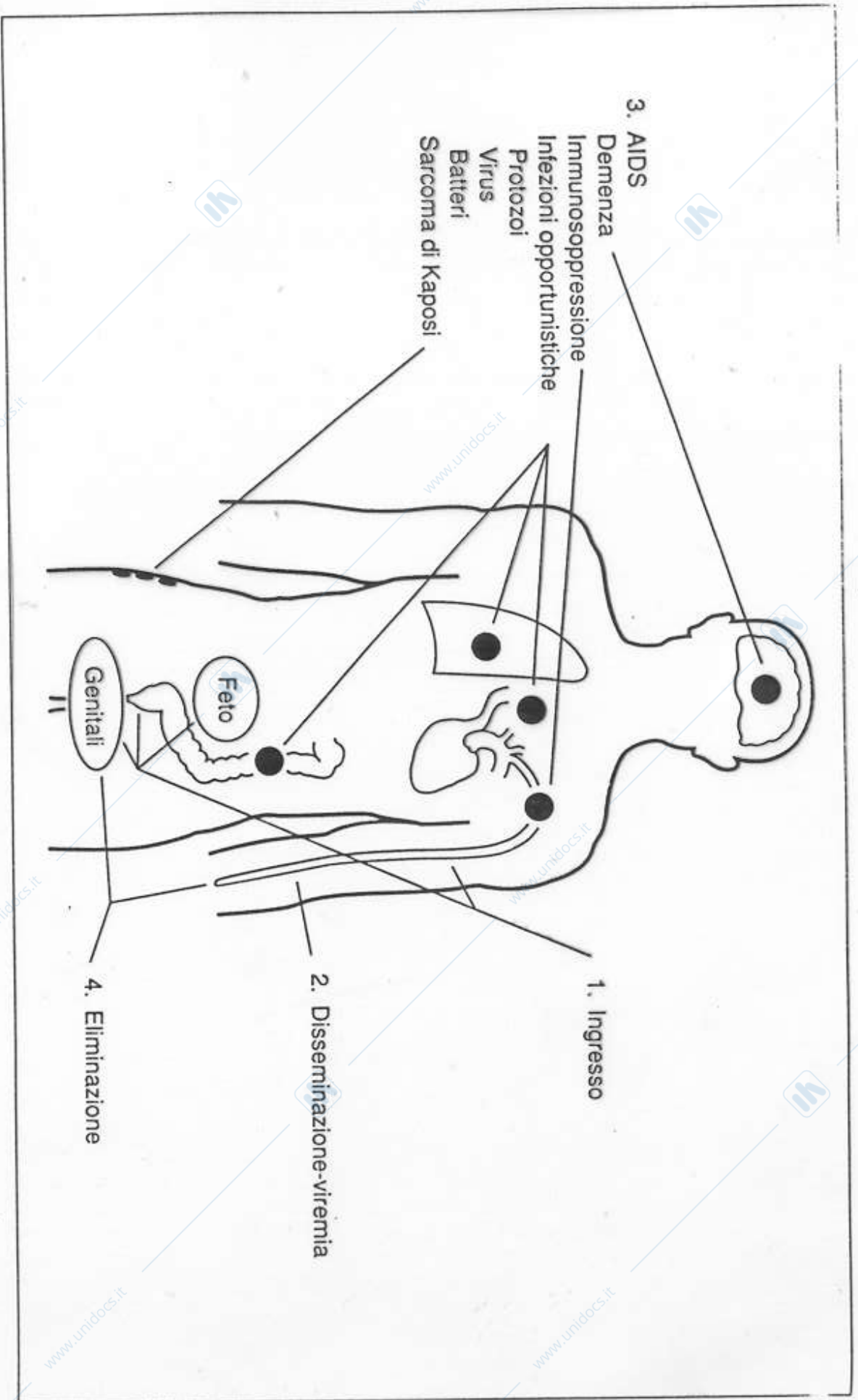


Figura 18.5 Manifestazioni cliniche e patogenesi dell'infezione da HIV. (Da Baron S. [ed.]: *Medical microbiology*, 4^a ed., UTMB, Galveston, 1996.)

SINTOMATOLOGIA CLINICA

Fase asintomatica: (2-10 anni) I pazienti stanno bene, ma sono infettivi

Fase prodromica che precede all' AIDS: linfadenopatia, perdita di peso, febbre, candidiasi, diarrea

AIDS: febbre, diarrea, rash epidermico, perdita di peso

Malattie neurologiche: demenza, mielopatia, neuropatia periferica

Immunodeficienza con infezioni opportunistiche

Tumori rari: sarcoma di Kaposi, leucoplakia capelluta orale, linfomi

Coma

Infections	
Parasites	<p>Toxoplasma species Cryptosporidium species Leishmania species Microsporidium species</p>
Bacteria	<p>Mycobacterium tuberculosis Mycobacterium avium intracellulare Salmonella species</p>
Fungi	<p>Pneumocystis carinii Cryptococcus neoformans Candida species Histoplasma capsulatum Coccidioides immitis</p>
Viruses	<p>Herpes simplex Cytomegalovirus Varicella-zoster</p>
Malignancies	
<p>Kaposi's sarcoma (associated with herpes virus HHV8) Non-Hodgkin's lymphoma, including EBV-positive Burkitt's lymphoma Primary lymphoma of the brain</p>	

Figure 9-22 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

TEST DI LABORATORIO

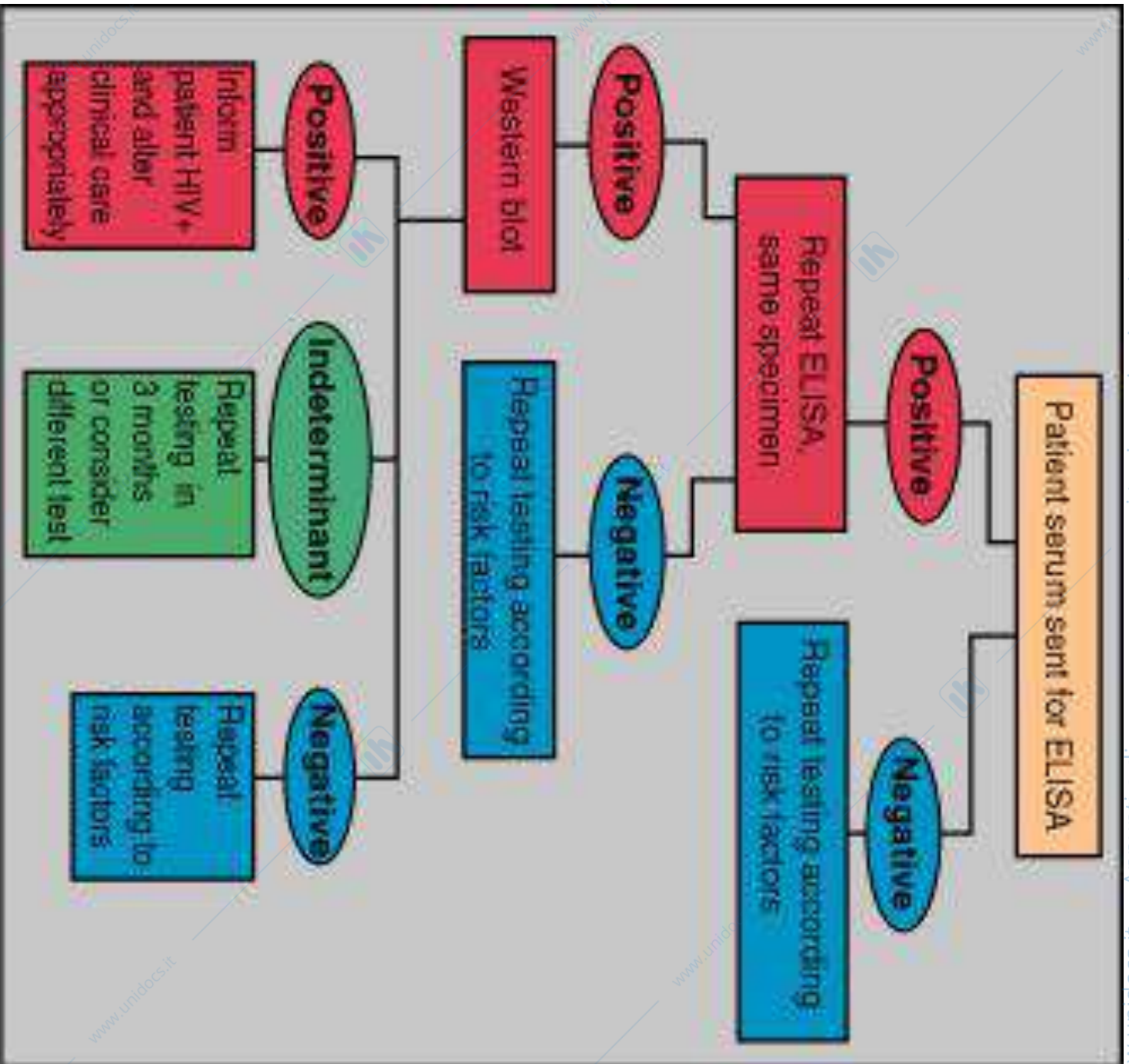
PER LA DIAGNOSI

- Ricerca anticorpi (CLIA)
- Rapid prick test
- Se positivo: conferma presenza anticorpale con Western Blotting (periodo finestra: 3-6mm)
- RNA qualitativo (PCR): nei bambini di madri HIV+, nel sospetto di infezione primaria
- **PER LA VALUTAZIONE PROGNOSTICA**
- RNA quantitativo
- Conta CD4



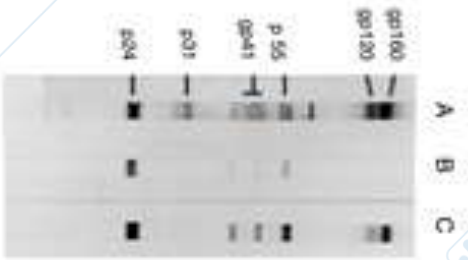
PERIODO FINESTRA

- Periodo che intercorre tra il contagio (test negativo) e la positività agli anticorpi anti HIV (test positivo)
- Possono trascorrere circa 6 mesi
- Il soggetto è infettivo



ALGORITMO DIAGNOSI INFEZIONE HIV

HIV Diagnostics – Evolution over 30 years



1st Gen

- Vironostika[®]



2nd Gen

- Clearview[®]
- OraQuick Advance[®] Enhanced



3rd Gen

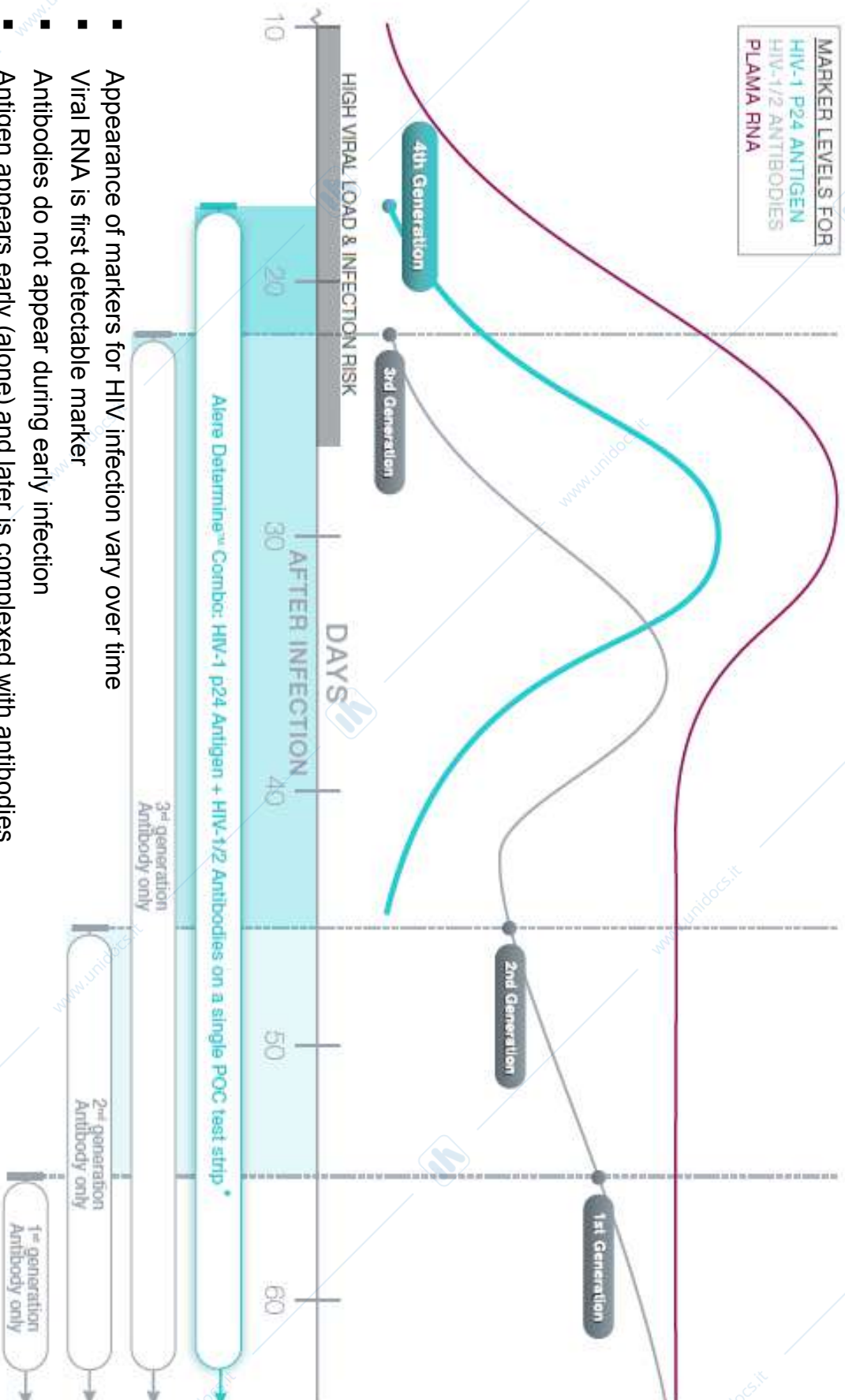
- Uni-Gold[™]
- ADVIA[®] Centaur HIV 1/OI2



4th Gen

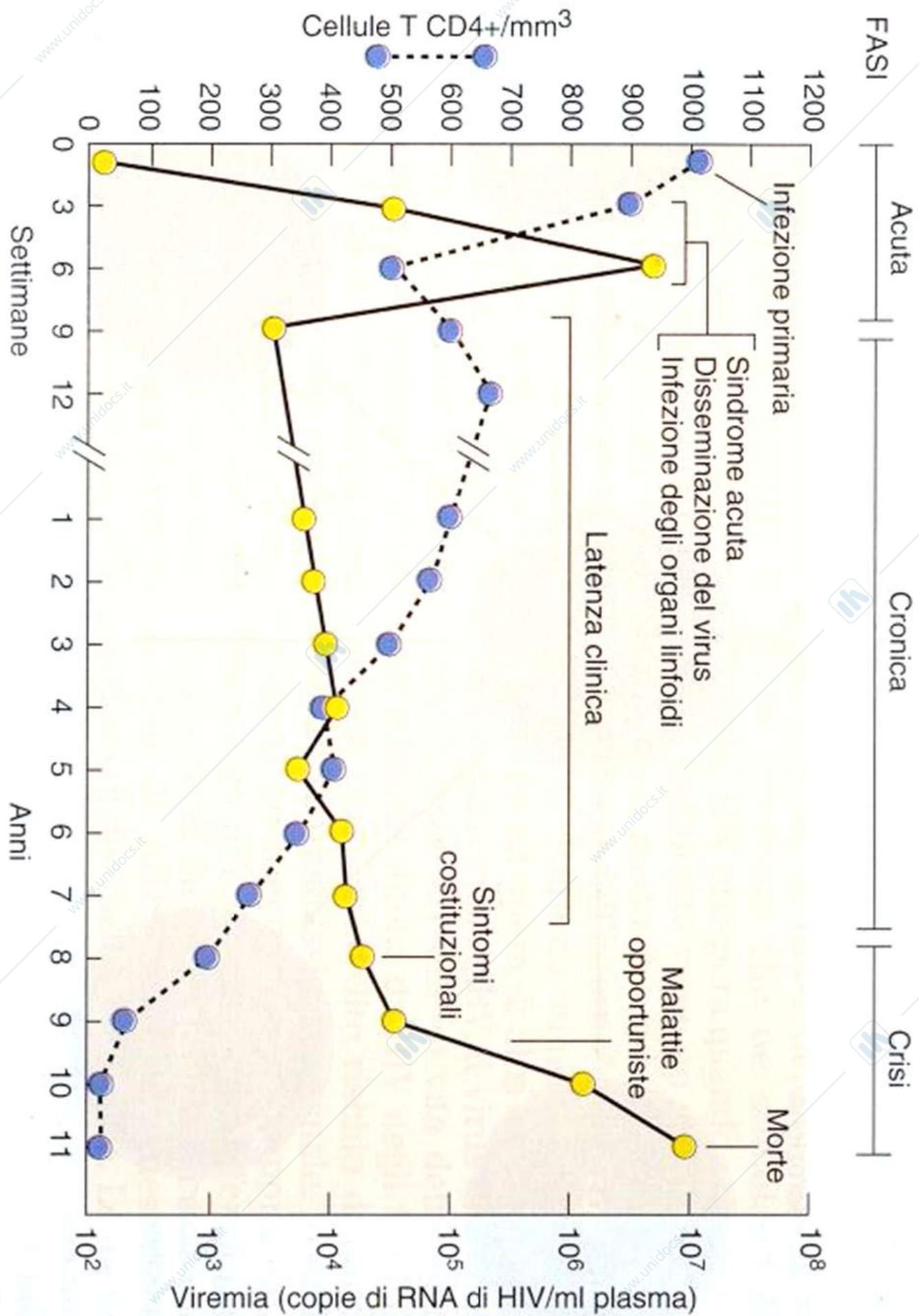
- **Lab-Based:**
- ARCHITECT[®] HIV Ag/Ab Combo
- Biorad GS HIV Combo Ag/Ab EIA
- **POC-Based:**
- Alere Determine[™] HIV 1/2 Ag/Ab Combo

Laboratory Markers of HIV Infection

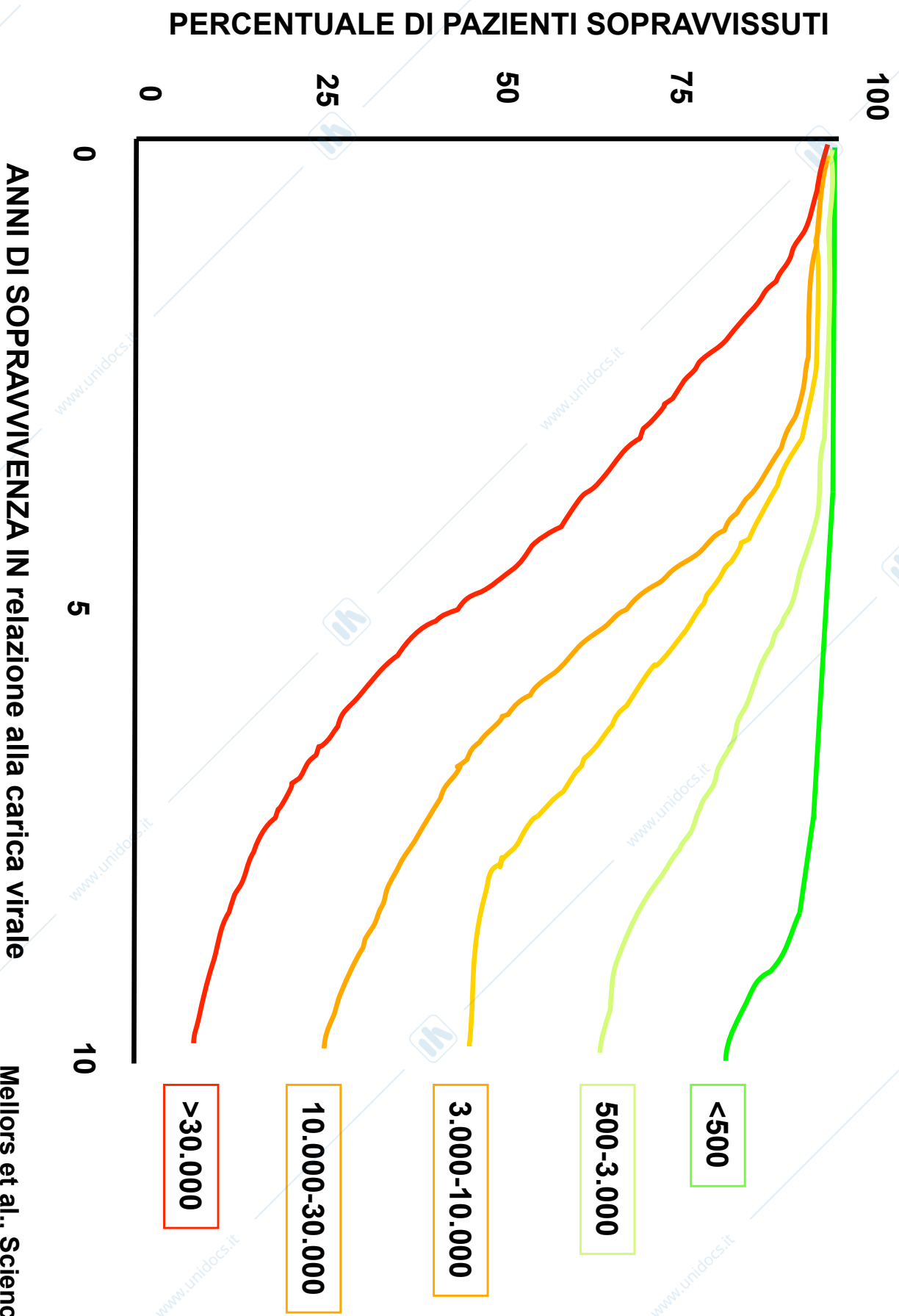


- Appearance of markers for HIV infection vary over time
- Viral RNA is first detectable marker
- Antibodies do not appear during early infection
- Antigen appears early (alone) and later is complexed with antibodies

Graph was modified from data: Fiebig et al., Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*. 2003;17(13):1871-1879.



“Viral load” come indicatore prognostico

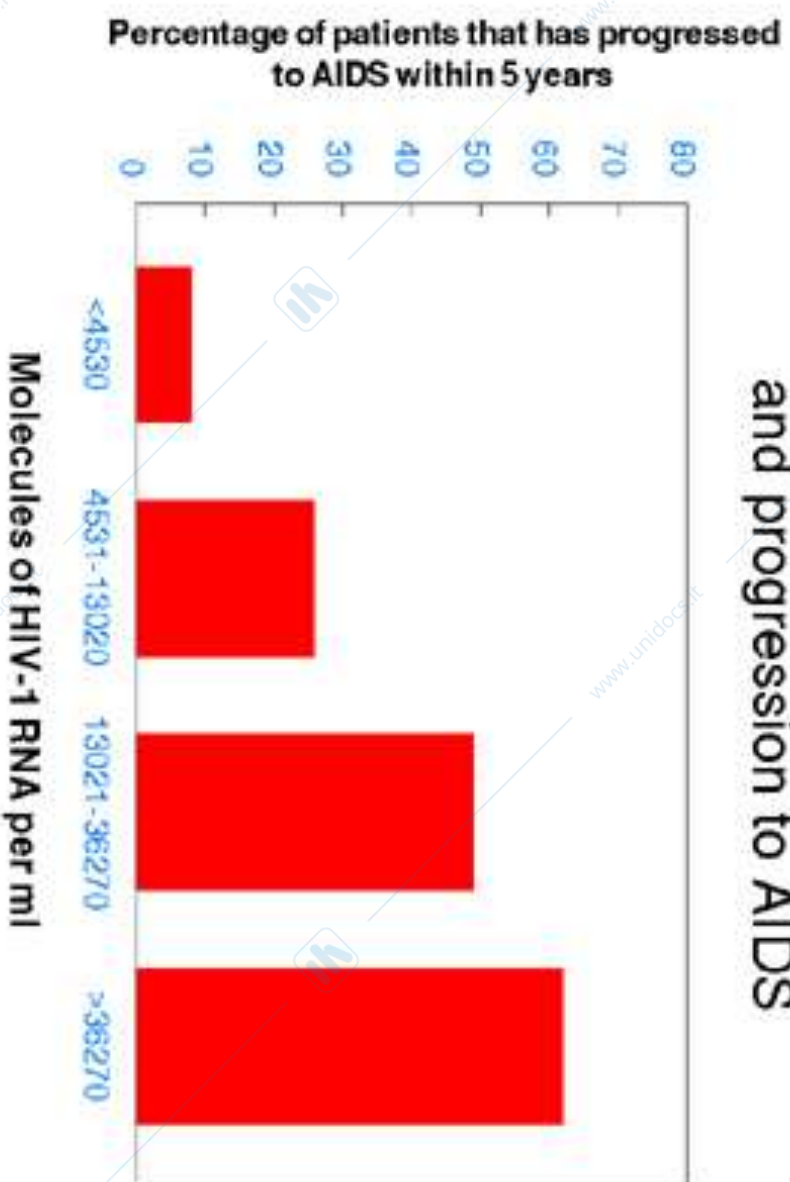


ANNI DI SOPRAVVIVENZA IN relazione alla carica virale

Mellors et al., Science, 1996

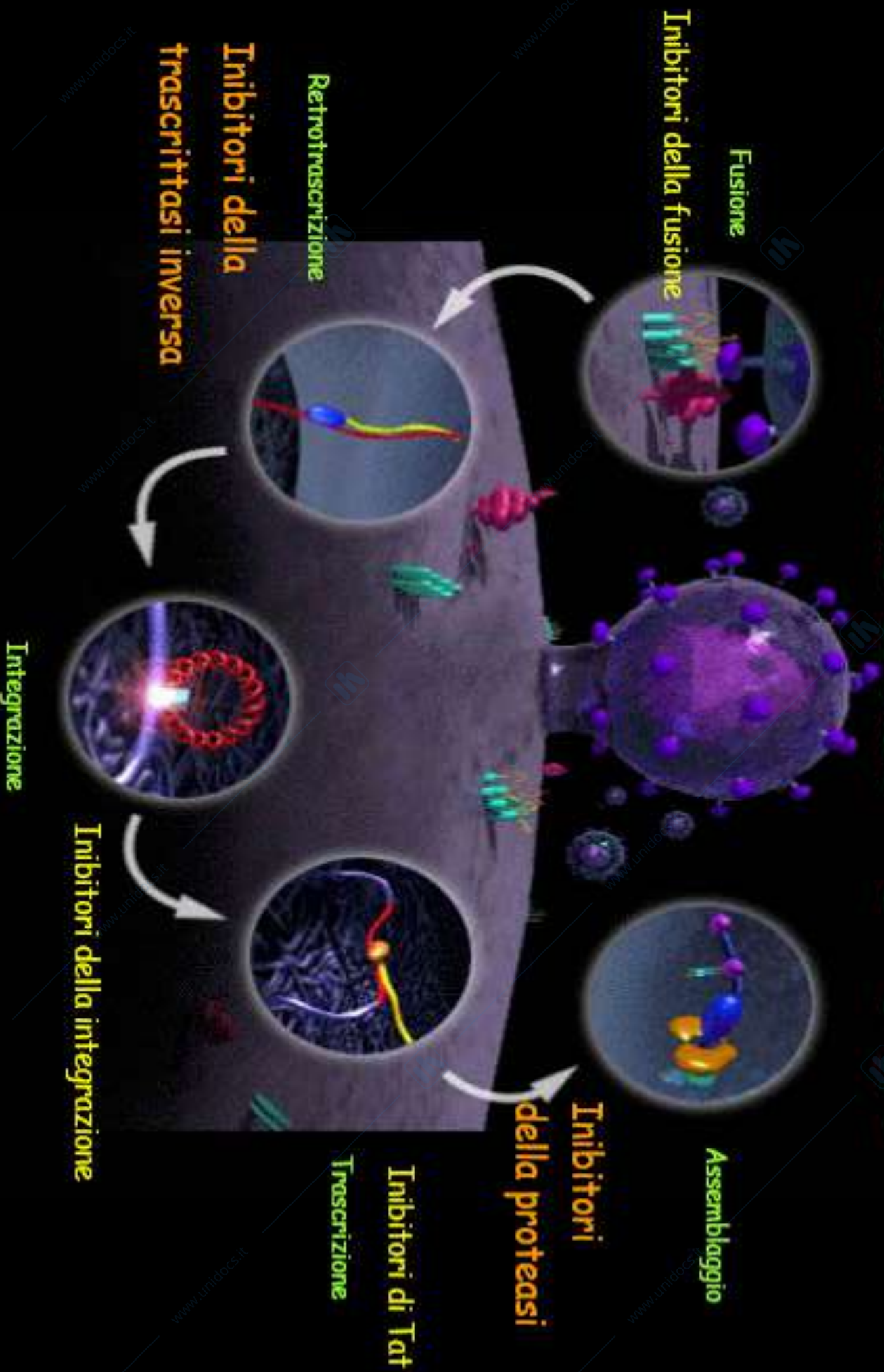
HIV e AIDS

Relation between baseline viral load and progression to AIDS



Buona correlazione tra n° di genomi di HIV nel sangue e progressione della malattia

Ciclo vitale di HIV1: 8-16 ore



HAART: High aggressive antiretroviral therapy

PRINCIPALI CLASSI DI FARMACI ANTI-HIV

- Inibitori nucleosidici/nucleotidici della trascrittasi inversa (NRTIs)
- Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTIs)
- Inibitori della proteasi (PI)
- Inibitori dell'ingresso nella cellula ospite
- Inibitori della fusione
- Inibitori della integrazione

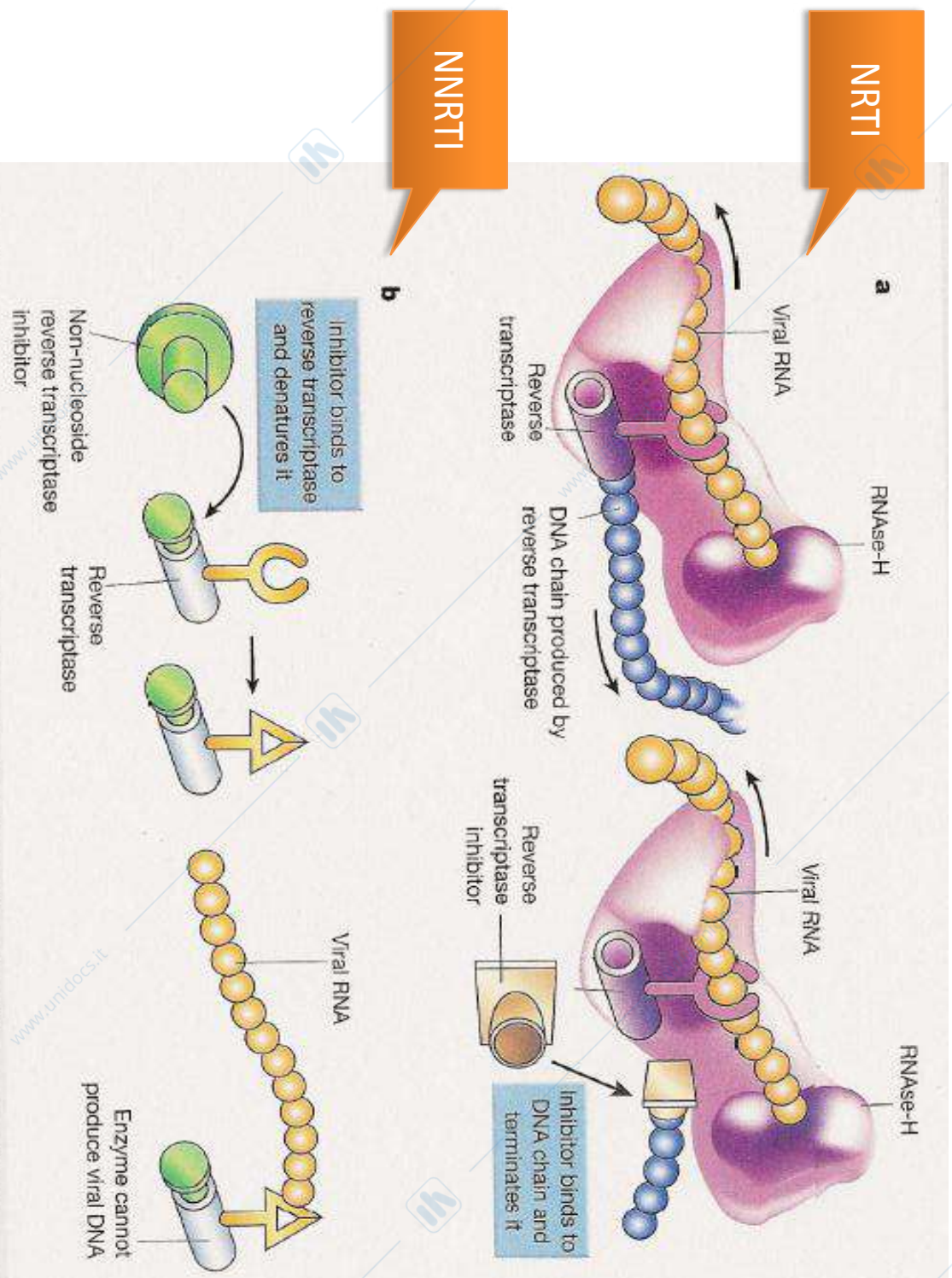
Il grande FREDDIE! (1946-1991)



INIBITORI DELLA TRASCRITTASI INVERSA

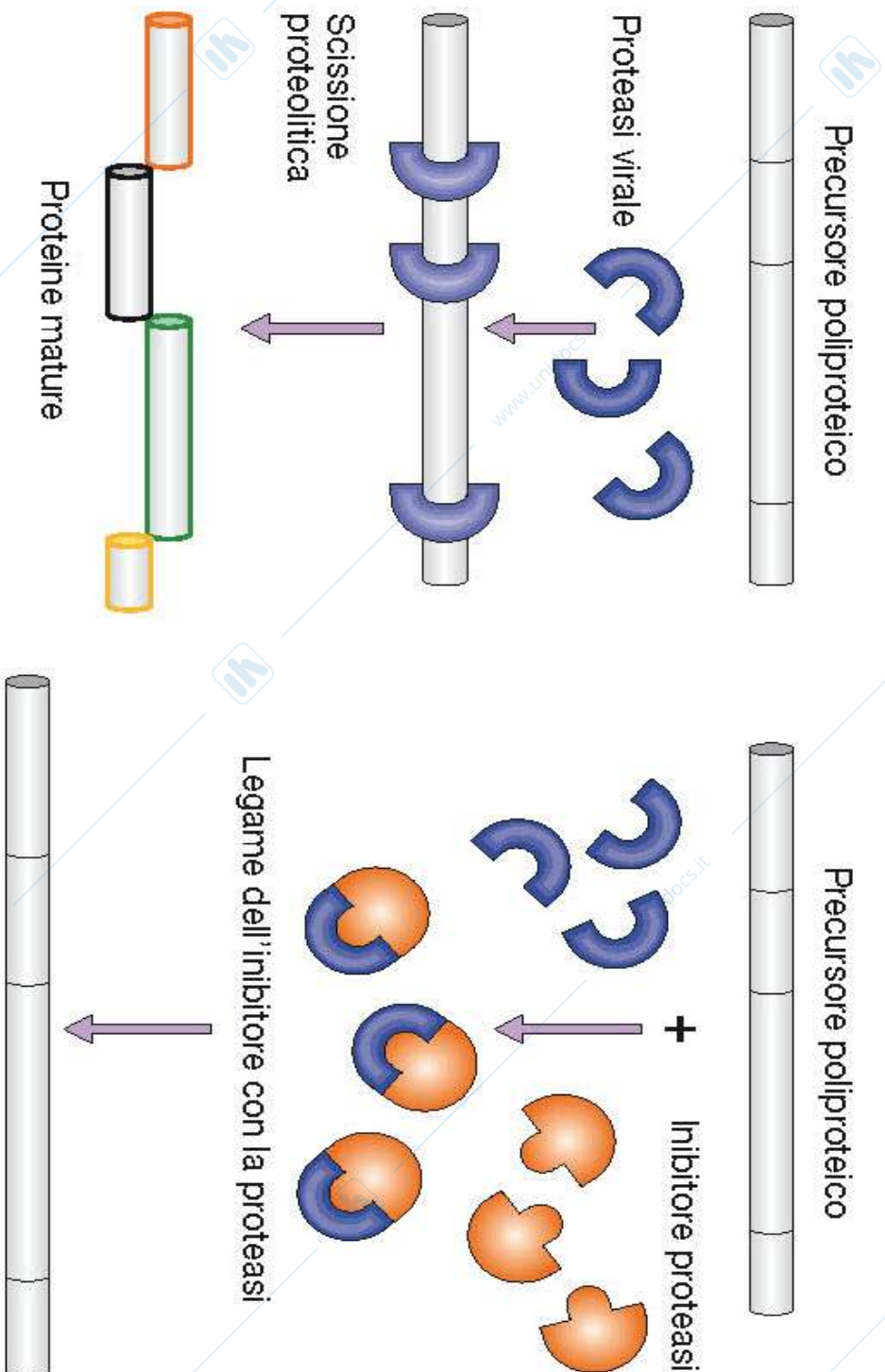
- **Analoghi nucleosidici e nucleotidici (NRTIs)**
(attivi su HIV-1, HIV-2 e altri virus)
 - **Vengono fosforilati a 5'-trifosfato**
 - **I derivati trifosfato possono comportarsi sia da inibitori, che da "substrati" della trascrittasi inversa;**
 - **Essendo privi dell' ossidrilie in 3' provocano l'arresto dell'allungamento della catena di DNA (chain terminator).**
 - **Inibitori non nucleosidici (NNRTIs)**
(possiedono un'attività antivirale limitata all'HIV-1)
- Inibiscono l' enzima legandosi ad un sito allosterico.**

NRTI e NNRTI agiscono diversamente sulla trascrittasi inversa di HIV



Gli NNRTI non richiedono attivazione e non competono con i nucleosidi

Inibitori della proteasi virale (HIV, HCV)

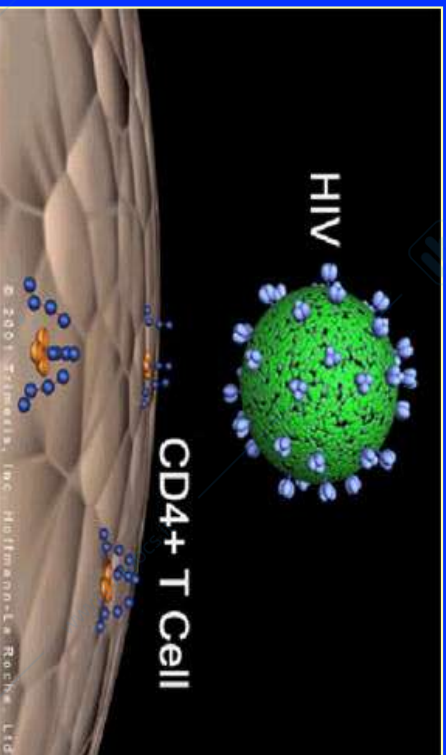


Virus infettivo

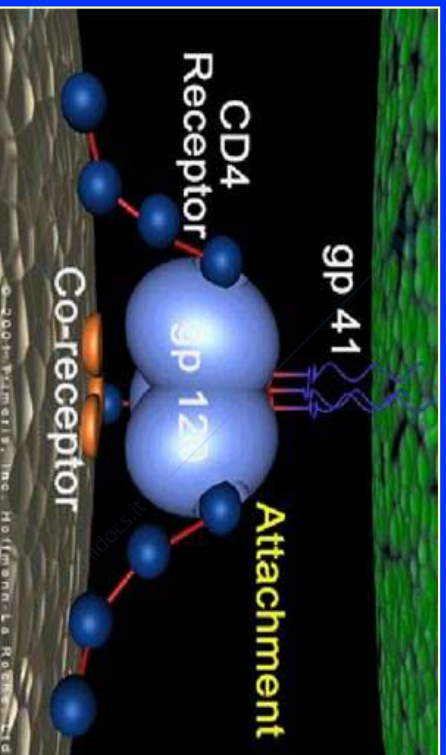
Virus non infettivo

Ingresso cellulare di HIV ed “entry inhibitors”

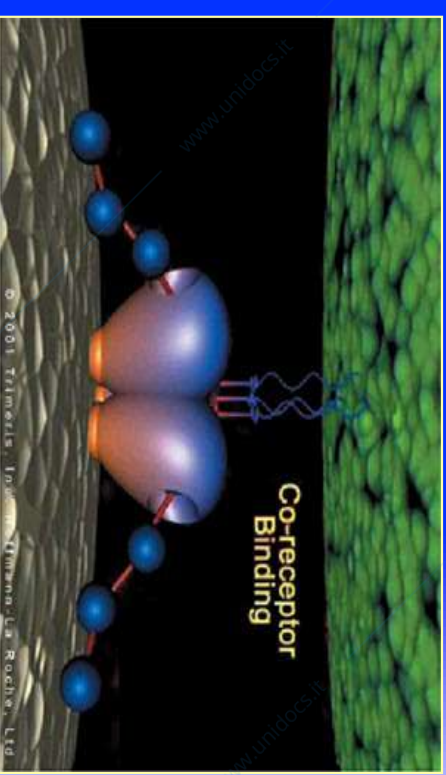
1) Avvicinamento HIV alla cellula bersaglio (Linfocita T-helper)



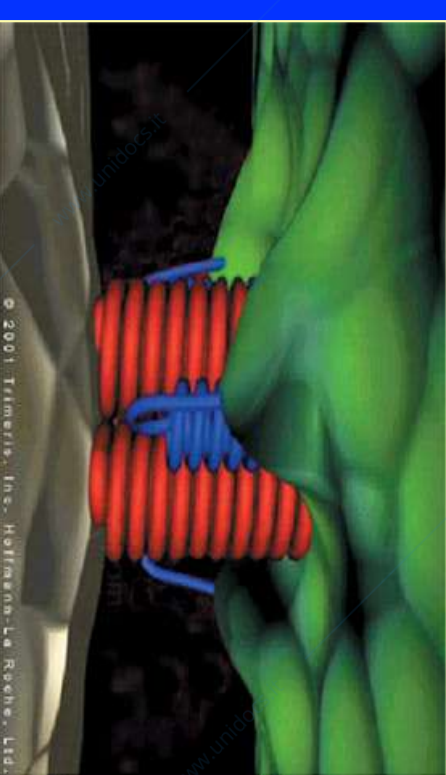
2) Interazione tra recettore CD4 e gp120 virale



3) Legame col corecettore CCR5 o CXCR4



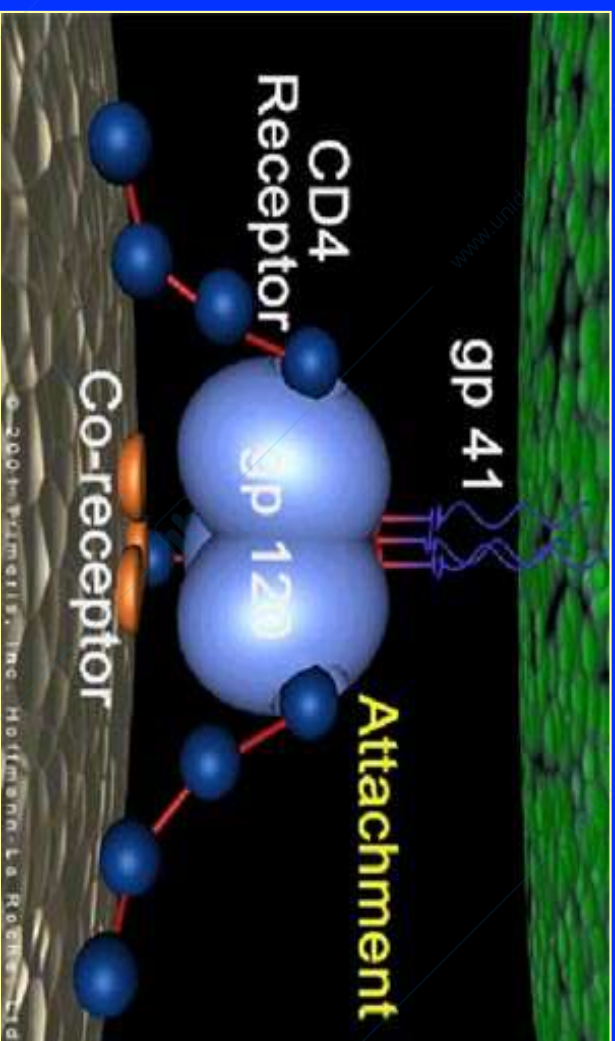
4) Fusione tra le due membrane

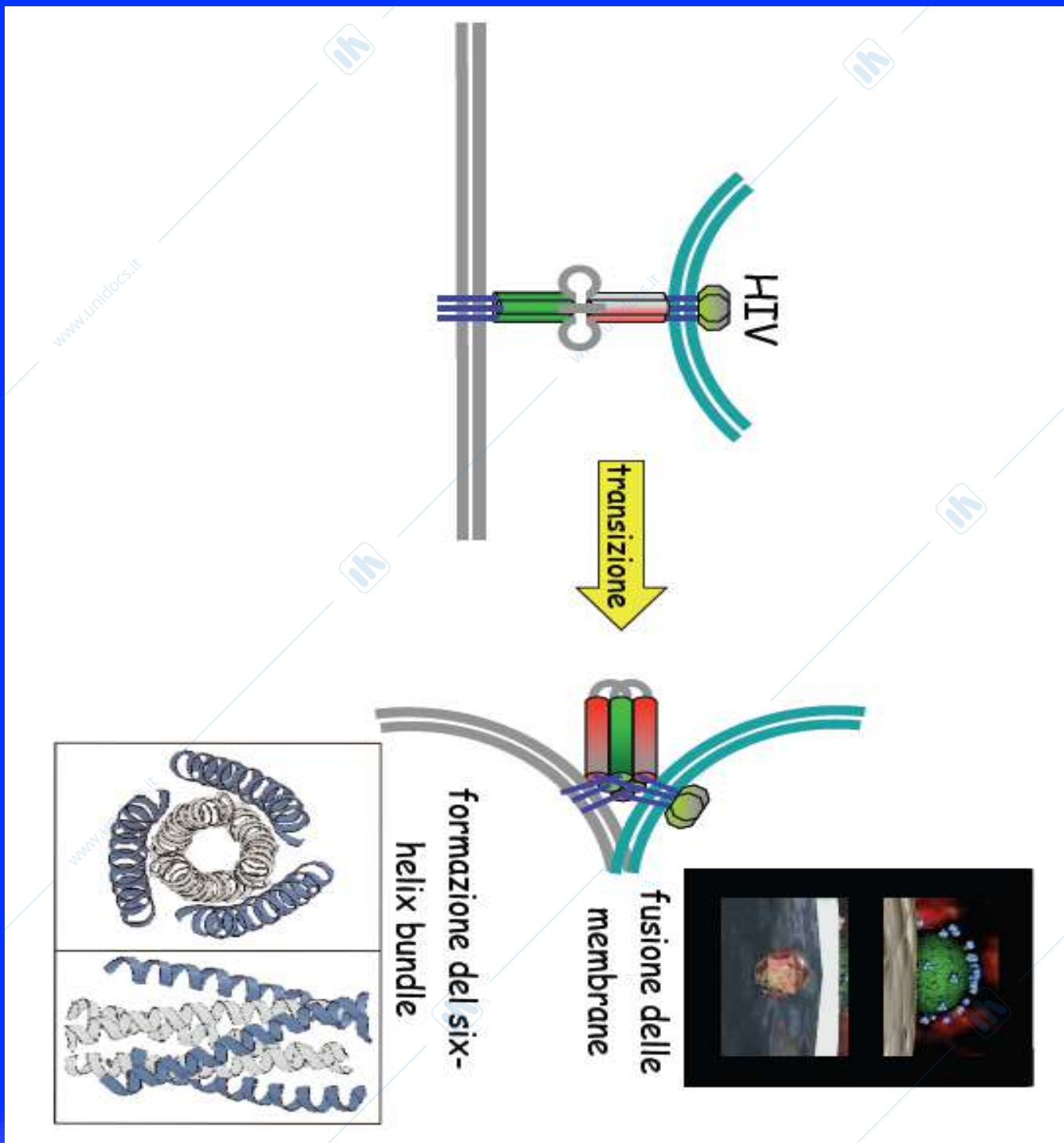


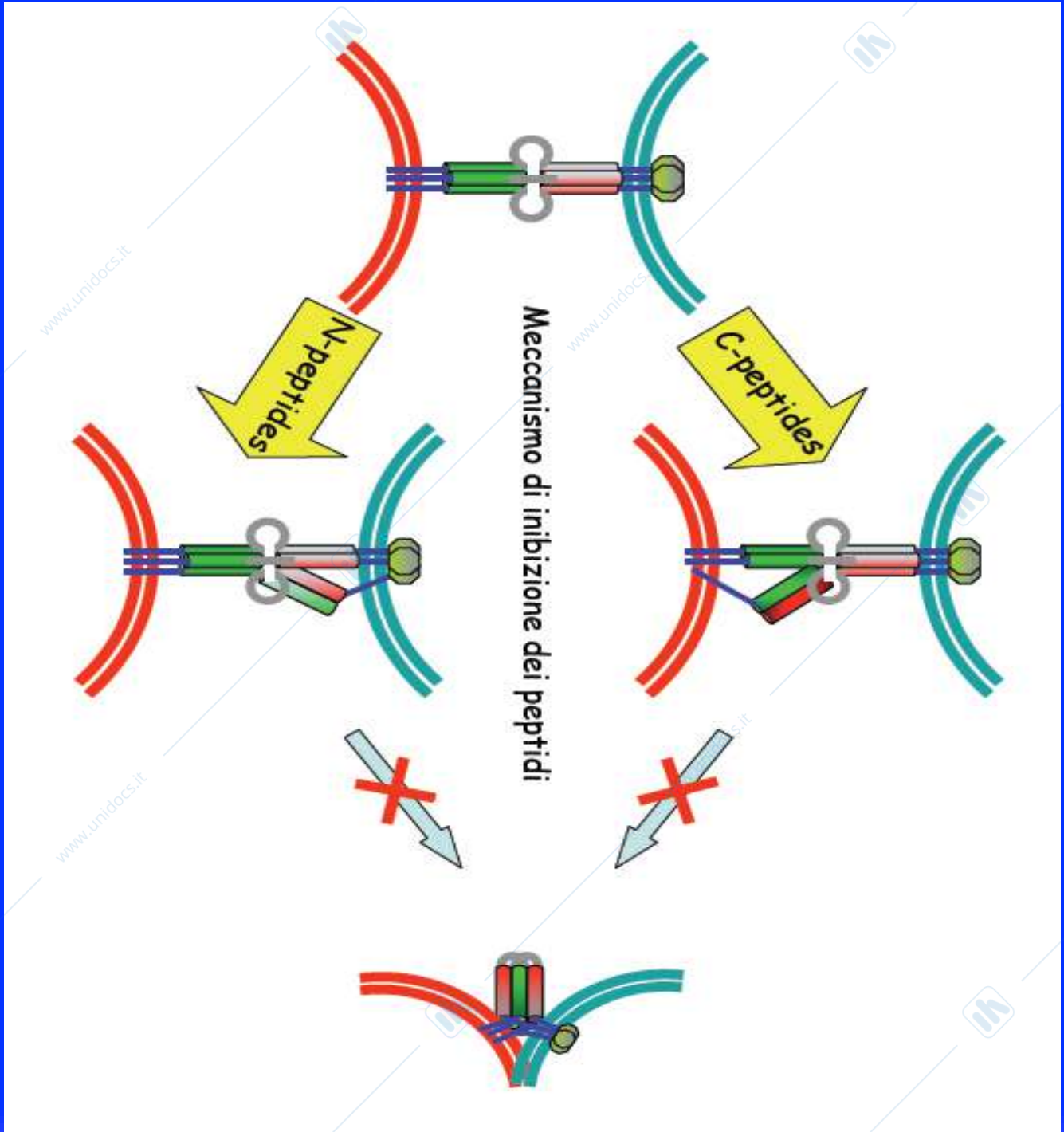
3. Antagonisti di Chemokine receptors

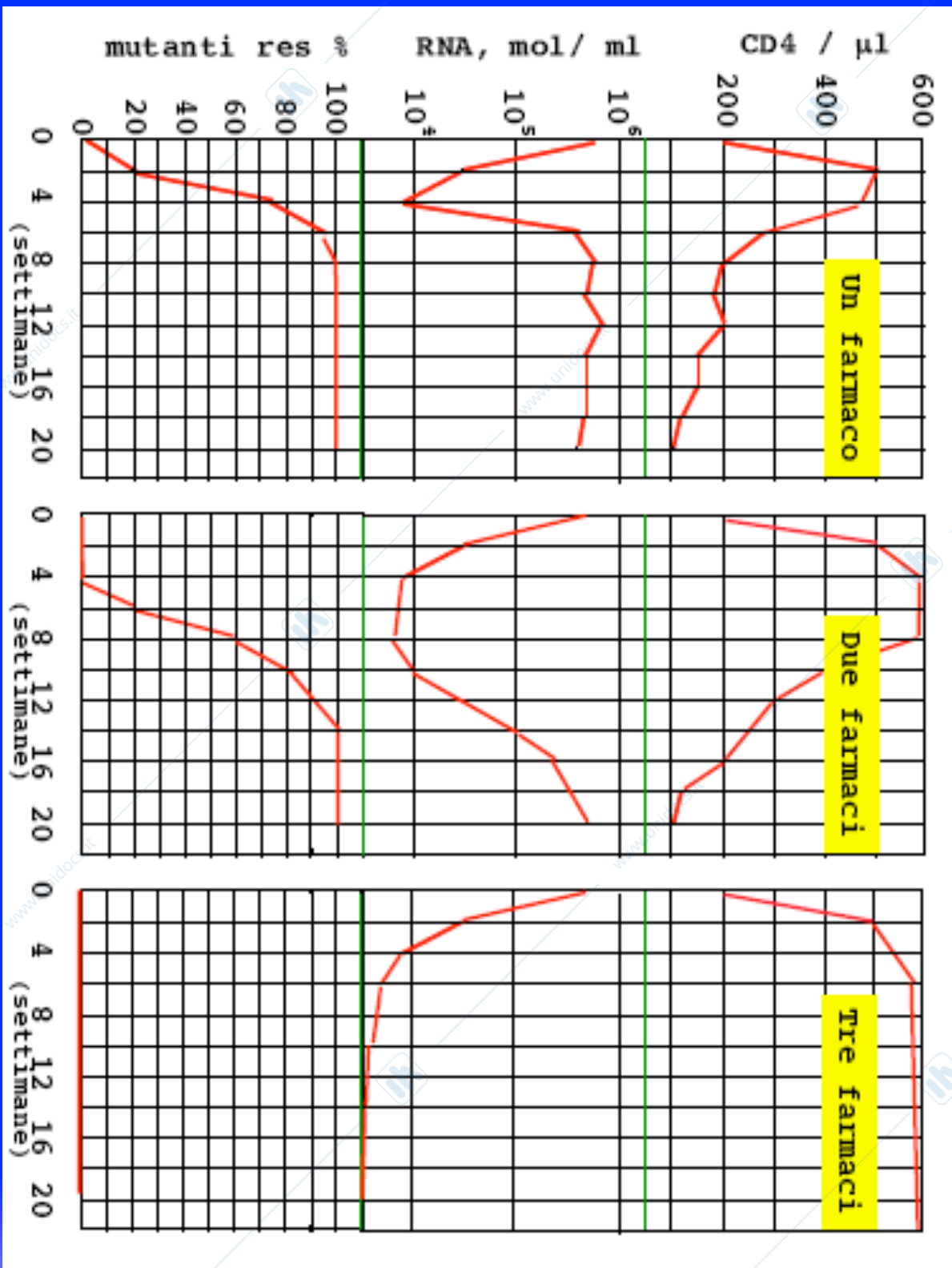
CXCR4 antagonist

CCR5 antagonist









Farmaci contro l'HIV-AIDS

L'aderenza è un fattore imprescindibile per il successo terapeutico
Il monitoraggio della persona con HIV deve essere periodico e con esami specifici

TERAPIA COMPLETA CPR (1), (1)

SINGOLI MEDICINALI PER CLASSE DI APPARTENENZA

Eviplera® (TDF+FTC+RPV), (2)

Genvoya® (TAF+FTC+EVG+COBI), (2)

Odofsey® (TAF+FTC+RPV), (2)

Stribild® (TDF+FTC+EVG+COBI), (2)

Triumeq® (ABC+3TC+DTG), (2)

NUCLEOSITIDICI

Emtriva® (FTC, CPS), (1, 3)

Epivir® (3TC, CPR), (1 o 2), (3)

Viread® (TDF), CPR (1), (1, 3)

Ziagen® (ABC, CPR), (2), (3)

NON NUCLEOSIDICI

Edurant® (RPV), CPR (1), (1, 2)

INIBITORI DELLA PROTEASI

Prezista® (DRV), CPR (1/2), (2, 4, 5)

Reyataz® (ATV), CPS, (1), (1, 2, 4)

INIBITORI DELLA PROTEASI CON BOOSTER, CPR (1), (1, 2)

Evotaz® (ATV+COBI)

Rezolsta® (DRV+COBI)

INIBITORI DELL'INTEGRASI

Isentress® (RAL), CPR (2)

Tivicay® (DTG), CPR (1)

COMBINATI DI NUCLEOSITIDICI CPR (1), (1)

Descovy® (TAF+TQ)

Kivexa® (ABC+3TC)

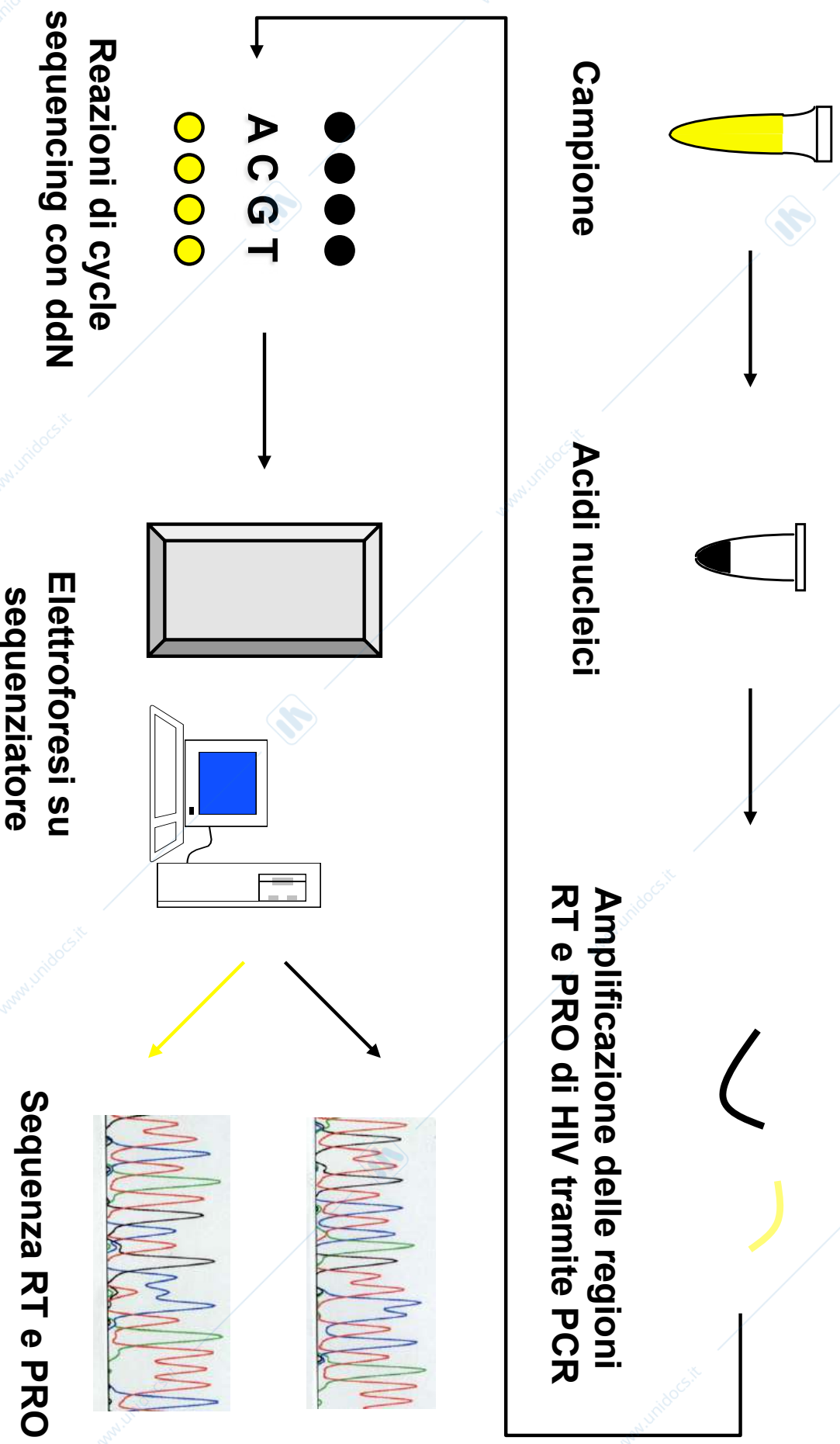
Truvada® (TDF+TQ)

POTENZIATORI FARMACOCINETICI (BOOSTER), CPR, (1)

Norvir® (RTV)

Tyboost® (COBI), (6)








Genotipizzazione: sequenziamento completo



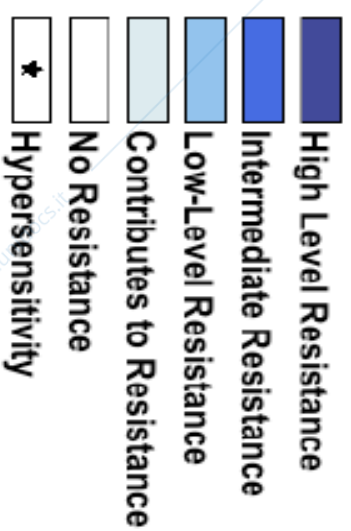
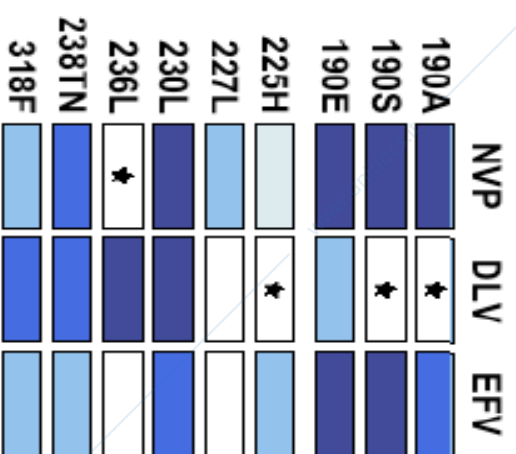
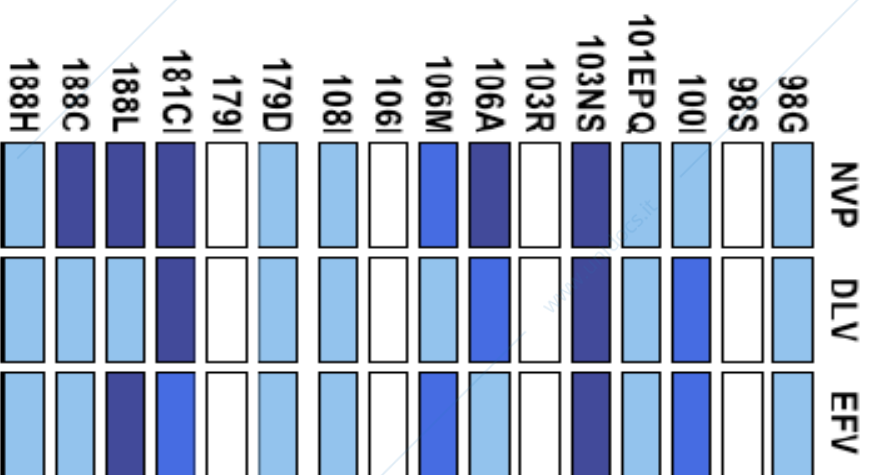
Mutazioni della RT che causano alterata suscettibilità agli inibitori nucleosidici

	AZT	DAT	TDF	ABC	DDI	3TC
41	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
67	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
70	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
210	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
215	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
219	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
184	Star	Star	Star	Light Blue	Light Blue	Dark Blue
69	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
65	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue
74	Star	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue
75T	Light Blue	Dark Blue	?	Light Blue	Dark Blue	Light Blue
62	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
75I	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
77	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
116	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
151	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue
69SS	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
44	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
118	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
115	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue

	AZT	DAT	TDF	ABC	DDI	3TC
184	Star	Star	Star	Light Blue	Light Blue	Dark Blue
69	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
65	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue
74	Star	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue
75T	Light Blue	Dark Blue	?	Light Blue	Dark Blue	Light Blue
62	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
75I	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
77	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
116	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
151	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue
69SS	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
44	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
118	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
115	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue





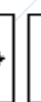

-  High Level Resistance
-  Intermediate Resistance
-  Low Level Resistance
-  Contributes to Resistance
-  No Resistance
-  Unknown
-  Hypersensitivity

Mutazioni della RT che causano alterata suscettibilità agli inibitori non nucleosidici



Mutazioni della Proteasi che causano alterata suscettibilità agli inibitori

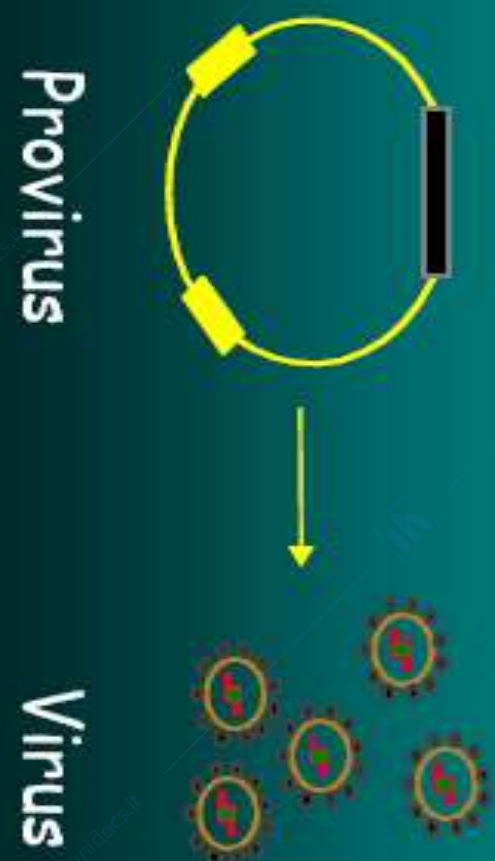
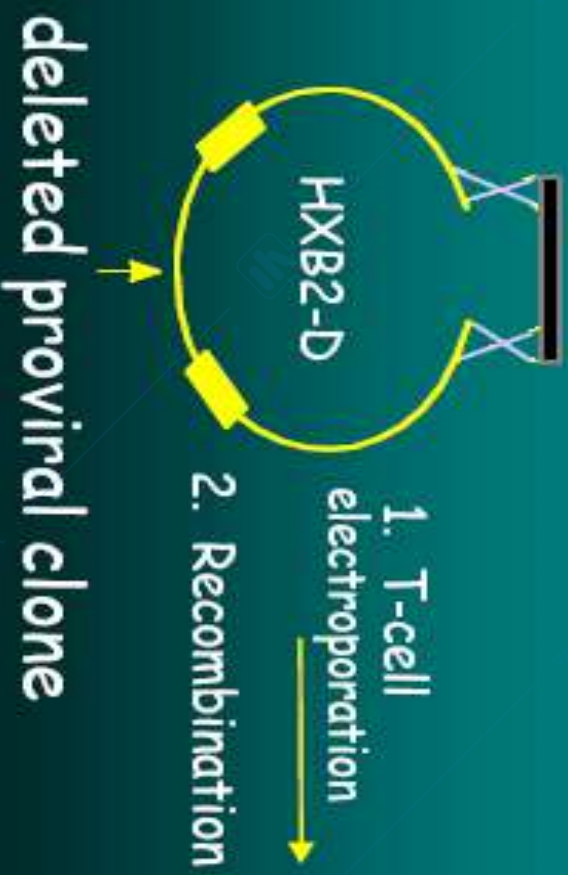
	NFV	SQV	IDV	RTV	APV	LPV	ATV
30	High-level resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance
48	High-level resistance	High-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance
50V	No Resistance	No Resistance	No Resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	No Resistance
50L	Hypersensitivity	Hypersensitivity	Hypersensitivity	Hypersensitivity	Hypersensitivity	Hypersensitivity	High-level resistance
82	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance
84	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance
90	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance
46	High-level resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance
47	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance
53	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance
54	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance
24	No Resistance	No Resistance	Low-level resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance
32	No Resistance	No Resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance	High-level resistance
73	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance	Low-level resistance
88	High-level resistance	No Resistance	Low-level resistance	No Resistance	Hypersensitivity	No Resistance	High-level resistance
10	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance
20	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance
33	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance
36	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance
63	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance
71	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance
77	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance	No Resistance
93	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance	Contributes to resistance

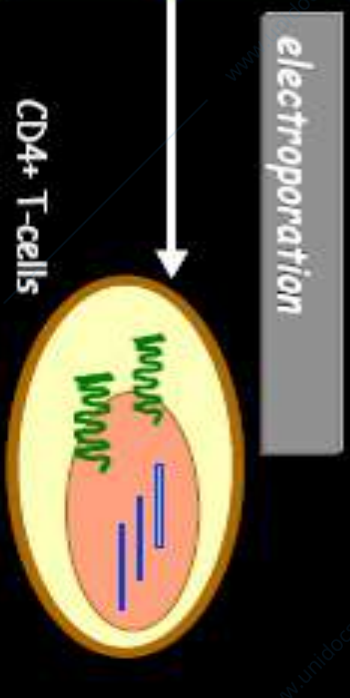
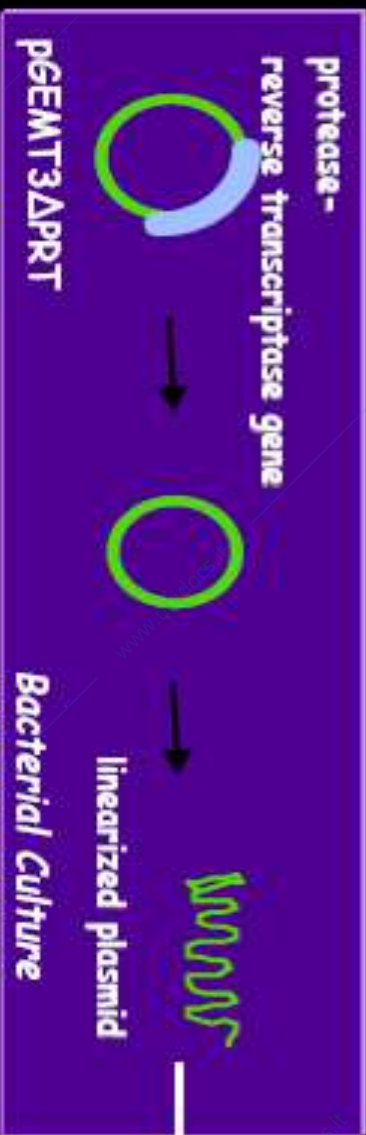
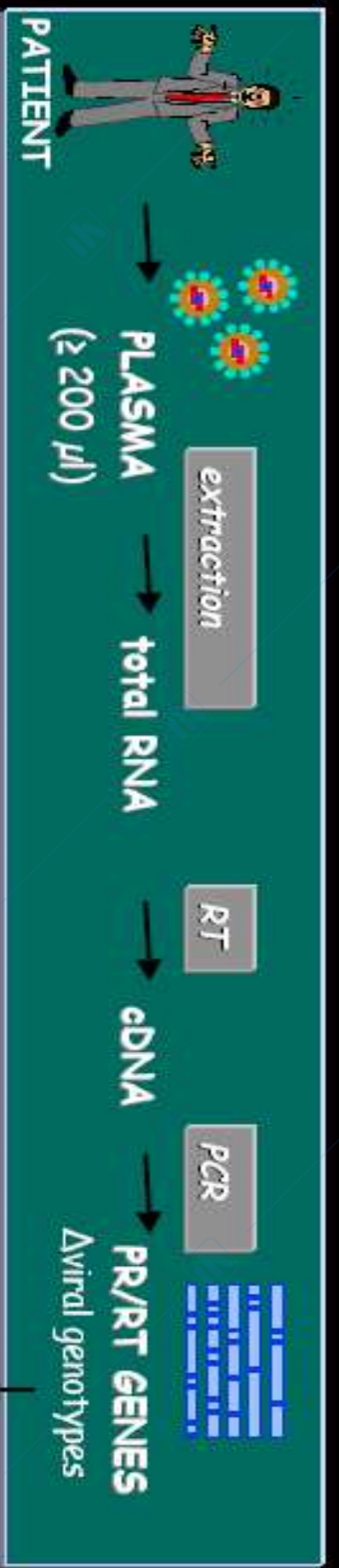
-  High-level resistance
-  Intermediate resistance
-  Low-level resistance
-  Contributes to resistance
-  No Resistance
-  Hypersensitivity

Phenotyping Assays

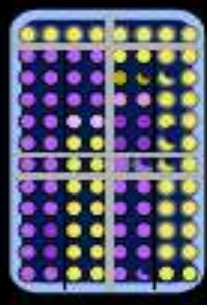
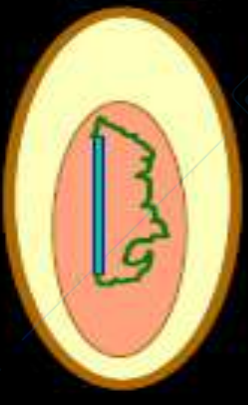
Recombinant Virus Assay

PCR fragment
(gag/Pro/RT)

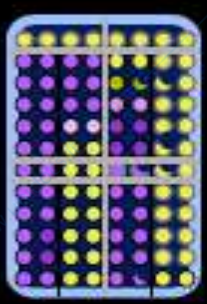




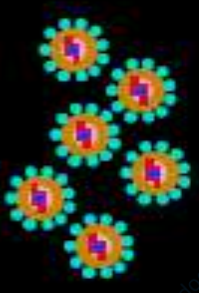
homologous recombination



Susceptibility Assay



Titration



Infectious HIV Aviral genotypes

ANTIVIROGRAM™

Patogenesi delle infezioni virali



DEFINIZIONI

Patogenicità: (dal greco Pathos=dolore): capacità di causare malattia

Patogeno: organismo capace di provocare malattia

Virulenza: Capacità di produrre malattia, caratteristica di un “particolare” ceppo virale

- **LA PATOGENESI DELLE INFEZIONI**
 - (dal greco *πάθος* = dolore)
 - è
 - la risultante di una sorta di conflitti tra le capacità invasive dell' agente infettante e le difese dell' ospite

Patogenesi delle infezioni virali

- Il virione rappresenta la forma inerte dei virus, l'attività del virus si esplica nel momento dell'interazione virus-cellula.
- La penetrazione del virus nella cellula genera una nuova entità: la **cellula infetta**.

La patogenesi in genere è legata:

- all'attività patogena del virus stesso
- alla permissività o meno dell'ospite e dei suoi organi

Equilibrio: duplice risultato di assicurare la diffusione del virus e la sopravvivenza dell'ospite.

La **virulenza** o la mancanza di essa per ciascun tipo di virus può essere determinata da piccole mutazioni nel genoma.

Patogenesi delle infezioni virali

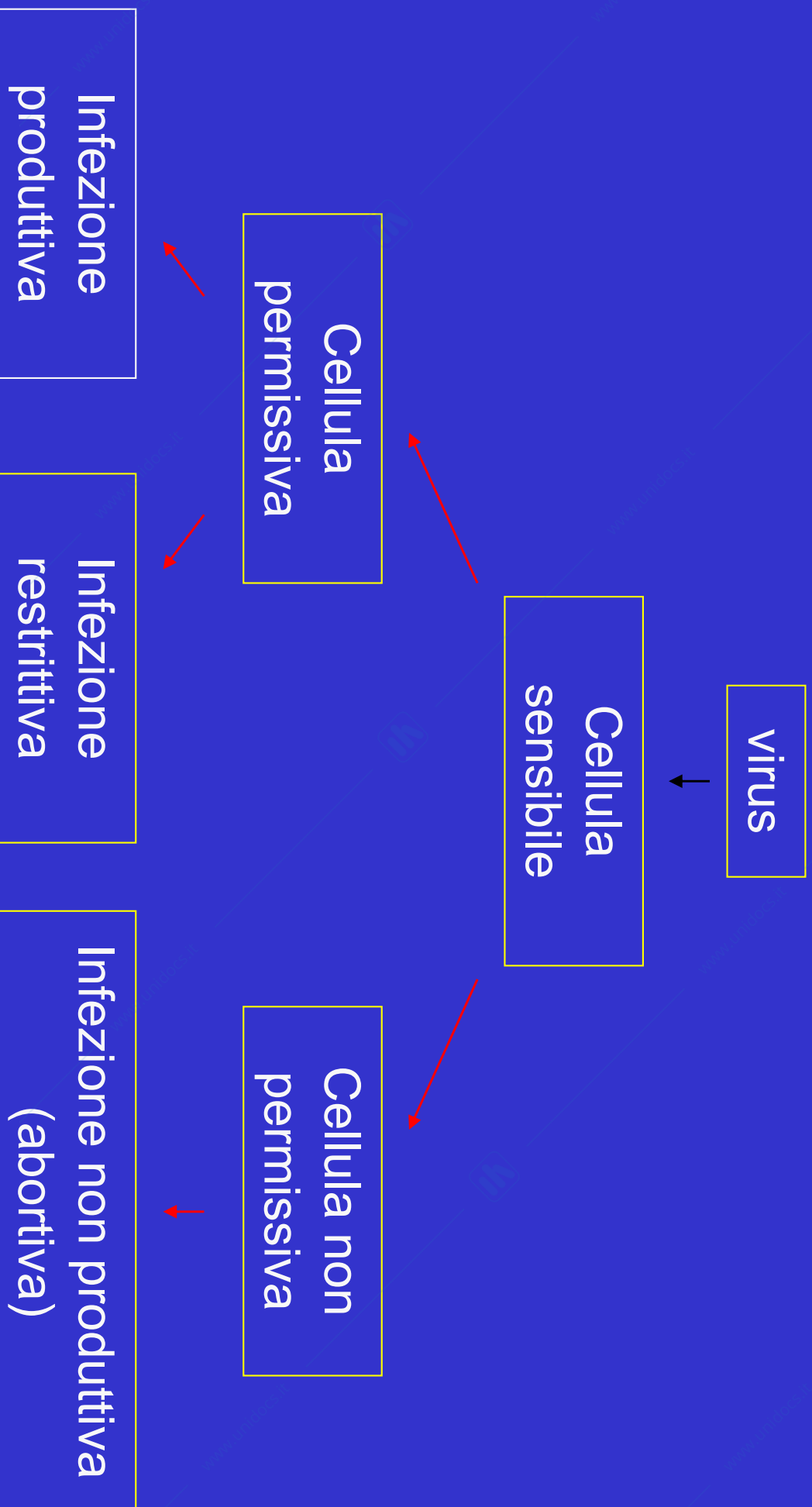
Importanti eventi nella patogenesi:

- l'**ingresso** del virus nell'ospite
- la replicazione nella sede di primo **impianto** che può coincidere o meno con il sito di ingresso
- il **superamento** delle difese locali (ad. es. **linfociti**, macrofagi, IFN)
- la **diffusione** dalla sede di impianto
- la **disseminazione** agli organi bersaglio
- l'**eliminazione** del virus dall'organismo

Interazione virus-cellula

Cellula sensibile: presenza recettori per quel virus

Cellula permissiva: supporta la replica di quel virus



- **Infezione produttiva**
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

- **Infezione abortiva**
In alcuni casi l'infezione può non completarsi. Ciò si verifica quando il virus infettante è difettivo (mancano ad es. parti essenziali del proprio genoma) o quando la cellula consente l'espressione di solo alcuni geni virali portando all'arresto dell'infezione

- **Infezione restrittiva**
Quando le cellule sono permissive solo in una certa fase del loro ciclo vitale

Ad es. quando alcuni virus, come parvovirus si replicano solo durante la fase S del ciclo cellulare



Le infezioni di tipo abortivo e restrittivo possono consentire la persistenza del virus all'interno della cellula ospite → **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

Effetti del virus sulle cellule

La penetrazione del virus nella cellula genera una nuova entità: **la cellula infetta**.

La moltiplicazione virale altera lo stato fisiologico della cellula: cambiamenti della morfologia cellulare, alterazioni metaboliche, genetiche e regolatorie.

L'infezione cellulare può determinare 2 eventi distinti (che dipendono dal tipo del virus e dal tipo della cellula):

- **morte della cellula** (infezioni citocide) per evento litico
- **trasformazione**

Meccanismi di danno cellulare da virus

Virus citolitici: effetti citopatici

Inibizione di proteine cellulari e di sintesi di RNA, perdita dell' integrità di membrana, perdita di enzimi da lisosomi, degradazione citoplasmatica

Formazione di sincizi da parte di virus con envelope

Apoptosi

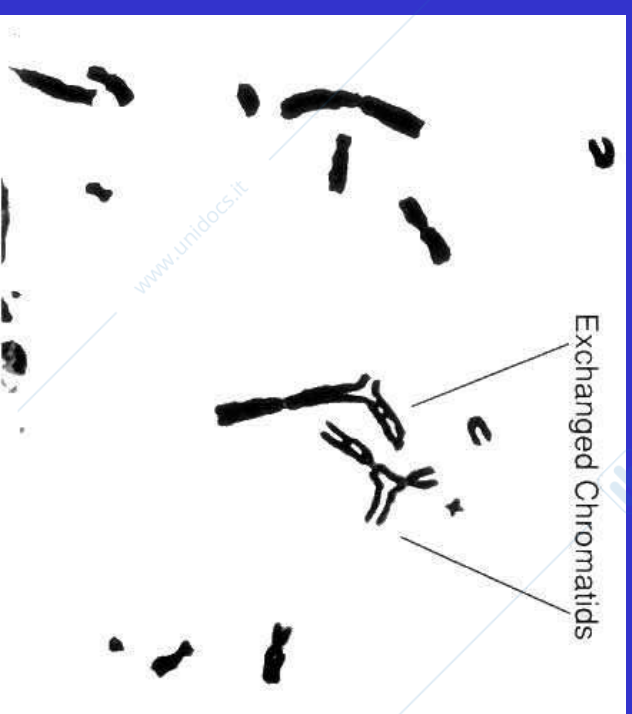
Infezione citocida: effetto citopatico (CPE)

- ❖ Alterazioni del citoscheletro e cambiamento morfologia (es. arrotondamento)
- ❖ Inclusioni nucleari o citoplasmatiche (addensamento di componenti virali anche associati a microfilamenti cellulari e microtubuli)
- ❖ Formazione di sincizi (cellule giganti multinucleate generate da passaggio virus diretto da cellula a cellula)

Alterazioni cromosomiche in seguito a infezione

- ❖ Causate da riarrangiamenti durante la replica del genoma virale e da interferenze con i meccanismi di manutenzione del DNA cellulare
- ❖ Spesso letali, altrimenti instabilità genetica e espressione alterata di geni cellulari, possibilità di accumulo mutazioni e immortalizzazione

Aberrazioni cromosomiche causate dall'infezione di linfociti periferici umani con citomegalovirus



ALCUNI DEI PIU' COMUNI EFFETTI CITOPATICI

IN VIVO CI SONO IMMAGINI

CITOPLASMATICHE

degenerazione balloniforme

vacuolizzazione

poichilocitosi

degenerazione spongiforme

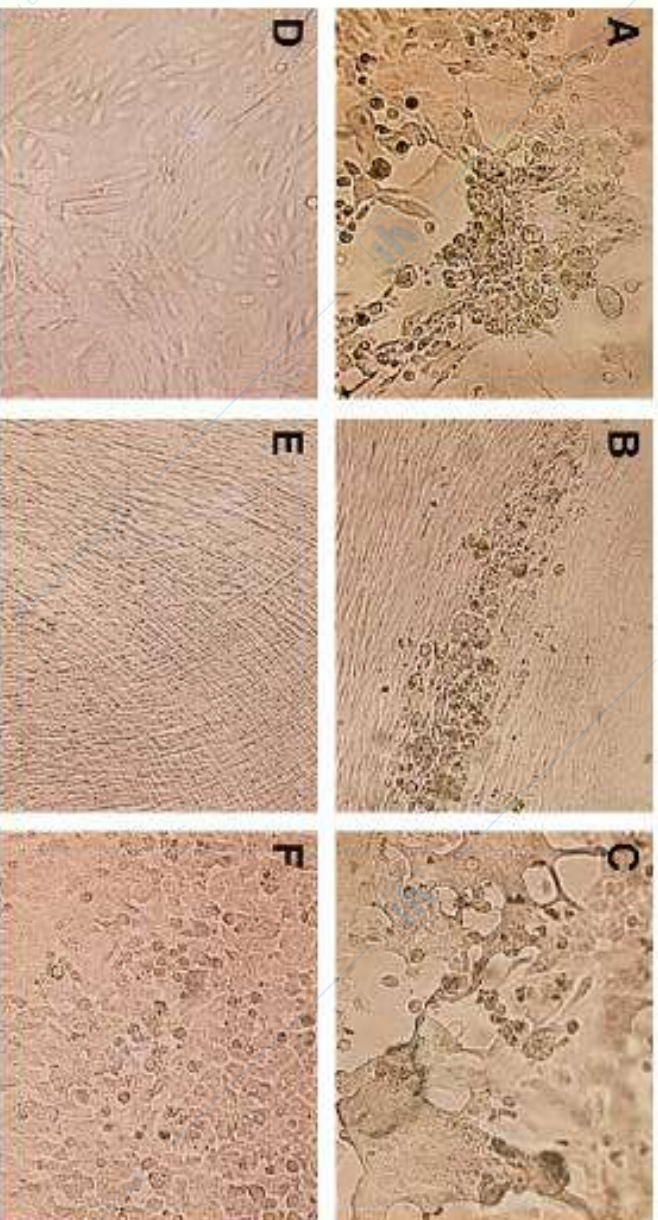
NUCLEARI

picnosi

aggregazioni

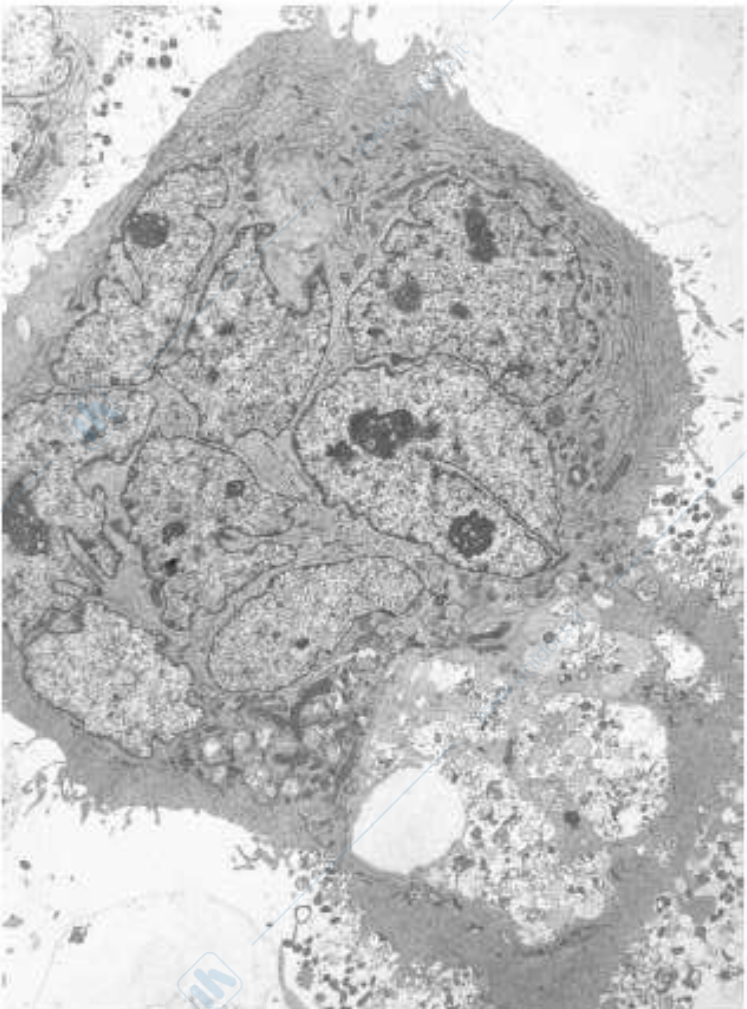
marginalizzazione cromatinica

cellule giganti



- A. Effetto della replicazione dell'Herpes Simplex in cellule di rene di scimmia.
- B. Effetto della replicazione di citomegalovirus in fibroblasti embrionali umani.
- C. Effetto della replicazione del virus respiratorio sinciziale in una linea cellulare di carcinoma laringeo umano.
- D.E. F. Controlli

SINCIZI



A syncytium formed by human immunodeficiency virus (HIV) infection of T cells. Electron micrograph courtesy of J. Sodroski.

BLOCCO DEI PROCESSI CELLULARI

INIBIZIONE DELLA SINTESI DI MACROMOLECOLE CELLULARI

✓ i poliovirus sono responsabili dell'inattivazione di una proteina cellulare (*cap-binding protein*), necessaria per la traduzione dei messaggeri cellulari, deputata all'inserimento della struttura mGppN in corrispondenza del 5' degli mRNA cellulari, ma non di quelli virali;

✓ il virus influenzale possiede un enzima virus-specifico che determina il trasferimento di residui guaninici metilati e di alcuni nucleotidi terminali dall'estremità 5' degli mRNA cellulari all'estremità 5' degli mRNA virali, inibendo i messaggeri cellulari ma non quelli virali.

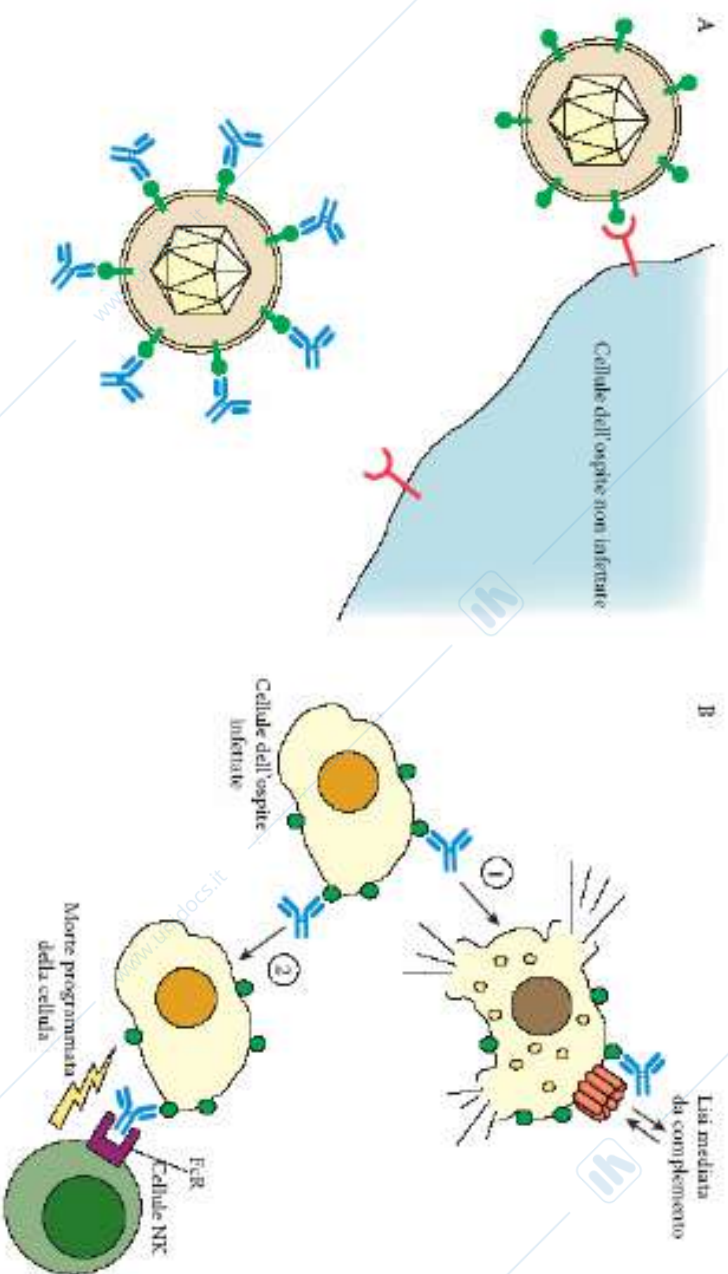
MODIFICAZIONE DELLE MEMBRANA CITOPLASMATICA

✓ l'aumentato afflusso di sodio può agire favorendo le traduzioni virali a scapito di quelle cellulari nell'infezione da polio.

APOPTOSI: MORTE CELLULARE PROGRAMMATA

E' un fenomeno codificato da geni specifici spesso ricordato come una forma di suicidio cellulare.

l'eliminazione delle cellule infette da virus ostacola in maniera molto efficace la diffusione del virus all'interno dell'organismo ospite.



Apoptosi: morte cellulare programmata.

I virus si sono evoluti parallelamente all'ospite e in qualche caso hanno sviluppato meccanismi atti a superare i processi dell'ospite attivati per combattere in maniera specifica le infezioni virali.

Es. i virus possono codificare proteine che ostacolano la presentazione antigenica, l'azione di specifiche citochine, l'attivazione del complemento, nonché inibire o favorire il processo apoptotico.

Principali virus animali in grado di inibire l'espressione di proteine **direttamente coinvolte nel processo apoptotico e bersagli relativi**

Virus

Adenovirus
CMV
EBV
HBV
HPV
Adenovirus
EBV
Poxvirus
Adenovirus

Bersaglio

p53
p53
p53
p53
p53
bcl-2
bcl-2
caspasi
TNF recettore

DANNI INDIRETTI:

Sono dipendenti dal coinvolgimento del sistema immunitario dell'ospite e comprendono:

- **INTERFERONE E LINFOCINE** (febbre, rinorrea, cefalea, malessere);
- **IMMUNOCOMPLESSI, ATTIVAZIONE DEL COMPLEMENTO, IPERSENSIBILITA' RITARDATA** (risposte infiammatorie locali e danno cellulare);
- **INFIAMMAZIONE INDOTTA DALLA RISPOSTA CELLULO-MEDIATA** (danni tissutali);
- **ACCUMULO DI IMMUNOCOMPLESSI NEL SANGUE E NEL RENE**(glomerulonefrite);

Infezione virale e malattia

- Il virus deve essere capace di riprodursi nell'ospite
- Deve essere capace di diffondere da un ospite all'altro
- Deve essere capace di evadere la risposta immune

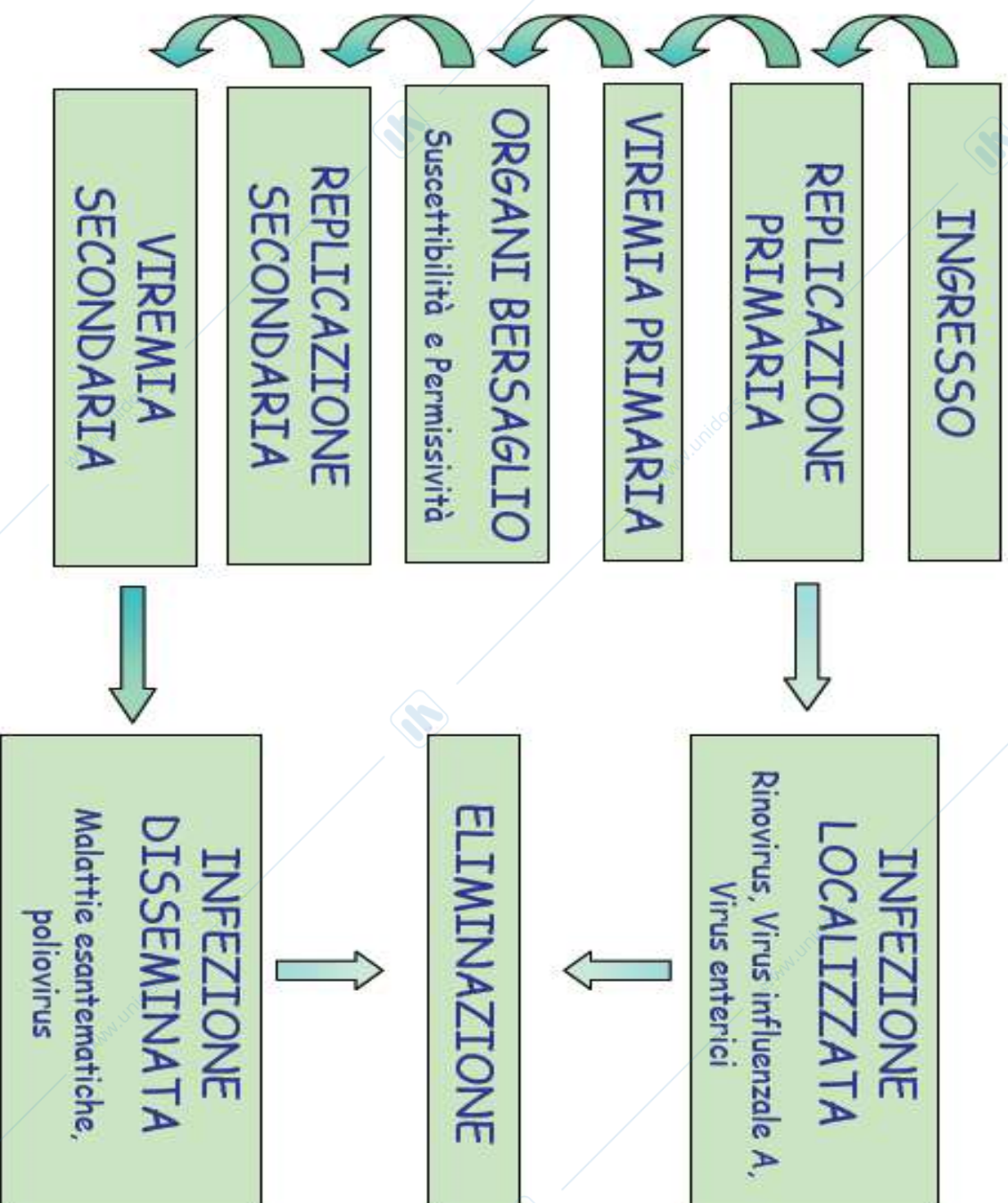
Infezione e malattia

Requisiti

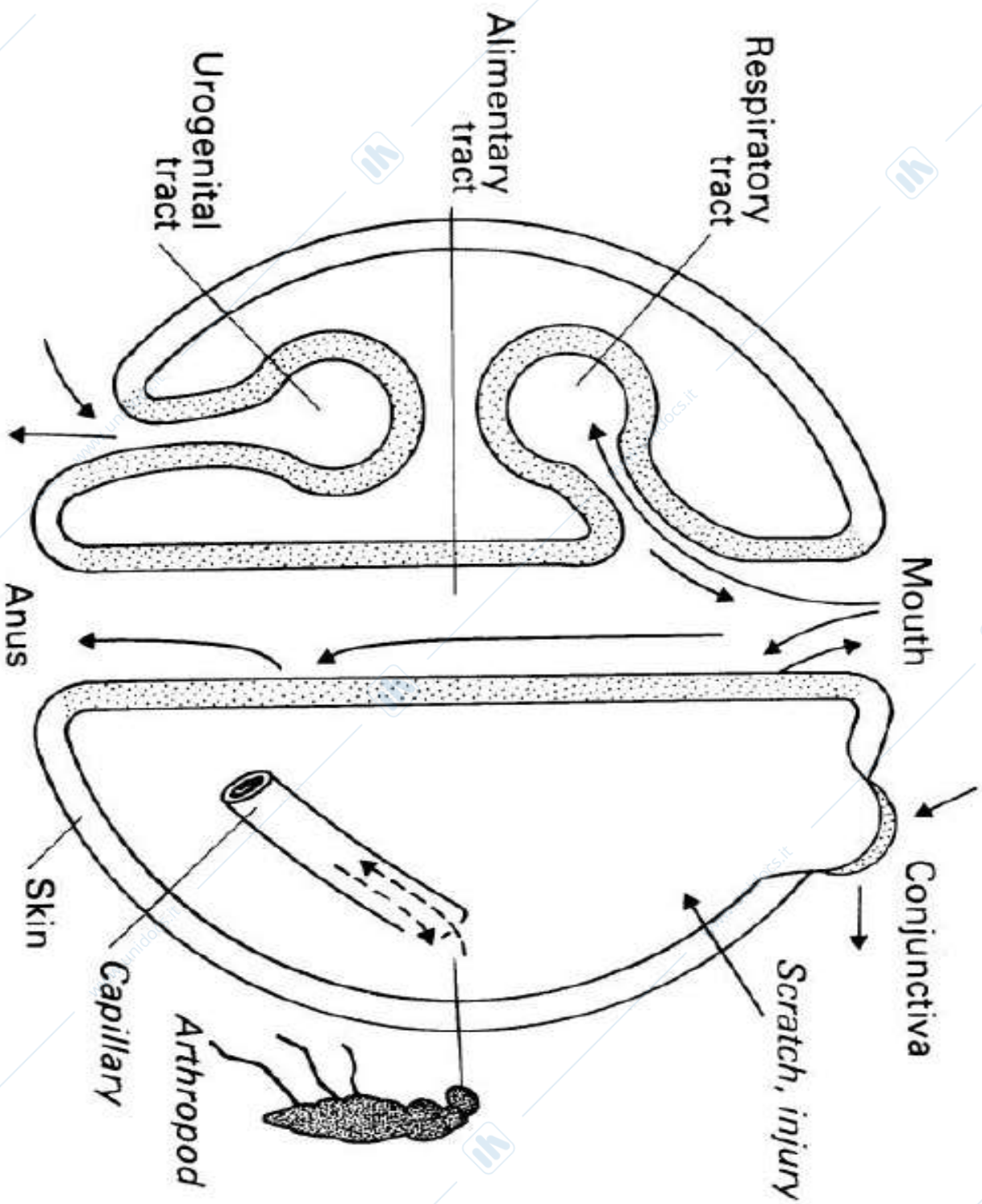
- ❖ Superamento delle barriere fisiche
- ❖ Superamento delle difese aspecifiche e specifiche dell'ospite
- ❖ Diffusione agli organi bersaglio
- ❖ Moltiplicazione in quantità sufficiente per danneggiare l'organo
 - Citopatologia diretta (morte cellulare)
 - Induzione di rilascio di fattori tossici
 - Innesco di reazioni immunopatologiche

TAPPE COMUNI

A QUASI TUTTE LE INFEZIONI VIRALI



VIE DI ENTRATA E DI USCITA DEL VIRUS NELL'OSPITE



1 **TAPPA: INGRESSO DEL VIRUS NELL'ORGANISMO OSPITE**

I virus possono penetrare principalmente:

- per via respiratoria (rinovirus);
 - per via gastrointestinale (HAV);
 - per via genitale (HCV, HIV, HBV, etc);
 - per via parenterale (attraverso insetti ematofagi, o per inoculazione di sangue o emoderivati);
 - per via cutanea (virus delle verruche e del mollusco contagioso)
- trapianti d'organo, soprattutto midollo osseo e rene (Citomegalovirus, Epstein-Barr virus)

Vie di ingresso delle infezioni virali

CUTE

- ❖ Strato corneo protettivo (cellule morte)
- Possibilità di ingresso per:
- ❖ Trauma (es. 'herpes gladiatorum')
 - ❖ Punture di artropodi (es. Toscana virus, TBE)
 - ❖ Morsi di animali (es. v. rabbia, Hantavirus, Ebola)
 - ❖ Inoculazione parenterale (es. chirurgia, dentista, droghe endovena, tatuaggi, piercing) (es. HBV, HCV, HIV, CMV)

Scarsa importanza come via di uscita e diffusione (VZV)

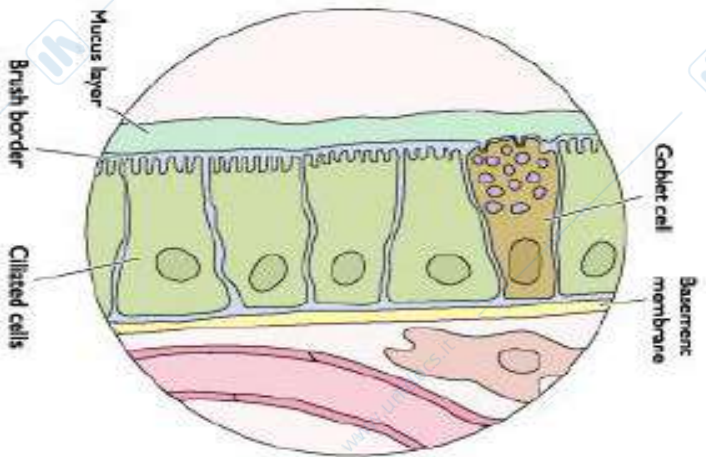
Vie di ingresso delle infezioni virali

VIE RESPIRATORIE

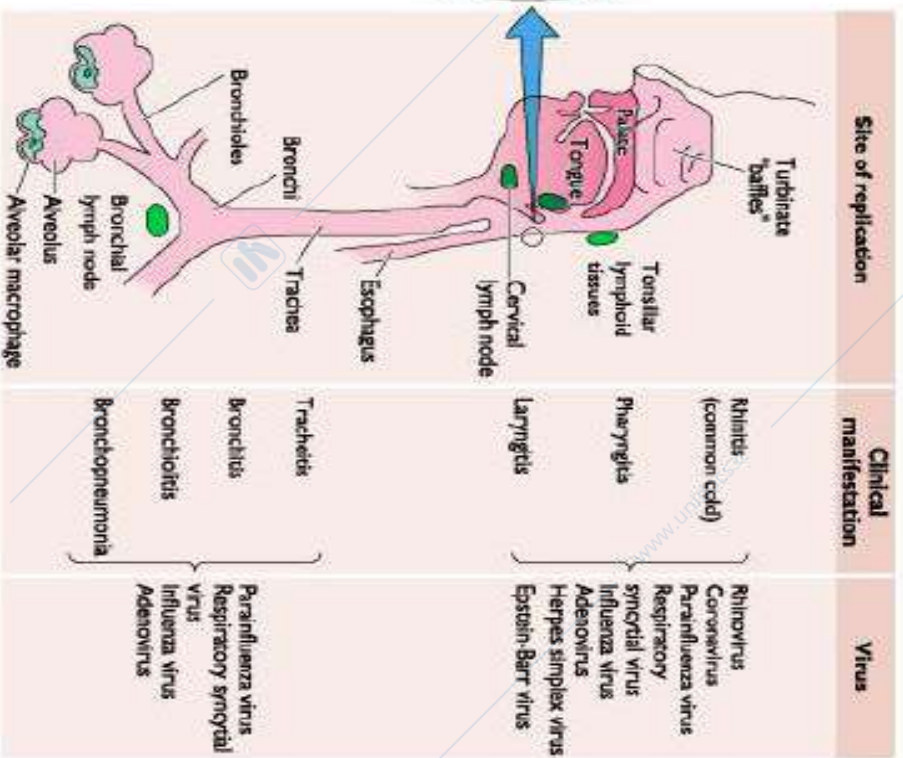
- ❖ Difese specifiche (immunità mucosale) e non (epitelio ciliato, muco)
- ❖ Principale via di ingresso nei paesi occidentali
- ❖ Inalazione di aerosol (<1 μm diametro) contenenti virus
- ❖ Virus che si moltiplicano solo nel tratto respiratorio ('virus respiratori') causando raffreddore, faringite, bronchiolite, polmonite
- ❖ Virus che possono dare infezione sistemica

Grande importanza come via di uscita e diffusione

INFEZIONI DELLE VIE RESPIRATORIE



-influenza neuraminidase (NA) may be important in "digesting" the mucus layer



From Flint et al Principles of Virology ASM Press

Vie di ingresso delle infezioni virali

VIA ALIMENTARE

- ❖ Difese specifiche (immunità mucosale) e non (HCl, sali biliari)
- ❖ Via di ingresso importante nei paesi in via di sviluppo
- ❖ Moltiplicazione nelle cellule epiteliali dell'intestino tenue ed eliminazione attraverso le feci
- ❖ Infezione sintomatica o asintomatica
- ❖ Buona resistenza in ambiente extracorporeo

Possibilità di epidemie attraverso il circuito oro-fecale (es. HAV)

Virus che fanno ingresso per il tratto alimentare

Site of Infection	Family	Specific Viruses
Mouth or oropharynx	Poxviridae Herpesviridae	Monkeypox virus HSV, EBV, cytomegalovirus
Intestinal tract Producing enteritis	Reoviridae Caliciviridae Adenoviridae	Rotaviruses Norwalk agent and related viruses Several types
Producing generalized disease, usually without local symptoms	Picornaviridae Caliciviridae	Many enteroviruses including polioviruses and hepatitis A virus Hepatitis E virus
Usually symptomless	Picornaviridae Adenoviridae Reoviridae Coronaviridae	Some enteroviruses Some adenoviruses Reoviruses Coronaviruses (rarely)

Vie di ingresso delle infezioni virali

TRATTO GENITALE

- ❖ Difese specifiche (mucosa vaginale) e non (muco)
- ❖ Infezioni localizzate (HSV, HPV) o sistemiche (HIV, HTLV, HBV)

Rilascio per via urinaria

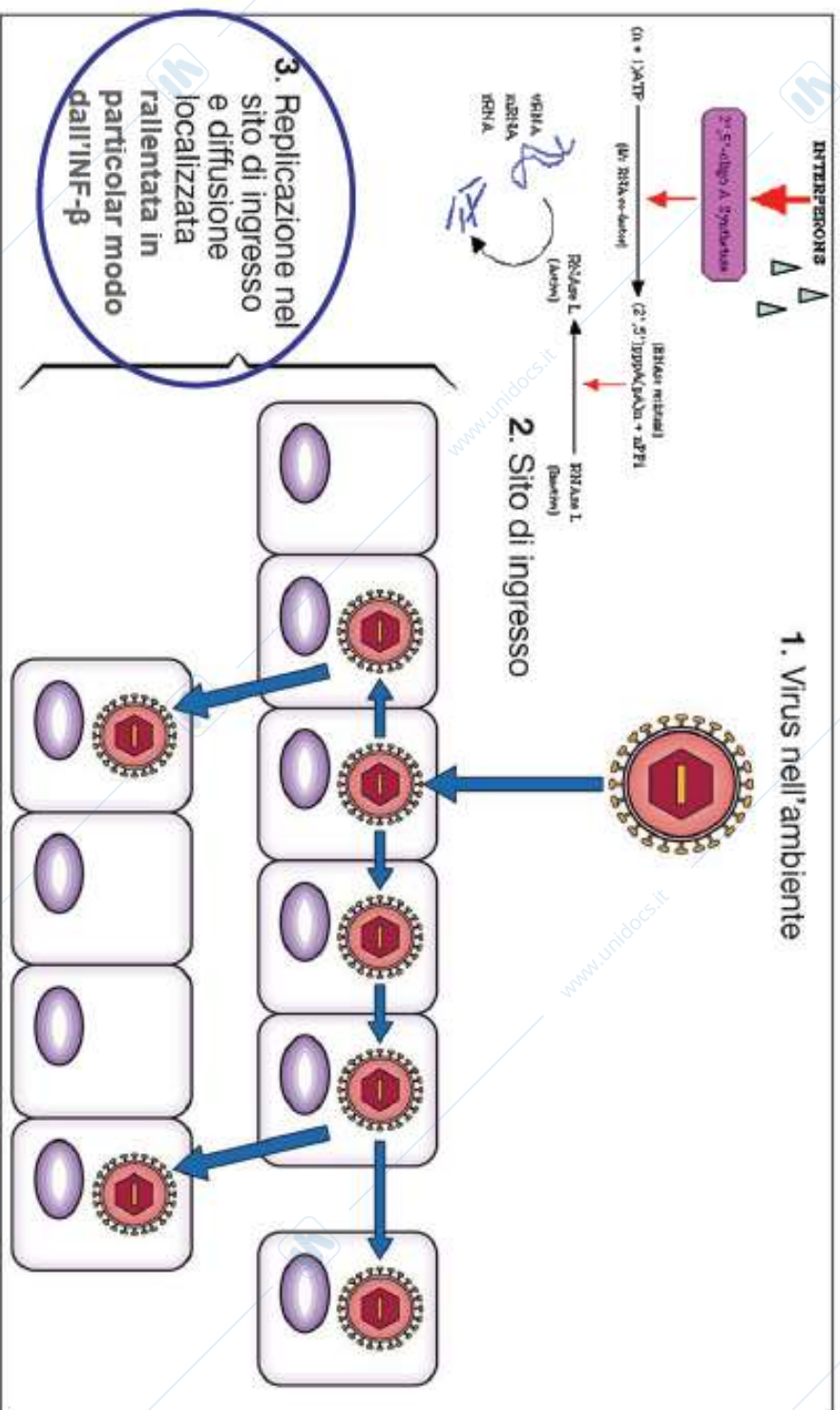
- ❖ Alcuni virus umani (es. CMV, v. rosolia, v. morbillo) ma ruolo epidemiologico non importante
- ❖ Alcuni virus animali che possono poi essere trasmessi all'uomo (es. Arenavirus e Hantavirus nei roditori)

II TAPPA: DIFFUSIONE DEL VIRUS NELL'ORGANISMO OSPITE

I virioni prodotti possono:

- continuare a diffondersi nella stessa sede di impianto
- estendendo l'infezione nell'ambito del medesimo organo o apparato (rinovirus, Influenza A);
- diffondere per via ematica attraverso i vasi linfatici (HIV, HCV, HBV);
- diffondere per via nervosa, utilizzando i nervi periferici per raggiungere il SNC (Rabdovirus, α Herpesvirus).

DIFFUSIONE DEL VIRUS IN UN'INFEZIONE LOCALIZZATA



Infezioni localizzate

Sono le infezioni che rimangono **circoscritte ai tessuti del sito di ingresso** o a quelli ad esso **contigui**.

Sono **infezioni dell'epitelio superficiale** : cute, congiuntiva e mucose del tratto respiratorio, gastrointestinale e genitale.

Es. **Rinovirus**, l'infezione non va oltre le cavità nasali

Sebbene la replicazione virale sia ristretta a certe superfici gli effetti sull'organismo possono essere molto più generalizzati (es. influenza).

Infezioni generalizzate

Schema generale

I virioni entrano attraverso un tessuto epiteliale/mucose dove effettuano una limitata replicazione.

I virioni prodotti migrano ai linfonodi regionali: alcuni vengono distrutti dai macrofagi, altri passano nel circolo sanguigno determinando una **viremia primaria** (fase generalmente asintomatica o paucisintomatica) che a volte dà origine ai prodromi della malattia e febbre.

Dal sangue il virus accede al **sistema reticolo-endoteliale di organi** come fegato, milza, midollo osseo in cui esso può replicare.

In questo ciclo di amplificazione viene prodotta una grande quantità di virus che si riversa nel circolo sanguigno causando una **viremia secondaria**.

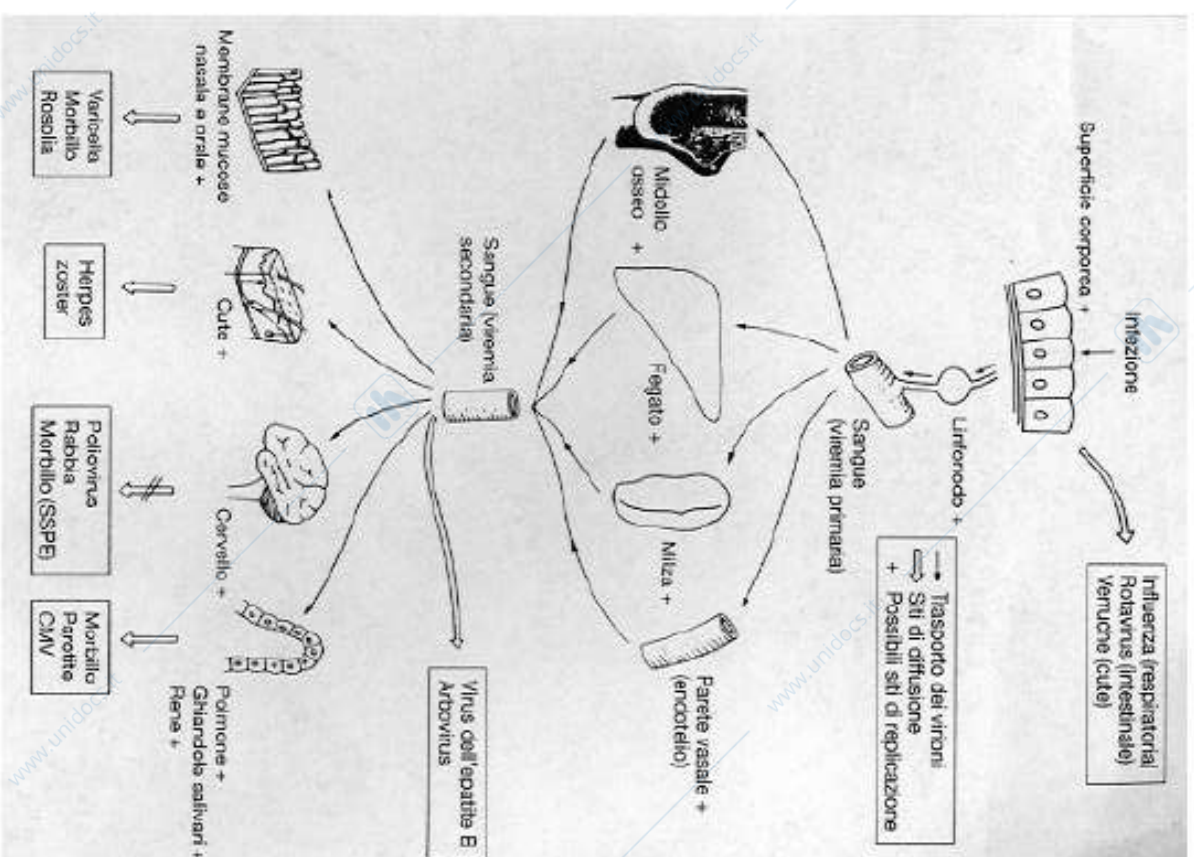
Dal circolo sanguigno il virus raggiunge il suo **organo bersaglio** determinando l'insorgenza della malattia.

In questo tipo di infezioni possono essere coinvolti vari organi bersaglio.

Diffusione dei virioni nell'organismo umano in corso di infezione.

Presuppone il drenaggio per via linfatica.

Sono indicati i siti di replicazione e le principali vie di diffusione dei vari virus.



I evento: ingresso
Possibile replicazione nella mucose di primo impianto

II evento: disseminazione
Prima e fugace viremia

III evento: Infezione organi interni
Possibile massiva replicazione

IV evento: disseminazione
seconda fase viremica più lunga

V evento: Infezione organi bersaglio

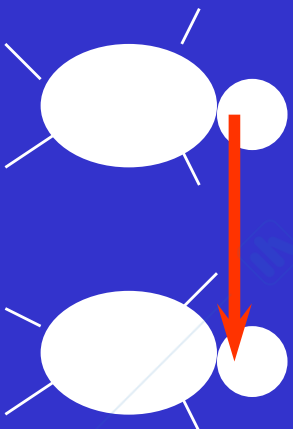
III TAPPA: ELIMINAZIONE DEL VIRUS DALL'ORGANISMO OSPITE

Assicura al virus la sua permanenza nella sua particolare sfera ecologica e ne determina le modalità di trasmissione.

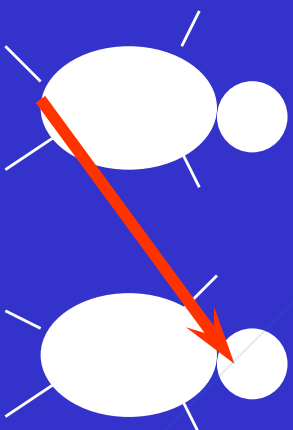
Coinvolge:

- le vie respiratorie (Rinovirus, Influenza A);
- l'apparato digerente (HAV, Poliovirus);
- la via ematica (HCV, HIV, etc);
- le secrezioni genitali (Herpes simplex II, Papovavirus, HIV, etc);
- più vie in momenti diversi dell'infezione (Enterovirus);
- le cellule germinali (Retrovirus in topi portatori).

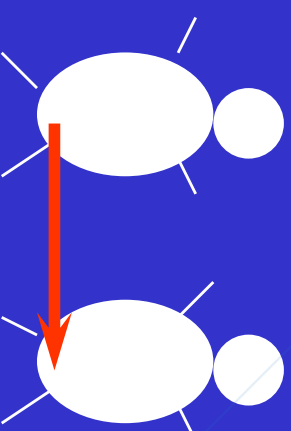
Trasmissione Interumana diretta



Respiratory route
eg. Influenza A

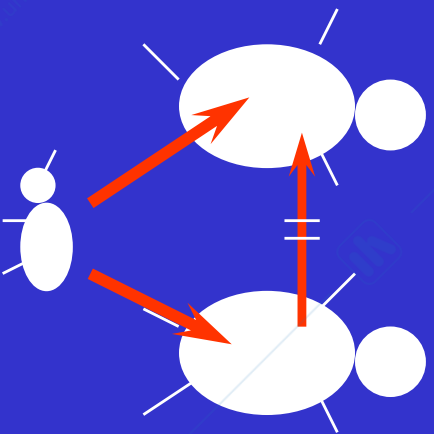


Fecal-oral route
eg. Hepatitis A

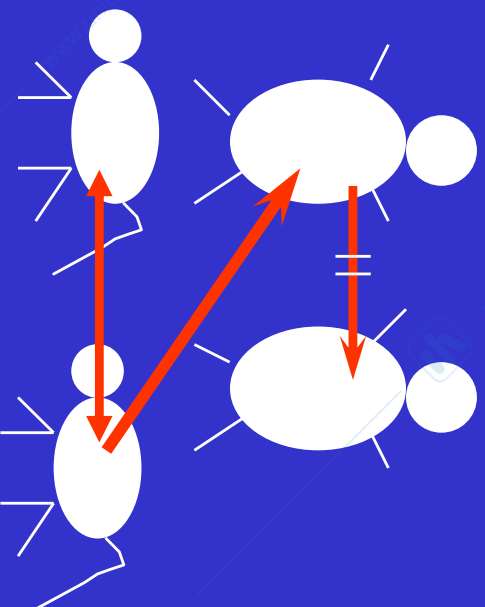


Sexually transmitted route, eg. papillomaviruses

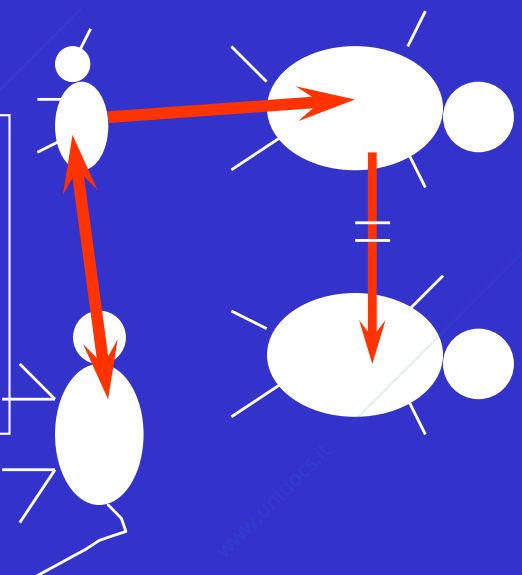
Infezioni zoonotiche



Yellow Fever Virus



Rabies Virus



Flaviviruses

Infezioni virali a trasmissione verticale

Verticale (dalla madre al figlio)

Attraverso le cellule gametiche contenenti il virus

Per via transplacentare

Nella vita perinatale

Trasmissione verticale

- ❖ Infezione delle cellule germinali
- ❖ Infezione transplacentare (inf. intrauterina, 'congenita') (es. CMV, v. rosolia, HIV, HBV)
- ❖ Infezione alla nascita (inf. 'neonatale') (es. HSV, HIV, HBV, HCV)
- ❖ Infezioni tramite allattamento (inf. 'perinatale') (es. HIV, CMV, HBV)

Come risponde l'ospite?

DIFESE DELL'ORGANISMO CONTRO LE INFEZIONI VIRALI

1. Barriere naturali anatomiche;
2. Barriere chimiche dell'epidermide e delle mucose;
3. Variabilità recettoriale (CCR5 e AIDS);
4. Difese aspecifiche umorali (infiammazione, complemento, Interferon);
5. Difese aspecifiche cellulari (Cellule natural killer e macrofagi);
6. Difese specifiche umorali (Anticorpi);
7. Difese specifiche cellulari (CTL e macrofagi).

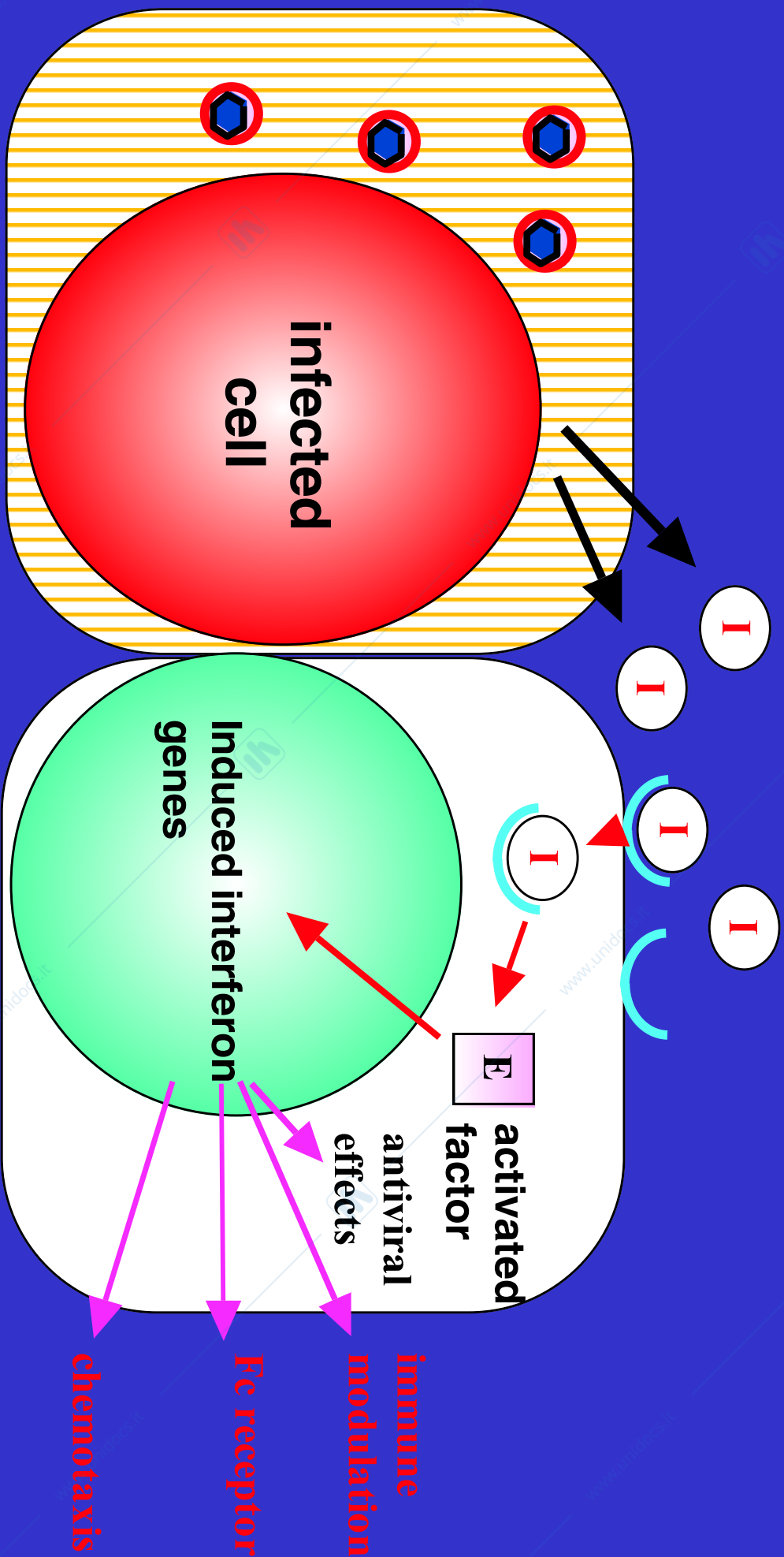
Non-Specific Responses

Barriere meccaniche - epitelio respiratorio, pelle

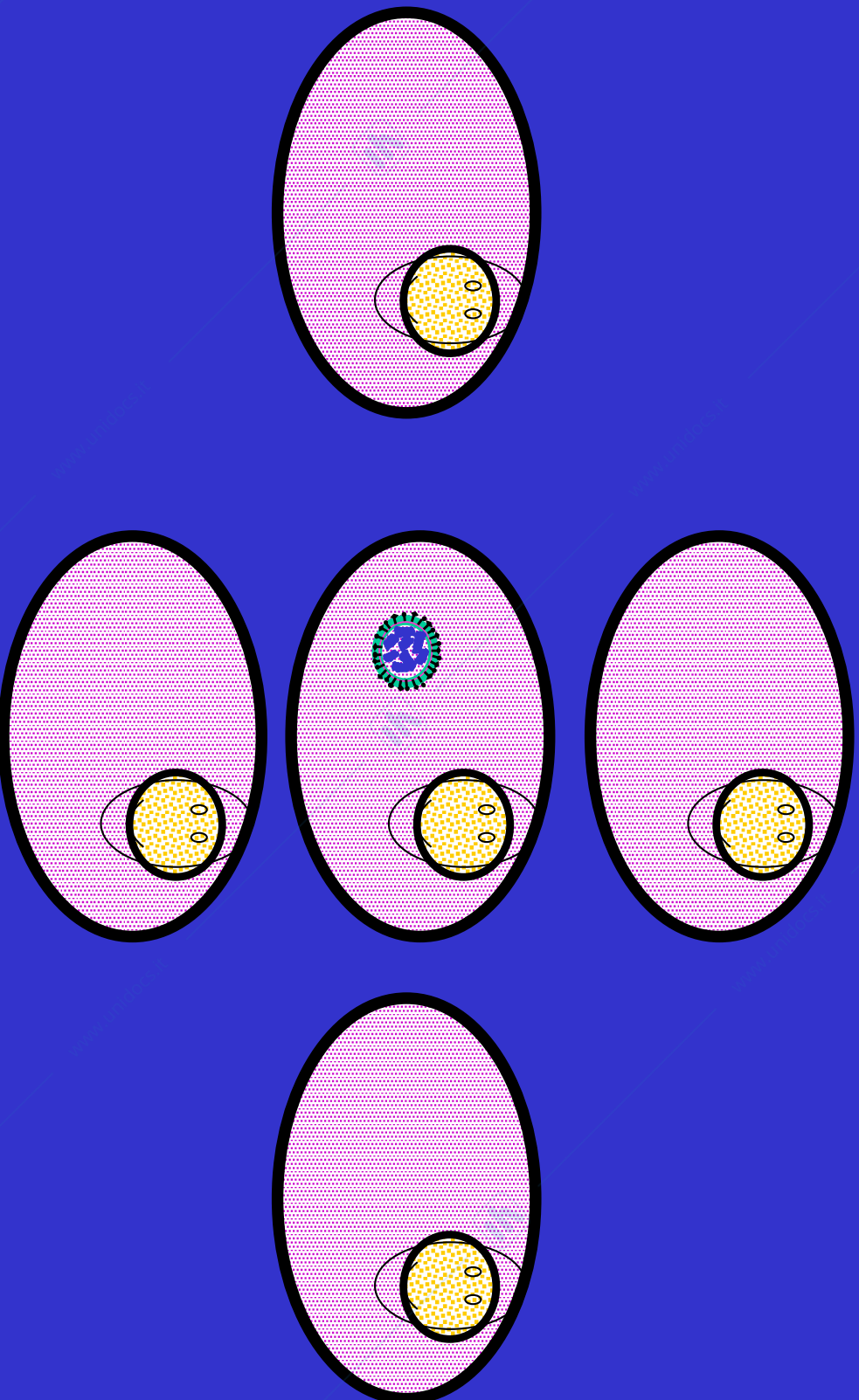
Fluidi corporali - lacrime, acidi gastrici

Interferone (induce uno stato di resistenza indiretta nelle cellule con le quali viene a contatto - produzione proteine effettrici) Azione specie-specifica e non virus-specifica

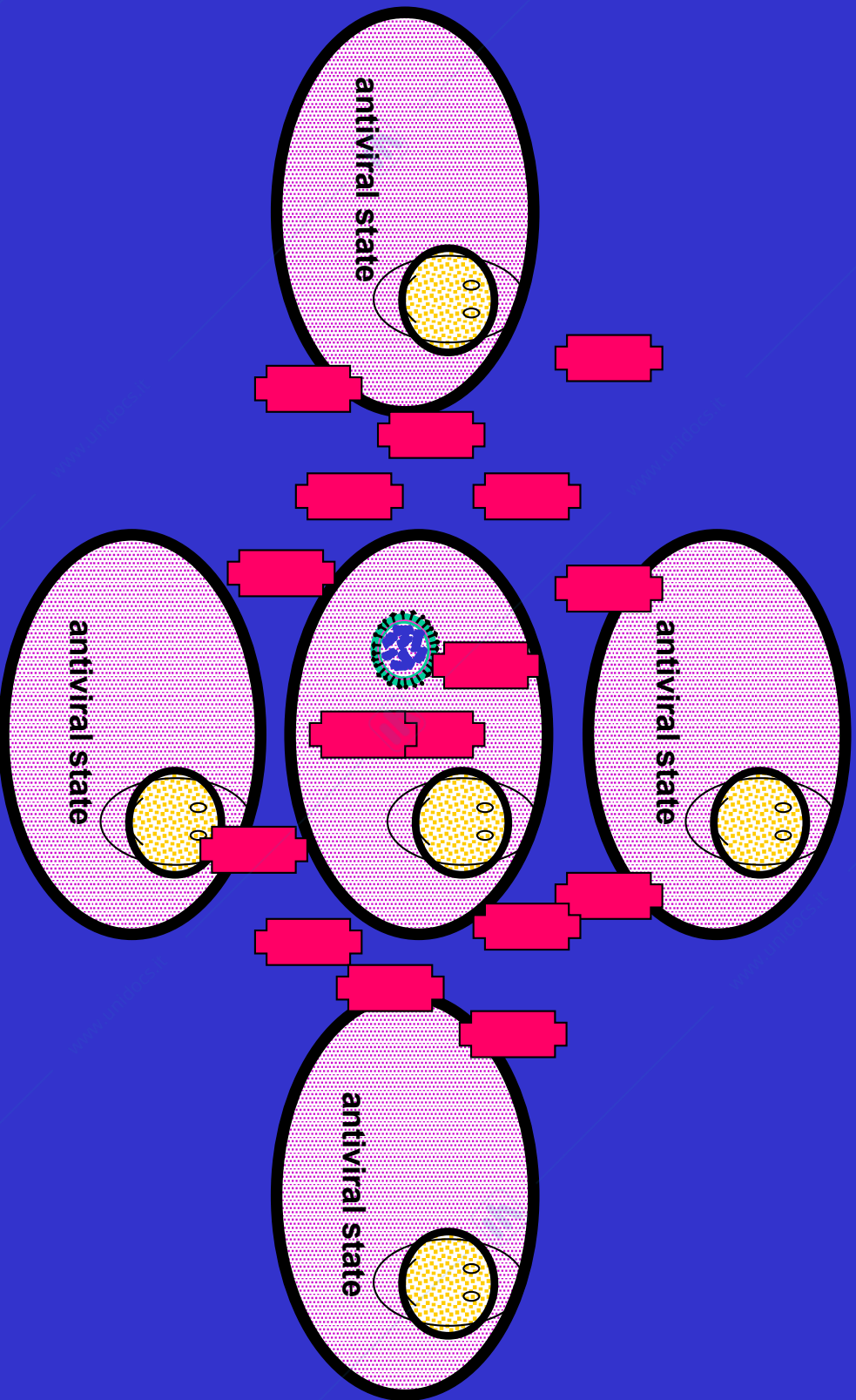
Interferoni



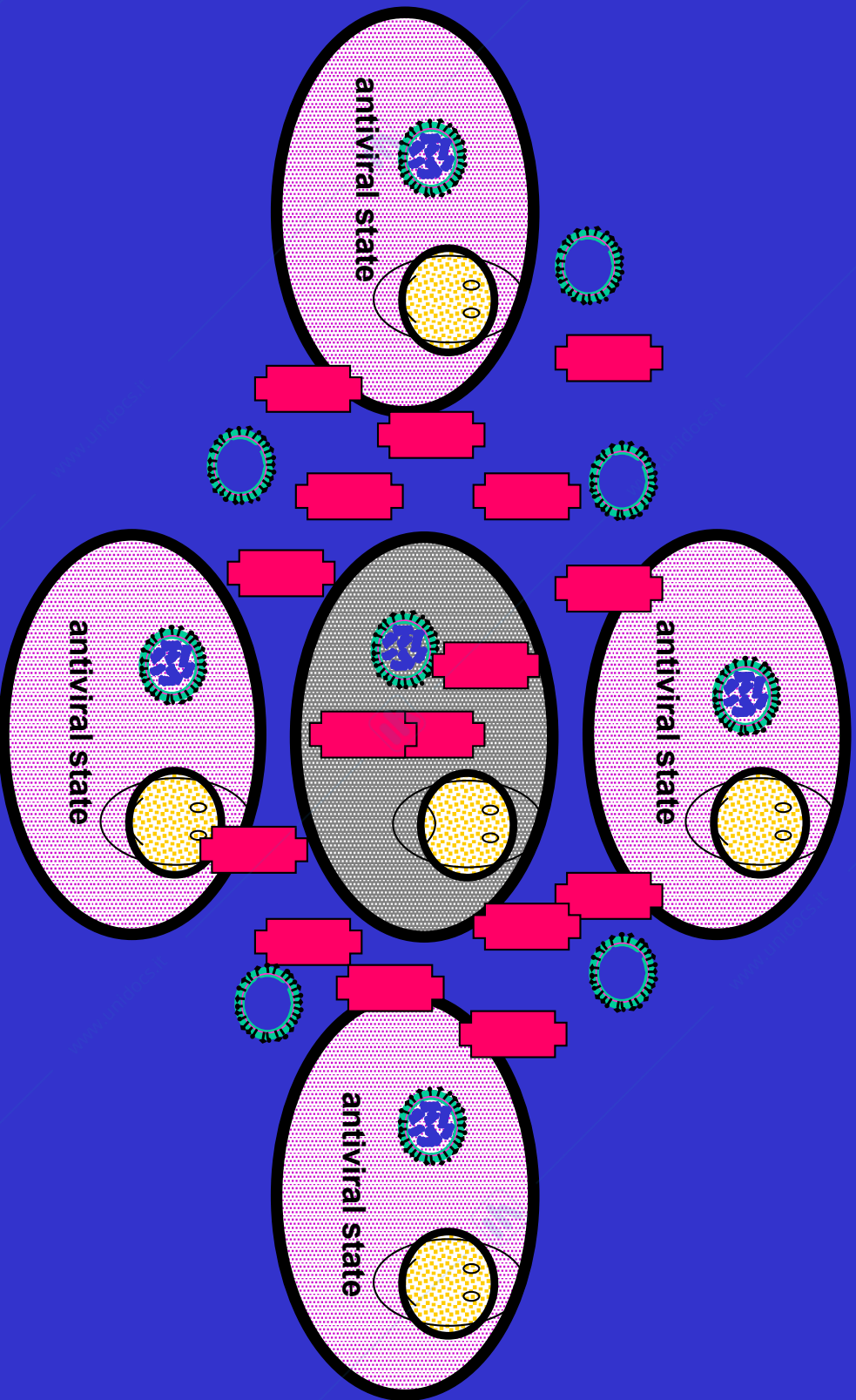
INTERFERON



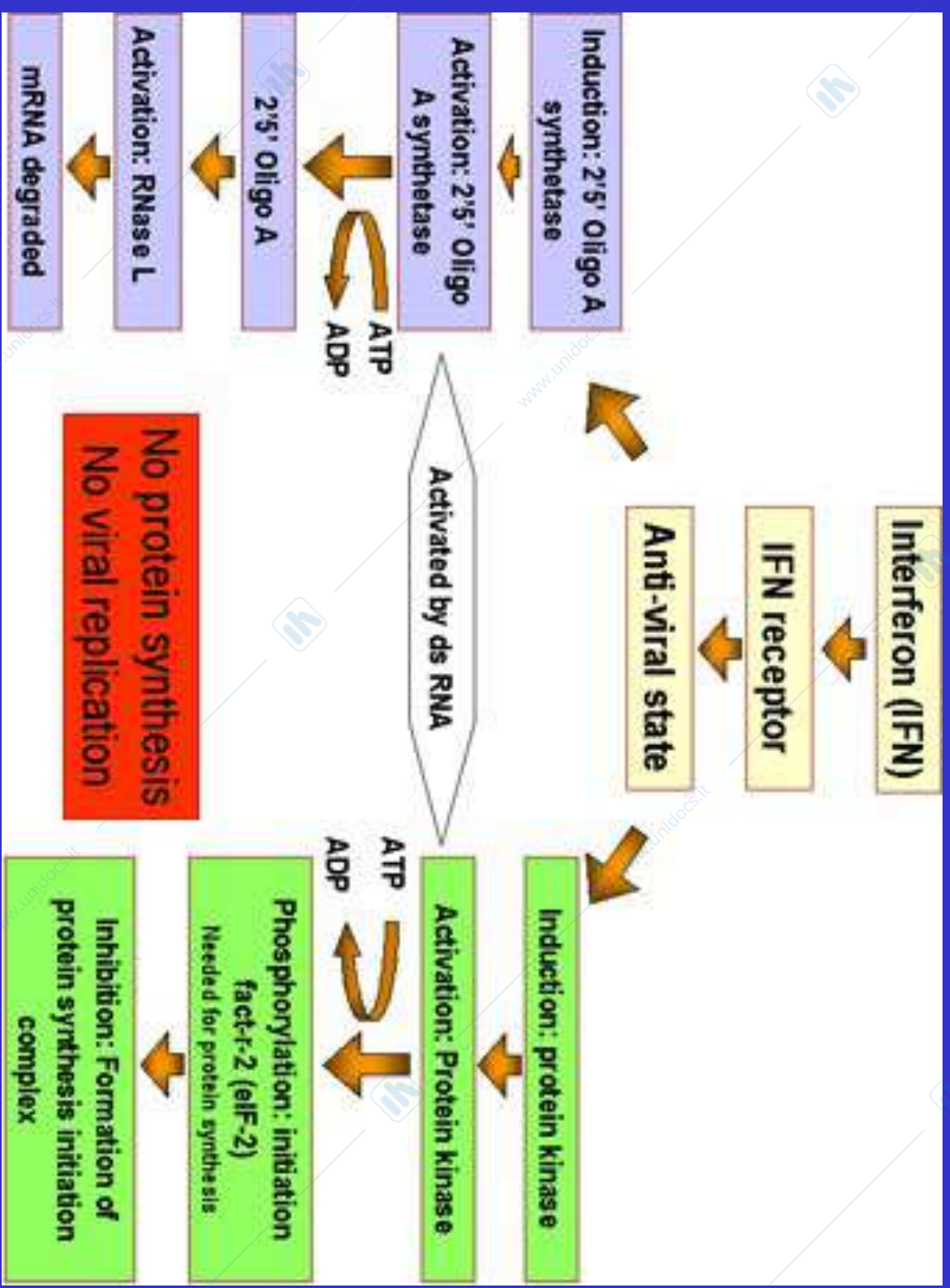
INTERFERON



INTERFERON



Meccanismo d'azione dell'Interferone



ribonucleasi

IFN-deficient patient.

•Before



•IFN therapy



IL VIRUS E' IN GRADO, TUTTAVIA, DI

ELUDERE LE DIFESE DELL'OSPITE

TRAMITE:

- ✓ **ESCAPE MUTANTS** favoriti dalla estesa variabilità genetica tipica di molti virus ad RNA (*HIV, HCV*);
- ✓ **RIDUZIONE DEI LIVELLI DI HLA DI CLASSE I** sulla superficie cellulare (*HSV I*);
- ✓ **INIBIZIONE DEL PROCESSING ANIGENICO** (*ADENOVIRUS*);
- ✓ **INIBIZIONE DELLE CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE**, AD ES. IL-2;
- ✓ **PROMOSSA SINTESI DI CITOCHINE CHE STIMOLANO LA RISPOSTA TH2** (*EBV*);
- ✓ **SINTESI DI UN OMOLOGO DELLA IL-10**, che stimola le risposte TH2.

Come i virus evadono dalle risposte dell'ospite???

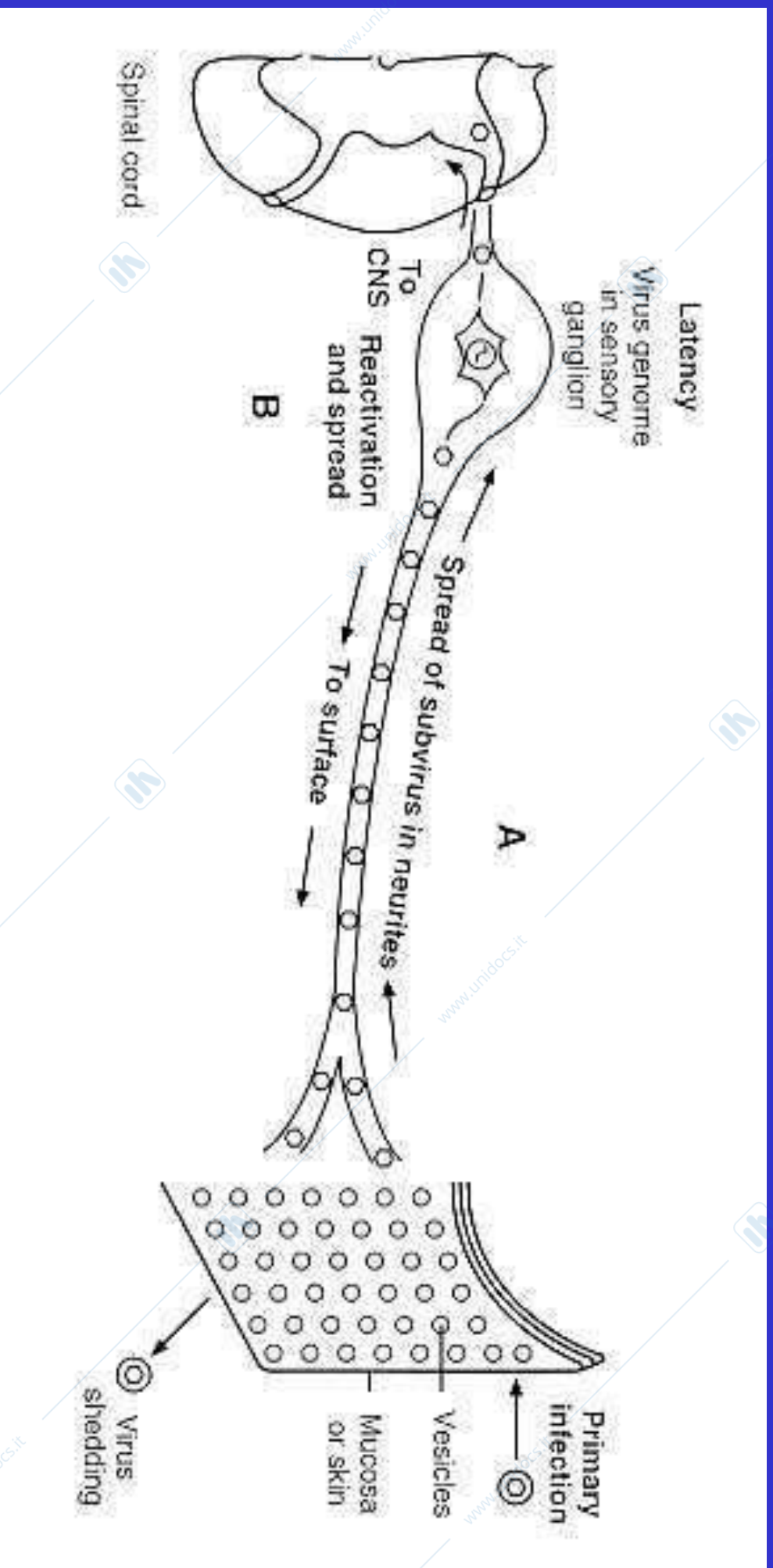
Alcuni virus possono instaurare infezioni in siti non accessibili da parte delle cellule del sistema immune

Localizzazione in siti privilegiati (es. HSV, VZV in CNS)

Modulazione dell'espressione del genoma virale

- Proteine virali associate a latenza (es. EBV EBNA5)
- Trascritti virali associati a latenza (es. HSV LATs)

Infezione primaria e riattivazione da HSV / VZV



(A) Latenza del virus dell'herpes simplex o del virus della varicella-zoster nei gangli sensoriali dopo l'infezione primaria. (B) Riattivazione del virus nei gangli e diffusione alla mucosa o all'epidermide attraverso la via nervosa, con produzione di lesioni superficiali ovvero diffusione retrograda al sistema nervoso centrale con conseguente encefalite (rara).

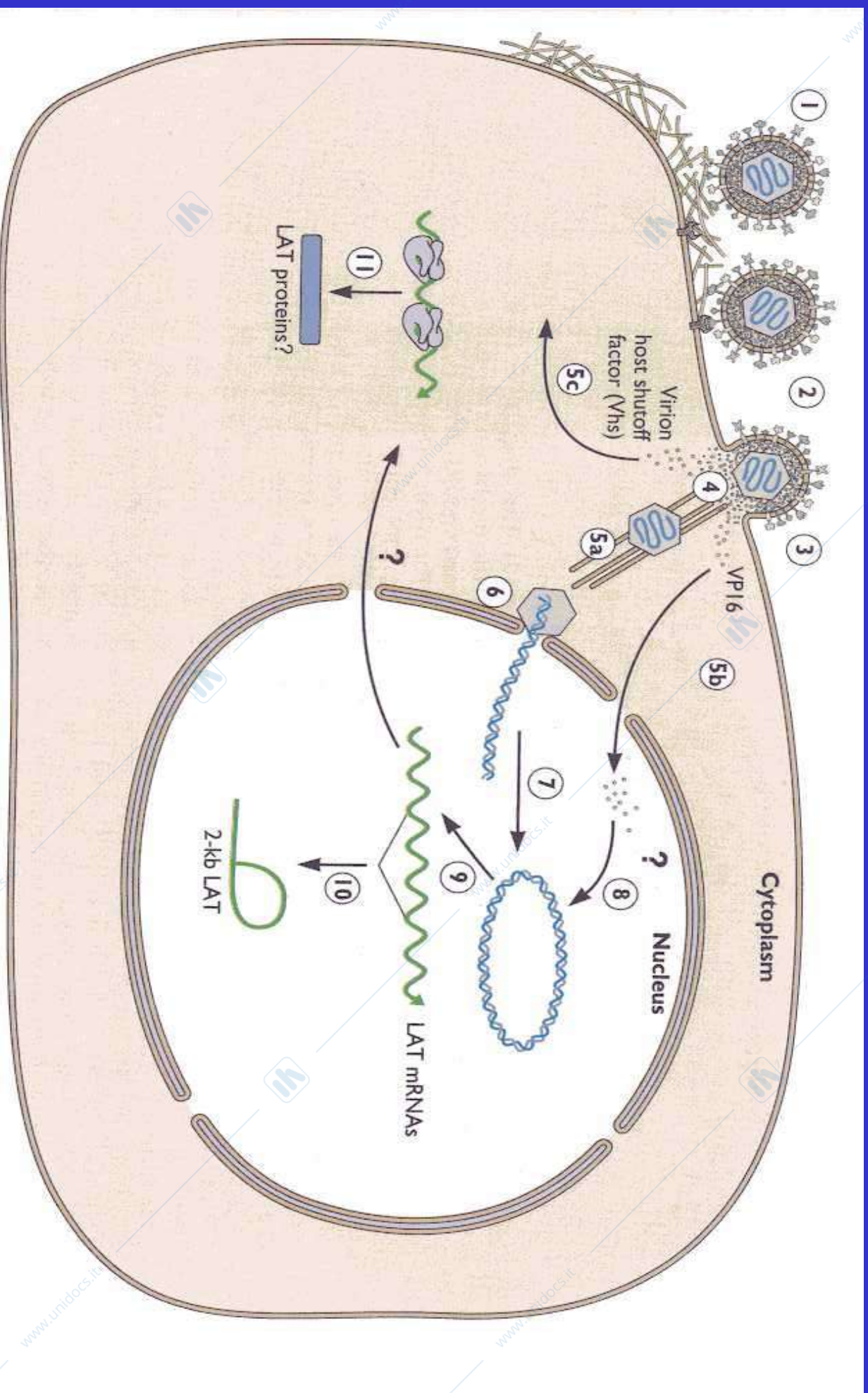


Figure 19 Herpes simplex virus latent infection.

LAT= latency associated transcript

Meccanismo di escape dalla risposta immune

Molti virus infettano le cellule del sistema immunitario durante l'infezione acuta, alcuni persistono

Virus	Sede latenza	Genoma	Patologia
HIV	Cellule T CD4+ macrofagi	integrato	AIDS
EBV	Cellule B	episomico	Linfomi, pat. EBV in HIV+
CMV	Linfomonociti e altre cellule	episomico	Infez. cong. Disordini CNS, retinite, polmonite
HHV-6	Cellule T CD4+	episomico	VI malattia, disordini linfoproliferativi
HTLV	Cellule T	integrato	Leucemie, disordini neurol.

Infezioni persistenti – altri distretti

Virus	Sede latenza	Genoma	Meccanismo	Patologia
HBV	Epatociti, cell. pancreatiche	Integrato / episomico	Restrizione espressione	Epatite cronica, cirrosi, HCC
HCV	Epatociti	?	?	Epatite cronica, cirrosi, HCC
Parvo	Preursori eritroidi	episomico	?	Anemia emolitica cronica, artrite
HPV	Cellule epiteliali germinali	Episomico Integrato	Restrizione espressione mediante fattori cellulari (p53) e virali (E1)	Verruche, papillomi, carcinomi

Come i virus evadono dalle risposte dell'ospite???

Possano mutare

Es: HIV and influenza A

Variabilità antigenica

Es: HA ed NA del virus influenzale che causano epidemie e pandemie

Quasi-specie in HIV ed HCV: il virus all'interno dell'ospite subisce mutazioni genomiche nel tempo che determinano la comparsa di nuove varianti genotipiche nello stesso ospite

Come i virus evadono dalle risposte dell'ospite???

Possono inibire direttamente o indirettamente le difese dell'ospite

“Downregulation” di molecole di superficie necessarie per il riconoscimento da parte delle cellule T

**MHC I: Adeno, CMV, HSV, HIV;
MHC II: CMV, HIV, Measles;
ICAM 1: EBV**

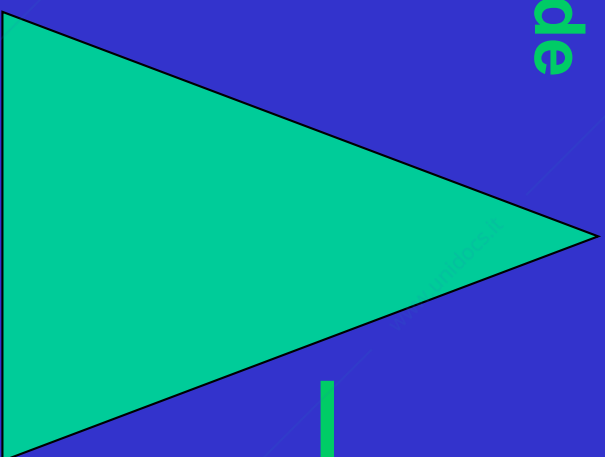
Come i virus evadono dalle risposte dell'ospite??

Possano interferire con le citochine dell'ospite

- Inibiscono citochine pro-infiammatorie , es. IL-2
- secernono citochine che favoriscono T helper 2 (Th2), es. EBV esprime un omologo di IL-10 , che stimola risposte Th2

.....e alla fine?

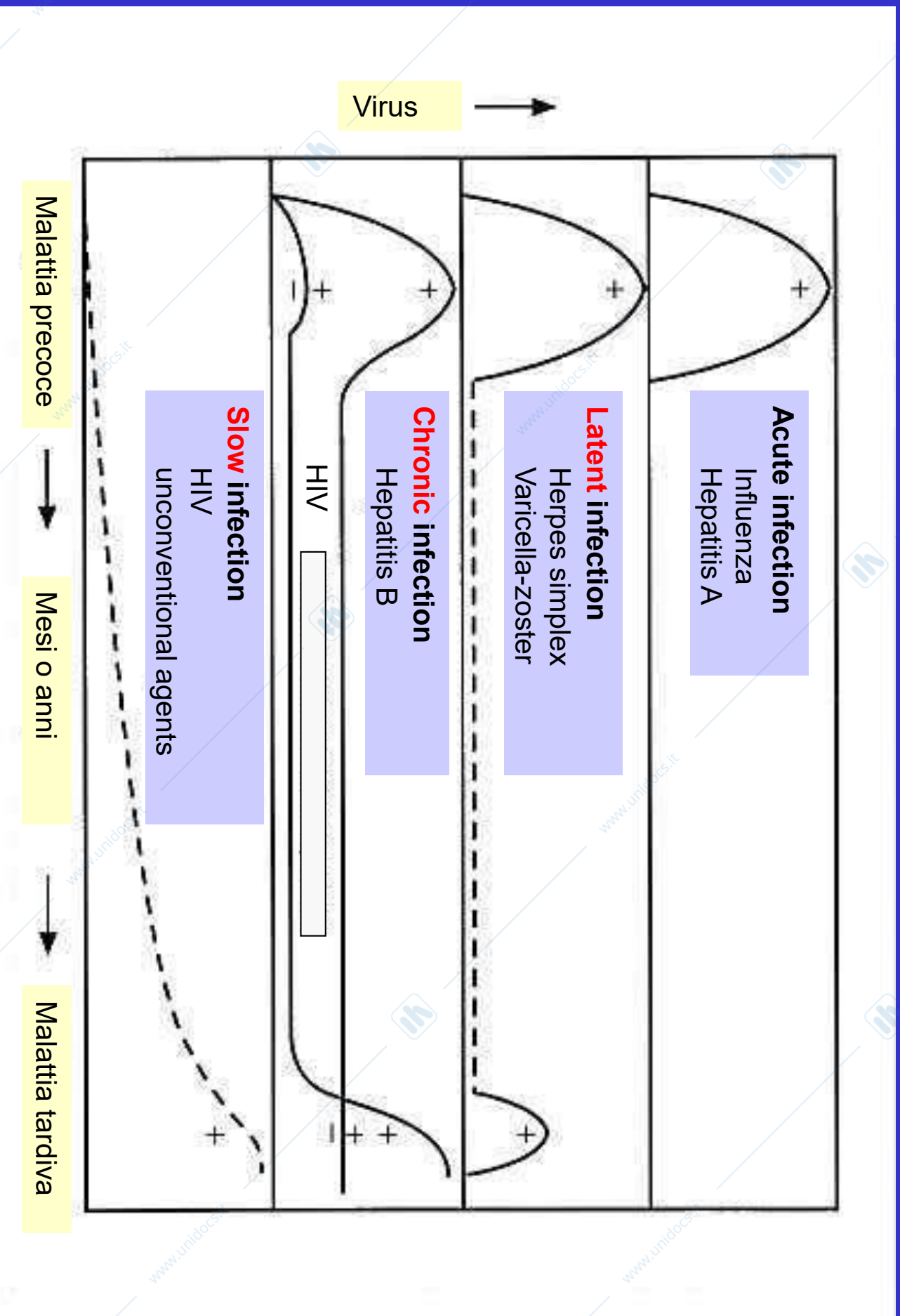
Piramide



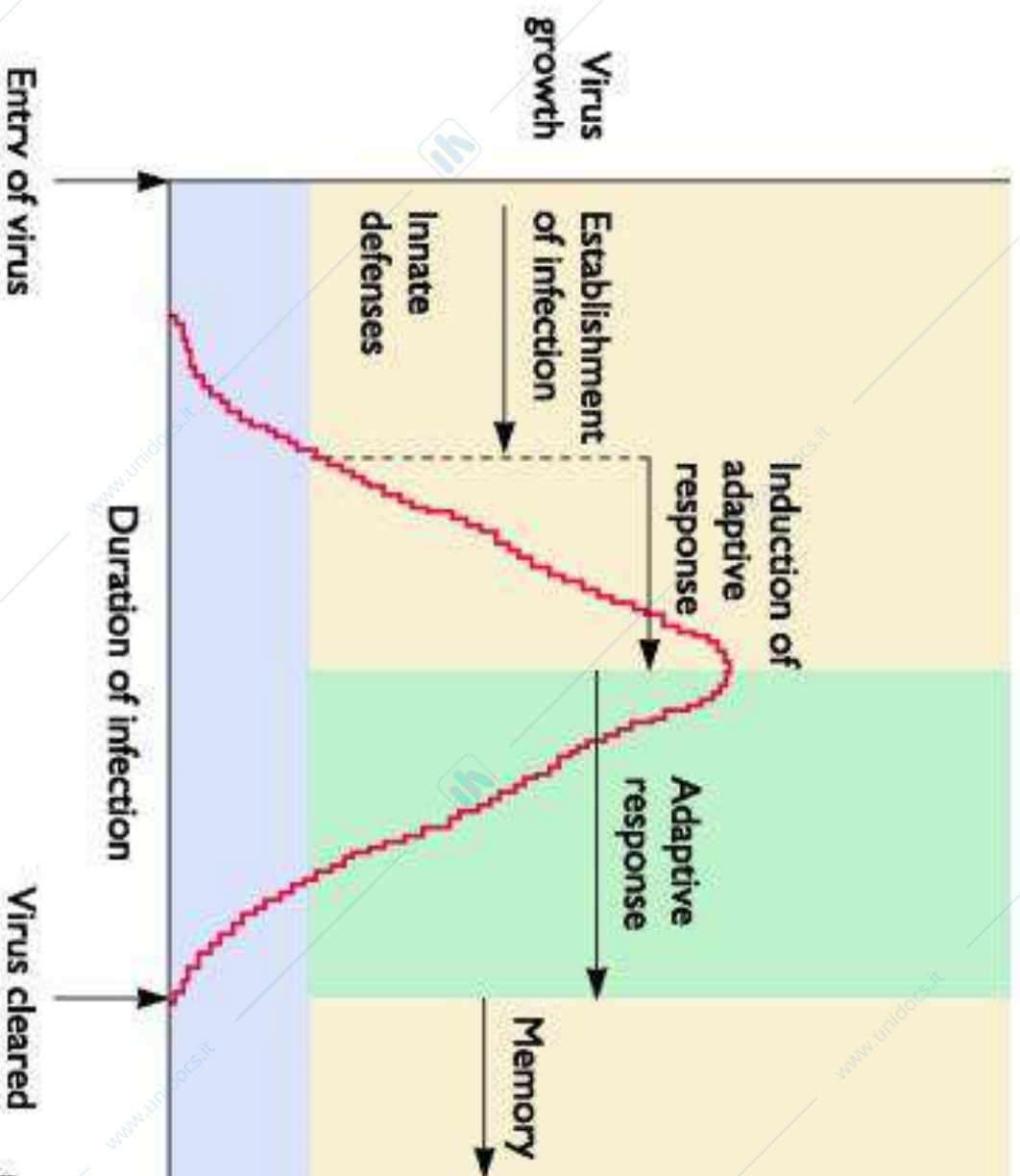
morte dell'ospite
malattia grave
malattia non grave

infezioni paucisintomatiche
infezioni asintomatiche
contaminazione

Tipologie di infezione virale



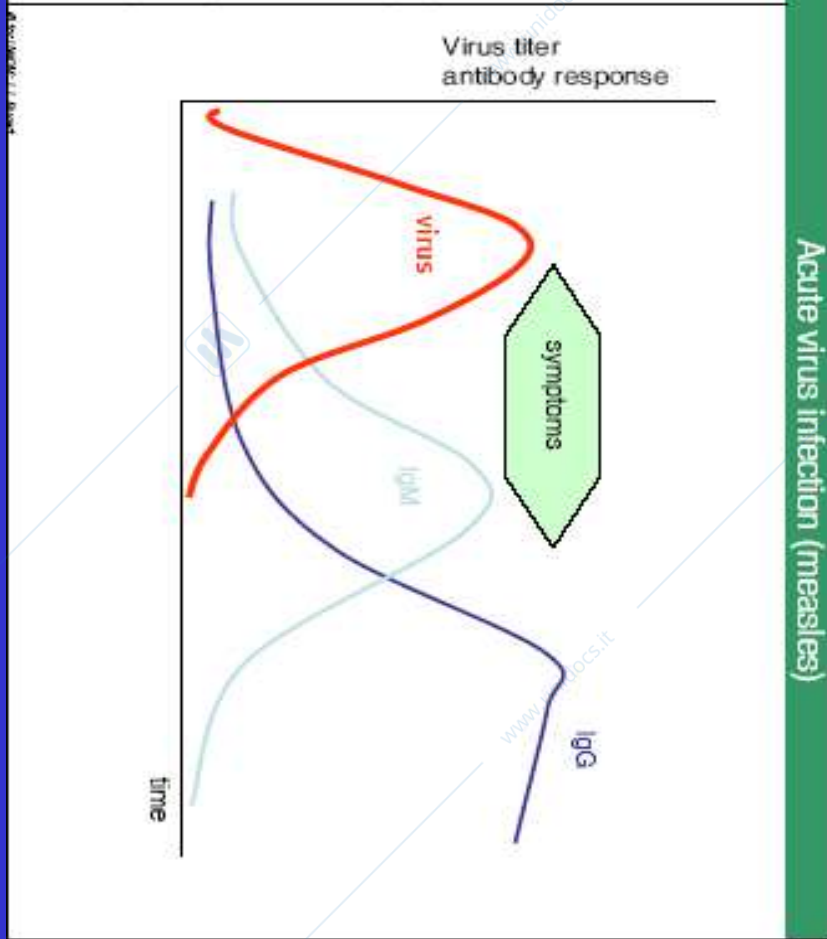
The course of a typical acute infection



Threshold level
of virus required
to activate adaptive
immune response

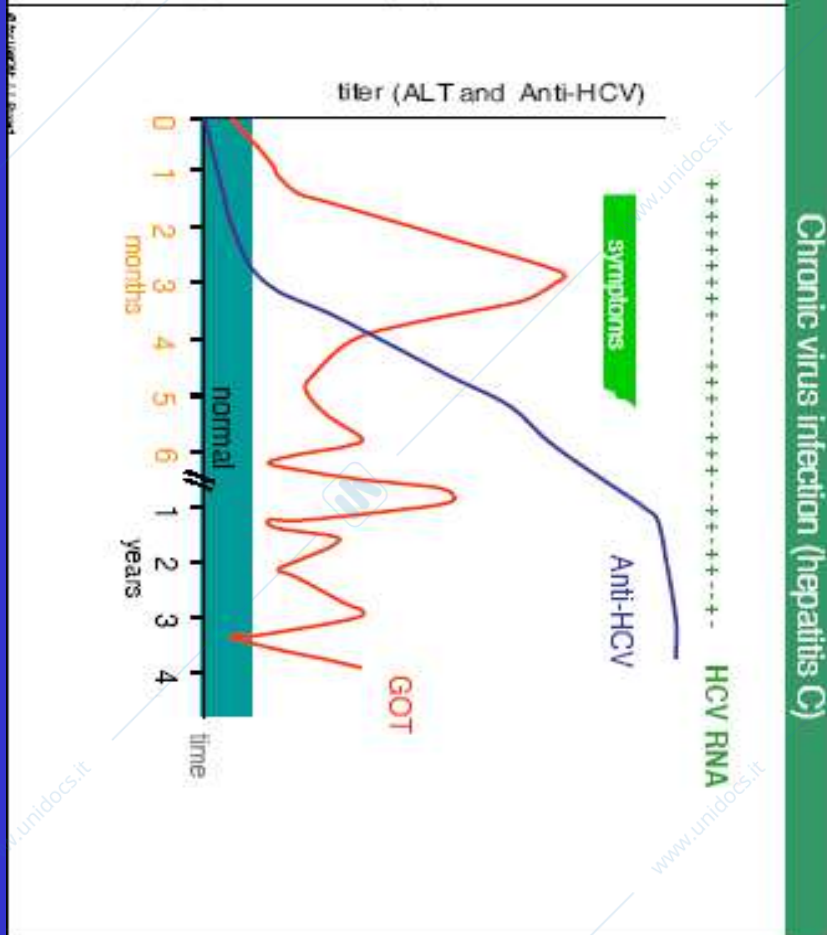
From Flint et al Principles of Virology

Viral pathogenesis: from symptoms to molecular events



Acute virus infection (measles)

Viral pathogenesis: from symptoms to molecular events



Chronic virus infection (hepatitis C)

• **INFEZIONE PERSISTENTE:** risulta da un delicato equilibrio tra virus e organismo ospite. Dopo la fase acuta, il virus adatta il suo ciclo replicativo e la sua patogenicità così da evitare la morte dell'ospite e persistere per tutta la sua vita in forma di:

- **INFEZIONE CRONICA**
- **INFEZIONE LATENTE**
- **INFEZIONI LENTE**

INFEZIONI CRONICHE:

Sono caratterizzate dalla continua presenza del virus che continua a essere prodotto, anche dopo la fase acuta, in genere a livelli molto più bassi e per lungo tempo, **compatibili con la sopravvivenza dell'ospite.**

Es classici: virus dell'epatite B e C, i retrovirus umani HIV e HTLV e i papovavirus.

I danni per l'ospite sono tipicamente da accumulo (immunodeplezione, autoimmunità, infiammazione cronica, oncogenesi)

INFEZIONE LATENTE:

Il virus è rilevabile durante la fase acuta di replicazione, poi non è più rilevabile come virus infettante negli intervalli tra successive riattivazioni.

Il virus rimane sotto forma di **acido nucleico integrato nel genoma cellulare** o presente nel nucleo in **forma episomica**.

In alcune situazioni il virus può “risvegliarsi” e iniziare un nuovo ciclo di replicazione produttiva (**recidiva**), che si conclude a sua volta con una fase di latenza.

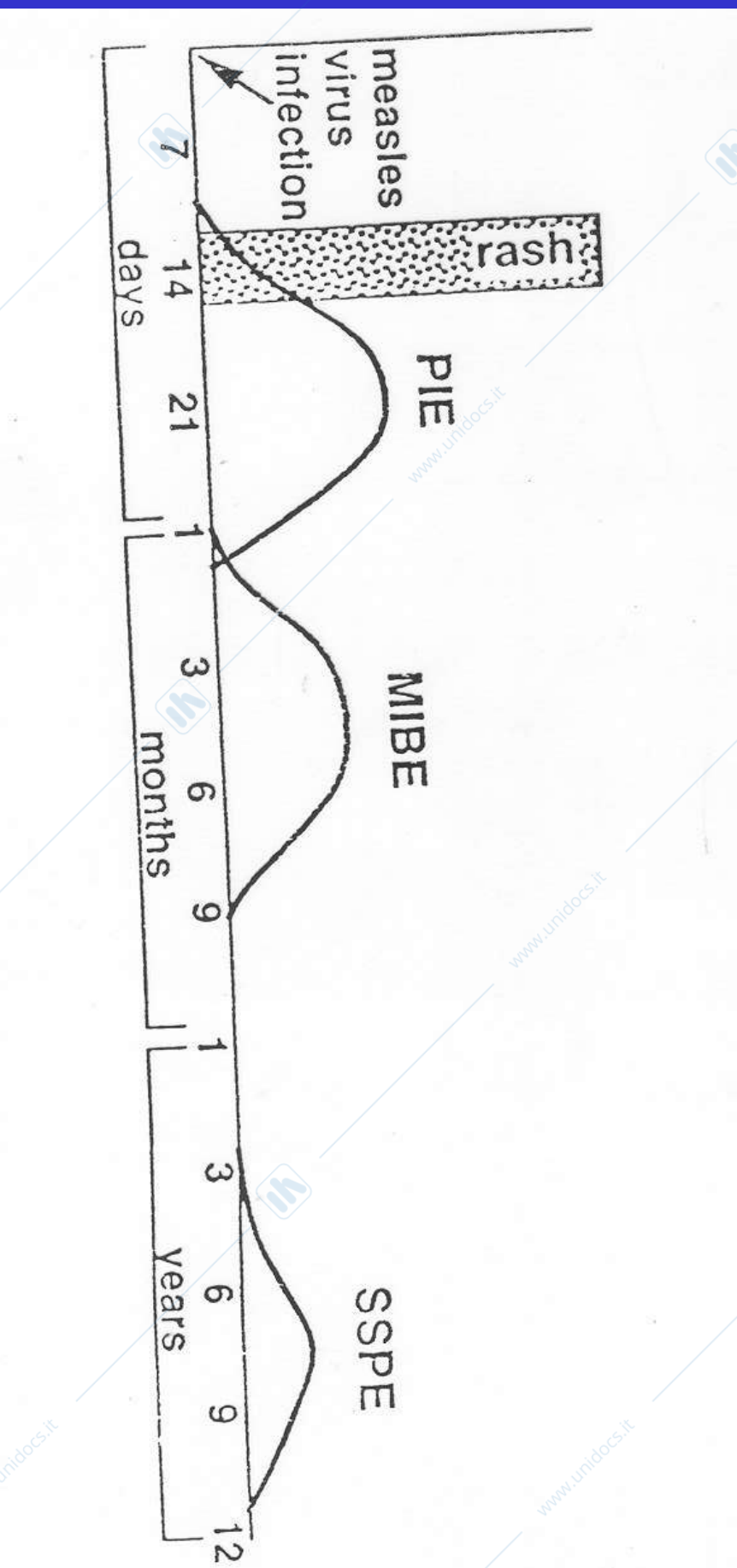
Es: **herpes virus, papovavirus, virus dell’epatite B, e altri virus con intermedi di replicazione a DNA.**

Alcune forme di latenza sono sospettate per i virus a RNA:
Virus del morbillo e alcuni enterovirus.

Tab. 42.5. Malattie da virus lenti e non tradizionali.

Malattia	Agente	Ospiti	Periodo di incubazione	Natura della malattia
Malattie umane				
Kuru	Prione	Umani, scimpanzè, scimmie	Da mesi a anni	Encelalopatia spongiforme
Malattia di Creutzfeldt-Jakob	Prione	Umani, scimpanzè, scimmie	Da mesi a anni	Encelalopatia spongiforme
Panencefalite sclerosante sub-acute	Variante di virus del morbillo	Umani	Da 2 a 20 anni	Panencefalite cronica sclerosante
Leucoencefalopatia multifocale progressiva	Papovavirus	Umani	Anni	Demielizzazione del sistema nervoso centrale
Malattie animali				
Scrapie	Prione	Pecore, capre, topi	Da mesi a anni	Encelalopatia spongiforme
Encelalopatia trasmissibile del visone	Prione	Visone, altri animali	Mesi	Encelalopatia spongiforme
Encelalopatia spongiforme bovina	Prione	Bovini	Da mesi a anni	Encelalopatia spongiforme
Visna	Retrovirus	Pecore	Da mesi a anni	Demielizzazione del sistema nervoso centrale

Infezione da virus del morbillo



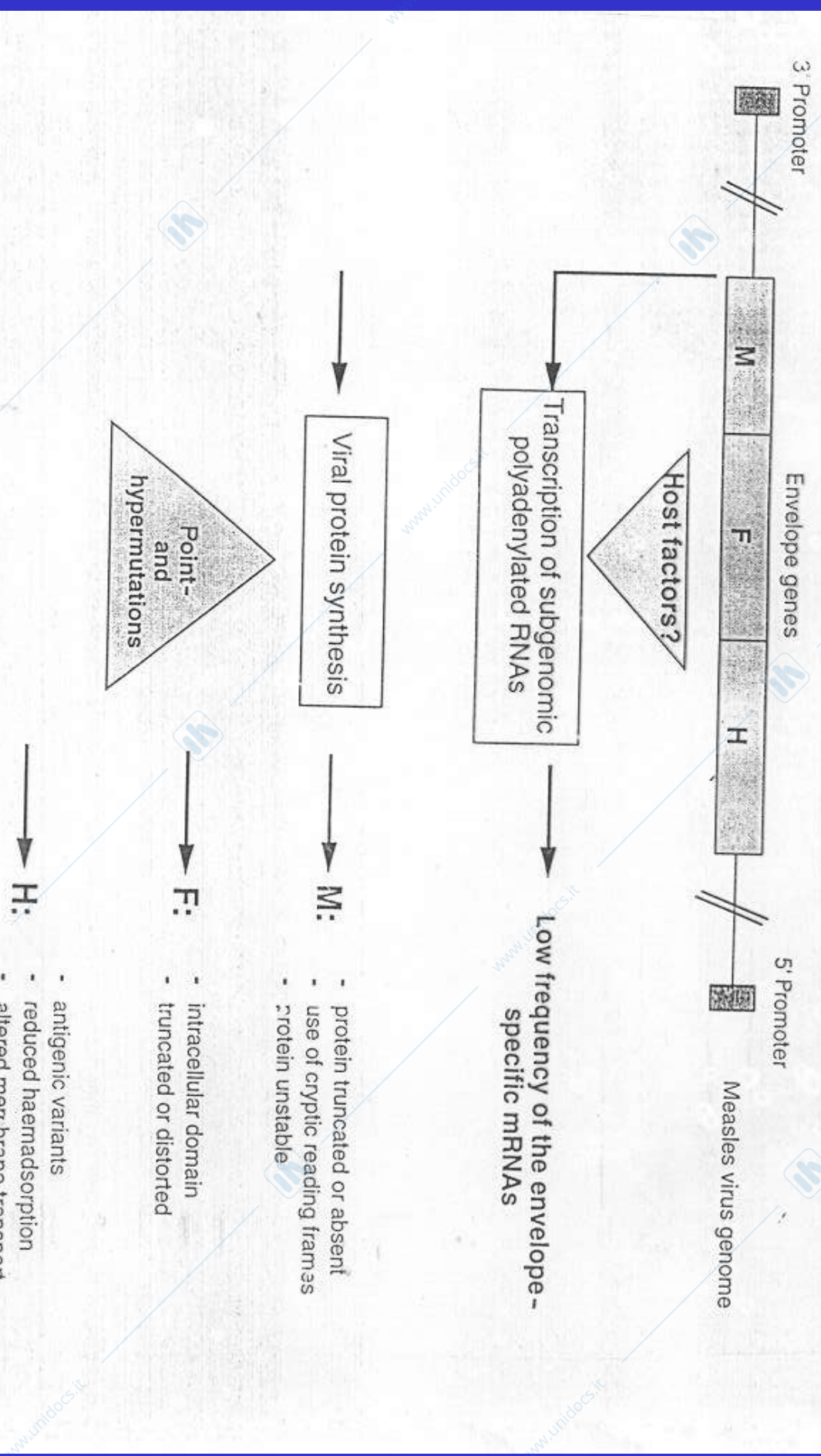


Figure 11.7 Restrictions of MV gene expression found in SSPE brain tissue. MV mRNAs encoding the viral envelope proteins are expressed at low frequency (most probably due to host cell control mechanisms) and, in addition, harbour mutations that prevent the synthesis of functional translation products

INFEZIONI LENTE:

Sono caratterizzate da un lunghissimo periodo di incubazione che può durare alcuni anni, seguito da una malattia progressiva: non si ha mai una fase acuta.

Vi appartengono le infezioni da “agenti non convenzionali” detti **prioni**: con progressiva degenerazione spongiforme del SNC, con esito letale.

Vaccini Virali

Immunizzazione: il metodo più frequentemente applicato per prevenire malattie infettive.

Vaccinare: amministrare, come dose singola o multipla, un antigene non patogeno (virus intatto o virione subunità) ad un animale o ad essere umano cosicché il sistema immunitario dell'individuo risponda producendo anticorpi (immunità umorale) e, in alcuni casi, inducendo risposta cellulare mediata diretta contro uno, alcuni o tutti gli antigeni virali.

Eradicazione di smallpox

Eradicazione di polio in Europe: 2002

Vaccini

- Stabiliscono una immunità di memoria senza che l'ospite sia venuto a contatto con l'agente infettivo
- Successi del passato
- Possibilità per il Futuro

Smallpox

Vaccination

- Jenner 1796 : Cowpox/Swinepox
- 1800' s Compulsory childhood vaccination
- 1930' s Last natural UK case
- 1940' s last natural US case
- 1958 WHO program
- October 1977: Last case (Somalia)



Caratteristiche di un vaccino

INNOCUITA'

EFFICACIA

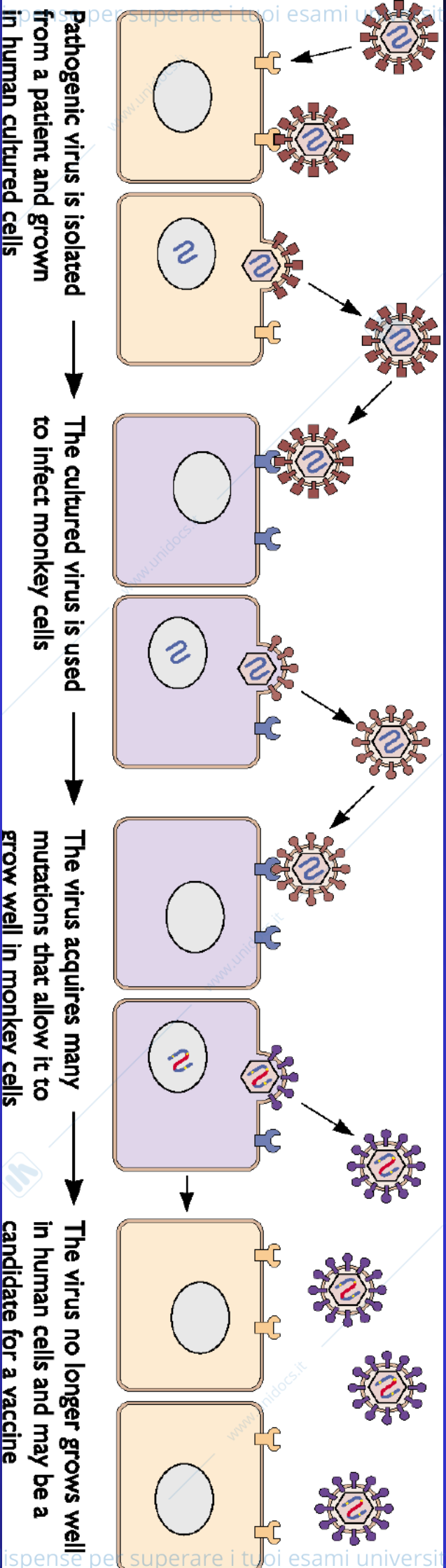
STERILITA'

Un vaccino per essere tale **DEVE** prevenire l'infezione e **NON** la malattia (caso particolare rabbia)

Viral vaccines licensed in the US

Disease or virus	Type of vaccine	Indications for use	Schedule
Adenovirus	Live, attenuated, oral	Military recruits	One dose
Hepatitis A	Inactivated whole virus	Travelers, other high-risk groups	0, 1, and 6 mo
Hepatitis B	Yeast-produced recombinant surface protein	Universal in children, exposure to blood, sexual promiscuity	0, 1, 6, and 12 mo
Influenza	Inactivated viral subunits	Elderly and other high-risk groups	Two-dose primary series, then one seasonal dose
Japanese encephalitis	Inactivated whole virus	Travelers or inhabitants of high-risk areas in Asia	0, 7, and 30 days
Measles	Live attenuated	Universal vaccination of infants	12 mo; 2nd dose, 6–12 yr
Mumps	Live attenuated	Universal vaccination of infants	Same as measles, given as MMR ⁶
Polio (inactivated)	Inactivated whole viruses of types 1, 2, and 3	Changing: commonly used for immunosuppressed where live vaccine cannot be used	2, 4, and 12 to 18 mo; then 4 to 6 yr
Polio (live)	Live, attenuated, oral mixture of types 1, 2, and 3	Universal vaccination; no longer used in United States	2, 4, and 6–18 mo
Rabies	Inactivated whole virus	Exposure to rabies, actual or prospective	0, 3, 7, 14, and 28 days after exposure
Rubella	Live attenuated	Universal vaccination of infants	Same as measles, given as MMR
Smallpox	Live vaccinia virus	Certain laboratory workers	One dose
Varicella	Live attenuated	Universal vaccination of infants	12–18 mo
Yellow fever	Live attenuated	Travel in areas where infection is common	One dose every 10 yr

Live attenuated virus vaccines



from Flint et al. (2000) *Principles of Virology* ASM Press

Successful live attenuated vaccines are effective for 3 reasons:

- ▶ The attenuated viruses replicate to some extent in the host
- ▶ The attenuated viruses have a reduced capacity to spread from the site of replication
- ▶ The attenuated viruses cause mild or inapparent disease.

Vaccini vivi attenuati

Vantaggi

- Può indurre IgA mucosali oltre a IgG sistemiche se somministrato per la via naturale d'infezione
- Induce risposta immunitaria protettiva. Induce immunità più duratura
- Poche dosi di somministrazione
- Bassi costi di produzione
- Elimina la circolazione del virus selvaggio

Vaccini vivi attenuati

Svantaggi

- Mutazioni; reversione alla virulenza
- Diffusione del virus vaccinale per contatto nei soggetti non vaccinati o sieronegativi
- Problemi di mantenimento della “catena del freddo” per la conservazione del vaccino nei Paesi caldi.
 - Eventuali effetti collaterali in soggetti Immunocompromessi

Possibilità di interferenza

Vaccini inattivati

Vantaggi

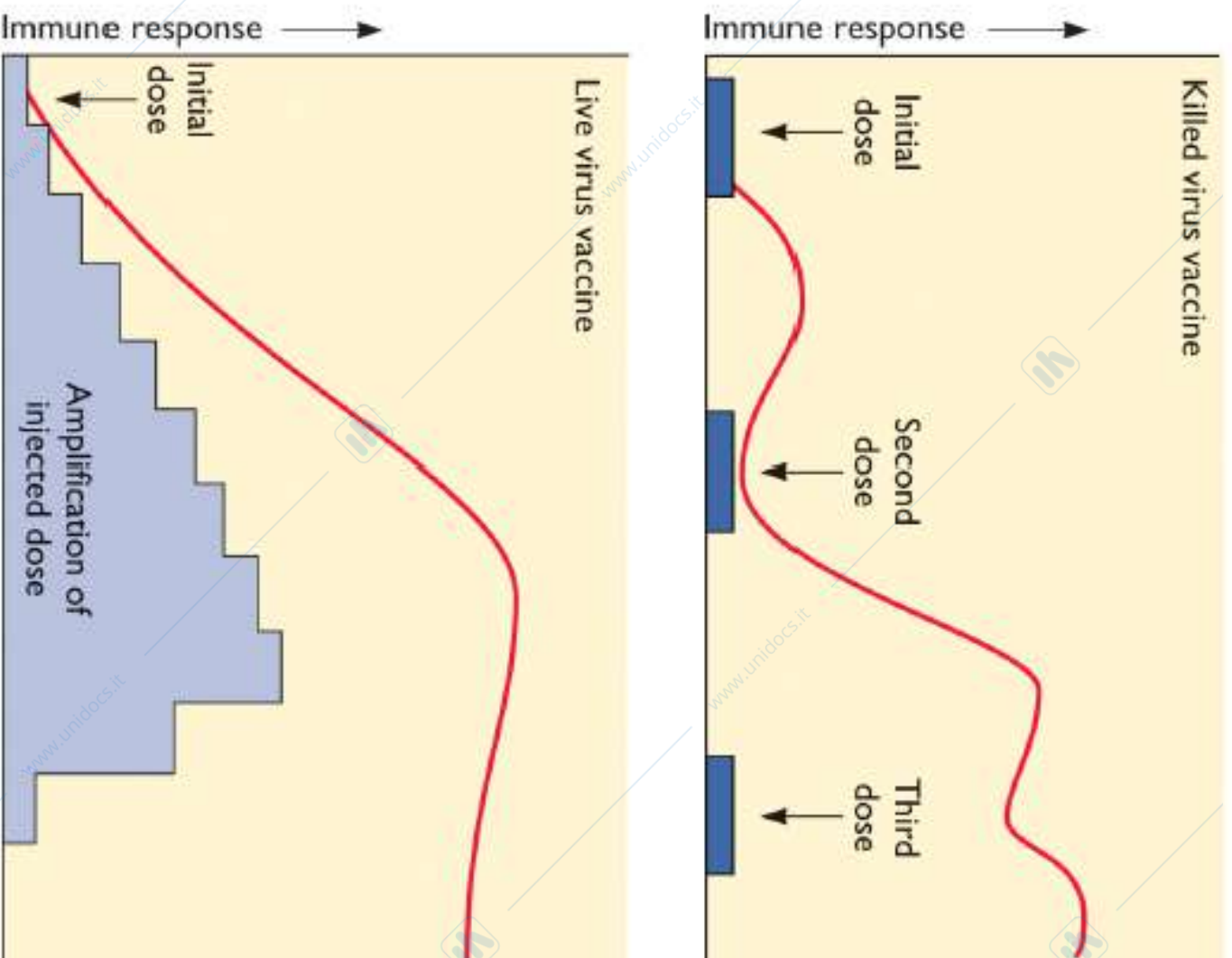
- Induce adeguata risposta umorale
- Non esistono rischi di mutazione o reversione alla virulenza
- Può essere somministrato a soggetti immunocompromessi
- E' più facile la sua conservazione
- Assenza di interferenza

Svantaggi

Alcune volte non inducono una risposta immune adeguata

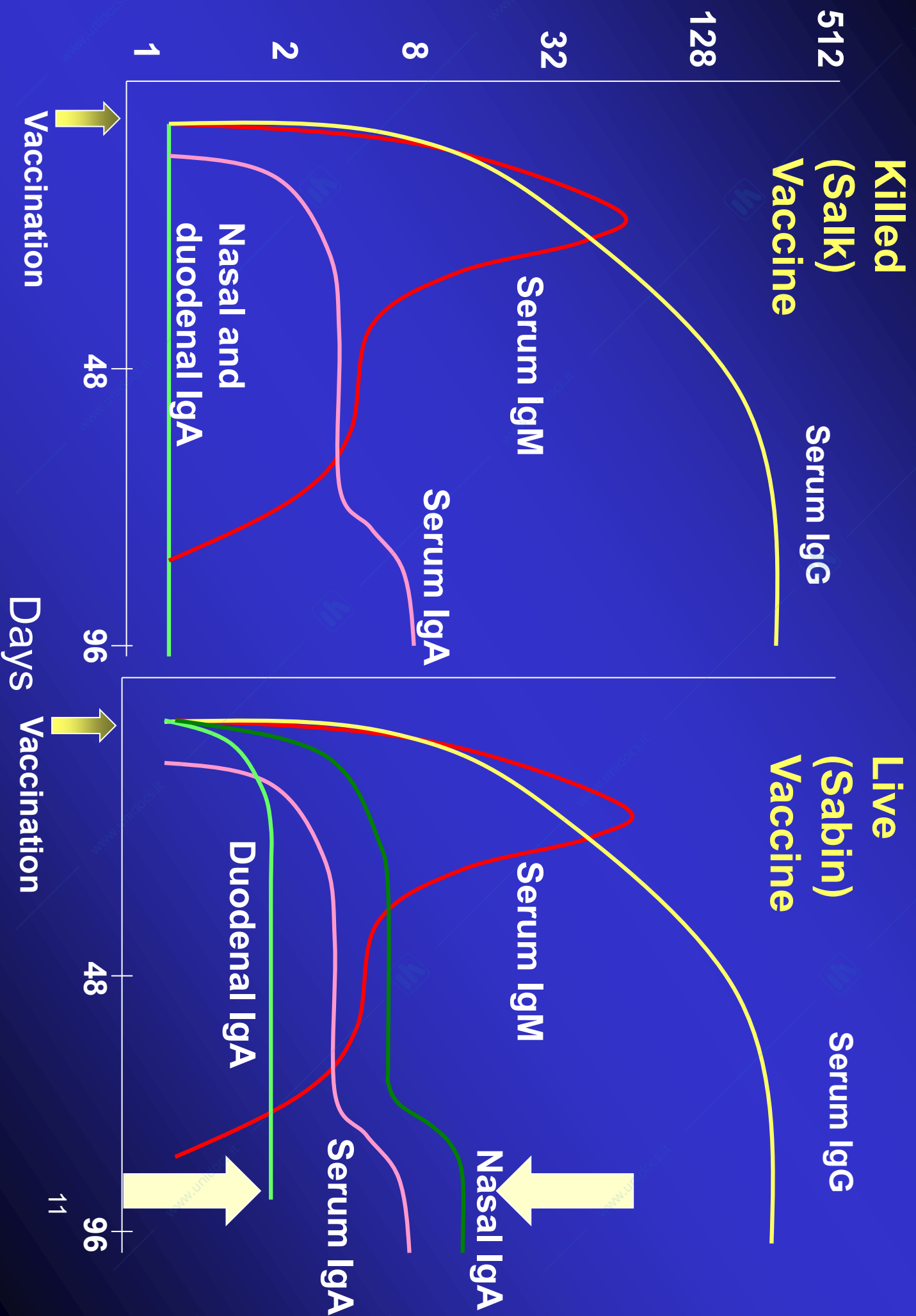
Sono necessari diversi richiami

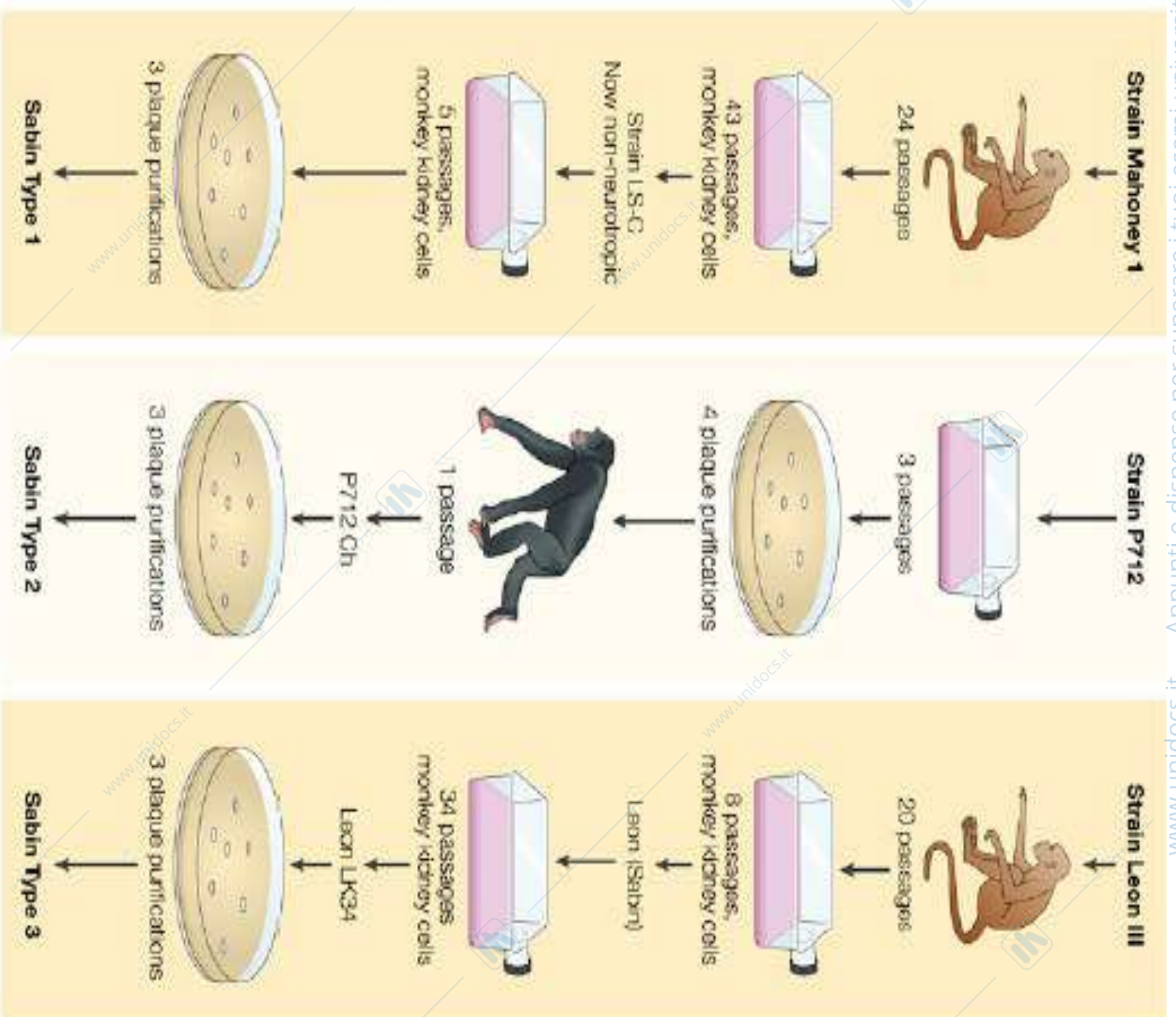
- Non si induce immunità mucosale (IgA)
- Maggiori costi di produzione
- Rischio di non adeguata inattivazione del virus



Comparison of immune responses to live and killed viruses

Reciprocal virus antibody titer

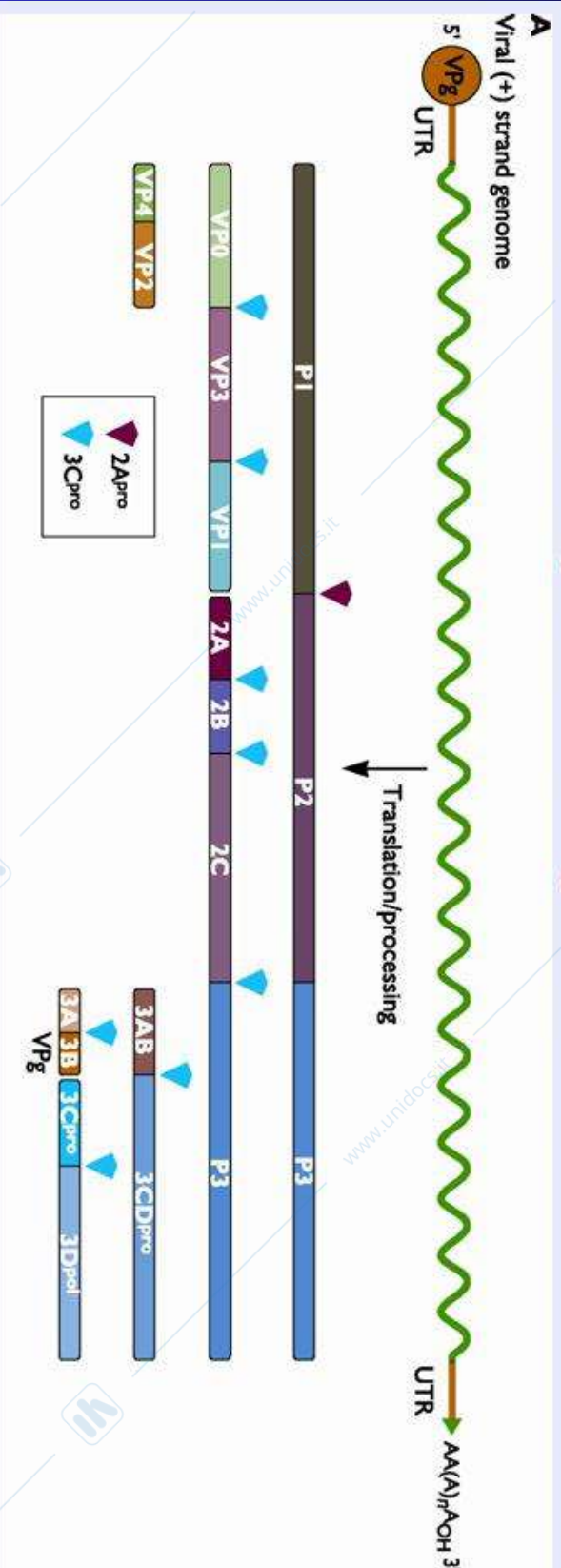




Determinanti di attenuazione

Virus	Attenuation determinant
P1/Sabin	5'-UTR (480) VP4 (4065) VP3 (3225) VP1 (1106) VP1 (1134)
P2/Sabin	5'-UTR (481) VP1 (1143)
P3/Sabin	5'-UTR (472) VP3 (3091)

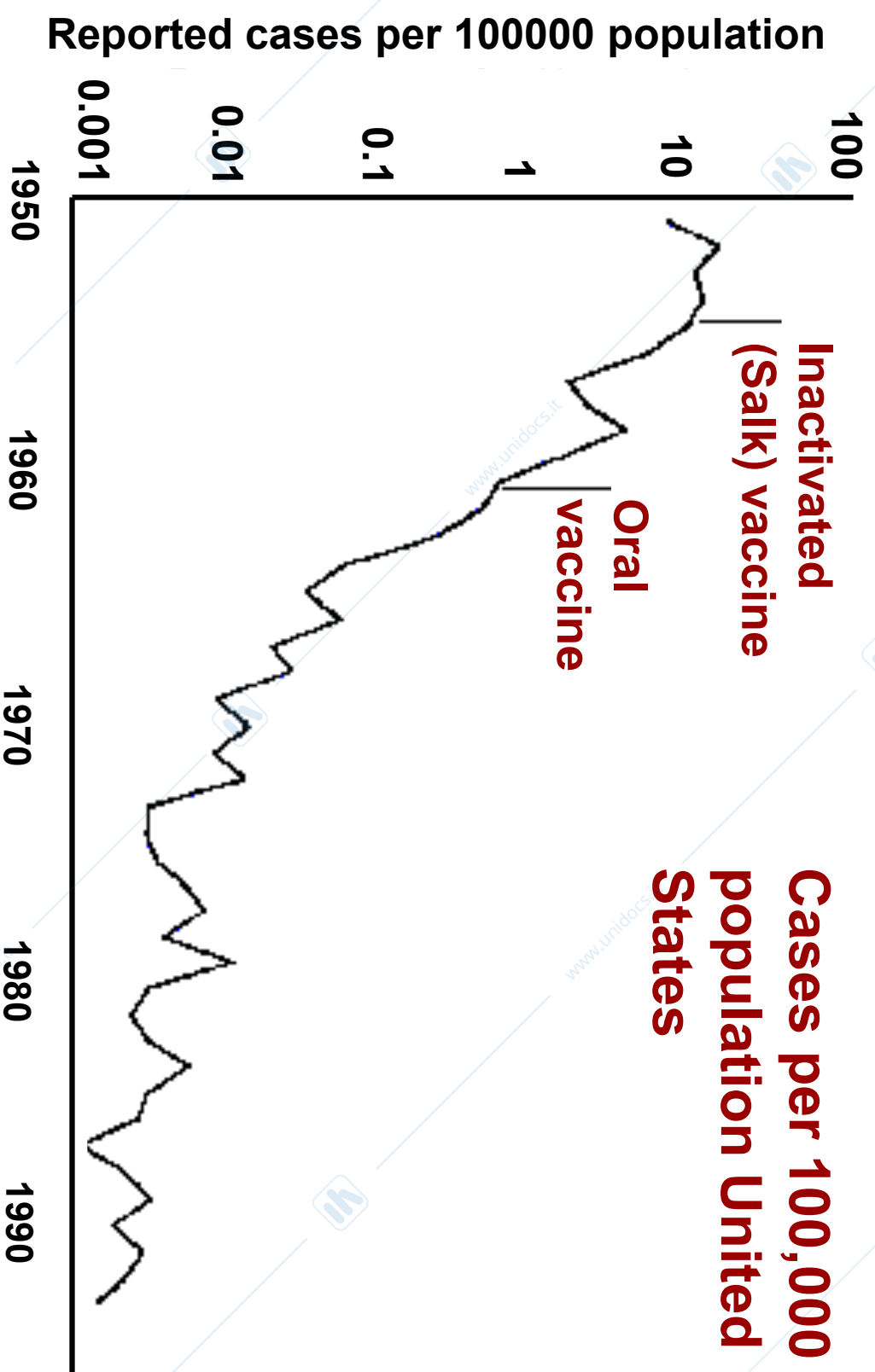
Poliovirus genome organization

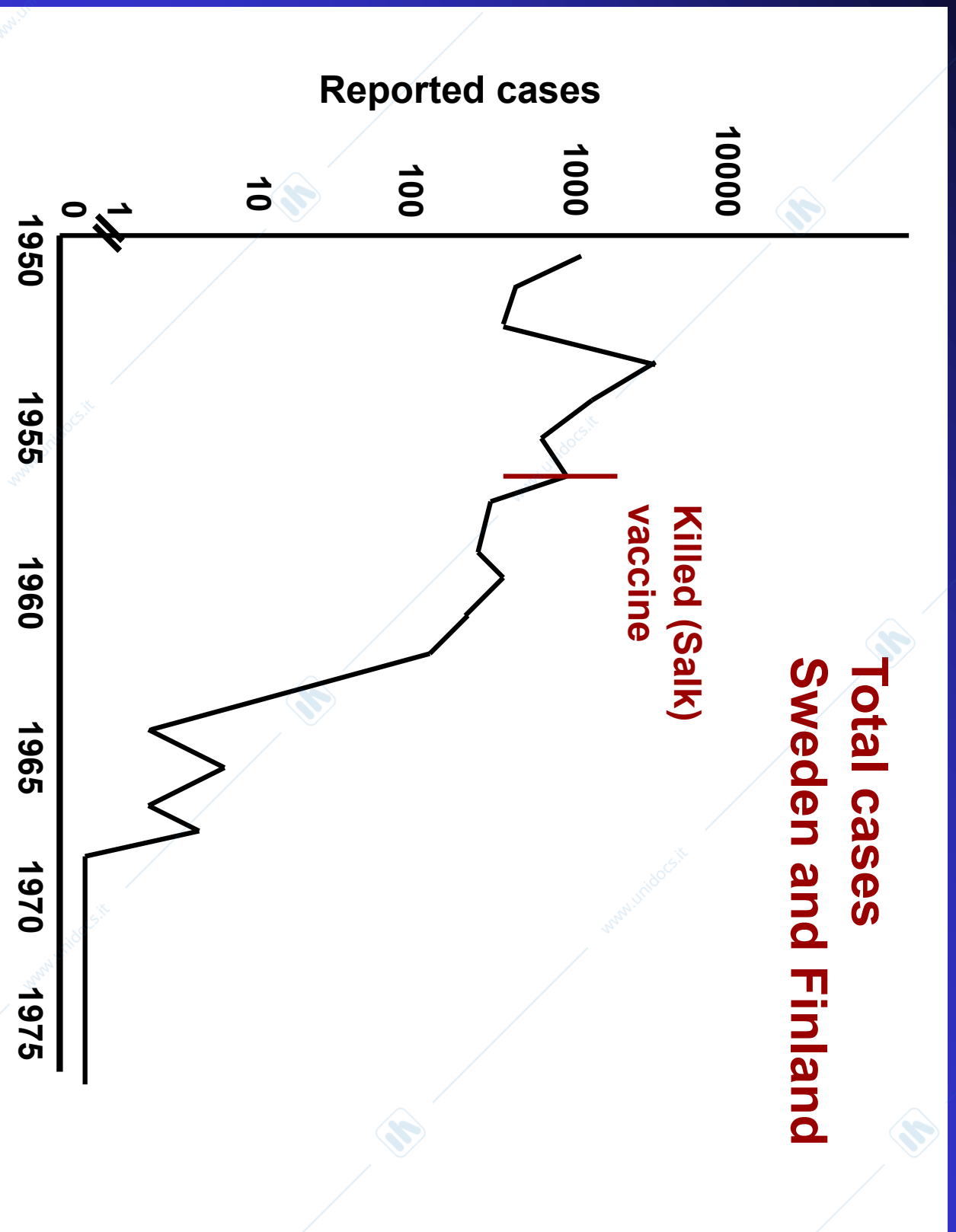


- Poliovirus replication occurs on membranes.
- 2C and 3AB bring the RNA polymerase to membranes.
- 2C anchors viral RNA to membranes during replication.
- 3AB anchors the viral primer, VPg to membranes.
- 3D^{pol} is brought to the replication complex by binding to 3AB

Salk Polio Vaccine

- Virus ucciso con formaldeide
- **No reversione**





Sabin Polio Vaccine

Attenuazione ottenuta tramite passaggi seriali su colture cellulari

Poliovirus cresce su:

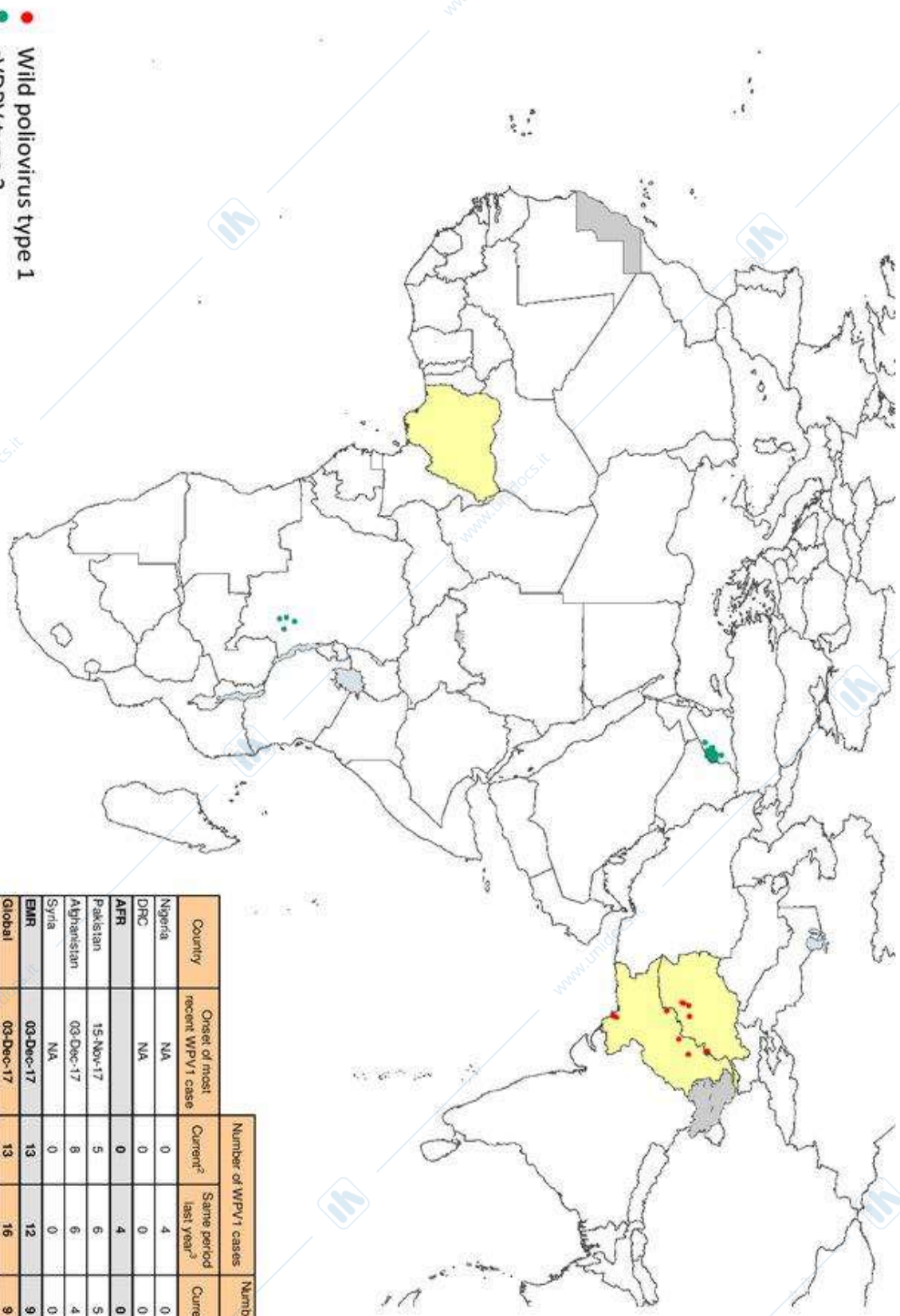
- cellule di rene di scimmia
 - cellule epiteliali
- **NON** cresce in cellule nervose
 - Non causa paralisi
- Induce immunità locale nell'intestino (IgA)

Scheda di vaccinazione antipoliomielitica in Italia, oggi

<u>Age</u>	<u>Vaccine</u>	<u>Minimum Interval</u>
2 months	IPV	---
4 months	IPV	4 wks
6-18 months	IPV	4 wks
4-6 years*	IPV	4 wks

*the fourth dose of IPV may be given as early as 18 weeks of age

Global Wild Poliovirus & cVDPV Cases¹, Previous 6 Months²



- Wild poliovirus type 1
- cVDPV type 2
- Endemic country

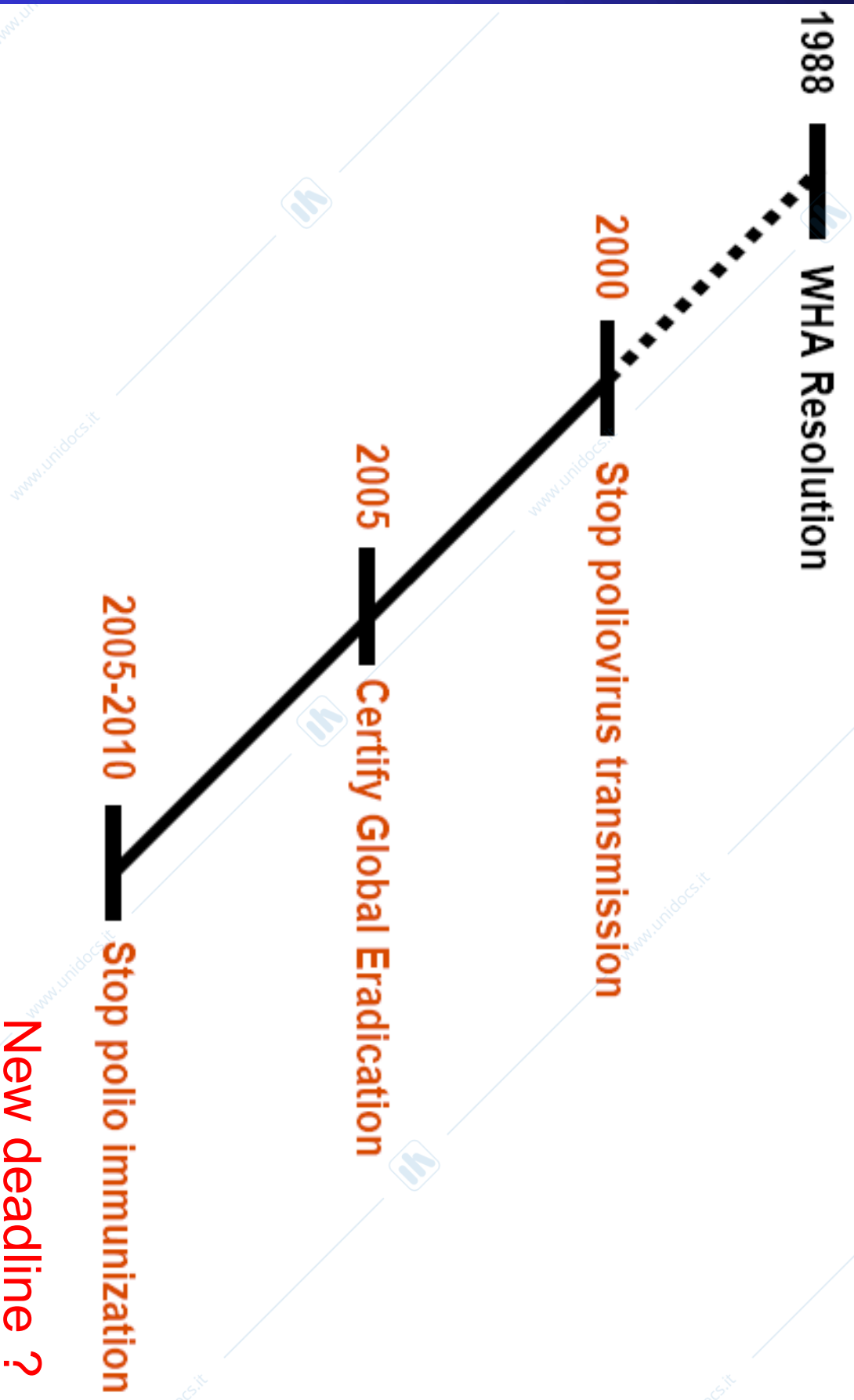
¹Excludes viruses detected from environmental surveillance
²Onset of paralysis 03 July 2017 – 02 January 2018

Country	Onset of most recent WPV/1 case	Number of WPV/1 cases		Number of WPV infected districts		cVDPV current 6 months Number of cases
		Current ²	Same period last year ³	Current ²	Same period last year ³	
Nigeria	NA	0	4	0	3	0
DRC	NA	0	0	0	0	4
AFR		0	4	0	3	4
Pakistan	15-Nov-17	5	6	5	4	0
Afghanistan	03-Dec-17	8	6	4	1	0
Syria	NA	0	0	0	0	39
EMR	03-Dec-17	13	12	9	5	39
Global	03-Dec-17	13	16	9	8	43

²Current rolling 6 months: 3 July 2017 – 2 January 2018
³Same period previous year: data reported from 3 July 2016

Data in WHO HQ as of 03 Jan 2018

WHO timeline for polio eradication



Vaccini a subunità

Vengono prodotti con metodi di estrazione e purificazione oppure tramite tecniche di DNA ricombinante (es. HA, NA influenza)

Molti non riescono ad indurre immunità protettiva

Methods for enhancing immunogenicity

Adjuvants

- When mixed with killed viruses or subunit vaccines, produce a more robust acquired immune response that requires less antigen.
- Adjuvants work in at least 3 ways:
 - by presentation of antigen as particles
 - by localisation of antigen to the site of inoculation
 - by direct stimulation of the immune response

Table 19.4 Vaccine delivery systems and adjuvants

Aluminum salt	Aluminum hydroxide or phosphate (alum). Forms precipitates with soluble antigen, making the complexes more immunogenic; antigen "depot" at site of injection; complement activation. The only adjuvant approved for use in humans.
Emulsions	Freund's complete adjuvant: antigen suspended in water/mineral oil emulsion with killed <i>Mycobacterium tuberculosis</i> bacteria or muramyl di- or tripeptide to stimulate strong T-cell responses. Freund's incomplete adjuvant: antigen suspended in water/mineral oil emulsion.
Microspheres	Antigen encapsulated in polymers of lactic and glycolic acids. They are biodegradable and cause slow release of antigen.
ISCOMs	Immune-stimulating complexes composed of glycosides in an adjuvant called QuilA (a purified saponin from the plant <i>Quillaja saponaria</i>), cholesterol, phospholipids, and antigens. Form spheres 30 to 40 nm in diameter that incorporate antigen.
Liposomes	Antigens encapsulated in lipid vesicles; vesicles provide targeting to antigen-presenting cells on injection. Ligands can be inserted into liposome membranes to increase specificity of vesicle targeting.
Nucleic acid vaccines	Genes encoding antigens expressed from strong promoters are introduced directly into muscle or skin using physical methods or liposomes, leading to intracellular protein expression and presentation of antigen to the immune system.
Engineered viruses	Genes encoding foreign antigens are introduced into a viral genome (the vector) such that the new protein is expressed following infection. Common viral vectors are retroviruses, vaccinia virus, adenovirus, and baculovirus. Many other viruses can also be modified to express foreign proteins.

*Adapted from C. A. Mims et al., *Mims' Pathogenesis of Infectious Disease*, 4th ed. (Academic Press, Orlando, Fla., 1995), with permission.

VACCINI COSTITUITI

DA PROTEINE PURIFICATE
PROTEINE CLONATE
PEPTIDI SINTETICI

VANTAGGI

Controllo di produzione e qualità
non tossico, non allergenico
attuabile anche se il virus non è coltivabile
più sicuro in infezioni da virus virulenti (es. HIV), persistenti (herpesvirus) o carcinogeni (HBV)

SVANTAGGI

Meno immunogeno del virus intero
richiede l'uso concomitante di adiuvanti
richiede diversi "booster"
può fallire nell'indurre una immunità cellulo-mediata

PEPTIDI SINTETICI COME VACCINI POTENZIALI

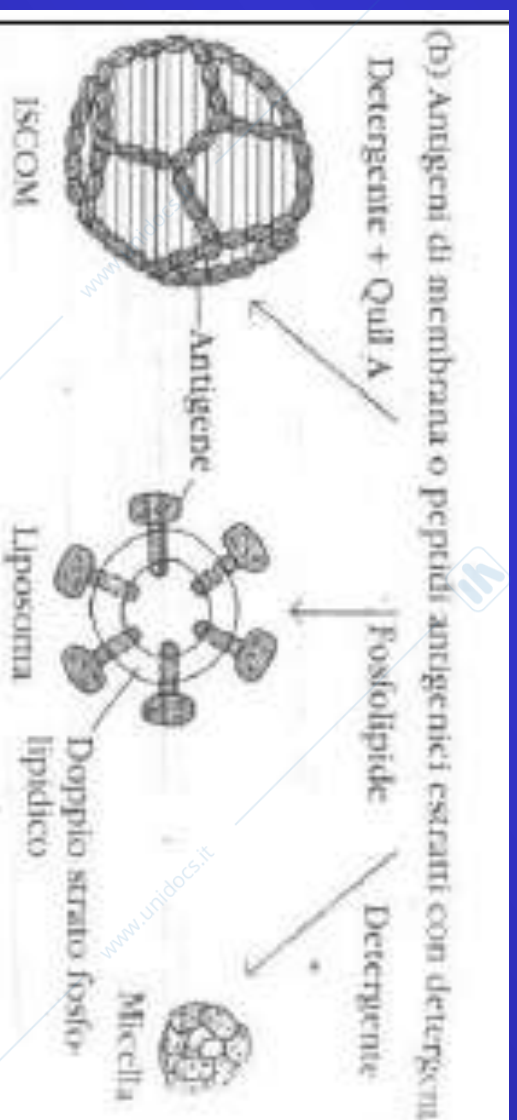
VANTAGGI

- sequenze peptidiche brevi che rappresentano l'epitopo protettivo
- innocuo, non tossico, stabile
- gli epitopi T sono di norma presentati nella forma peptidica
- costrutti artificiali che contengano epitopi B e T, o epitopi di diverse proteine

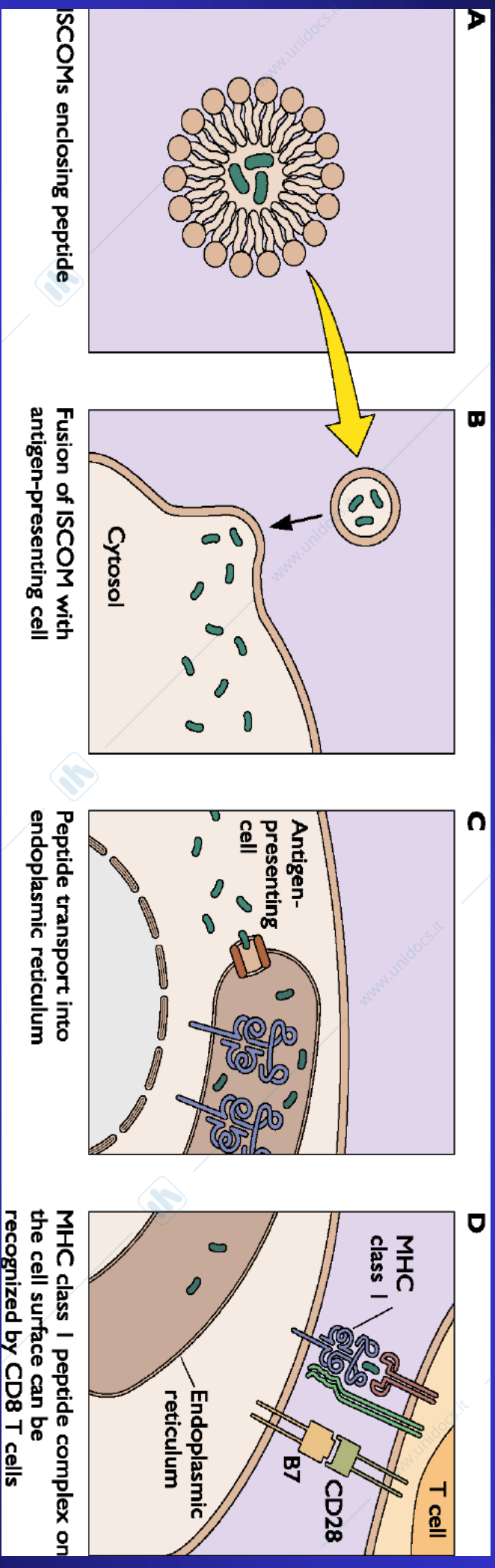
SVANTAGGI

- poco immunogeni, necessità di adiuvanti
- la maggior parte degli epitopi B è discontinua
- possono essere troppo specifici e non proteggere contro varianti naturali

- Un altro sistema è quello di usare un detergente per incorporare antigeni proteici o peptidi in **vescicole lipidiche** o in **micelle proteiche** o in **complessi immunostimolanti (ISCOM)**.
- Il peptide o la proteina vengono espressi come complesso multivalente sulla superficie della micella e si è inoltre osservato che i liposomi e gli ISCOM possono liberare l'antigene nella cellula inducendo immunità cellulo-mediata.



Immune-stimulating complexes (ISCOMs) as peptide delivery vehicles



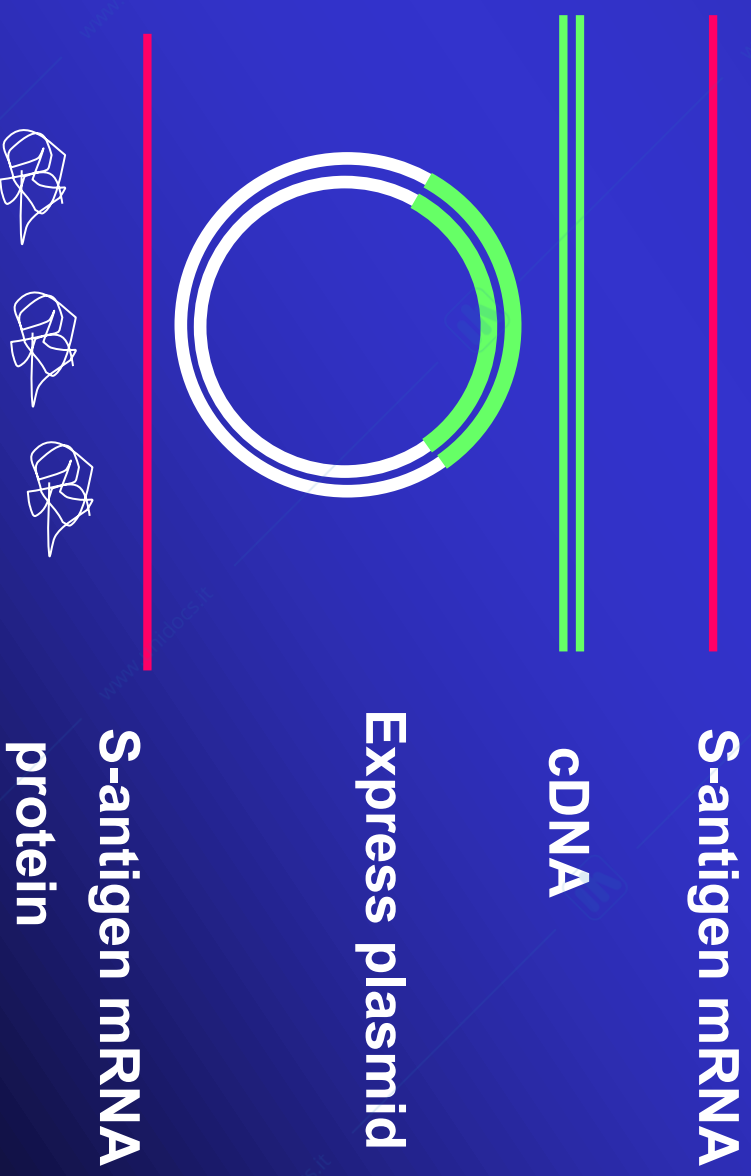
Il vaccino contro HBV, costituito da HBs Ag viene prodotto in lievito o cellule eucariotiche

Tre dosi, entro un periodo di 6 mesi, sono necessarie per indurre immunità nel 95% dei soggetti vaccinati

- **Recombinant DNA**
- **Single gene (subunit)**

Hepatitis B vaccine

raised in yeast



New Vaccine Technology

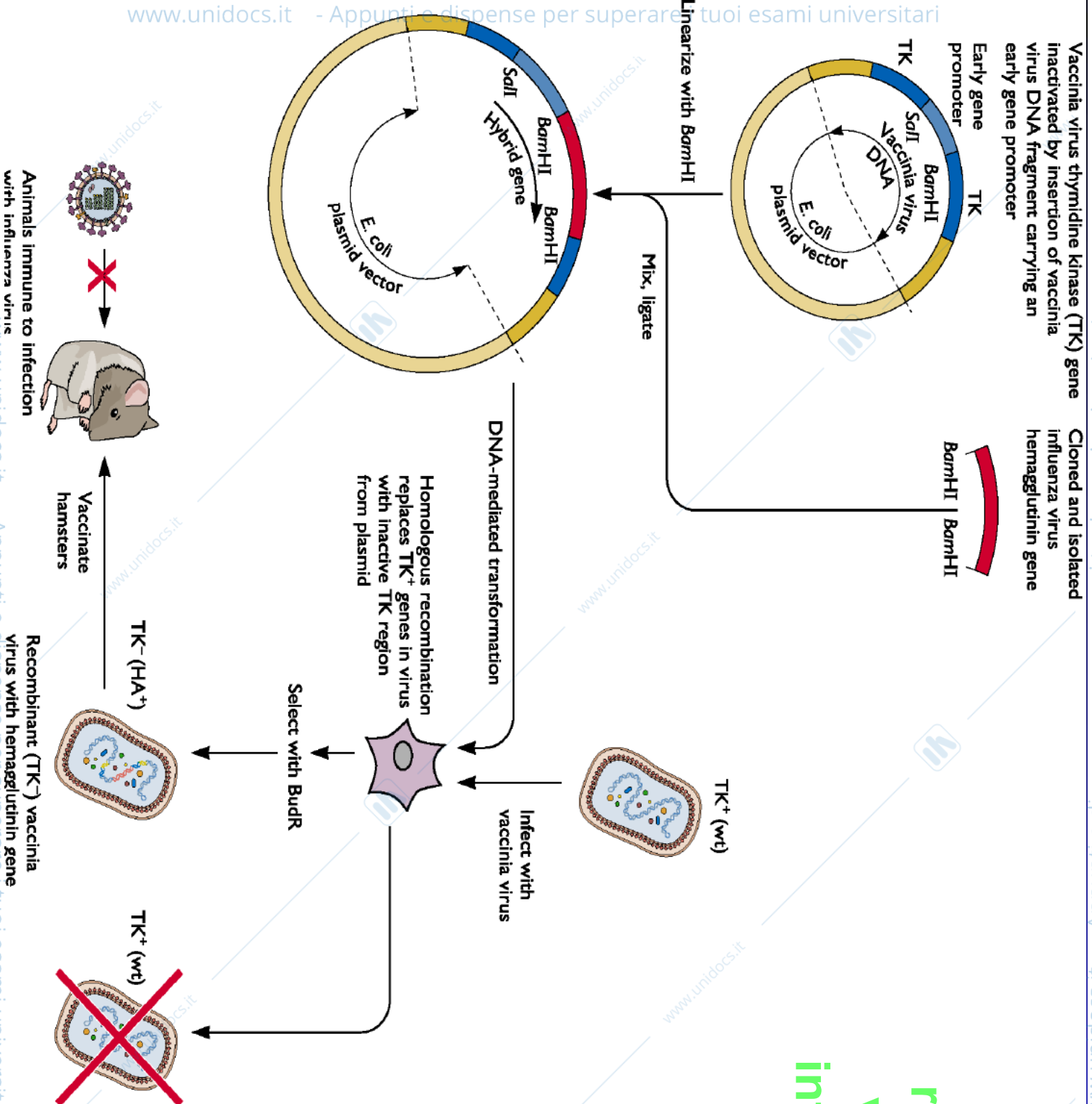
Viral vectors:

- ▶ Use nonpathogenic virus to immunise host against a pathogenic virus.
- ▶ Vaccinia virus: smallpox eradication; continued use as viral vector
- ▶ Parvovirus is used in gene therapy

▶ Problems:

- host is immunised against viral vector as well as the vaccine antigen subsequent uses of vector may result in weak/no response, or an immunopathological response.
- Immunocompromised individuals may be infected within the vaccinated population with adverse consequences.

Construction of a recombinant vaccinia virus expressing the influenza virus HA gene



from Flint et al. (2000)
Principles of Virology
ASM Press

VACCINO di ultima generazione

VIRION LIKE PARTICLES

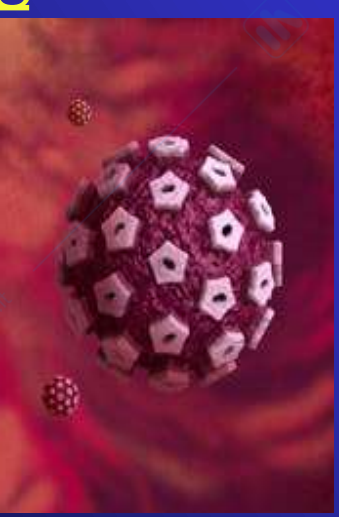
VLP

Characteristics of HPV

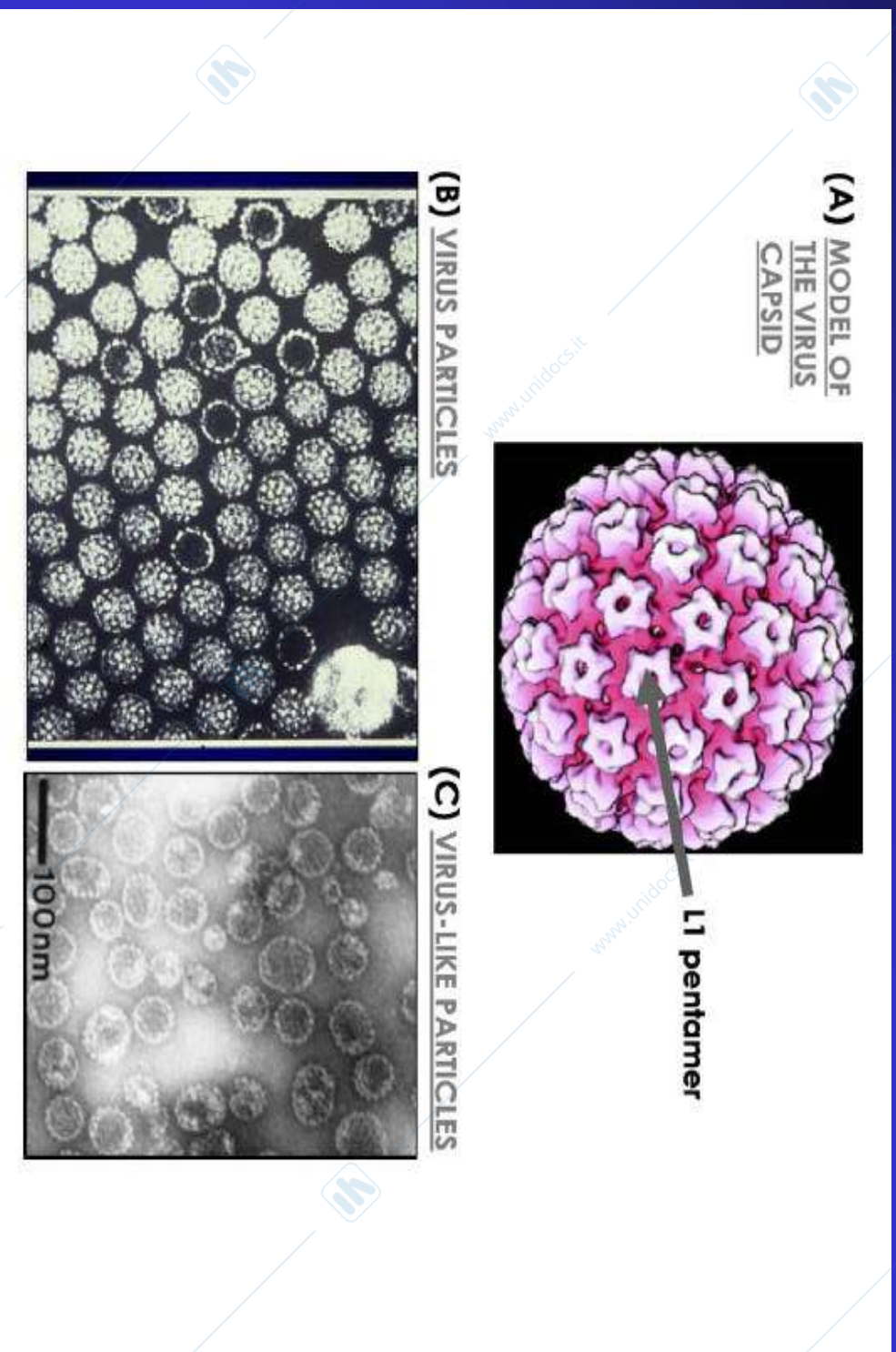
■ Small (55 nm) Icosahedral capsid, double-stranded non-enveloped DNA virus, 72 Capsomeres of L1 (Capsid protein)

■ HPV-18 and HPV-16 are highly associated with cervical cancer

- Species specific, site specific & Epitheliotropic
- Not yet Isolated in Lifeless culture Media
- The epitope that can be recognized by corresponding immunocytes locates on capsid protein(L1 protein)



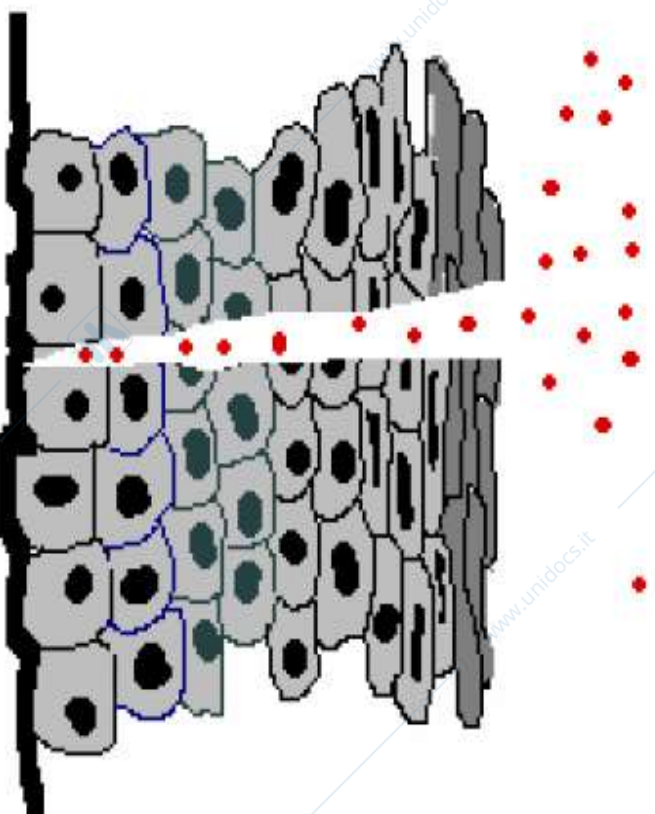
HPV L1 VLP vaccine



Mimic natural virion structure → generate potent immune response

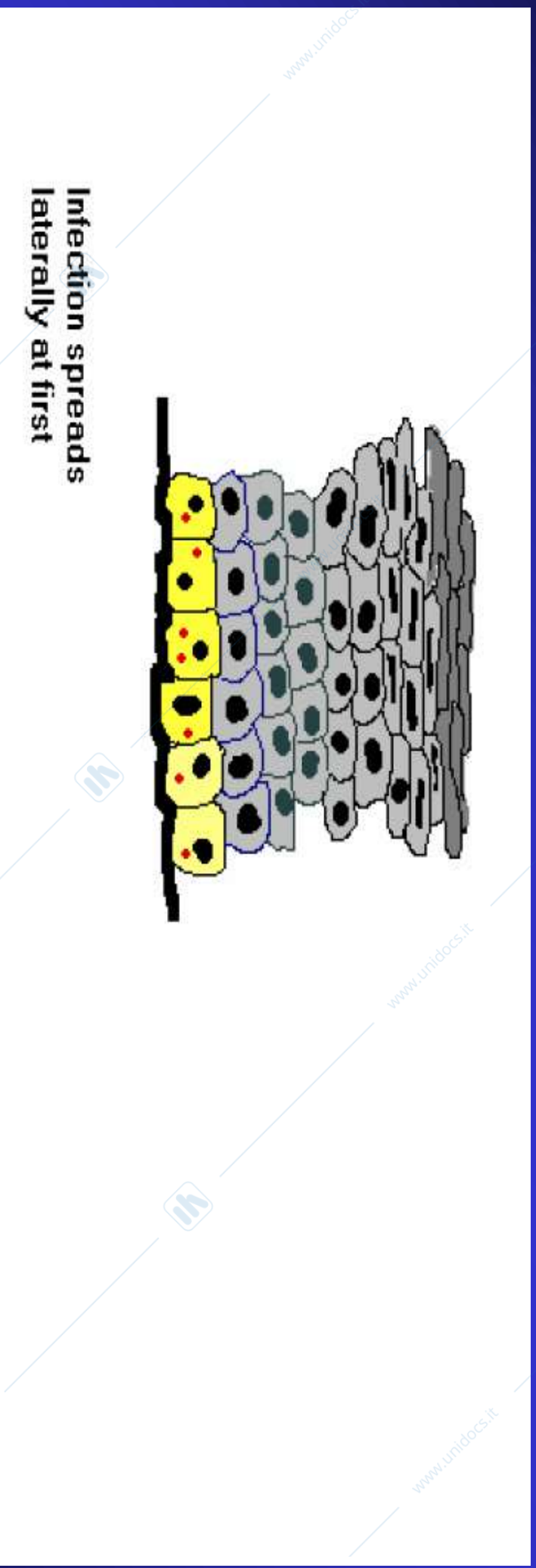
Capsid peptides bind with cell surface receptors in basal cell layer

Trauma that allows
virus to penetrate to
the basal membrane

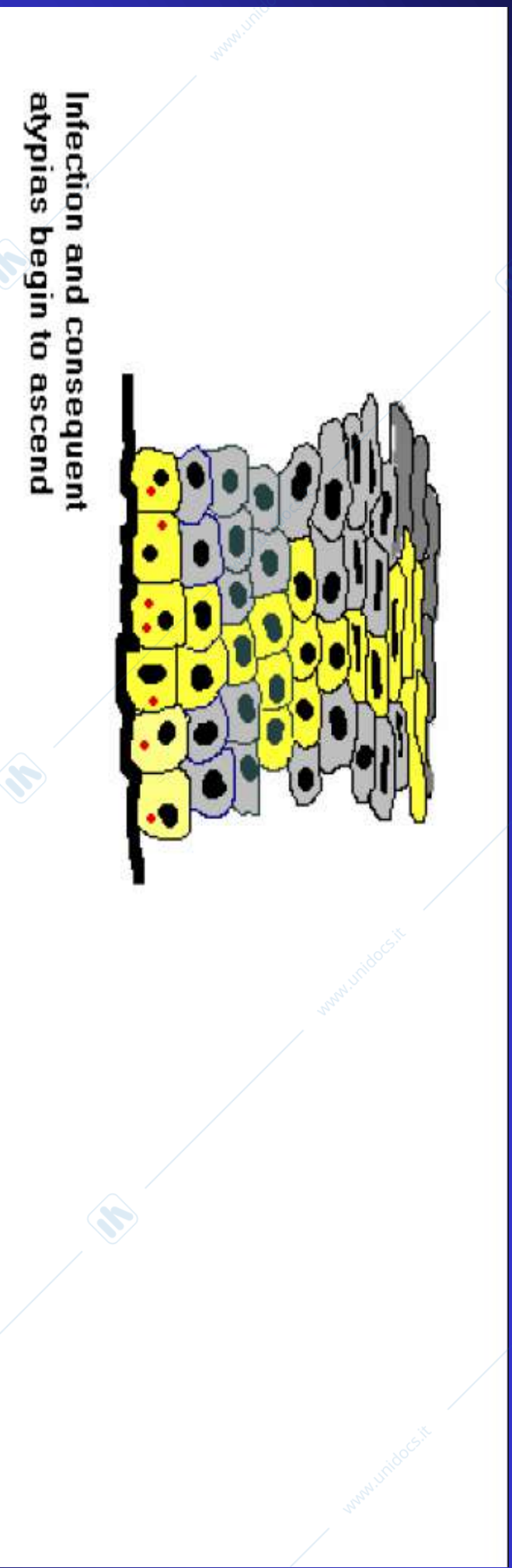


Alpha-7 integrin molecule is one of the candidate
receptors

Early proteins that regulate the virus are expressed in lowest layers of epithelium

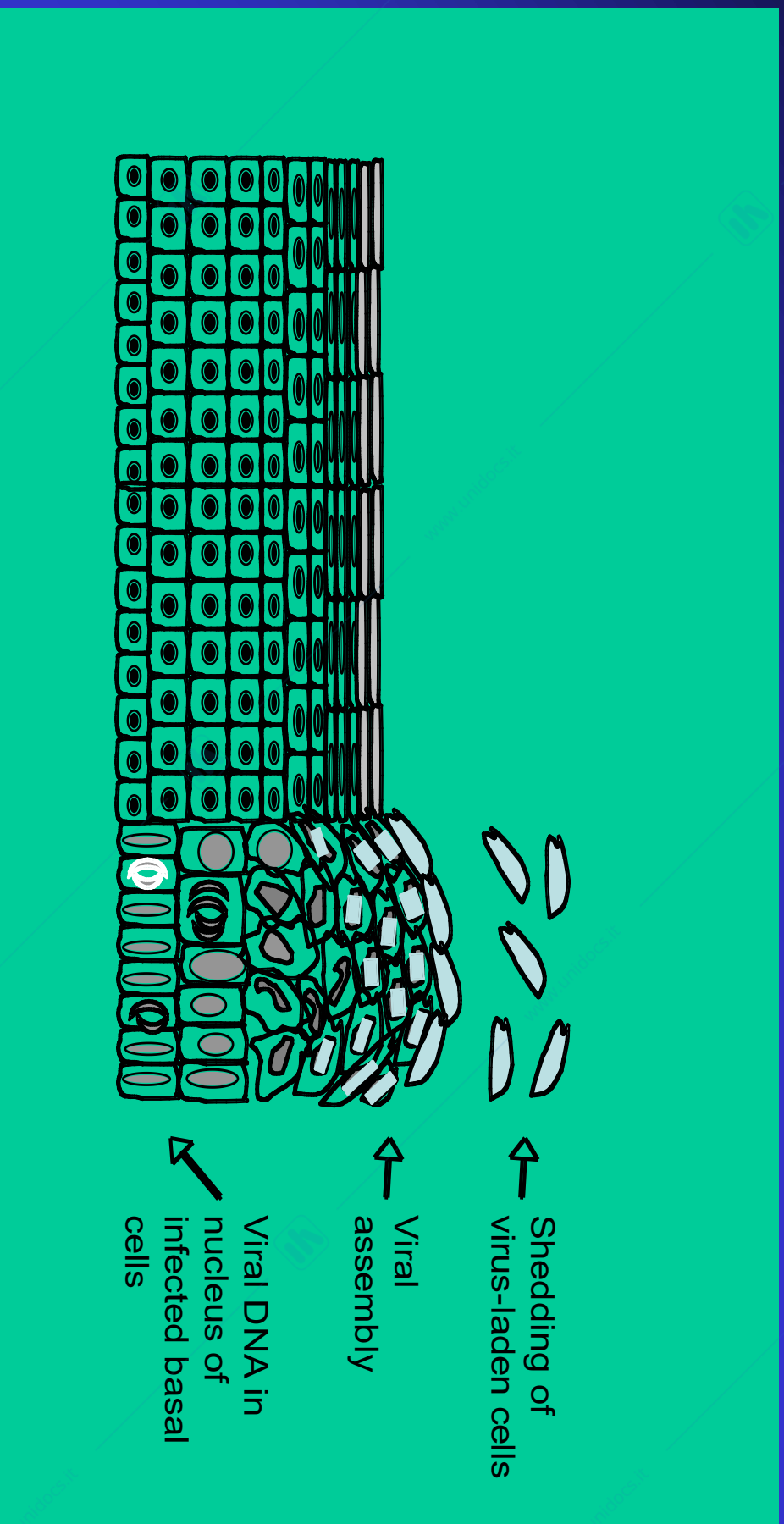


Late proteins are expressed in upper layers of epithelium



 Viral nucleic acid can be found in basal stem cells, but late gene expression (capsid proteins) is restricted to the uppermost layer of differentiated keratinocytes.

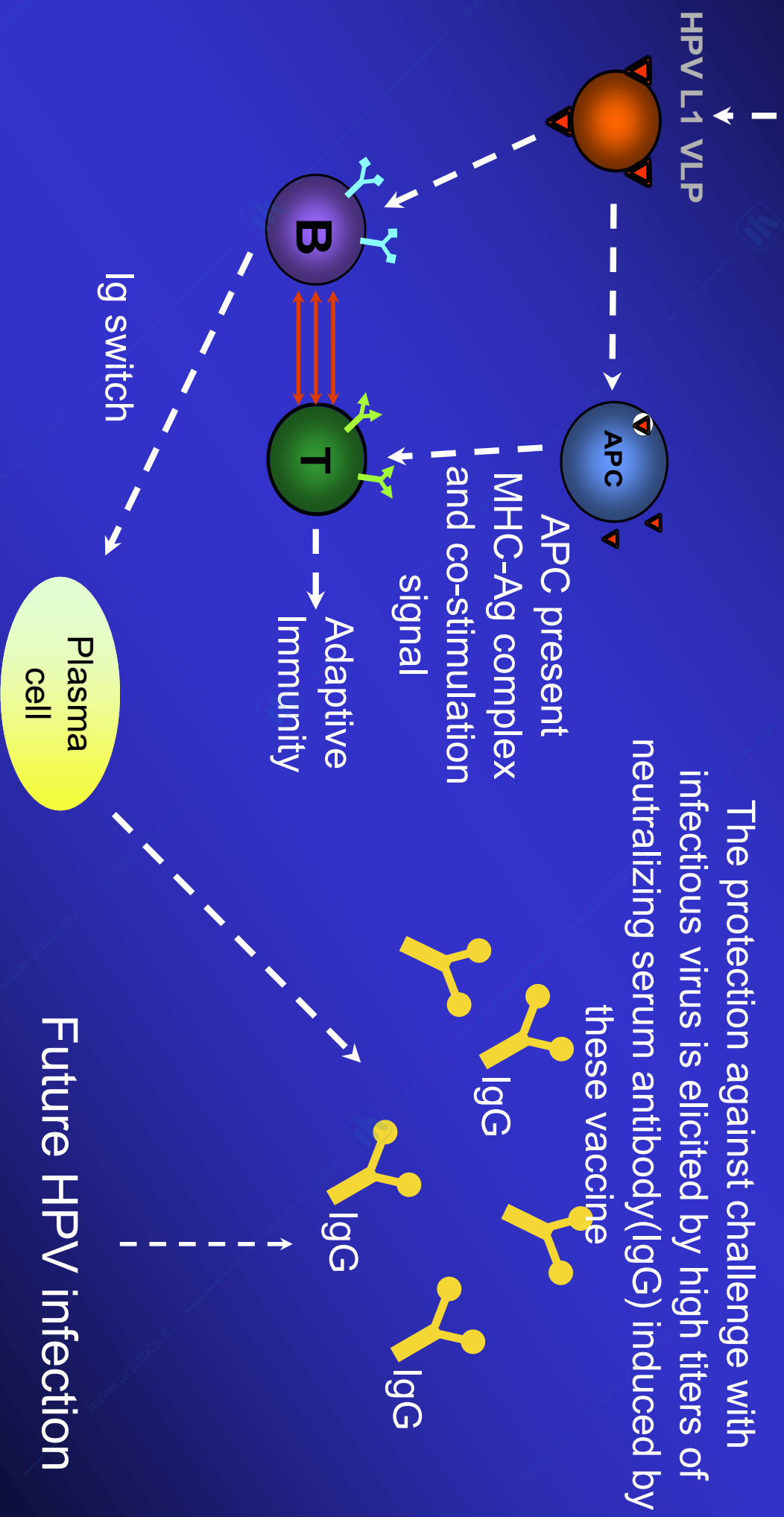
HPV Infection Causes Epithelial Neoplasia



 And it also results in that few APCs can catch these viruses.

HPV L1 VLP vaccine

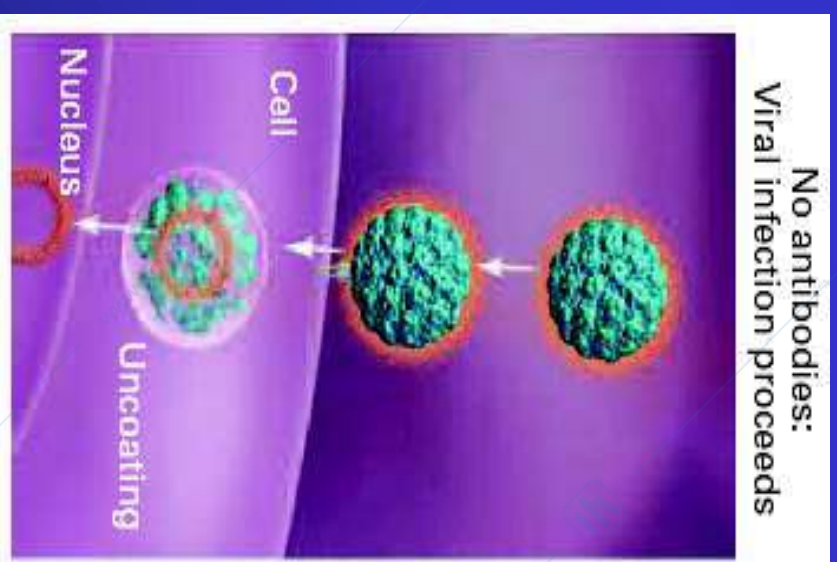
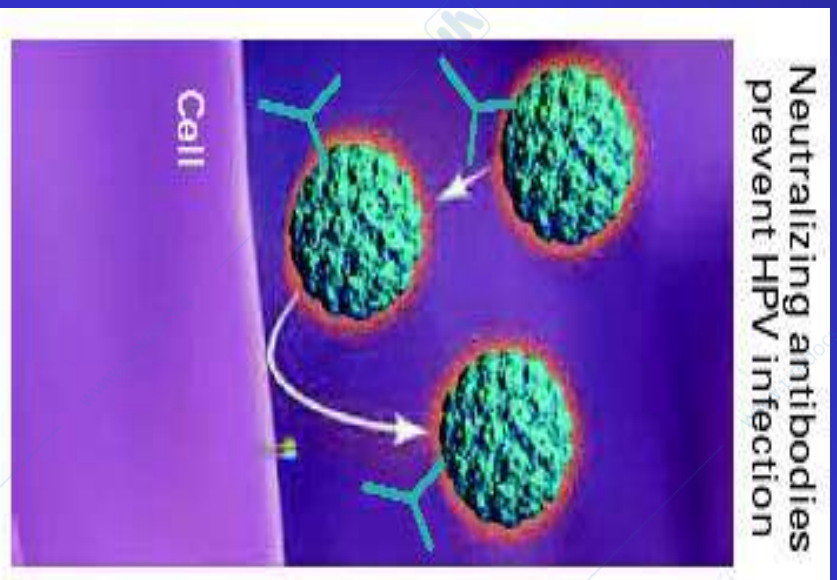
Immunized by HPV L1 VLP vaccine



Virus-Like Particles (VLPs) - 2

- ◆ Immune response targets the capsid proteins (at the time of viral entry), therefore ideal for prophylactic vaccine

Vaccination



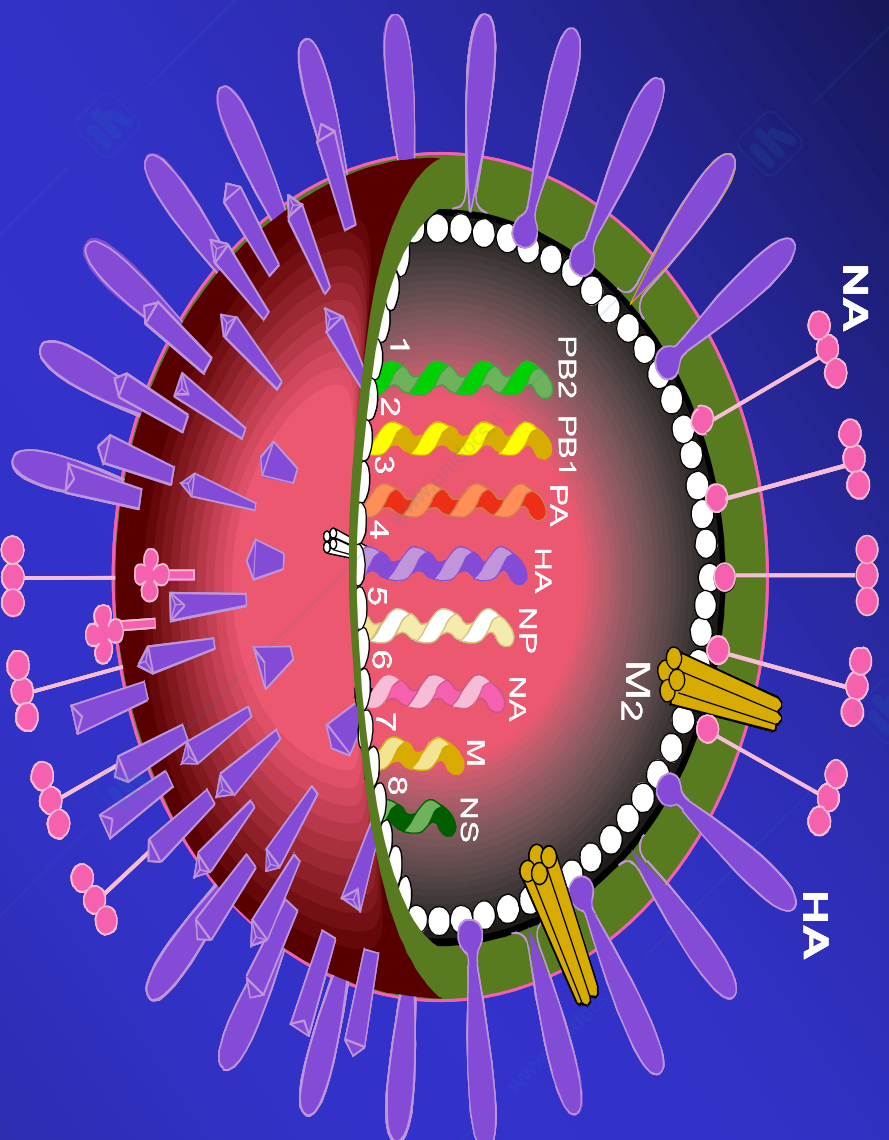
No
Vaccination

Nuovi Metodi

**Riassortimento genetico tra ceppi di virus influenzali
mutanti TS**

**Sono di solito virus attenuati con proteine interne mutate
a cui vengono assemblate le proteine di superficie (HA
ed NA) tramite riassortimento genetico**

Influenza Virus



Annicorpi neutralizzanti
contro emoagglutinina

Antigenic drift graduale cambiamento risultante nell'incapacità di pre-esistenti anticorpi a neutralizzare → richiede frequenti aggiornamenti del vaccino

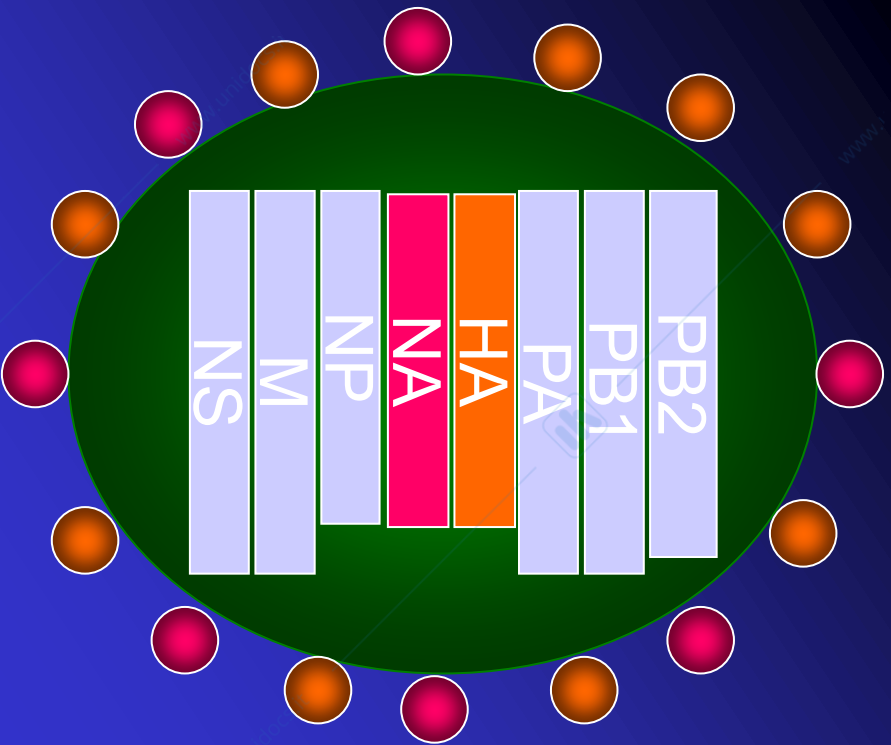
Antigenic shift nuovo HA-subtype, no anticorpi neutralizzanti

Vaccini per influenza

Vaccini Trivalenti :

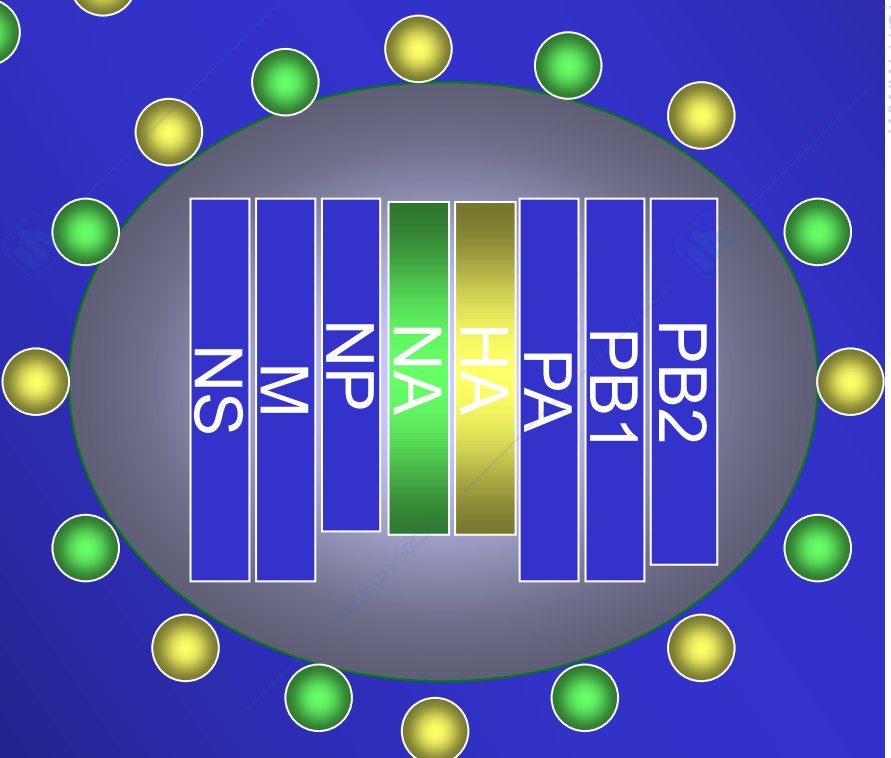
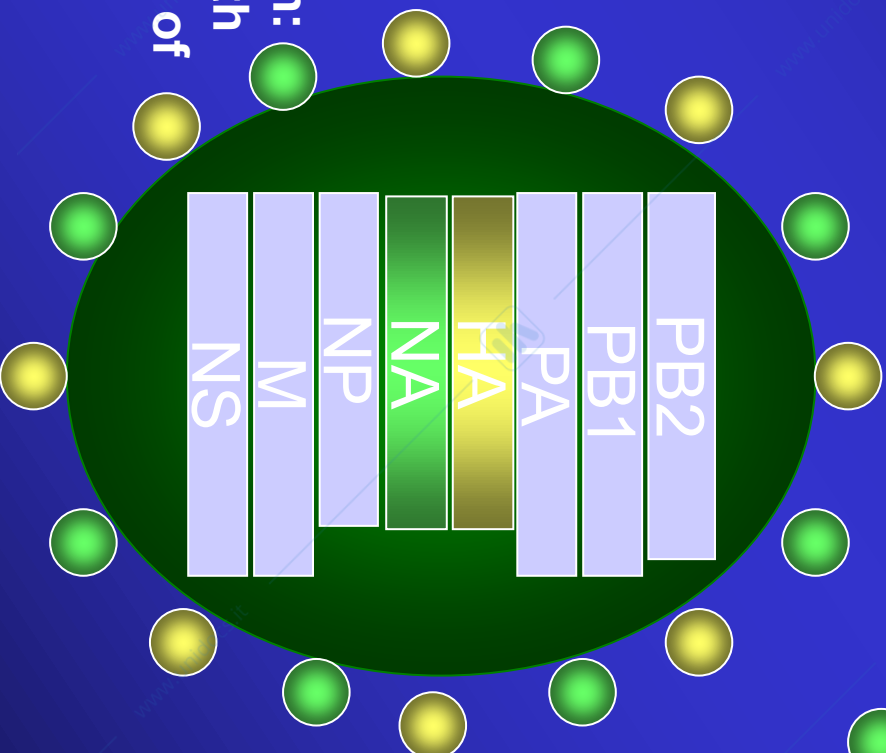
1. A/H1N1,
2. A/H3N2,
3. influenza B strain

- Vaccini Inattivati : Virus Riassortanti tra geni interni A/PR/8/34 (H1N1) e geni wt HA and NA di ceppi circoanti + wt influenza B strain
- Vaccini Vivi attenuati cold adapted (ca) : Virus Riassortanti contenenti geni HA and NA di ceppi wt A or B e geni interni di ca A/Ann Arbor/6/60 and B/Ann Arbor/1/66



Attenuated Donor
Master Strain

Attenuated Vaccine Strain:
Coat of Virulent strain with
Virulence Characteristics of
Attenuated Strain



New Virulent
Antigenic Variant
Strain

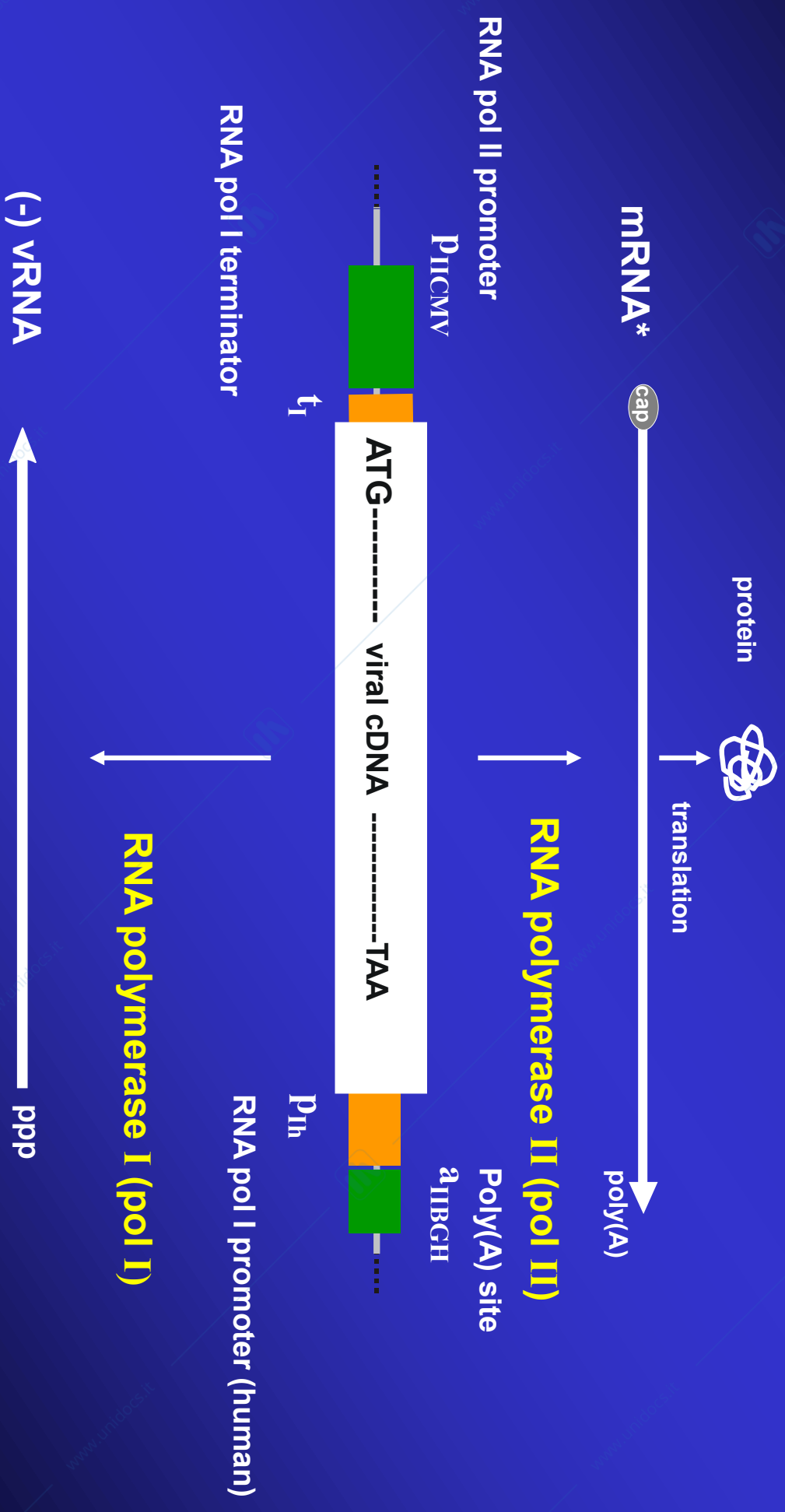
'Reverse Genetics'



Replicazione e trascrizione del virus influenzale

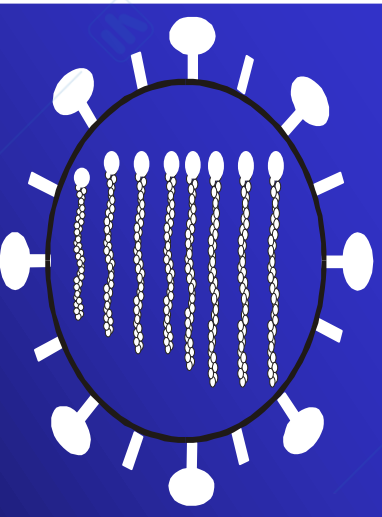
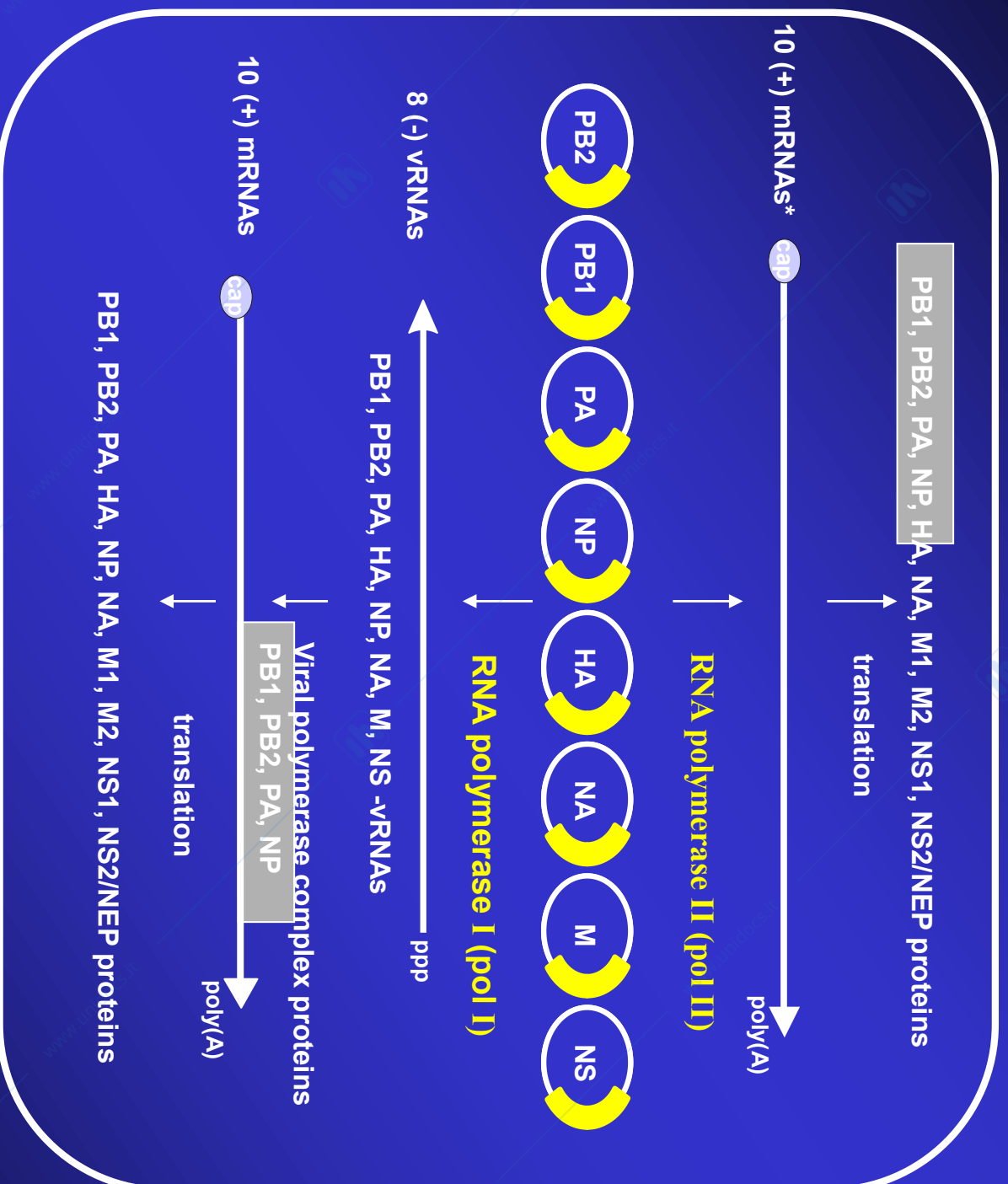


RNA pol I/pol II transcription system for synthesis of (-)vRNA and (+)mRNA (Bidirectional transcription)



Hoffmann et al., 2000₄₆

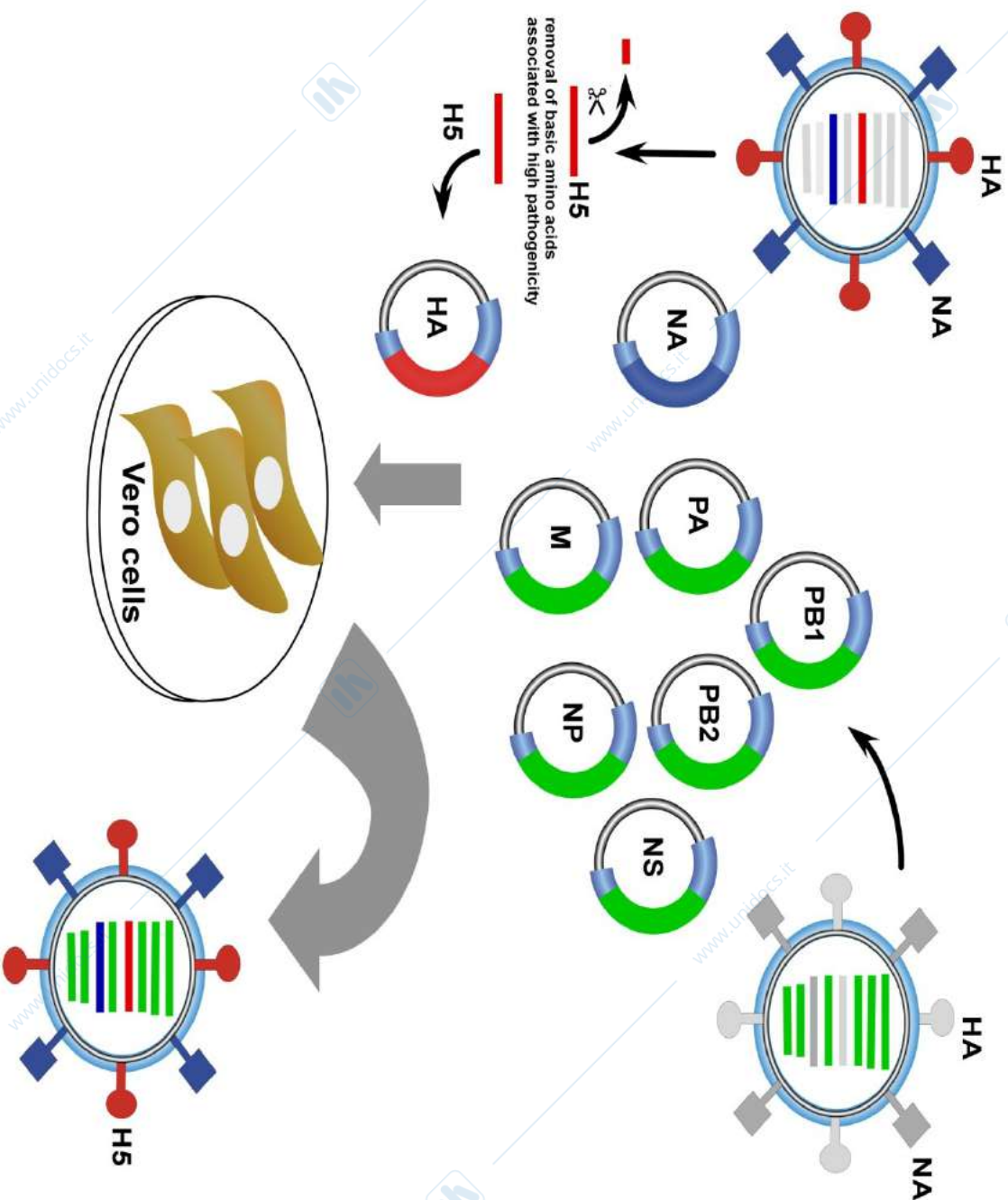
Sistema con Otto plasmidi per la generazione di virus della influenza A

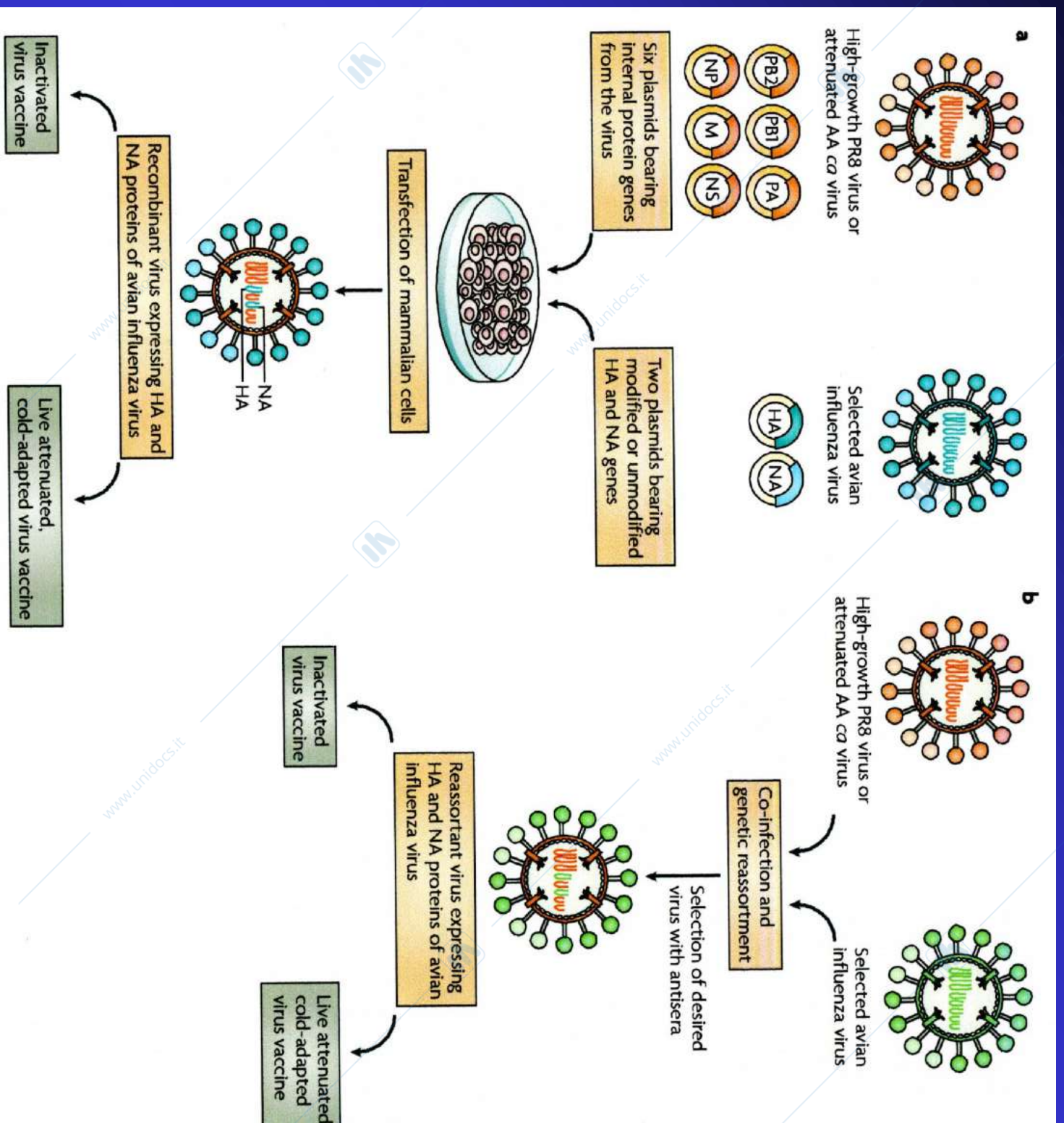


Vaccines for pandemic preparedness

A/Vietnam/1203/04 (H5N1)

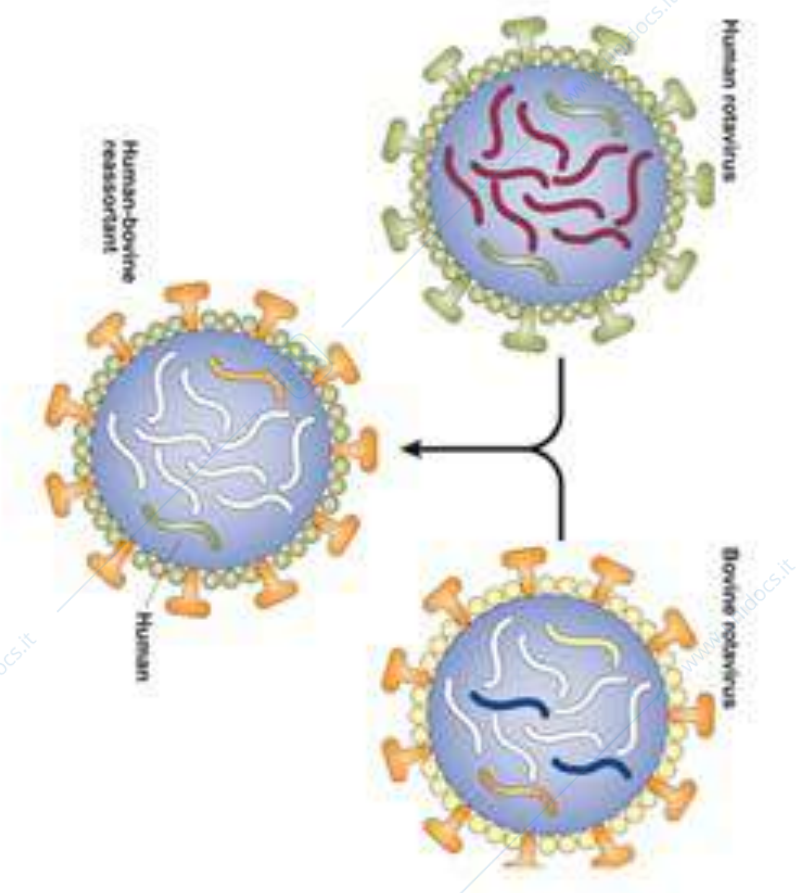
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)





NUOVO VACCINO ANTI-ROTAVIRUS

riassortante umano-bovino



Vaccines

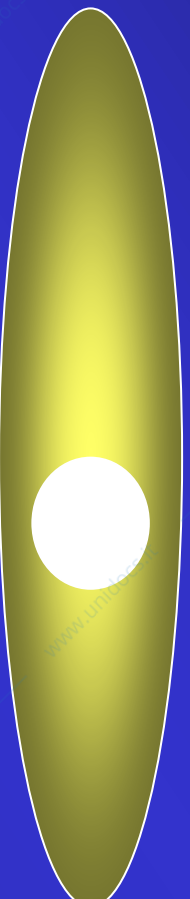
- **1796 Jenner: wild type animal-adapted virus**
- **1800's Pasteur: Attenuated virus**
 - **1996 DNA vaccines**

The third vaccine revolution

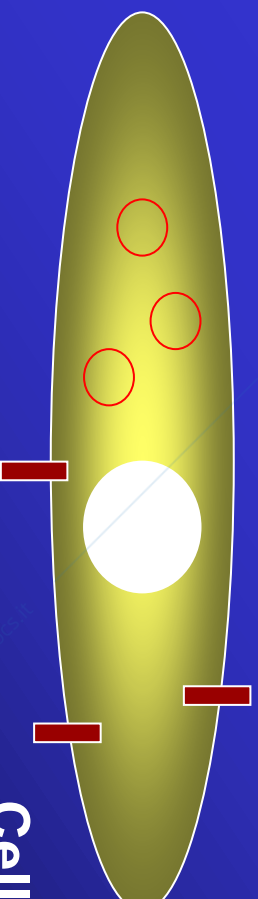
DNA Vaccines



**Plasmide
ricombinante**



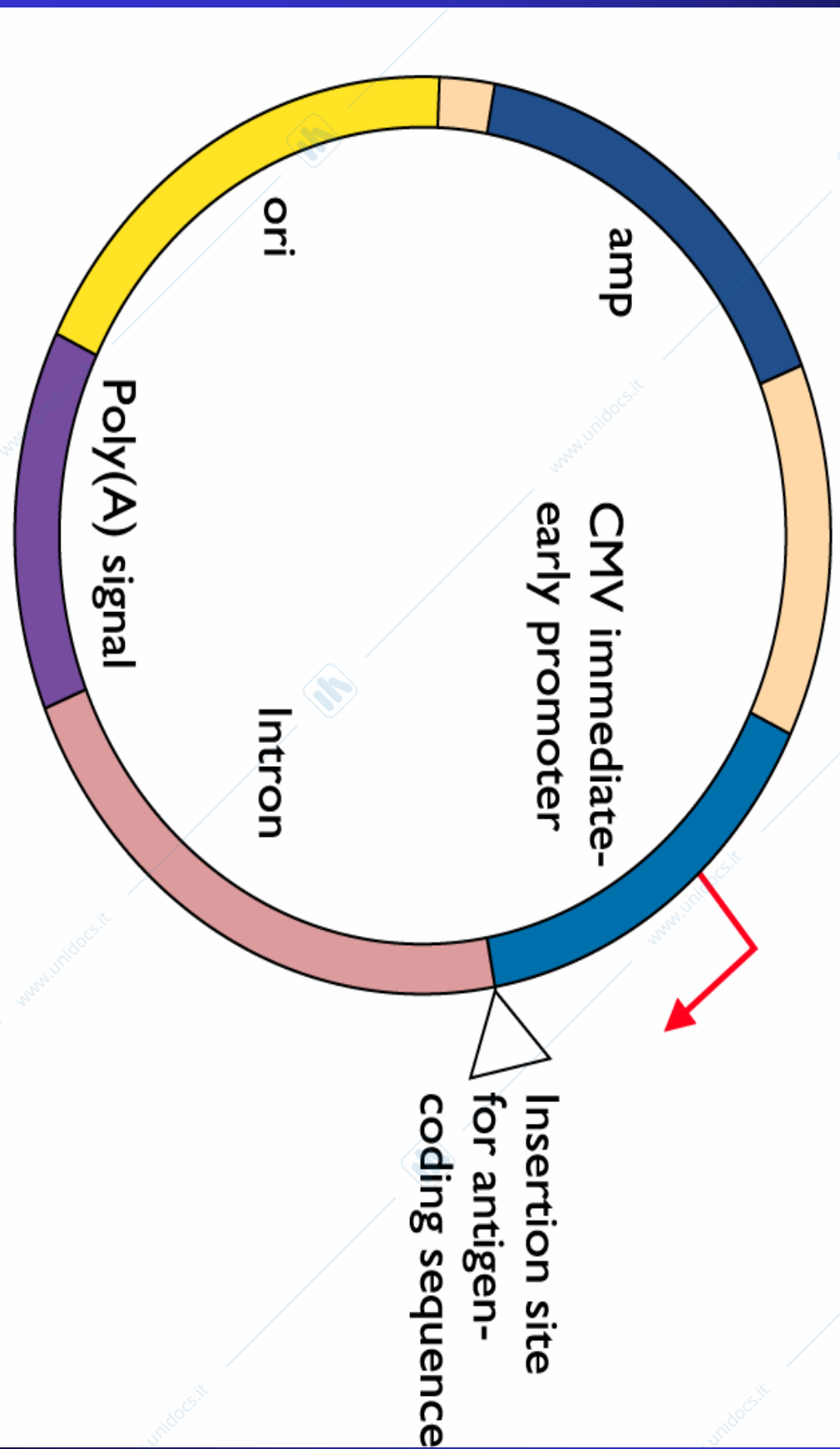
cellula muscolare



**Cellule che esprimono
epitopi antigenici
riconosciuti dal sistema
immune**

DNA vaccines

Functional components of DNA vaccine plasmid



Vaccini a DNA

- I plasmidi possono essere prodotti facilmente in grandi quantità
- Il DNA è stabile e resiste ad elevate temperature
- Le sequenze possono essere cambiate in laboratorio
- Induce risposta umorale, ma soprattutto cellulo-mediata e di tipo citotossico

• Possibili problemi

- Integrazione del DNA nel genoma cellulare
- Induzione di auto-anticorpi (anti DNA)
- Induzione di tolleranza

Table 19.5 DNA vaccines in animal models^a

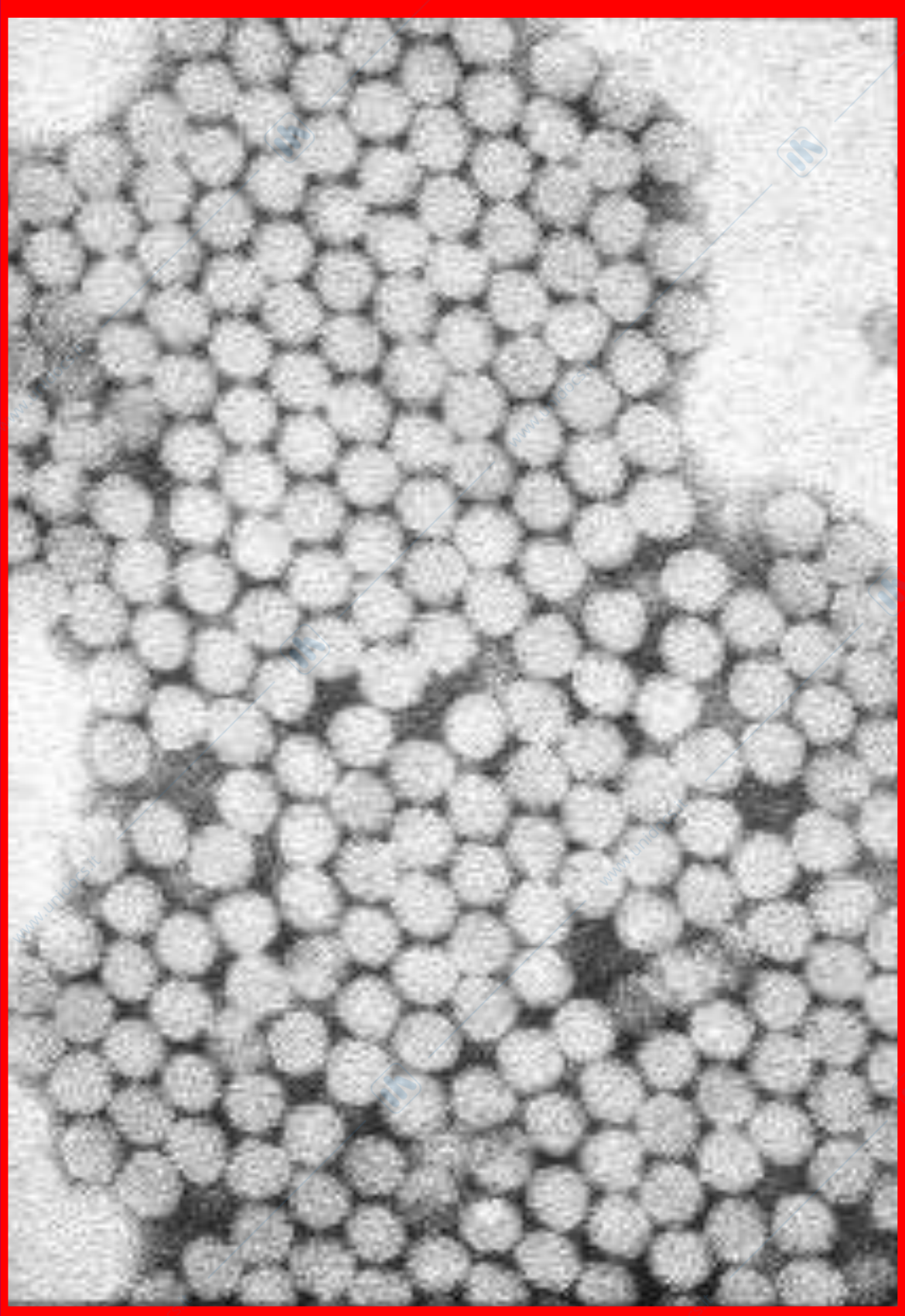
Pathogen	Proteins	Induction of ^b :			Protection
		AB	CTL		
Hepatitis C virus	Nucleocapsid	+	+	+	
Influenza virus	NP, HA, M1	+	+	+	
Rabies virus	Glycoprotein, NP	+	+	+	
Lymphocytic choriomeningitis virus	NP	+	+	+	
Human immunodeficiency virus	Env, Gag, Rev	+	+	ND	
Human T-cell leukemia virus type 1	Env	+	ND	ND	
Hepatitis B virus	Surface, core antigens	+	+	+	
Bovine herpesvirus	Glycoprotein	+	ND	+	
Herpes simplex virus	gB, gD, ICP27	+	+	+	

^aAdapted from J. B. Ulmer et al., *ASM News* **62:476–479**, 1996.

^bND, not detected; AB, antibody; CTL, cytotoxic T lymphocytes. “Protection” refers to survival after a lethal virus challenge.

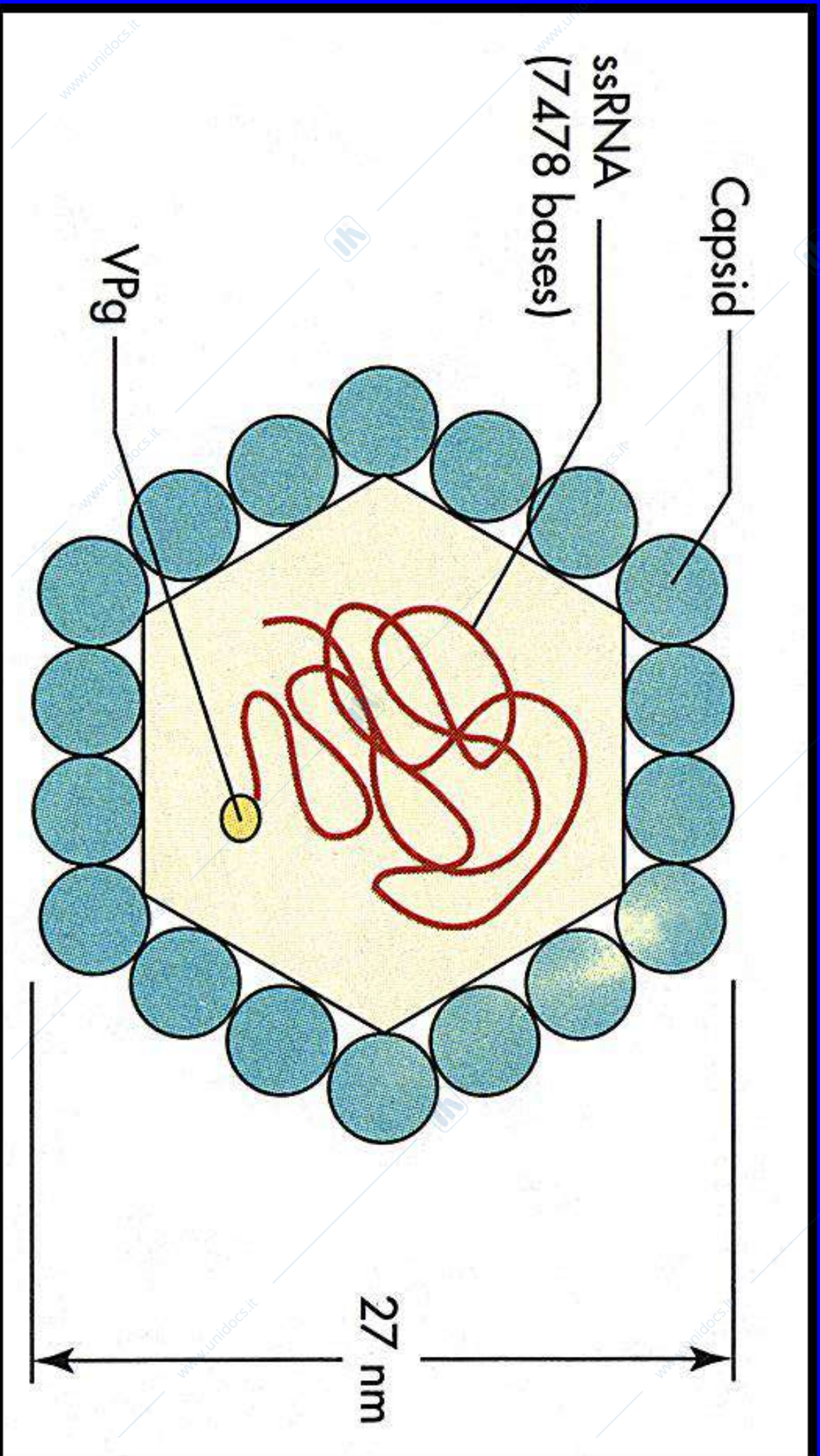
I VIRUS CHE CAUSANO EPATITE

- **VIRUS EPATITICI MAGGIORI**
 - virus A (HAV)
 - virus B (HBV)
 - virus C (HCV)
 - virus D o delta (HDV)
 - virus E (HEV)
- **VIRUS EPATITICI MINORI** (responsabili di circa l'1,5% delle epatiti acute)
 - Citomegalovirus
 - virus di Epstein-Barr
 - Coxsackie
 - Herpes Virus
 - Parotite
 - Rosolia



HEPATITIS A VIRUS

Struttura Virus epatite A



Hepatitis A Virus: Struttura e Classificazione

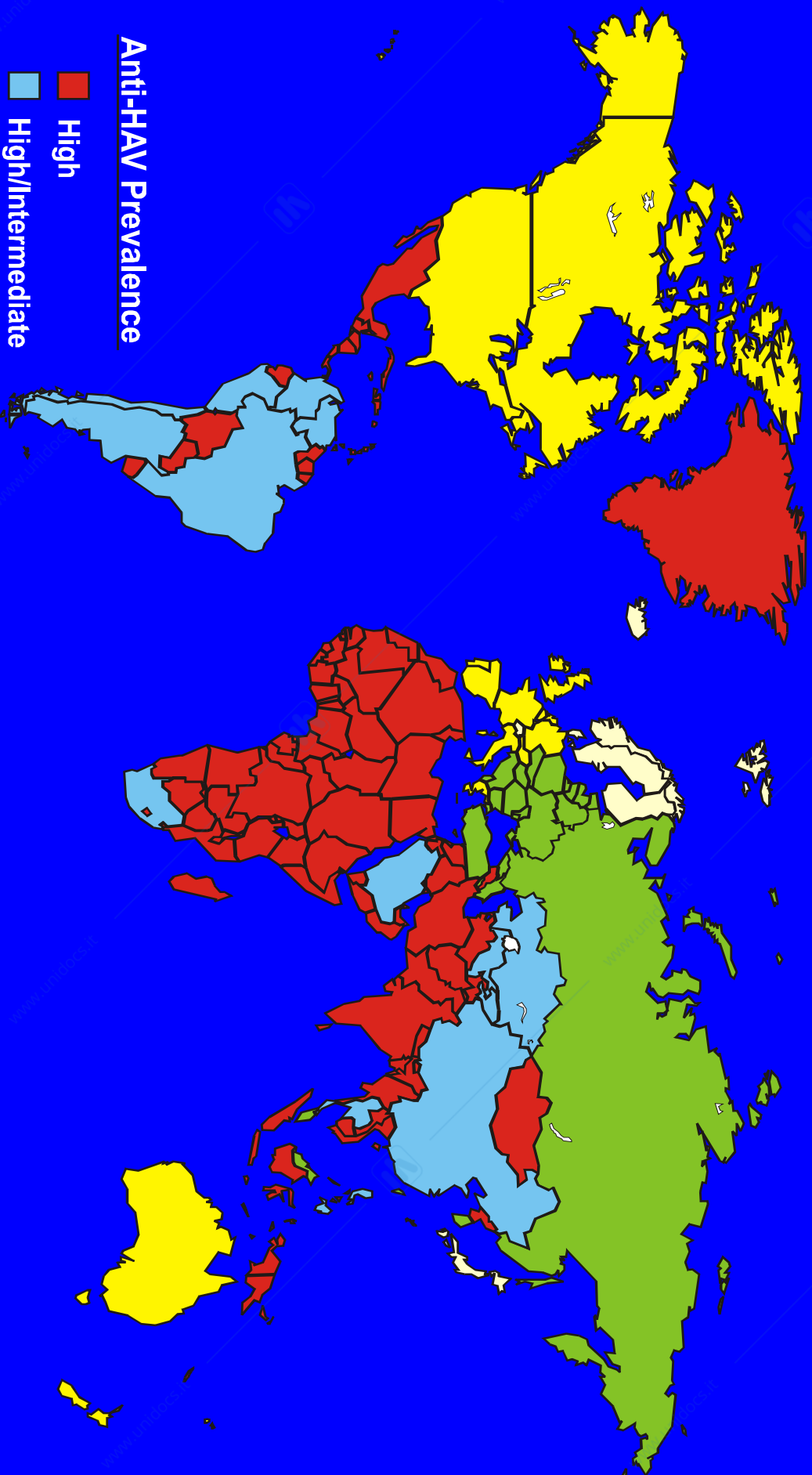
□ RNA Picornavirus

- Genere separato a causa di differenze con altri enterovirus
- Virus nudo
- capside icosaedrico
- SS RNA (740 nucleotides)
- Singolo serotipo nel mondo
- Uomo, unica reservoir

TRASMISSIONE HAV

- Oro-fecale
- Contatto stretto (asilo infantile)
- **Cibo, acqua contaminati**

DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA DI INFEZIONE HAV



Hepatitis A: Patogenesi

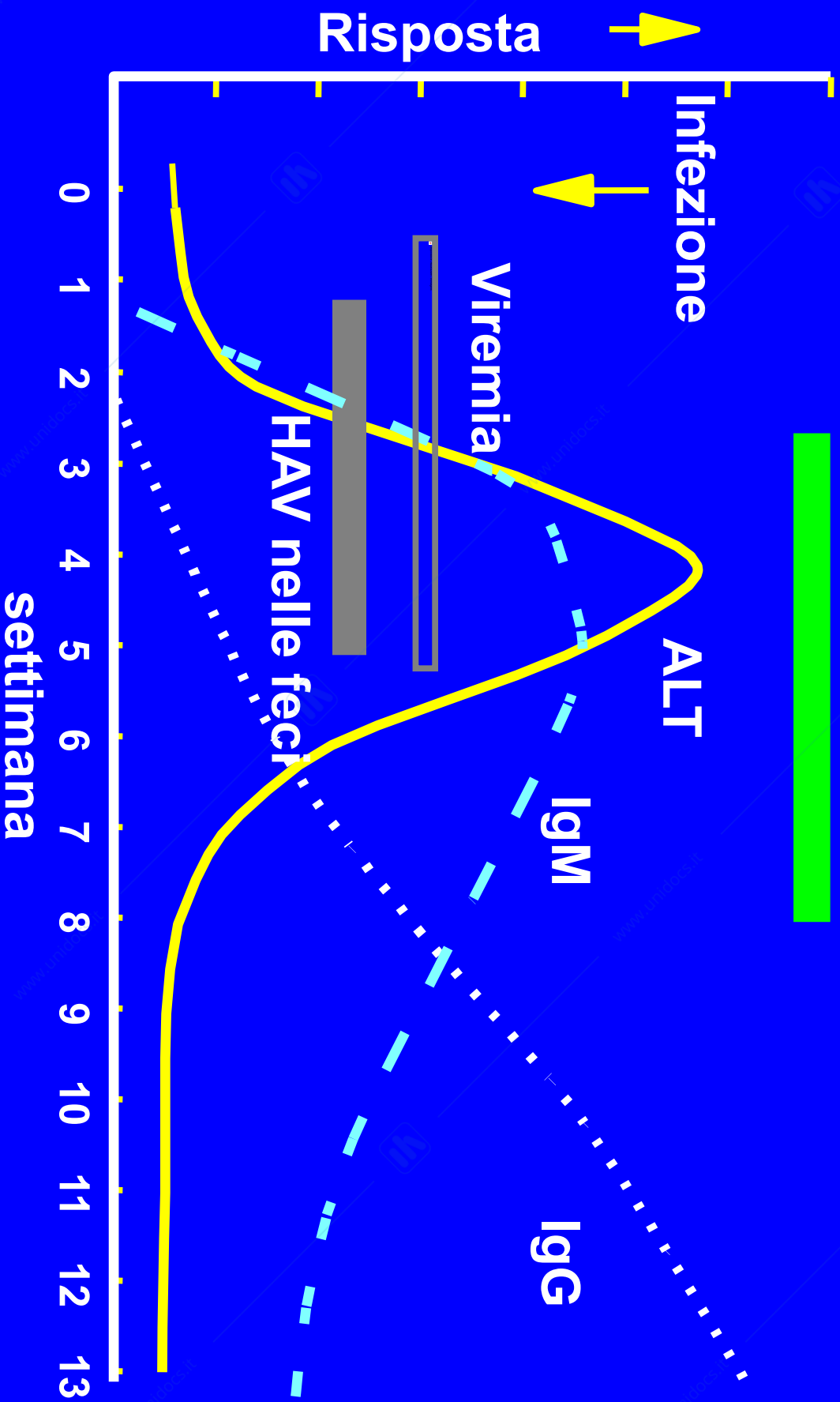
- Incubazione 4 settimane (range 2-6 settimane)
- Cavità orale → tratto GI → fegato via sangue
- Replica negli epatociti (poco danno alle cellule), rilasciato tramite la bile nell' intestino 7-10 giorni prima dei sintomi clinici
- Danno epatico e sindrome clinica derivati da risposta immune e non da effetto diretto del virus

Hepatitis A: Manifestazioni cliniche

- fatica, dolore addominale, perdita di appetito, nausea, vomito
- ittero or elevati livelli sierici di aminotransferase, urine scure, feci chiare
- Adulti di solito più sintomatici
- I pazienti sono infettivi quando eliminano il virus con le feci, di solito prima della comparsa dei sintomi.
- Di solito, l'epatite risolve benignamente in 2-4 settimane
- Recupero completo nel 99%
- Rara Epatite fulminante

INFEZIONE da HAV

Malattia Clinica



DIAGNOSI HAV

- RT-PCR su campioni fecali
- Analisi sierologica: ricerca IgM all'inizio della sintomatologia, IgG specifiche -3 settimane dopo

PREVENZIONE di HAV

- **Igiene (e.g., hand washing)**
- **Sanitizzazione (e.g., disinfezione fonti di acqua**
- **Immunoglobuline (pre- and post-exposure)**
- **Vaccino anti HAV (pre-exposure)**

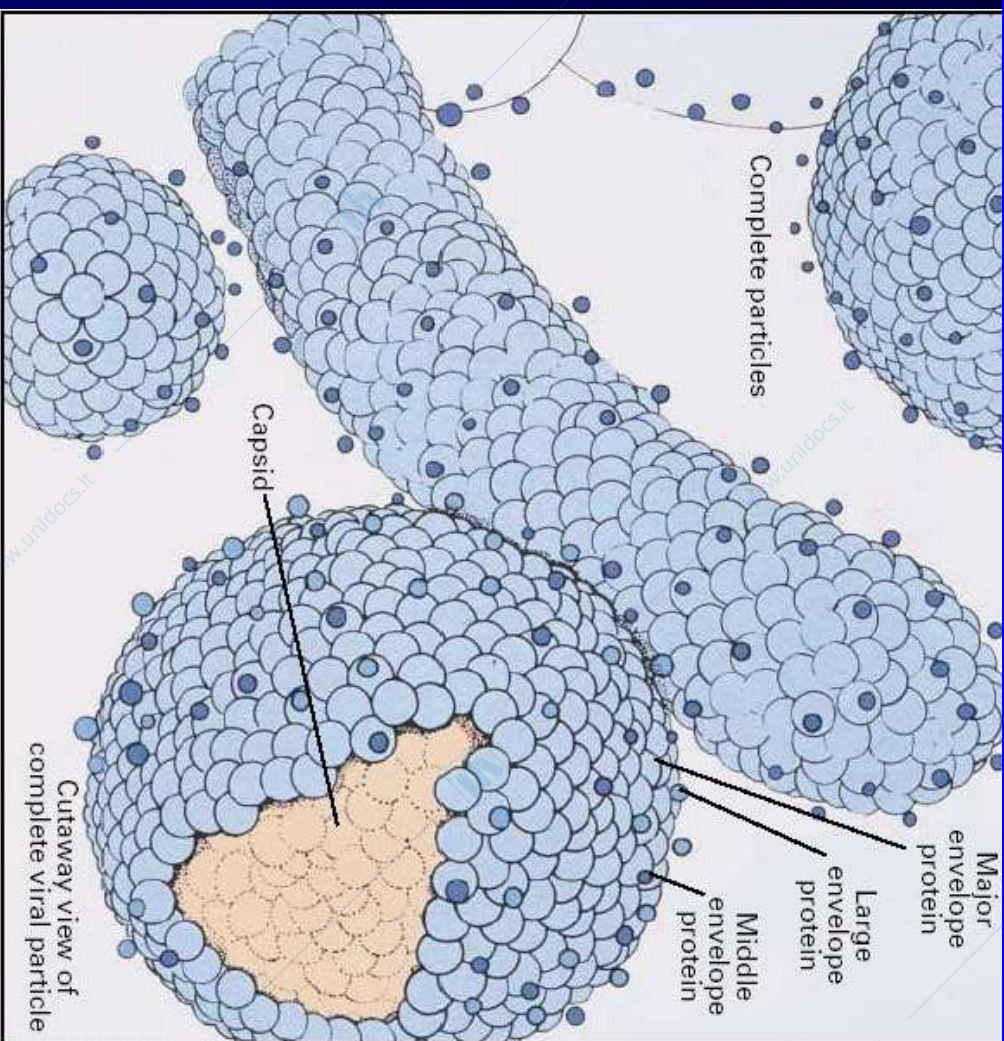
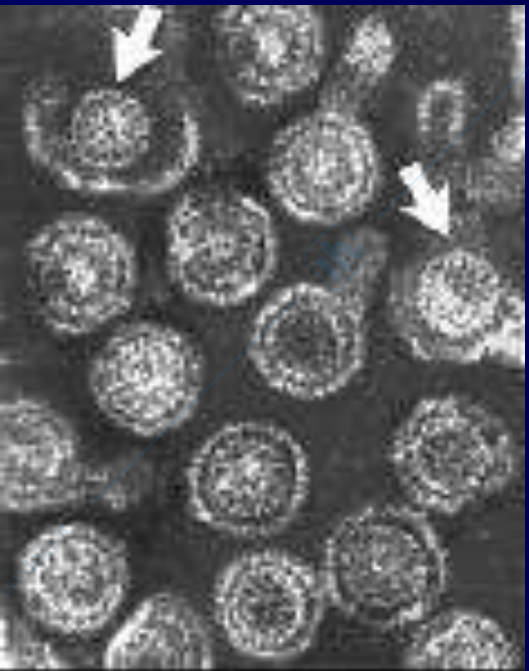
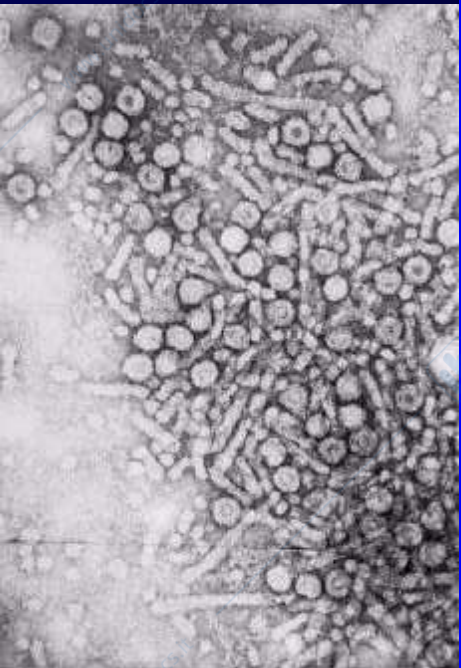
VACCINO anti HAV

- Vaccino inattivato
- Altamente immunogeno; circa 100% dei vaccinati hanno livelli di anticorpi protettivi dopo la 2^o dose

DURATA DELLA PROTEZIONE DA HAV DOPO VACCINO

- **La protezione inizia 4 settimane dopo vaccino**
- **Gli anticorpi specifici permangono per 5-8 anni, ma potrebbero persistere per almeno 20 anni secondo modelli matematici**
- **Contributo della memoria immunologica**

VIRUS EPATITTE B

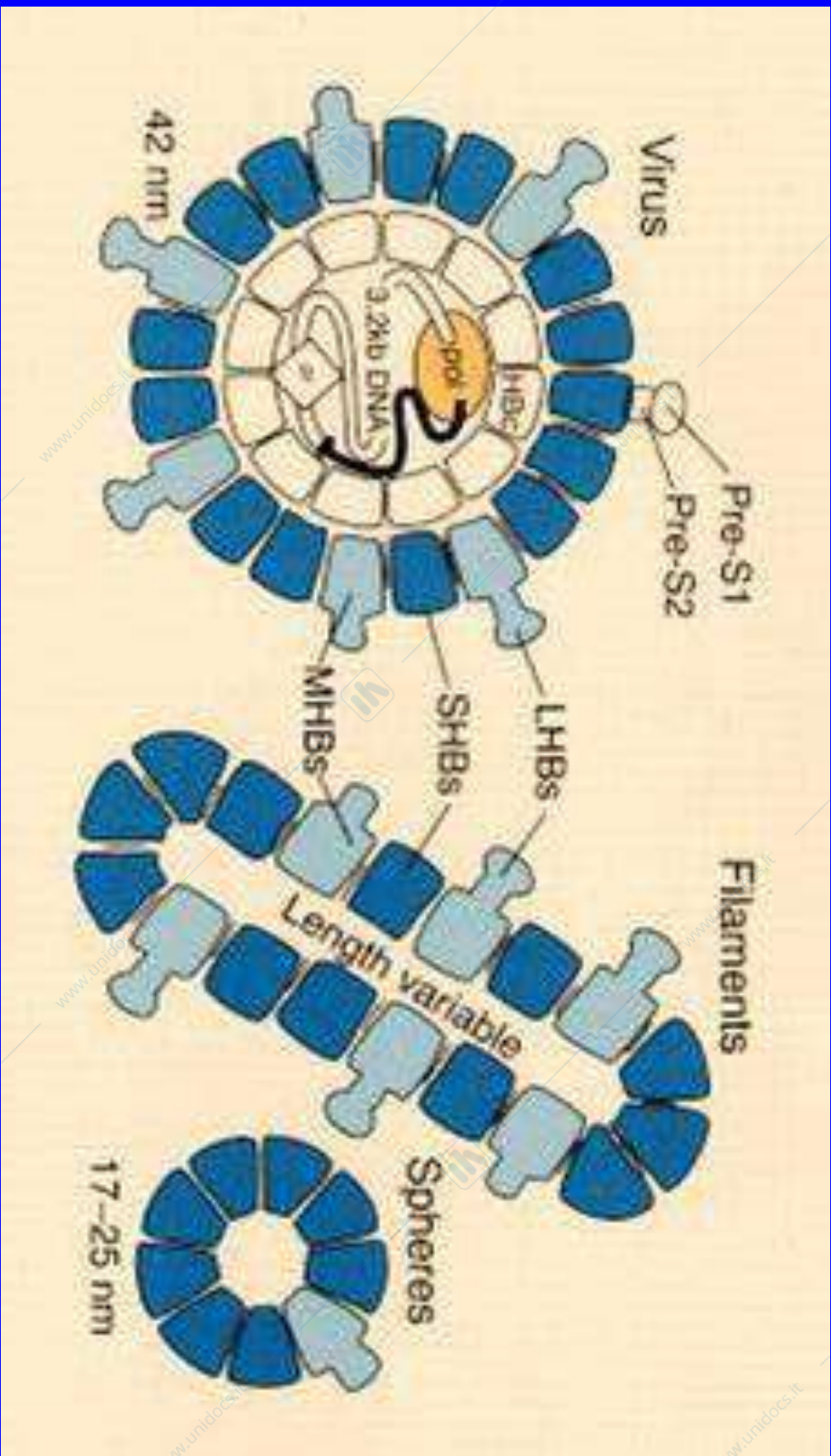


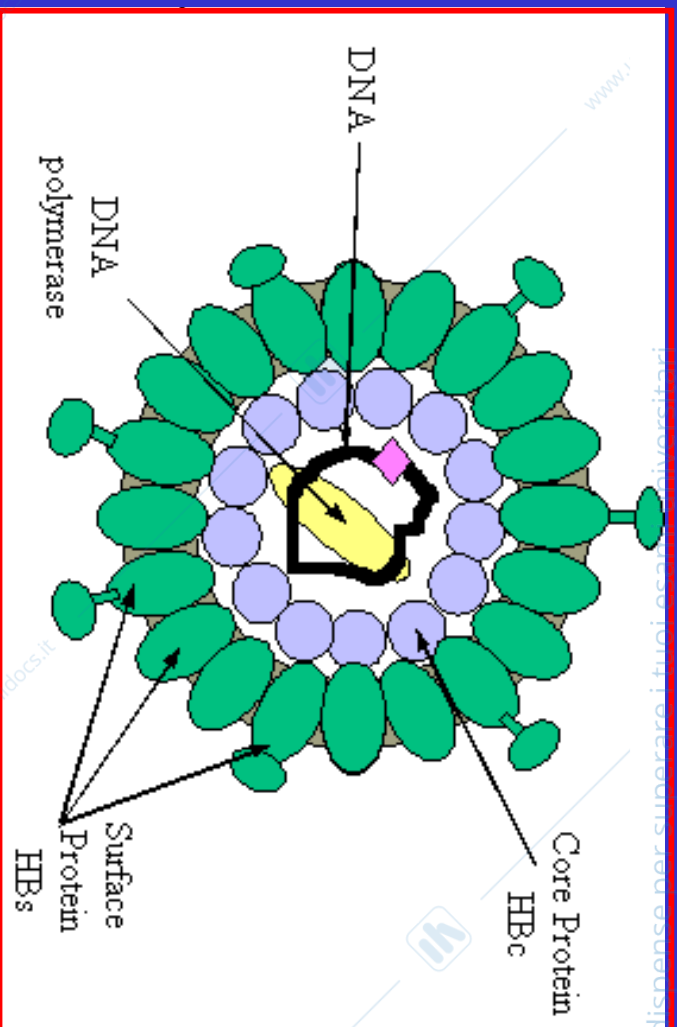
Virioni completi 40-45 nm (particelle di Dane)

Hepatitis B: Struttura

- **Membro di Hepadnaviridae**
- **Virione chiamato anche come particella di Dane (Dane particle)**
- **Virus con envelope**
 - **Core antigen (HbcAg)**
 - **e antigen (HBeAg)**- indicatore di trasmissibilità
 - **(componente derivato da HBcAg)**
- **Può assumere forme sferiche di 22nm e filamentose non contenenti DNA e perciò non infettive**

Hepatitis B virus particles





Il capside icosaedrico contiene la proteina C **HBcAg**

L'**HBcAg** è intimamente associato al nucleocapside ed il suo ruolo non è stato ancora chiarito, può circolare in forma solubile nel siero: è indicatore di replicazione virale

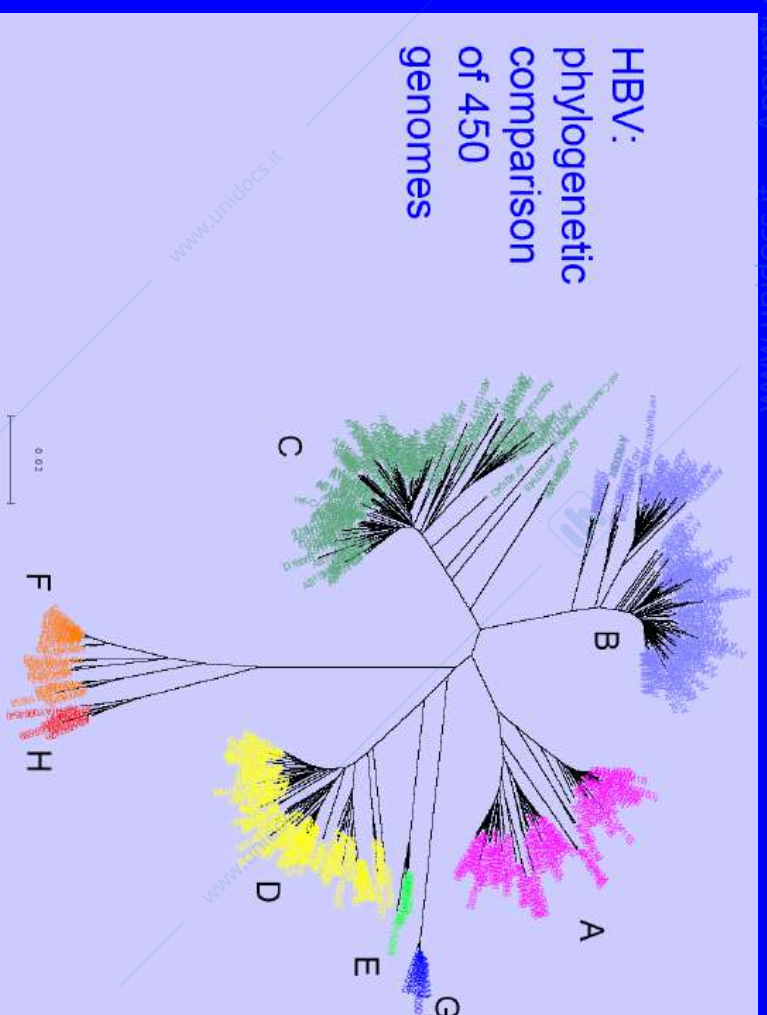
HBx è una proteina di regolazione con proprietà transattivanti

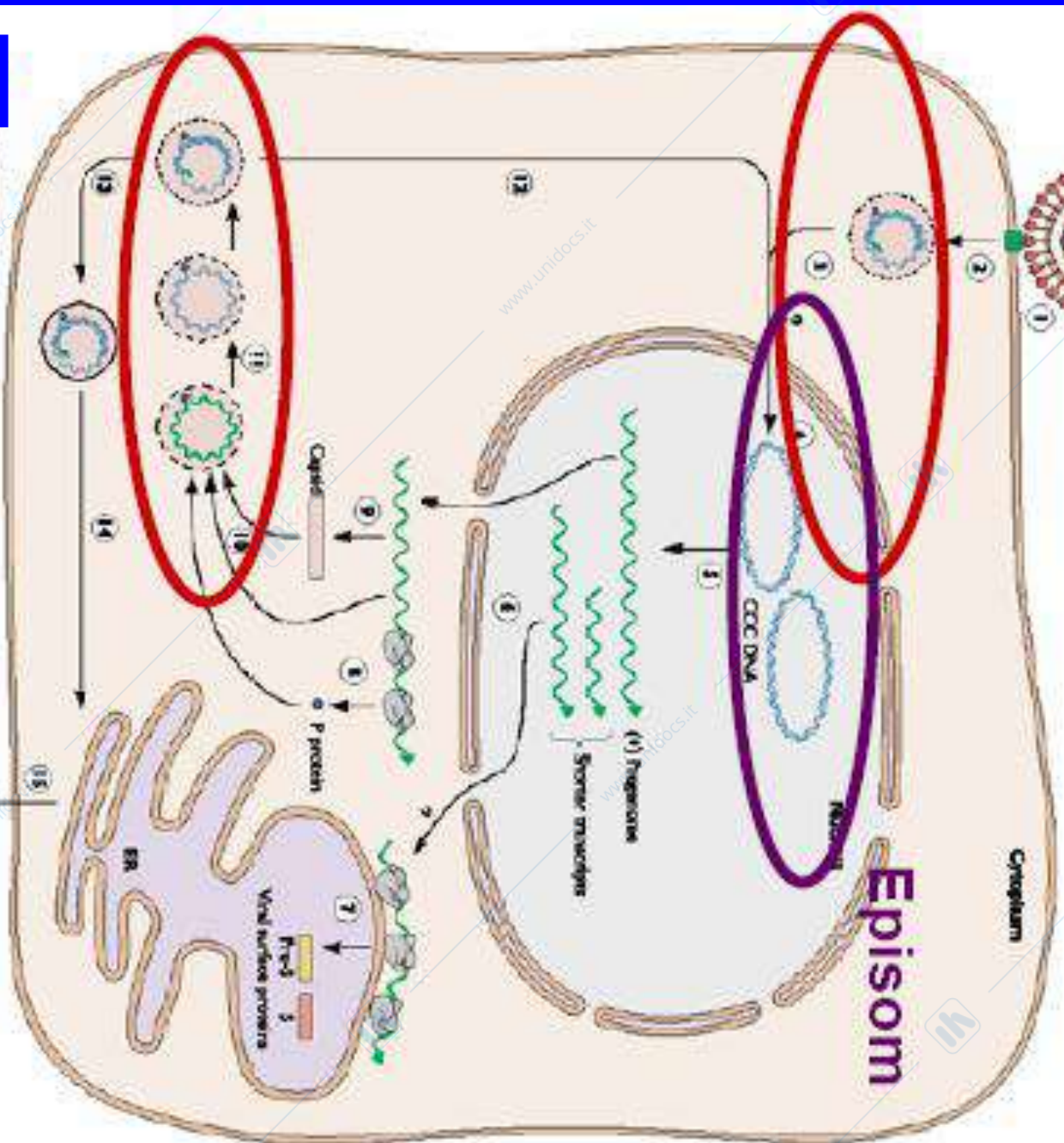
Al DNA è associato il prodotto del gene P = DNA polimerasi RNA dipendente e RNasiH (**Trascrittasi inversa**)

Il DNA è parzialmente bicatenario
Il filamento (-) è a piena lunghezza (3.2kb), quello (+) è di lunghezza variabile (2.5-2.8kb).
Pericapside contenente 3 glicoproteine derivate dal gene S indicate come **HBsAg**

HBV Genotypes

- 8 genotypes classified for hepatitis B virus, designated A-H
 - 19 sub-genotypes known, A1-A2, B1-B4, C1-C4, F1, F2, H (Gerlich, 2004)
- Difference between genotypes is >8% over the entire genome (4% within S gene)
- HBV Genotype distribution differs by geographical area
 - Genotype A Northwest Europe, North America, Central Africa
 - Genotype B Southeast Asia, including China, Japan and Taiwan
 - Genotype C Southeast Asia, including China, Japan
 - Genotype D Mediterranean area, Middle East, India
 - Genotype E Africa
 - Genotype F Native Americans, Polynesians, Central and South America
 - Genotype G United States, France
 - Genotype H Amerindian





Trascrizione inversa

Nel nucleo

DNA parentale
(circolare e parzialmente
bicatenario)

Enzimi cellulari
(sintesi di riparo ?)

RNA-polimerasi cellulare

DNA bicatenario
(iperspiralizzato) **In forma episomale**

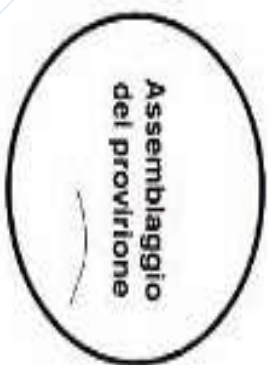
RNA (+) pre-genomico

Trascrizione
parziale

RNA (+) messenger
sub-genomici

Nel citoplasma

Trascrittasi inversa
e
Proteine strutturali



Proteine del pericapside
(e proteina X)

**Può avvenire l'integrazione del DNA
ad opera di meccanismi cellulari
Infezione cronica**

Trascrizione del (+) RNA pre-
genomico ad opera della trascrittasi
inversa, nel complesso RNA/DNA e
successiva conversione del com-
plesso, in DNA circolare, parzial-
mente bicatenario

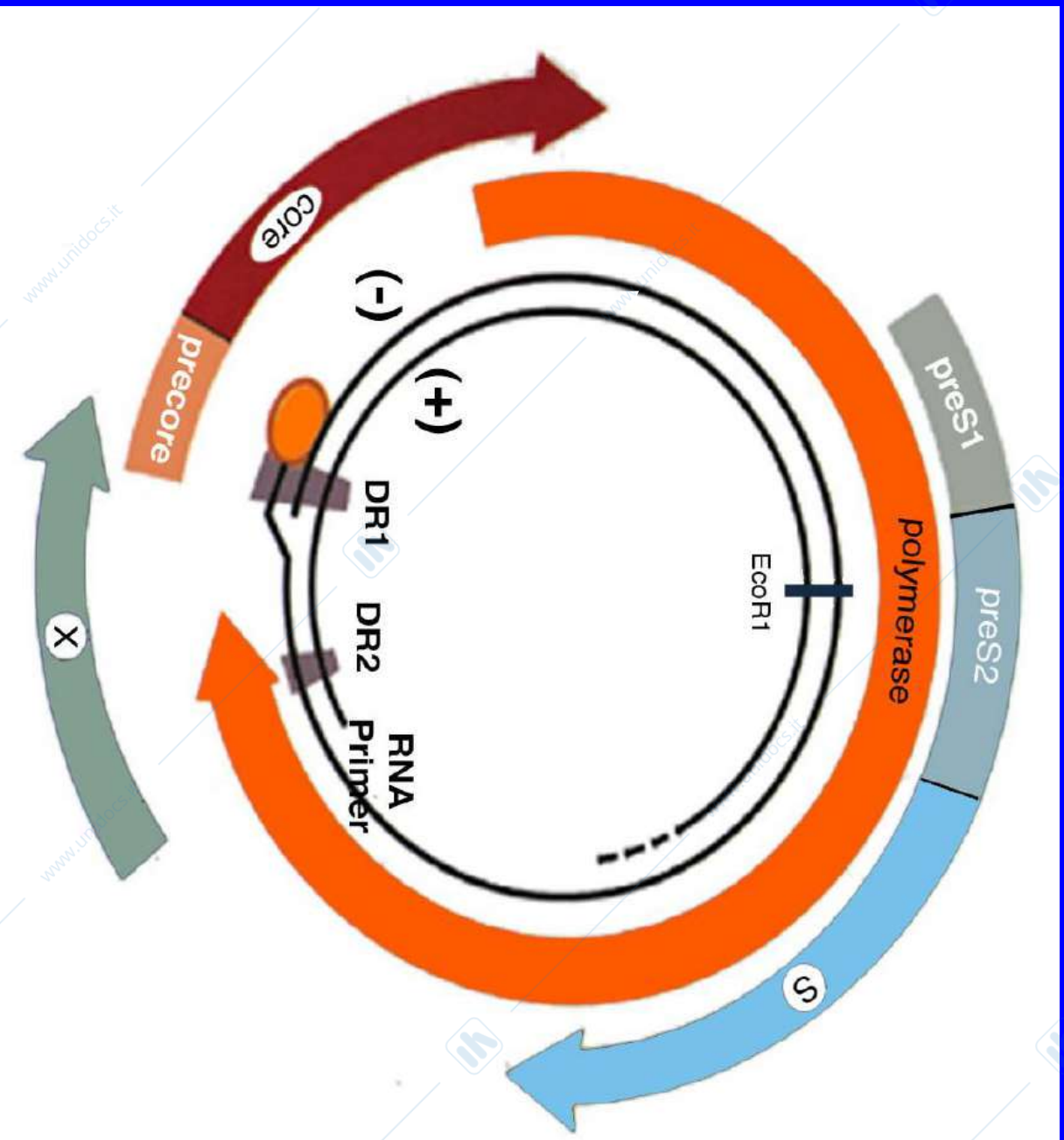
ACQUISIZIONE DEL PERICAPSIDE

Inserimento del nucleocapside

PROGENIE VIRALE

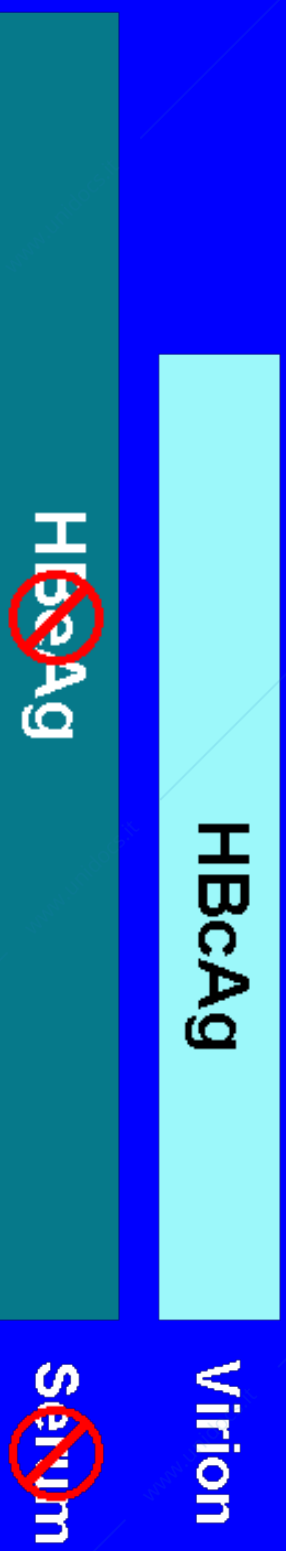
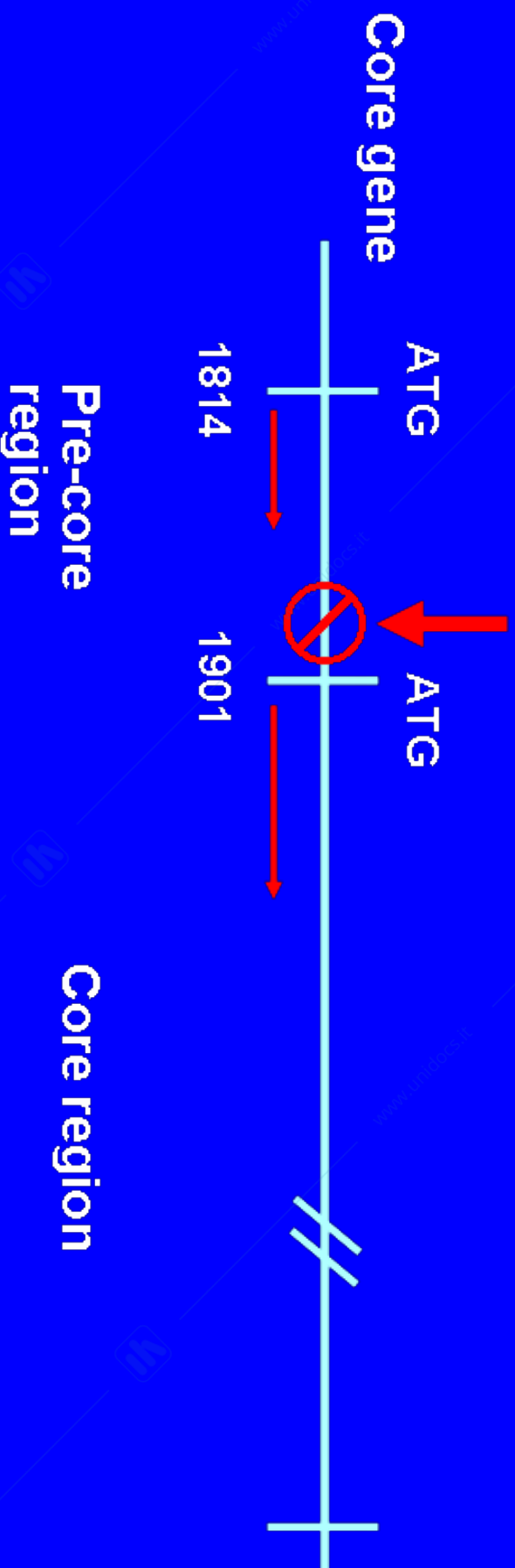
Processo di gemmazione

Genoma HBV



Mutazione del gene per HBcAg

G 1896A = stop codon, TAG



***Questa mutazione (HBeAg-) è
presente in molti soggetti con HBV
cronica***



Difficoltà di diagnosi

Modalità di Trasmissione HBV

- Sessuale
- Parenterale
- Perinatale

Concentrazione HBV in Vari Fluidi biologici

elevata	Moderata	bassa
sangue	liquido seminale	urina
siero	Fluido vaginale	feci
	saliva	lacrime
		Latte materno

HBV Patogenesi

- Il Virus entra nel fegato tramite sangue
- Risposta immune citotossica verso epatociti esprimenti antigeni virali sulla membrana, responsabile della sindrome clinica
- 5 % diventa portatore cronico (HBsAg > 6 mesi)
- Anticorpi anti HBsAg conferiscono immunità duratura

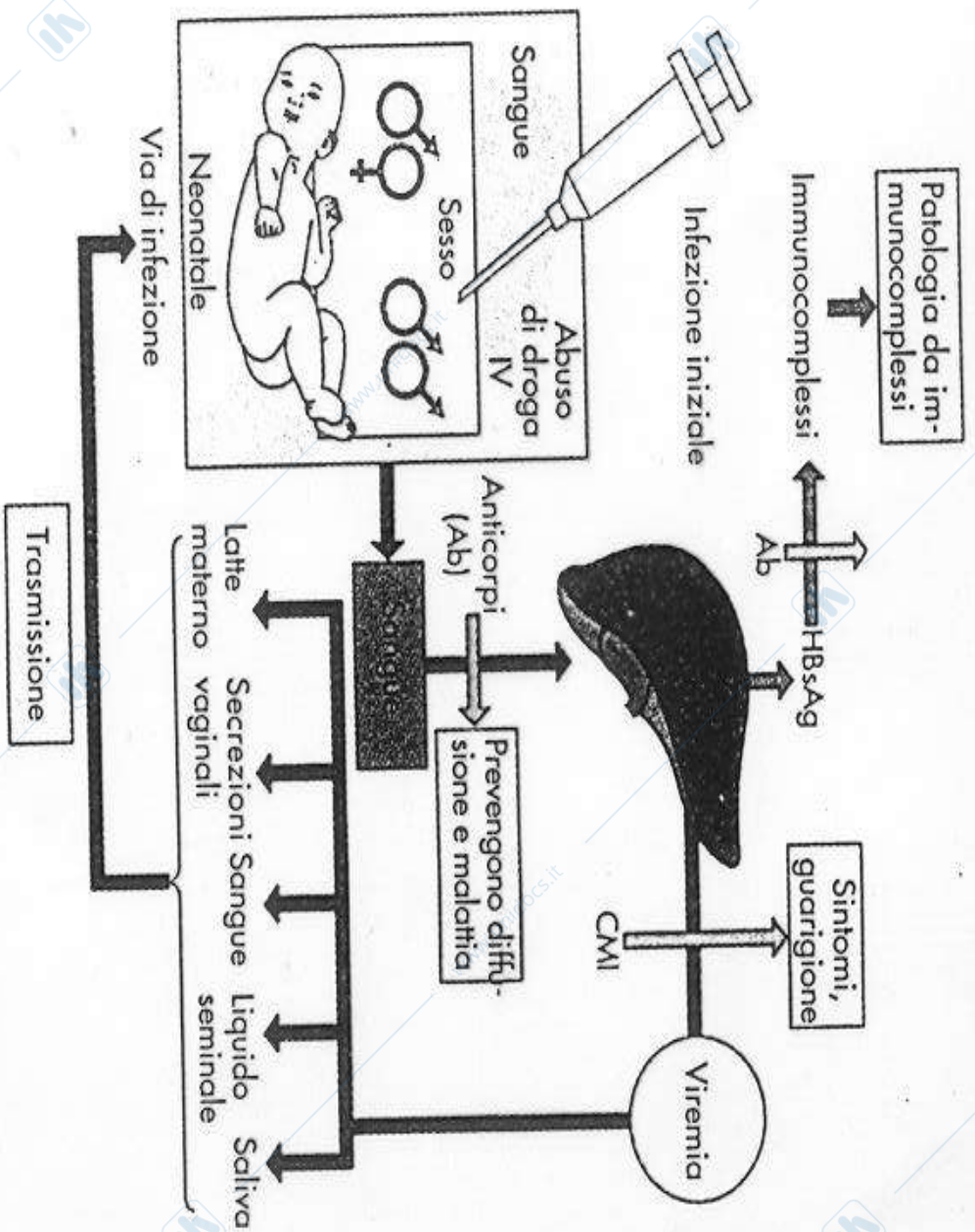
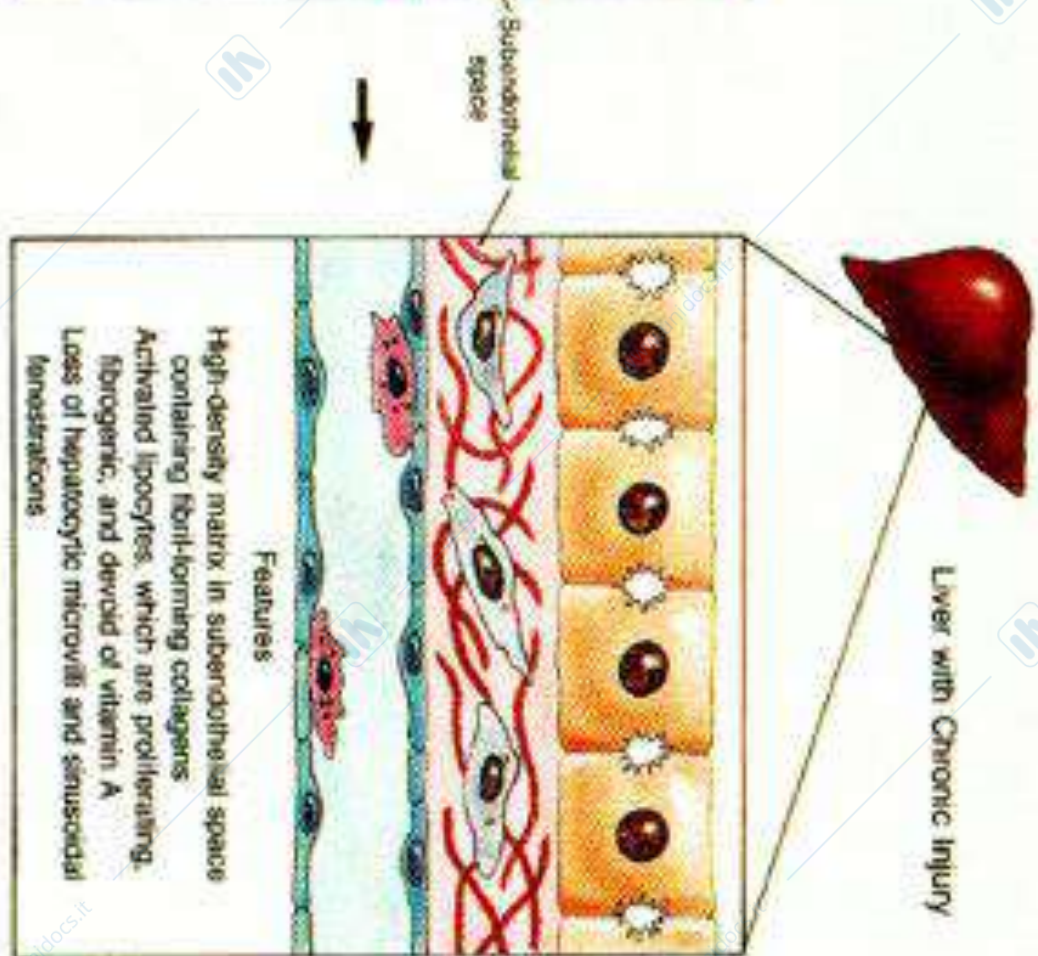
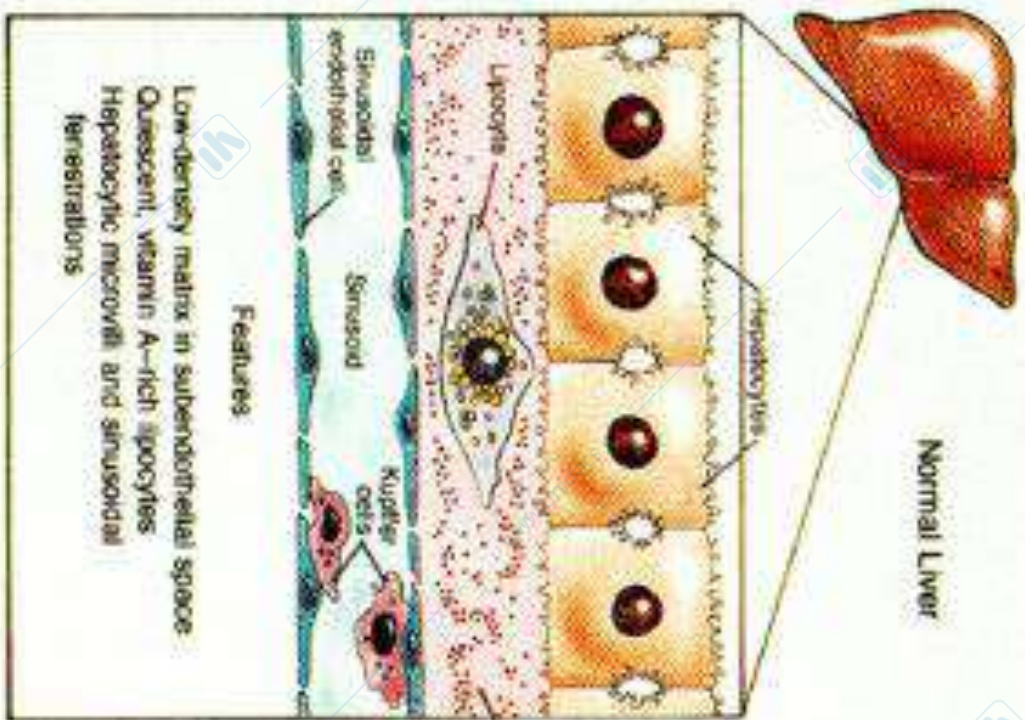


FIGURA 62-8 Diffusione di HBV nel corpo. L'iniziale infezione da HBV si verifica attraverso iniezione, rapporti eterosessuali e omosessuali, ed il parto. Il virus quindi raggiunge il fegato, si replica, determina una viremia e viene trasmesso attraverso varie secrezioni corporee, oltre al sangue, per iniziare un nuovo ciclo. I sintomi sono dovuti all'immunità cellulo-mediata (CMI) e agli immunocomplessi formati dal legame tra anticorpi e HBsAg. IV, via endovenosa.



HBV – integrazione

L'integrazione del DNA degli hepadnavirus avviene presumibilmente ad opera di meccanismi cellulari

In genere si attua durante l'infezione cronica

L'HBV non ha oncogeni

Il gene X viene mantenuto nel processo di integrazione ed il suo prodotto HBx si associa alla proteina p53 inattivandone le funzioni

Hepatitis B – Dati Clinici

- **periodo d' incubazione:** **Media: 60-90**
giorni manifestazione clinica **<5 yrs,**
<10%
- **Epatite fulminante:** **0.5%-1%**
≥5 yrs, 30%-50%
1/3 adulti-no sintomi
- **Infezione cronica:** **<5 yrs, 30%-90%**
≥5 yrs, 2%-10%
- **Prematura mortalità**
- **da epatite cronica:** **15%-25%**

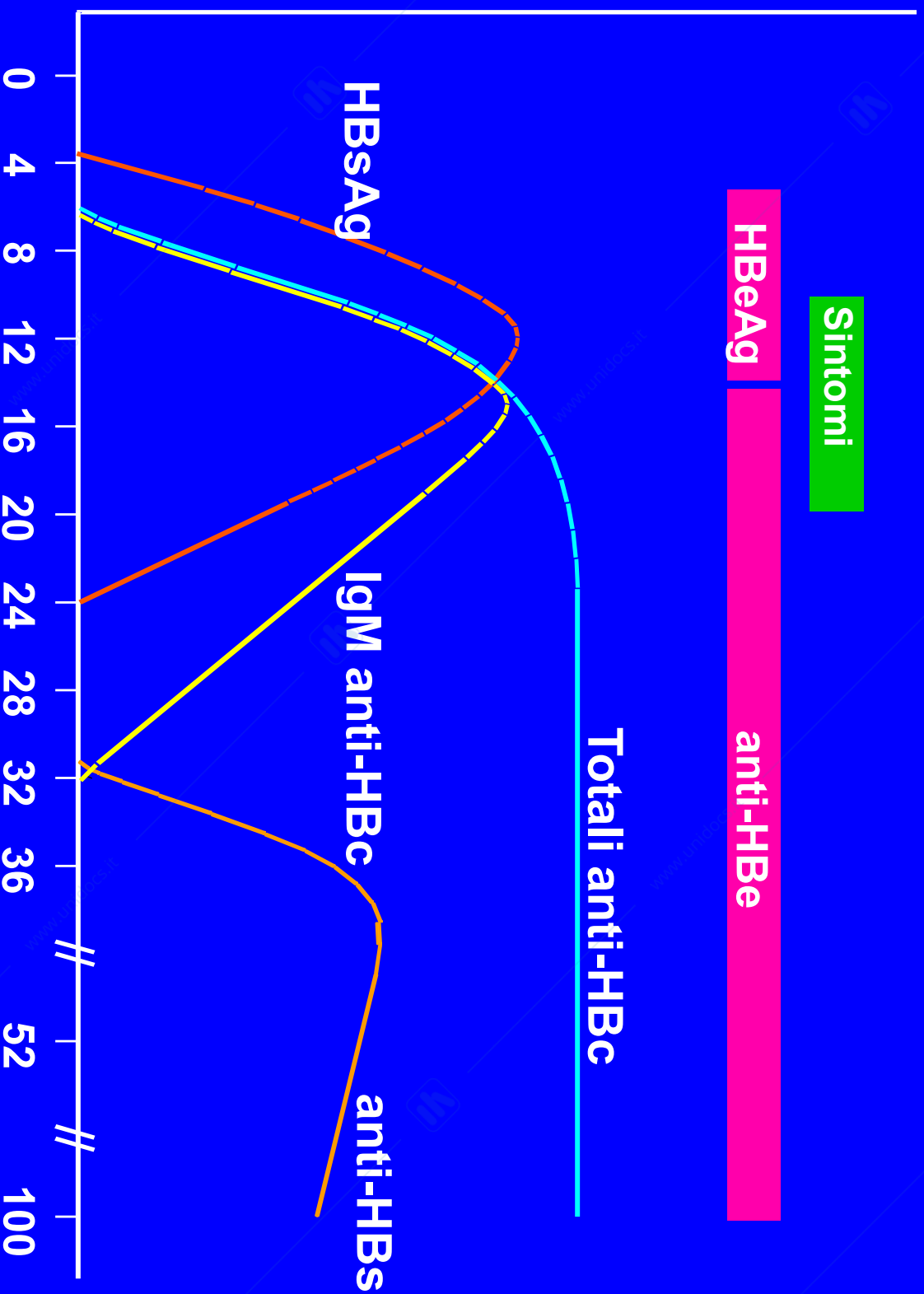
Infezione acuta da HBV con guarigione Tipico corso sierologico

Sintomi

HBeAg

anti-HBe

Titolo



Settimane dopo l'esposizione

l'esposizione

Progressione ad infezione cronica da HBV

Tipico corso sierologico

Acuta
(6 mesi)

Cronica
(anni)

HBeAg

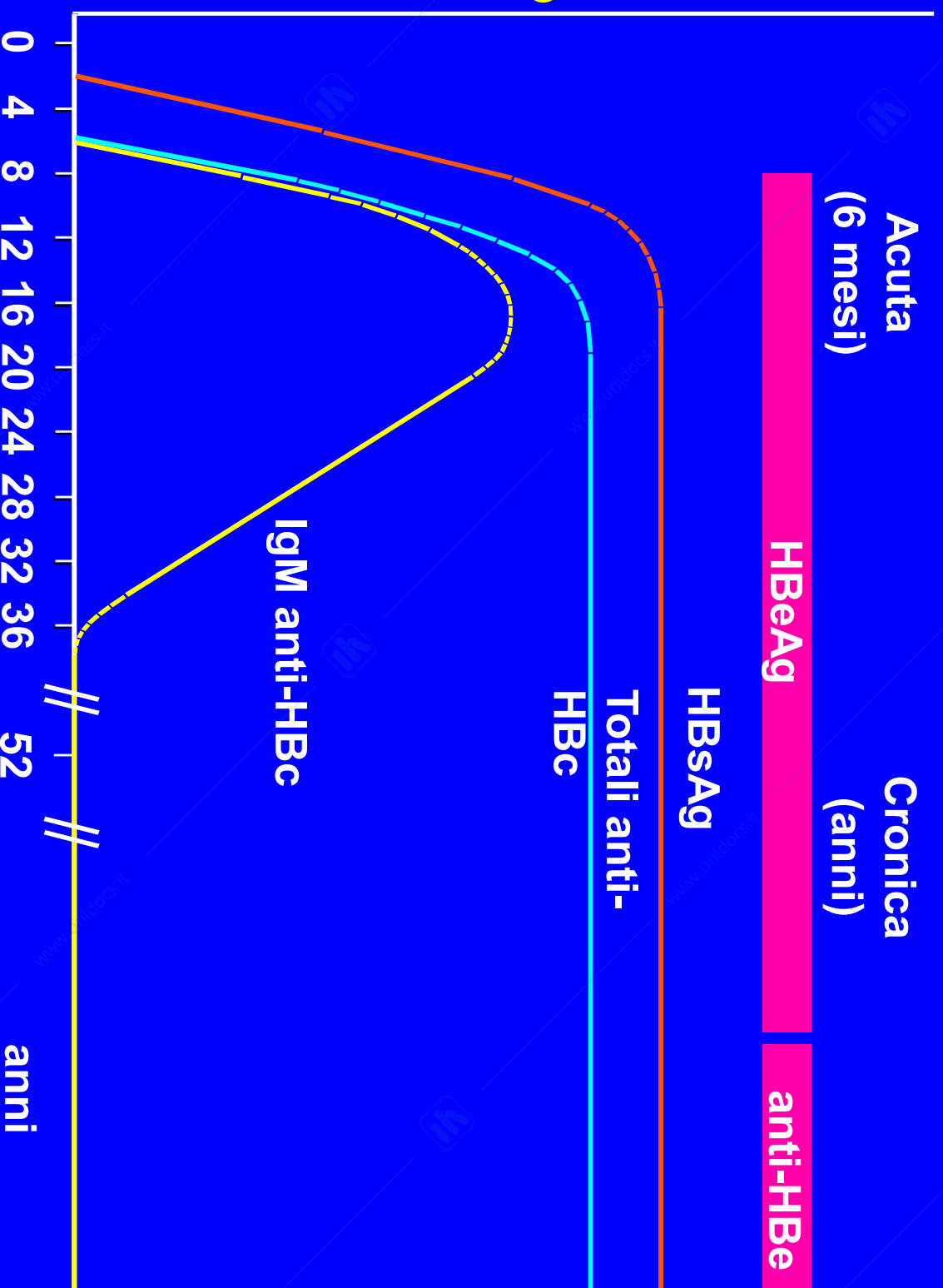
anti-HBe

HBsAg

Totali anti-

HBe

Titolo



Settimane dopo l'esposizione

Diagnosi HBV

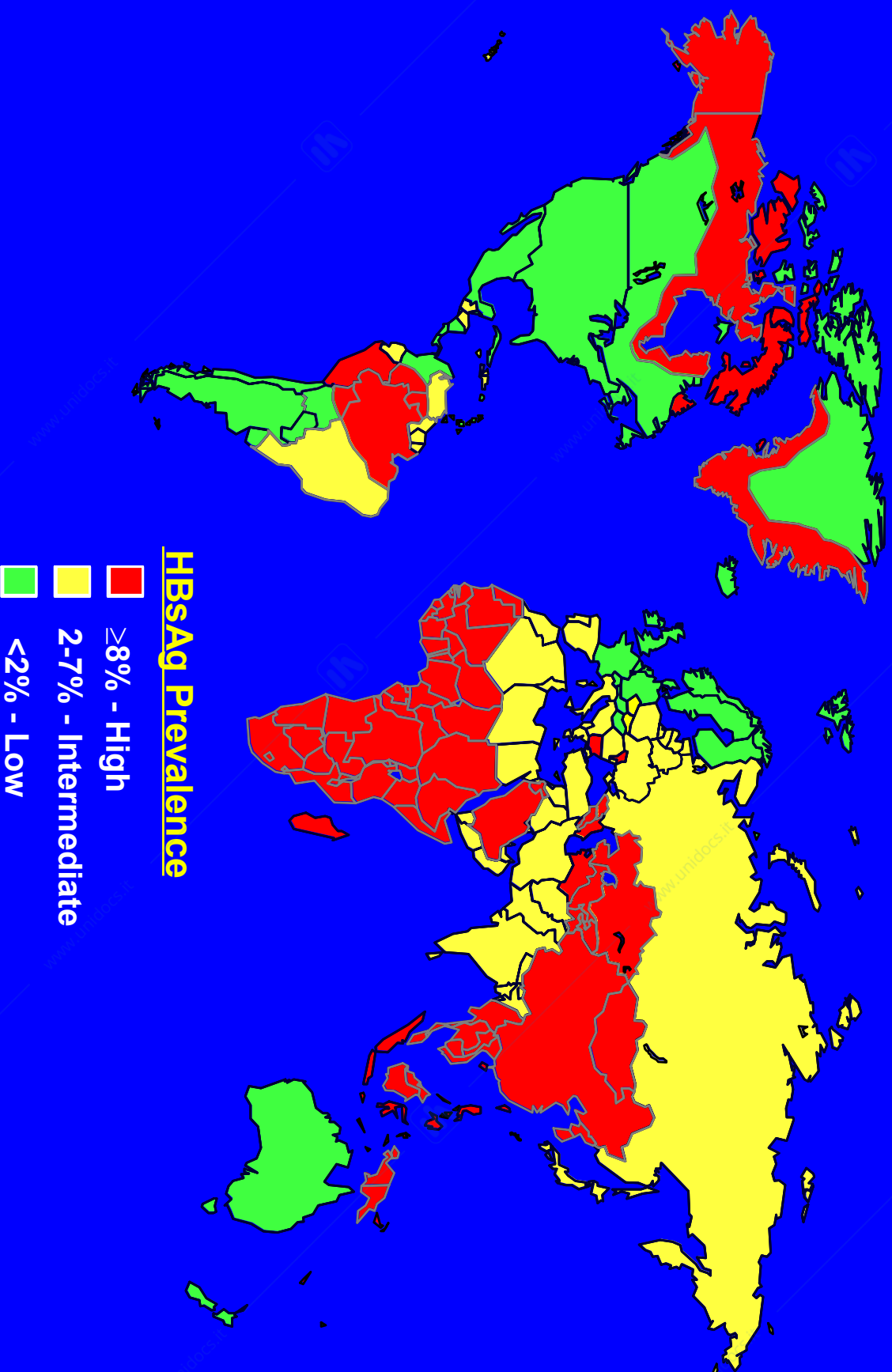
- Una batteria di test sierologici sono utilizzati per la diagnosi di epatite acuta e cronica di infezione da HBV.
- **HBsAg** – usato come marker generale di infezione.
- **HBsAb** – anticorpi che documentano l'avvenuta infezione
- **anti-HBc IgM** - marker di infezione acuta.
- **anti-HBc IgG** - anticorpi che documentano infezione passata o cronica.
- **HBcAg** – marker che indica replicazione attiva del virus e perciò infettività
- **Anti-HBe** – anticorpi che documentano l'avvenuta infezione
- **HBV-DNA** –indica replicazione attiva di HBV, più accurata del marker HBcAg, specialmente in casi di mutanti pre-core. Usato anche per monitorare i pazienti in terapia

Tabella 21.2 Ricerca di HBV: interpretazione dei risultati di laboratorio

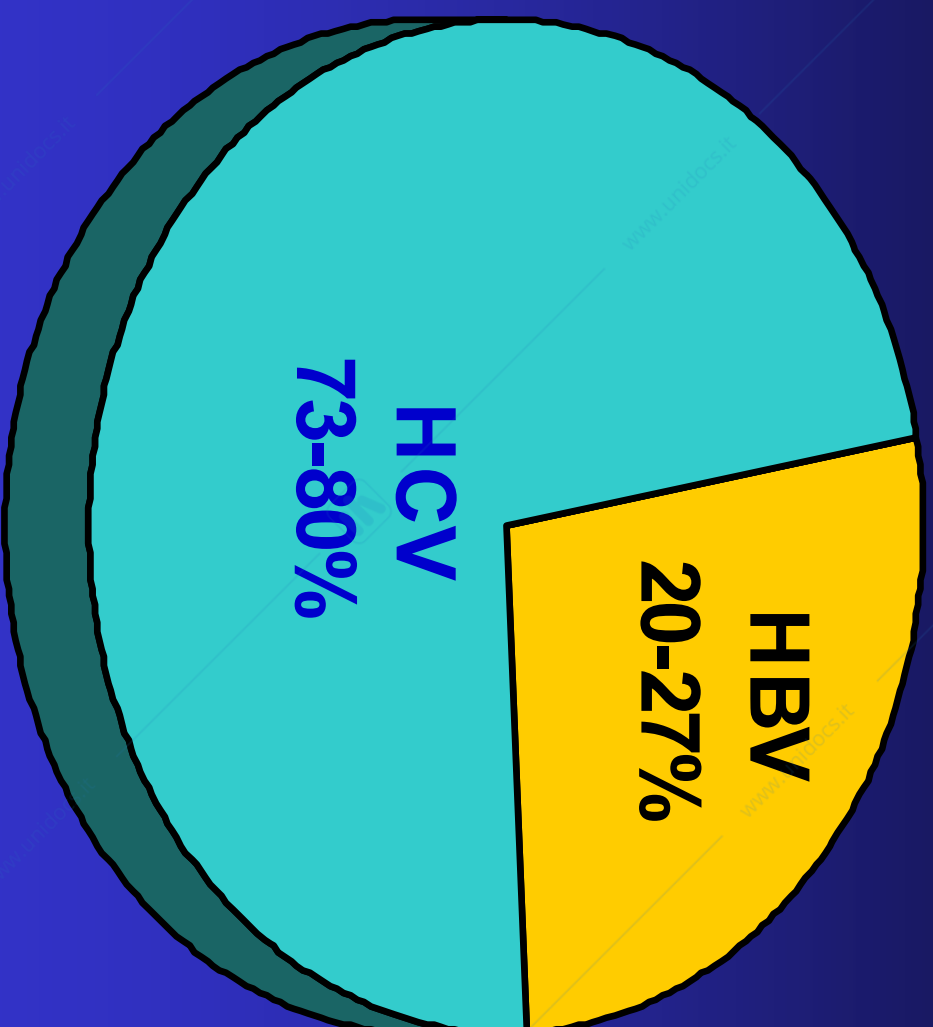
HBV-DNA e DNA-polimerasi	HBSAg	HBeAg*	Anti-HBe	Anti-HBc IgM	Anti-HBc totali (IgM+IgG)	Anti-HBs	Interpretazione
-	-	-	-	-	-	-	Non infezione
-/+	+	-/+	-	-	-	-	Incubazione
+	+	+	-	+	+	-	Epatite acuta
+	-	-	-	+	+	-	Infezione acuta con HBSAg non dosabile
+/-	+	-	+	+/-	+	-	Convalescenza iniziale
-	-	-	+	+/-	+	-	Convalescenza (periodo finestra)
-	-	-	+/-	+/-	+	+	Convalescenza tardiva
-	-	-	-	-	+	+	Guarigione
-	-	-	-	-	+	-	Guarigione con anti-HBs non più dosabile
-	-	-	-	-	-	+	Immunità (vaccinazione)
-	-	-	-	-	+	+	Immunità (infezione remota)
-/+	+++	-	+	-	+	-	Portatore asintomatico (bassa infettività)
+	+	+	-	-	+	-	Portatore (alta infettività)
+	+	-	+	-	+	-	Portatore con pre-core mutato
+	+	+	-	+	+	-	Epatite cronica attiva

* Se il paziente non è infetto con HBV con pre-core mutato.
 ** Positività per più di sei mesi.

Geographic Distribution of Chronic HBV Infection



EPIDEMIOLOGIA DELLE EPATITI CRONICHE VIRALI



Trattamenti correnti per HBV

- Interferon alfa (Intron A)
- Lamivudine (Epivir HBV)
- Adefovir dipivoxil (Hepsera)

PREVENZIONE HBV

E' disponibile un vaccino ricombinante costituito dalla proteina HBsAg prodotta nel lievito.

HBV: IMMUNOPROFILASSI

IMMUNOPROFILASSI PASSIVA:

IN SOGGETTI AD ELEVATO RISCHIO IMMEDIATO (ES.:PUNTURA CON AGO INFETTO).

IMMUNOPROFILASSI ATTIVA:

VACCINO ALLESTITO CON TECNICA DEL DNA RICOMBINANTE

LA SCHEDULA VACCINALE PREVEDE TRE SOMMINISTRAZIONI AL TEMPO 0, 1 E 6 MESI;

NEL NEONATO LE TRE DOSI VENGONO SOMMINISTRATE AL 3° -5° E 11° MESE

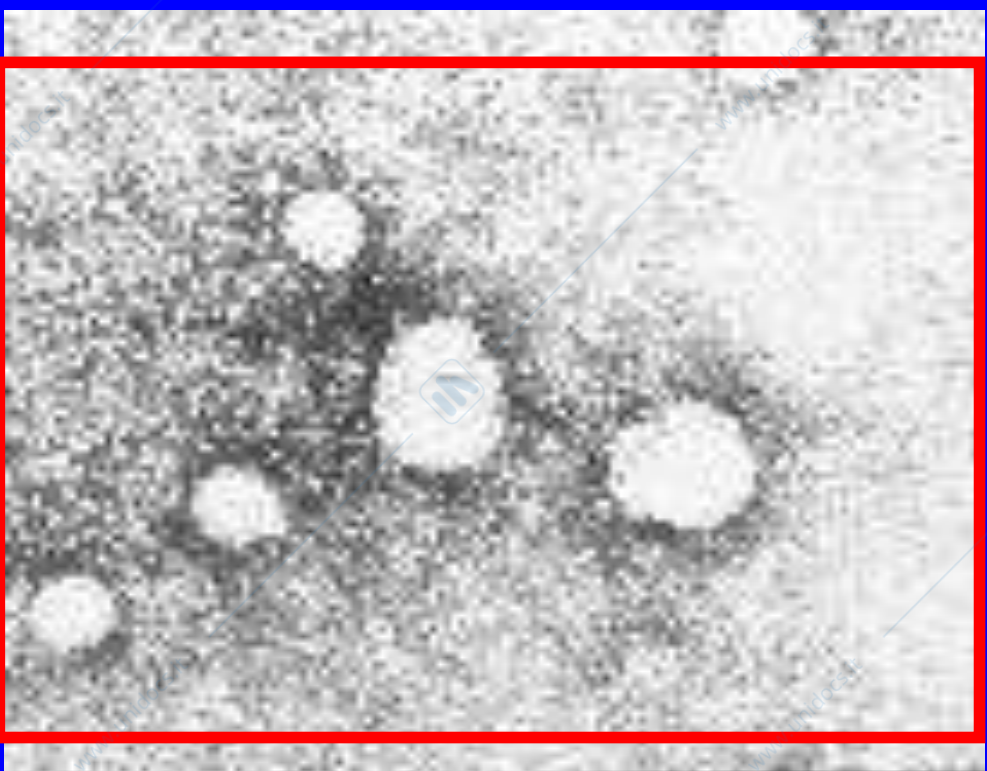
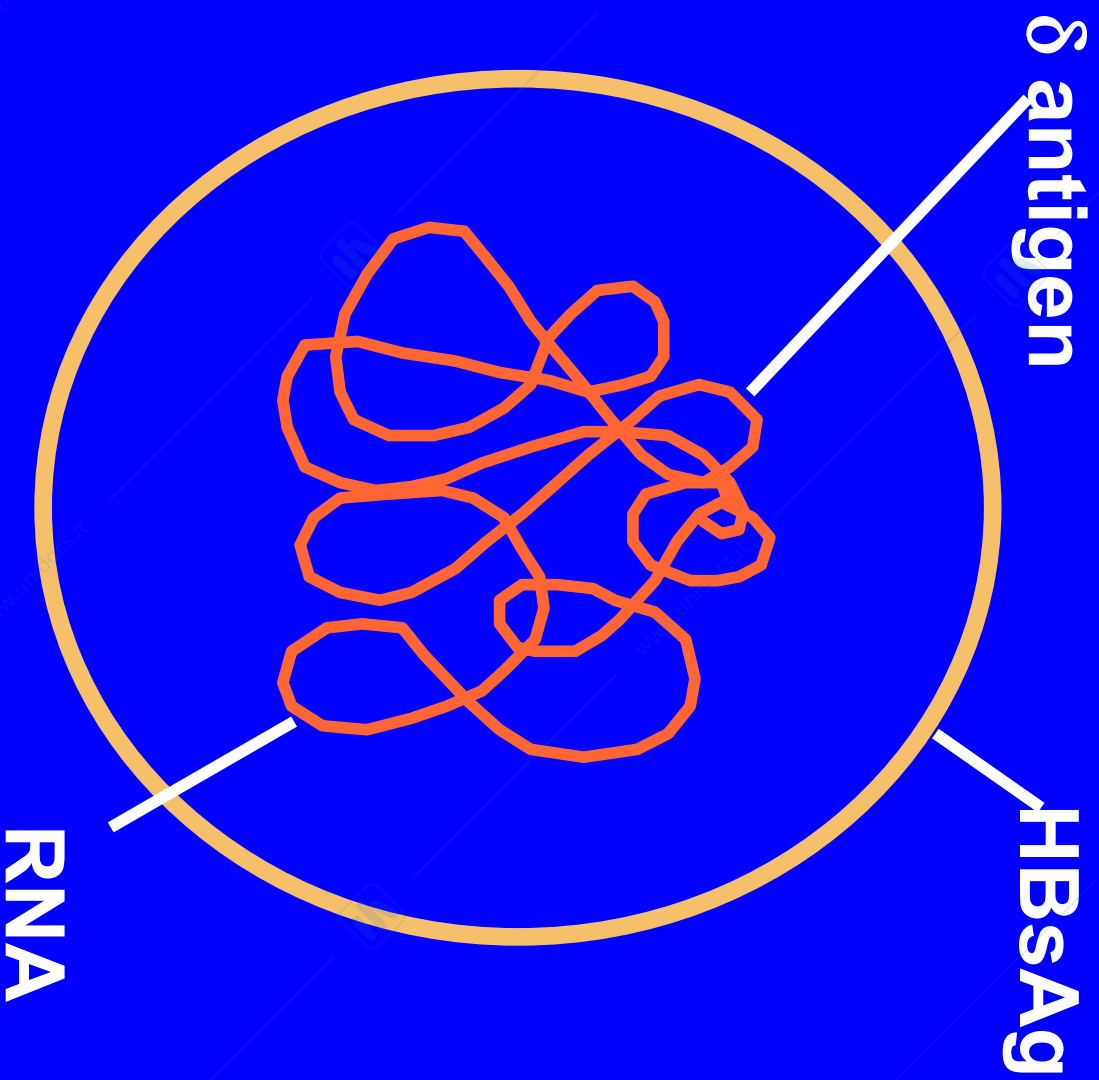
NEI NEONATI CHE NASCONO DA MADRI HBSAg POSITIVE VIENE ADOTTATO LO

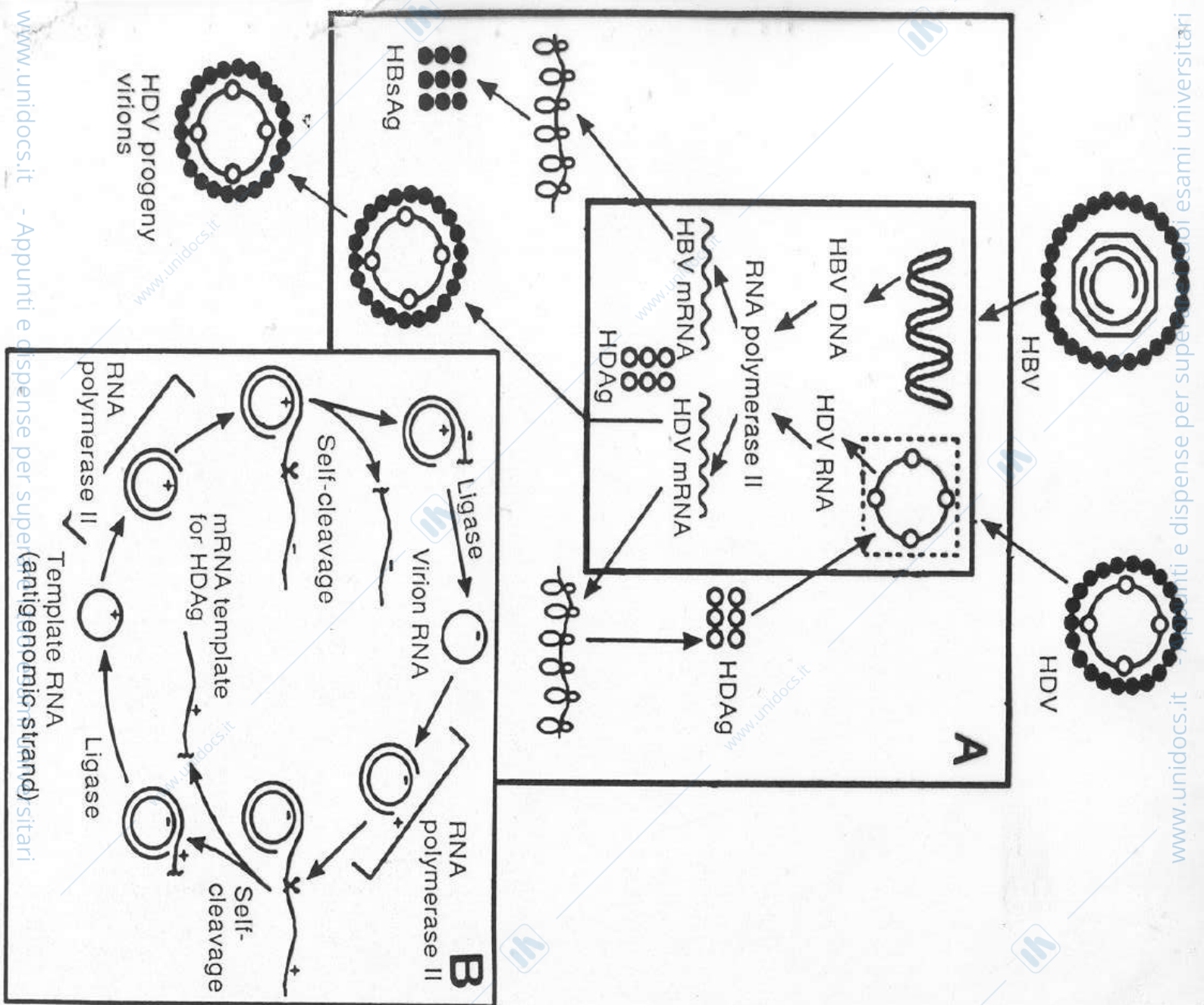
SCHEMA DI VACCINAZIONE A 0, 1, 2, 11 MESI.

VACCINAZIONE OBBLIGATORIA DAL 1990

TERAPIA: INTERFERONE E LAMIVUDINA (inibitore della trascrittasi inversa)

Hepatitis D (Delta) Virus





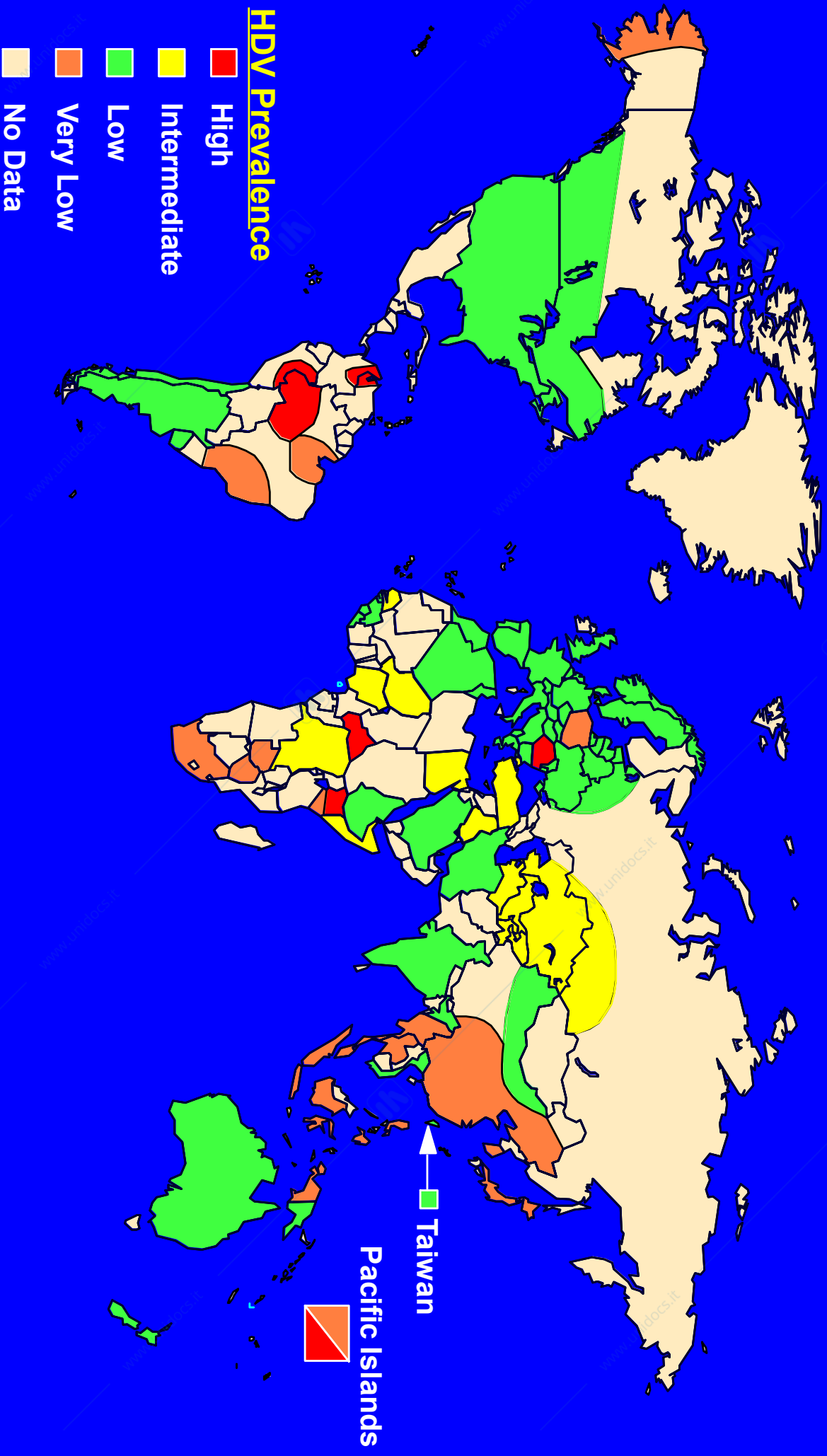
www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

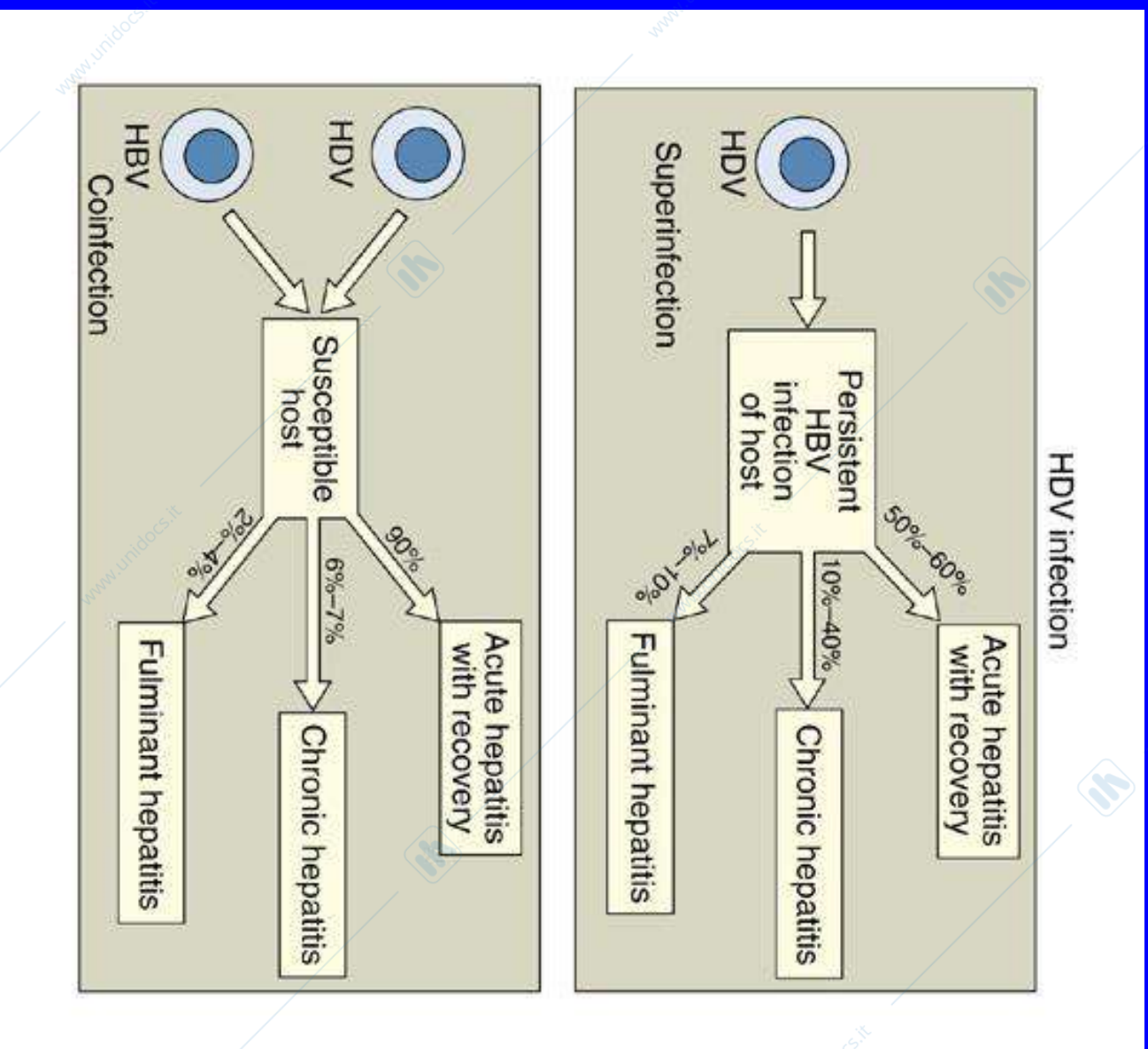
Struttura HDV

- Virus defettivo che richiede la co-infezione con HBV per la replica
- Virus con envelope e genoma a ssRNA -
- Codifica solo 1' antigene delta

Geographic Distribution of HDV Infection



Sequelae of hepatitis D virus



Di solito si sviluppa la forma cronica

Alto rischio di malattia epatica cronica

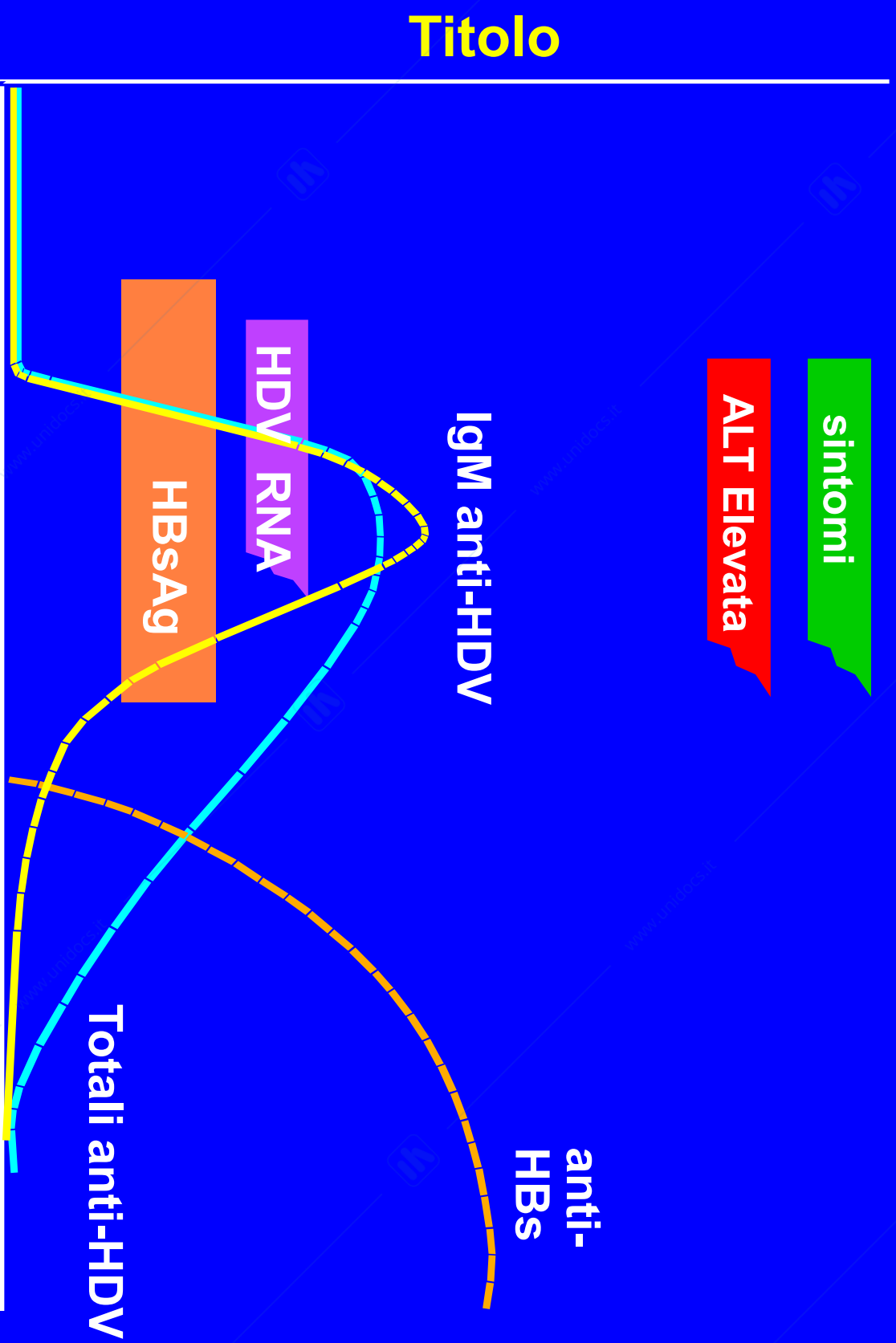
Grave forma acuta di malattia

Bassi rischi di cronicizzazione

HBV - HDV Coinfezione

Tipico Corso Sierologico

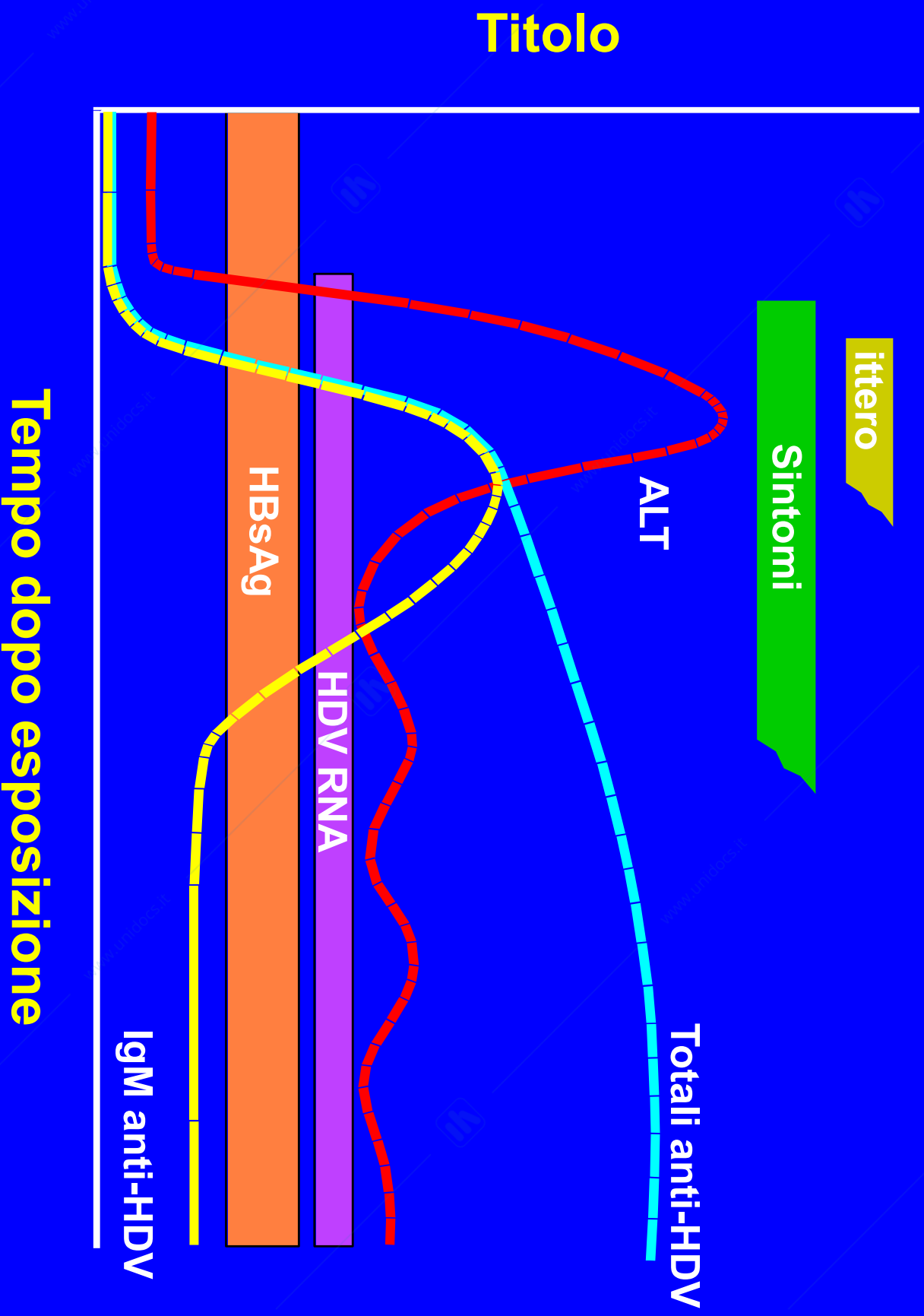
- sintomi
- ALT Elevata



Tempo dopo esposizione

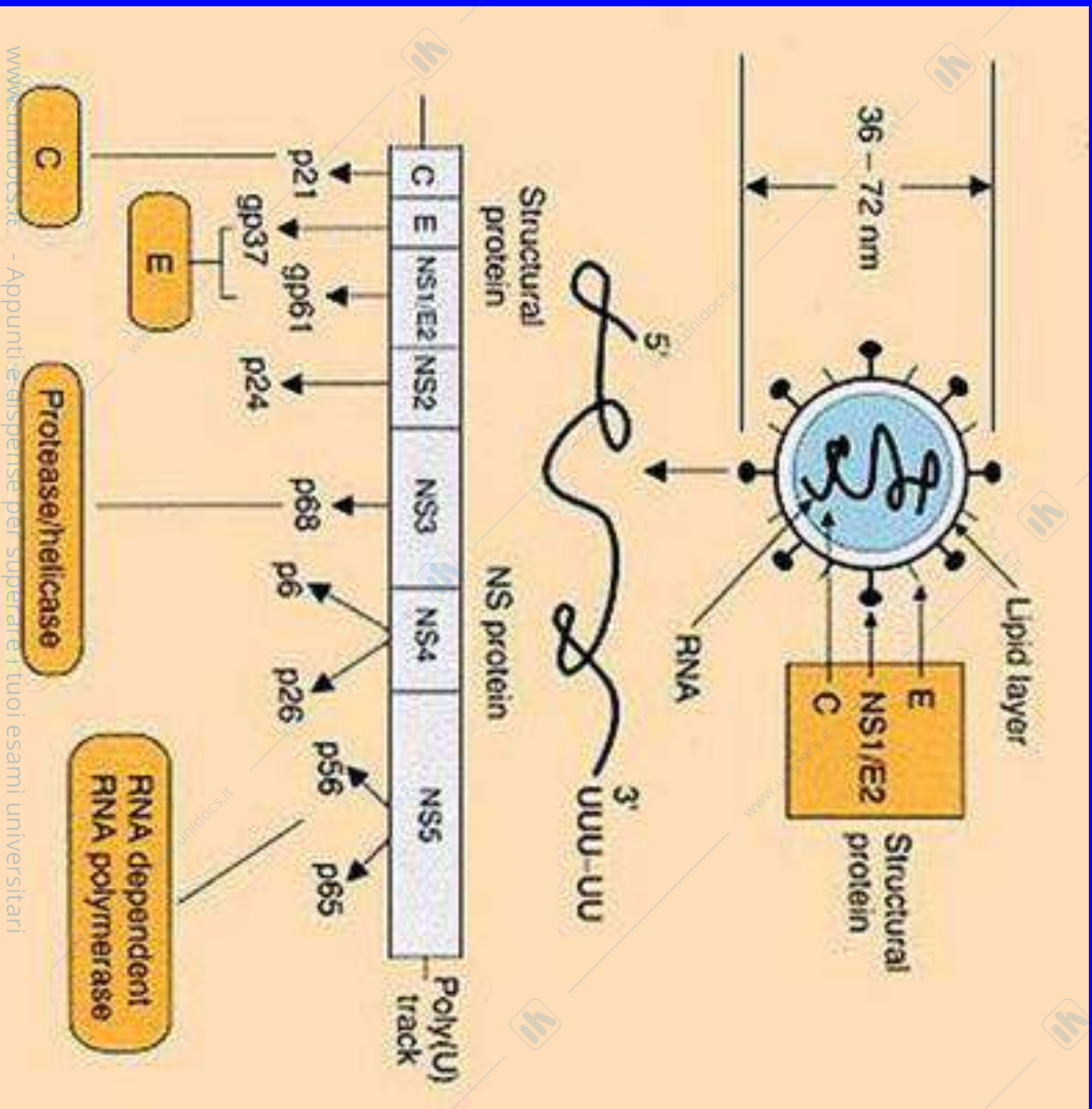
HBV - HDV Superinfezione

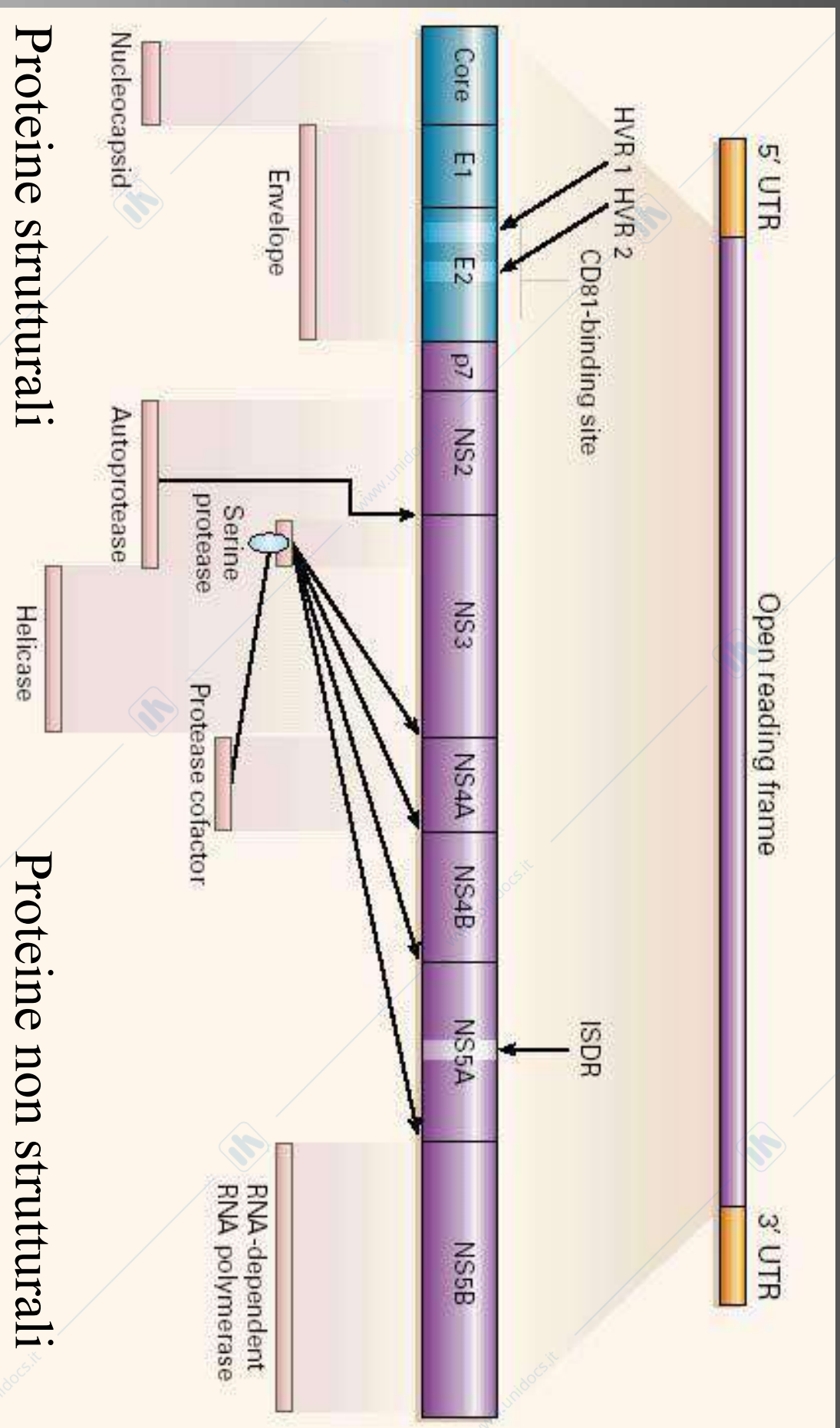
Tipico Corso Sierologico



Tempo dopo esposizione

Hepatitis C virus e genoma





Proteine strutturali

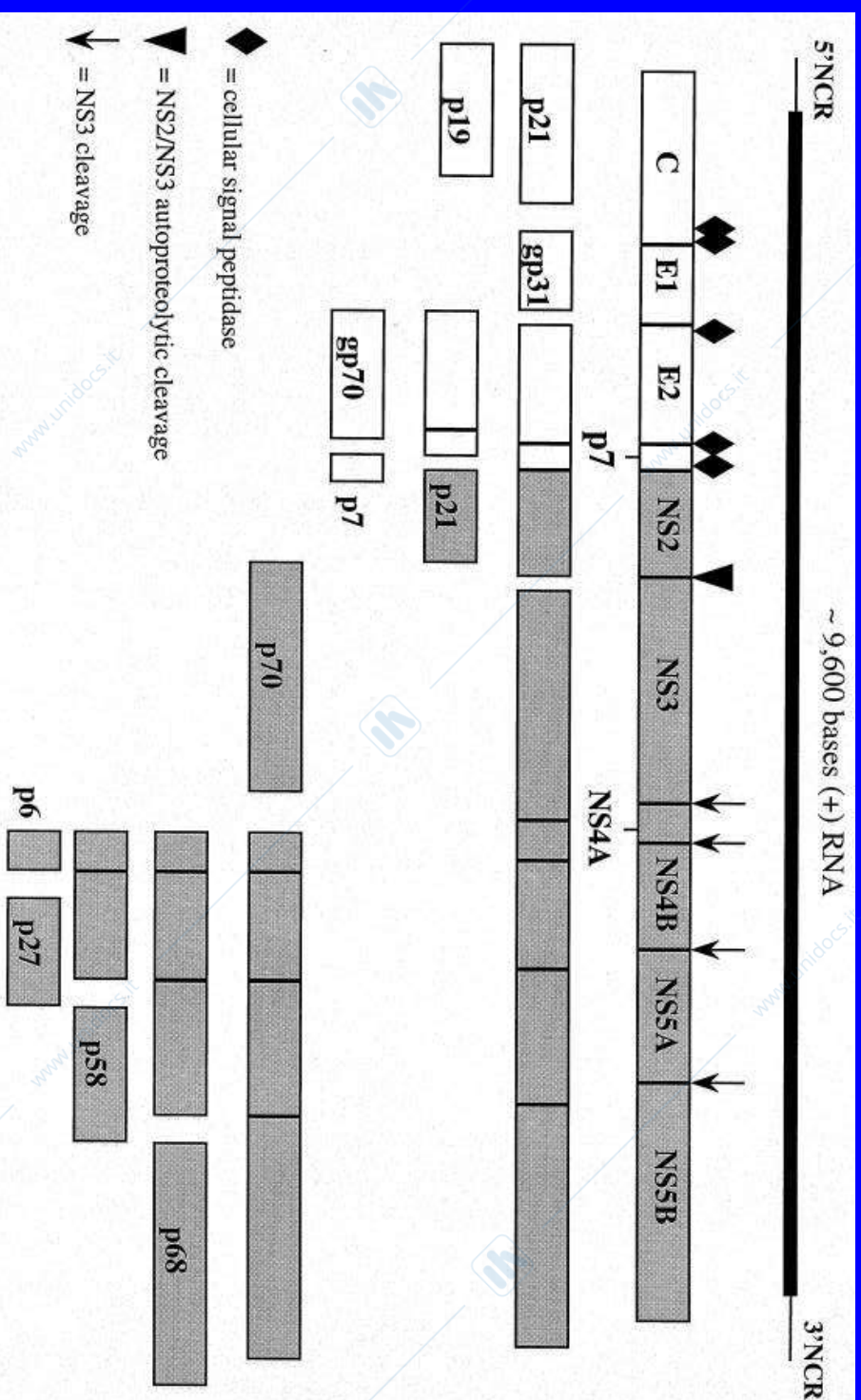
Proteine non strutturali

Il genoma non possiede il cap, pertanto non viene tradotto attraverso meccanismo cap-dipendente

E1 e E2 proteine glicosilate contenenti gli epitopi neutralizzanti

E2 contiene una regione ipervariabile (probabile causa di persistenza)

Structure and processing of the hepatitis C virus (HCV) polyprotein by cellular signal peptidases and virally encoded proteases (NS2/3 and NS3).



HCV Struttura e Classificazione

- Membro della famiglia flaviviridae (altri membri yellow fever and dengue)
- Envelope e ss RNA +
- Reservoirs: uomo e scimpanzè
- 6 sierotipi (genotipi) e molteplici sottotipi

Distribuzione geografica dei genotipi di HCV

Genotipo di HCV

Area geografica

- | | |
|----|---------------------------------------|
| 1a | Europa e USA |
| 1b | USA, Europa, Giappone |
| 2 | Italia, Paesi in via di sviluppo |
| 3 | Paesi occidentali (tossicodipendenti) |
| 4 | Medio Oriente, Africa del Nord |
| 5 | Africa del Sud |
| 6 | Asia |

Modalità di trasmissione dei virus epatitici per via parenterale inapparente.

Trasmissione Parenterale Inapparente

- Strumenti chirurgici non ben sterilizzati:
 - dentista
 - agopuntura
 - ecc.
- Altri strumenti non ben sterilizzati
 - estetista
 - barbiere
 - tatuaggi, piercing
 - ecc.
- Oggetti da toilette taglienti o abrasivi (rasoi, lamette, spazzolini da denti)

Soggetti esposti ad infezione da HCV

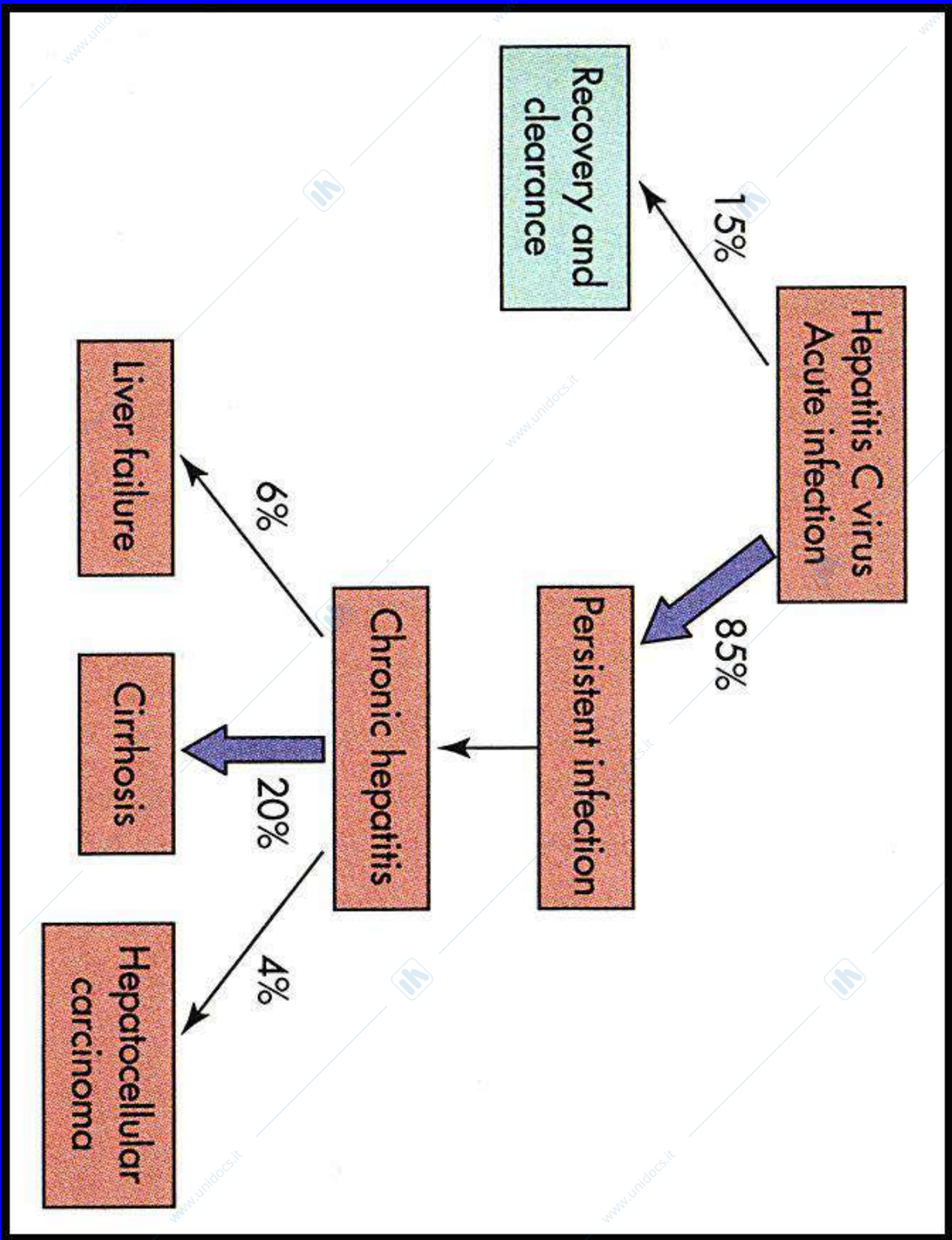
- Tossico-dipendenti
- Politrasfusi, soggetti sottoposti a trapianto,
- Personale a contatto con sangue e suoi derivati
- Via Iatrogena
- Nascita da madre HCV+
- Rapporti sessuali con partners multipli

Hep C: Patogenesi

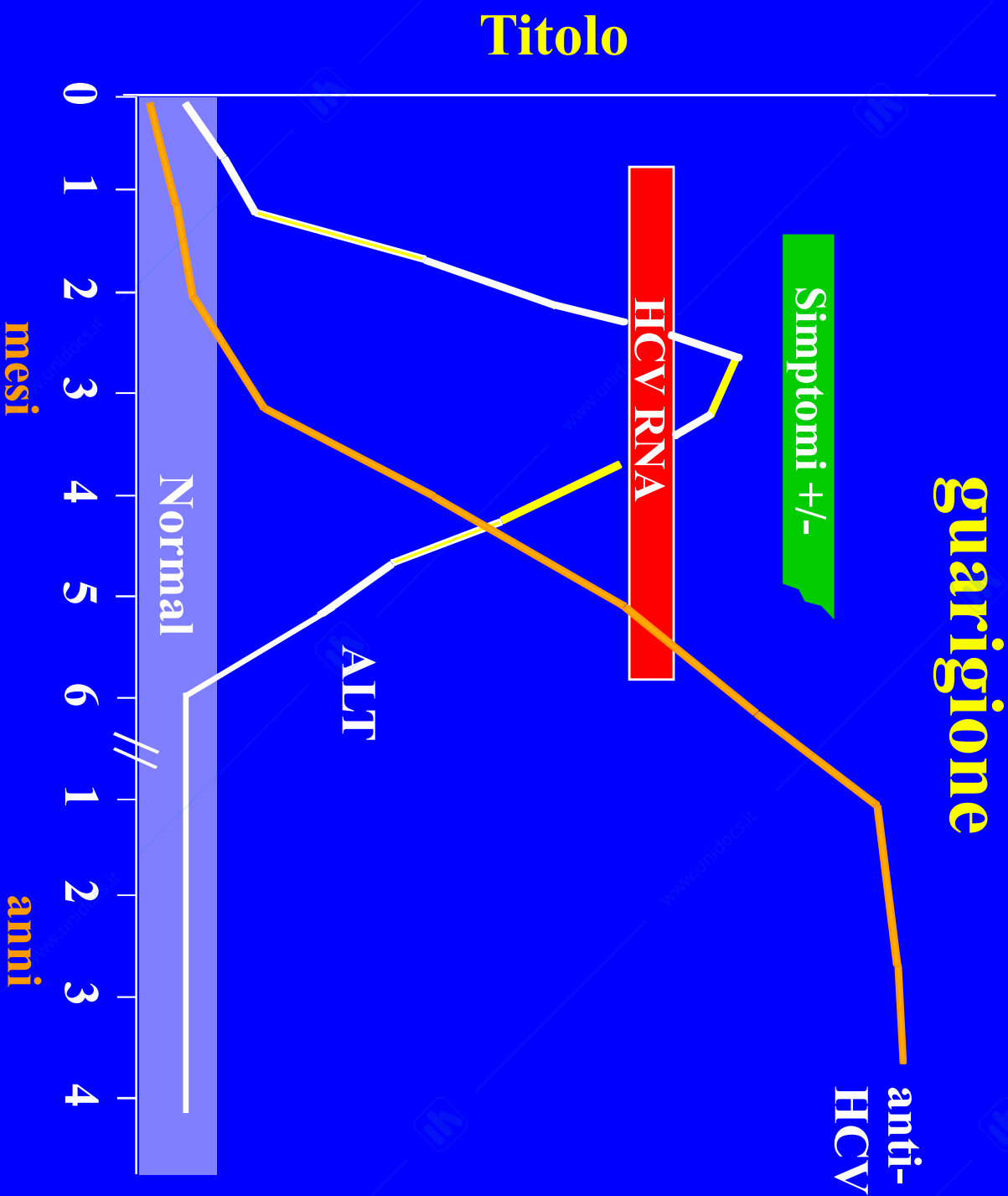
- Patogeno che circola nel sangue ed infetta epatociti
- Danneggiamento epatico dovuto più a fenomeni immunopatologici (mediati per lo più da CD8) che all'azione diretta del virus.
- Può causare cirrosi e, successivamente, epatocarcinoma
- Alcuni genotipi sono più sensibili alla terapia i.e. 2 e 3a

Infezione da Hepatitis C Virus

Periodo d' incubazione	<media 6-7 settimane Range 2-26 settimane
Malattia acuta (ittero) fatalità	media ($\leq 20\%$) bassa
Infezione cronica	60%-85%
Cirrosi	<5%-20%
Mortalità	1%-5%



Sierologia in infezione acuta da HCV con guarigione



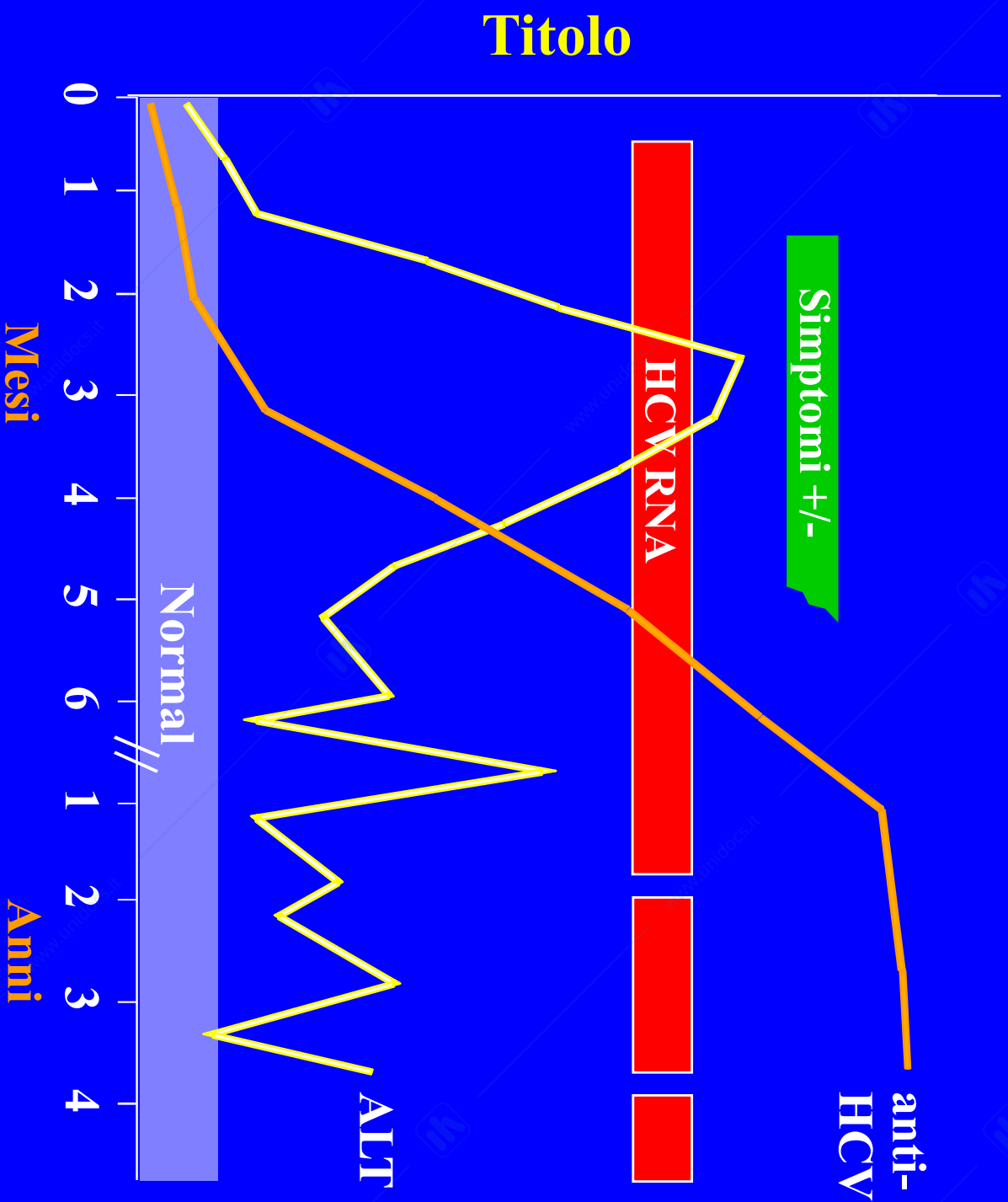
Tempo dopo l'esposizione

mesi

anni



Sierologia in infezione cronica da HCV



Tempo dopo l'esposizione

Mesi

Anni



Trattamento

- **Interferon - peghilato.**
- **Ribavirina** —

Pegasys Dosing Recommendations for Combination Therapy

- Medication supplied in *pre-filled syringes*; no reconstitution required
- Stable until expiration date if stored according to manufacturer's recommendations at 36° to 46°F and protected from light

Genotype	Pegasys Dose	Copegus Dose	Duration
Genotypes 1, 4	180 mcg QW	Patient weight: < 75 kg = 1000 mg ≥ 75 kg = 1200 mg	48 weeks 48 weeks
Genotypes 2, 3	180 mcg QW	800 mg	24 weeks

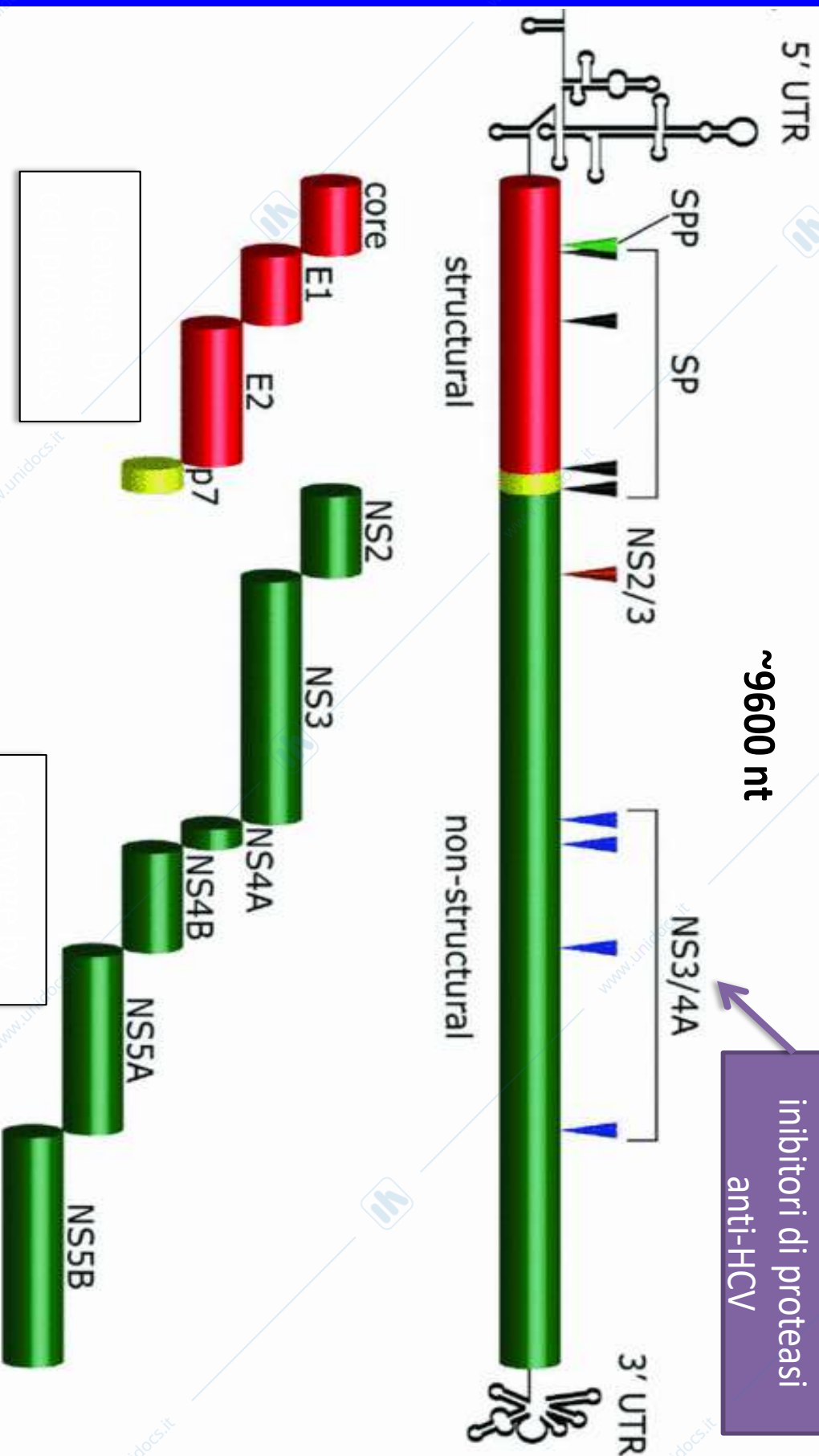
Pegasys (Peginterferon alfa-2a) [package insert]; Hoffmann-La Roche Inc. Nutley, NJ.

Genoma di HCV e processing della poliproteina

virale

~9600 nt

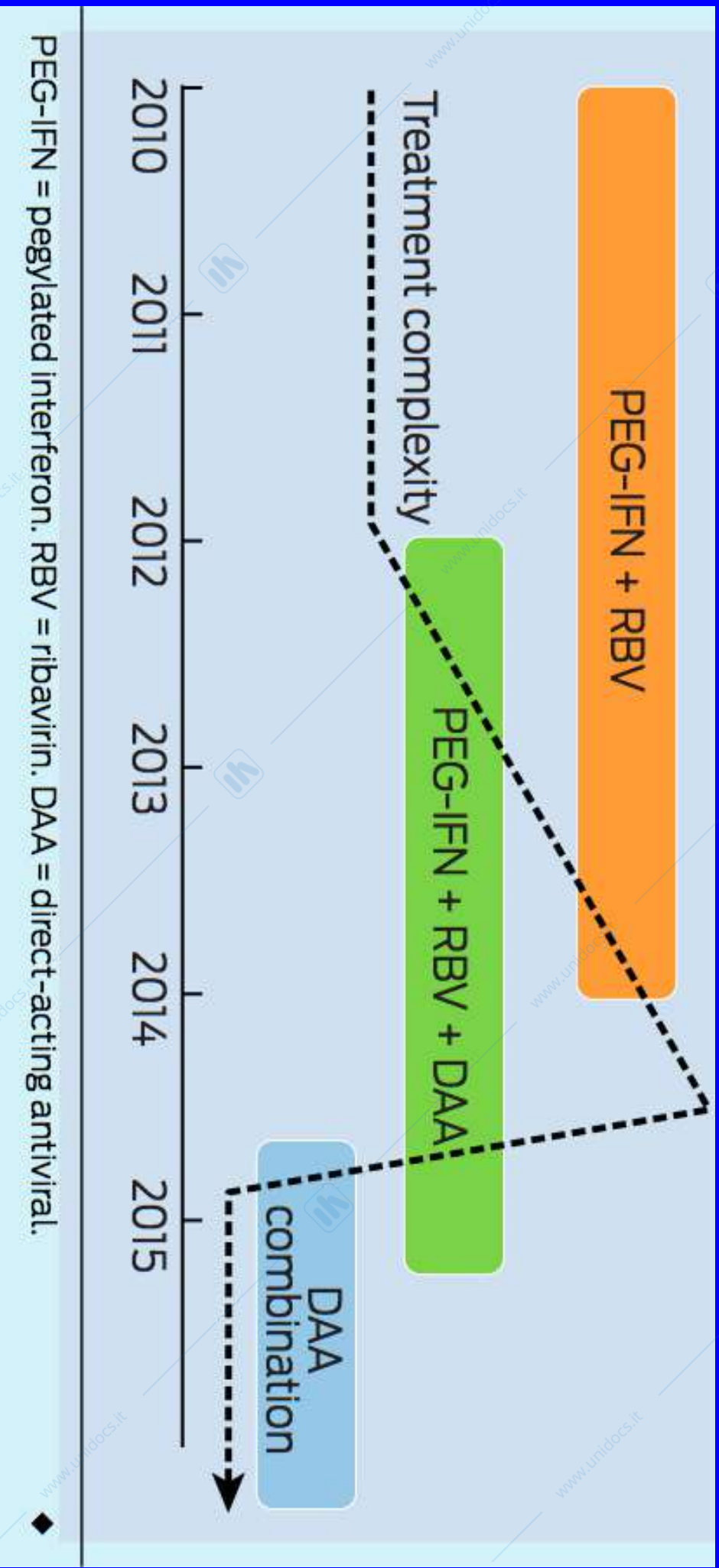
Bersaglio dei nuovi
inibitori di proteasi
anti-HCV



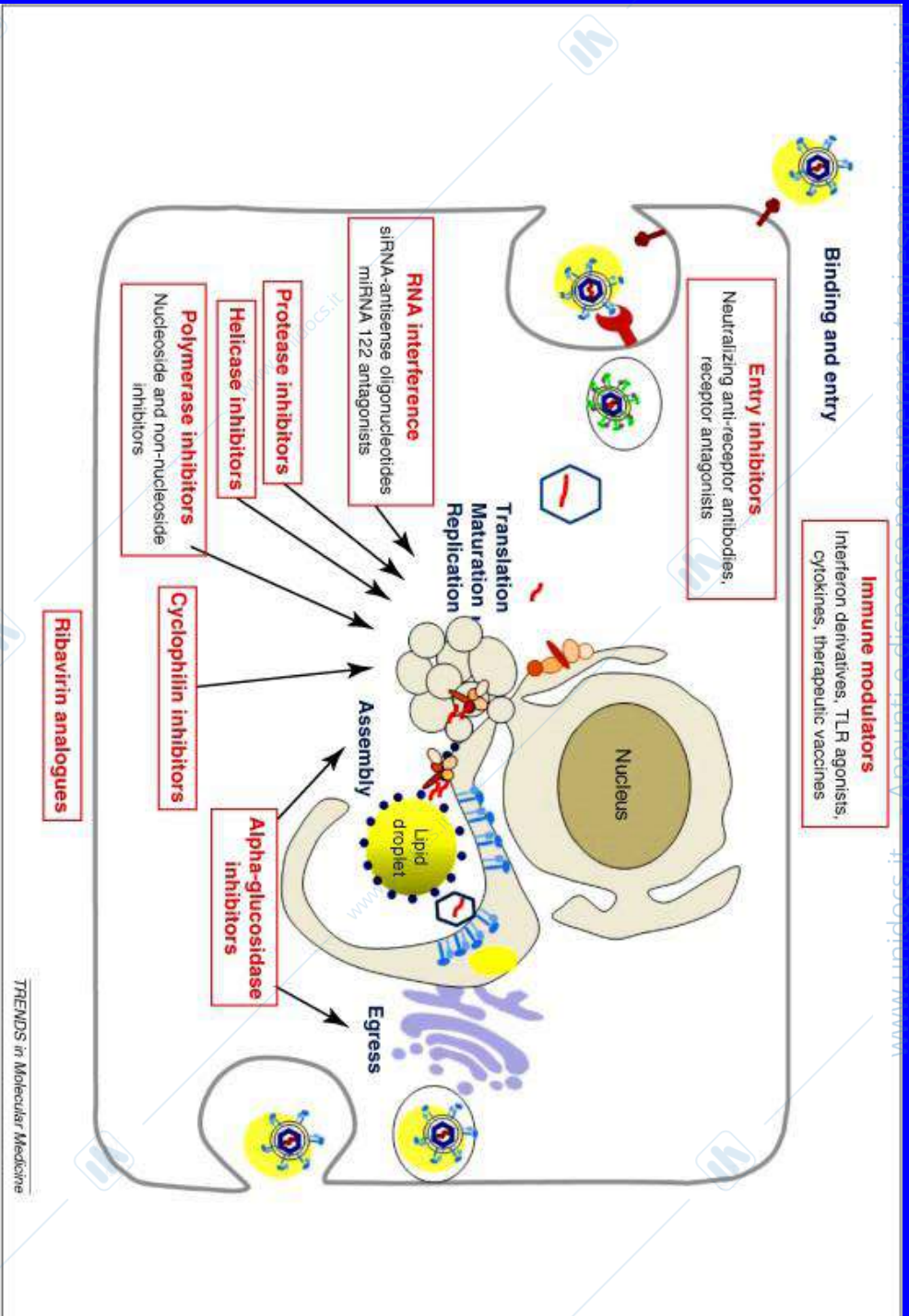
Inibitori della proteasi NS3/4A di HCV

- **NS3** è una proteina multifunzionale
 - Attività di **proteasi** per processare la poliproteina (clivaggio NS3/NS4A/NS4B/NS5A/NS5B)
 - Attività di **elicasi** per svolgere le strutture secondarie del genoma e l'intermedio replicativo RNA \pm
- Agisce assieme al cofattore NS4A
 - NS4A stabilizza NS3 e la associa al sistema di membrane su cui avviene gran parte della replica di HCV

CHANGING HCV TREATMENT LANDSCAPE



Dore GJ Med J Aust, 2012.



Novel antiviral strategies targeting viral and host factors mediating HCV infection. Examples of antiviral strategies currently in the late preclinical or clinical development are shown. Therapeutic strategies are indicated in red (boxes) and are...

Philippe Georgel, Catherine Schuster, Mirjam B. Zeisel, Françoise Stoll-Keller, Thomas Berg, Seiamak Bahram, ...

Virus–host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies

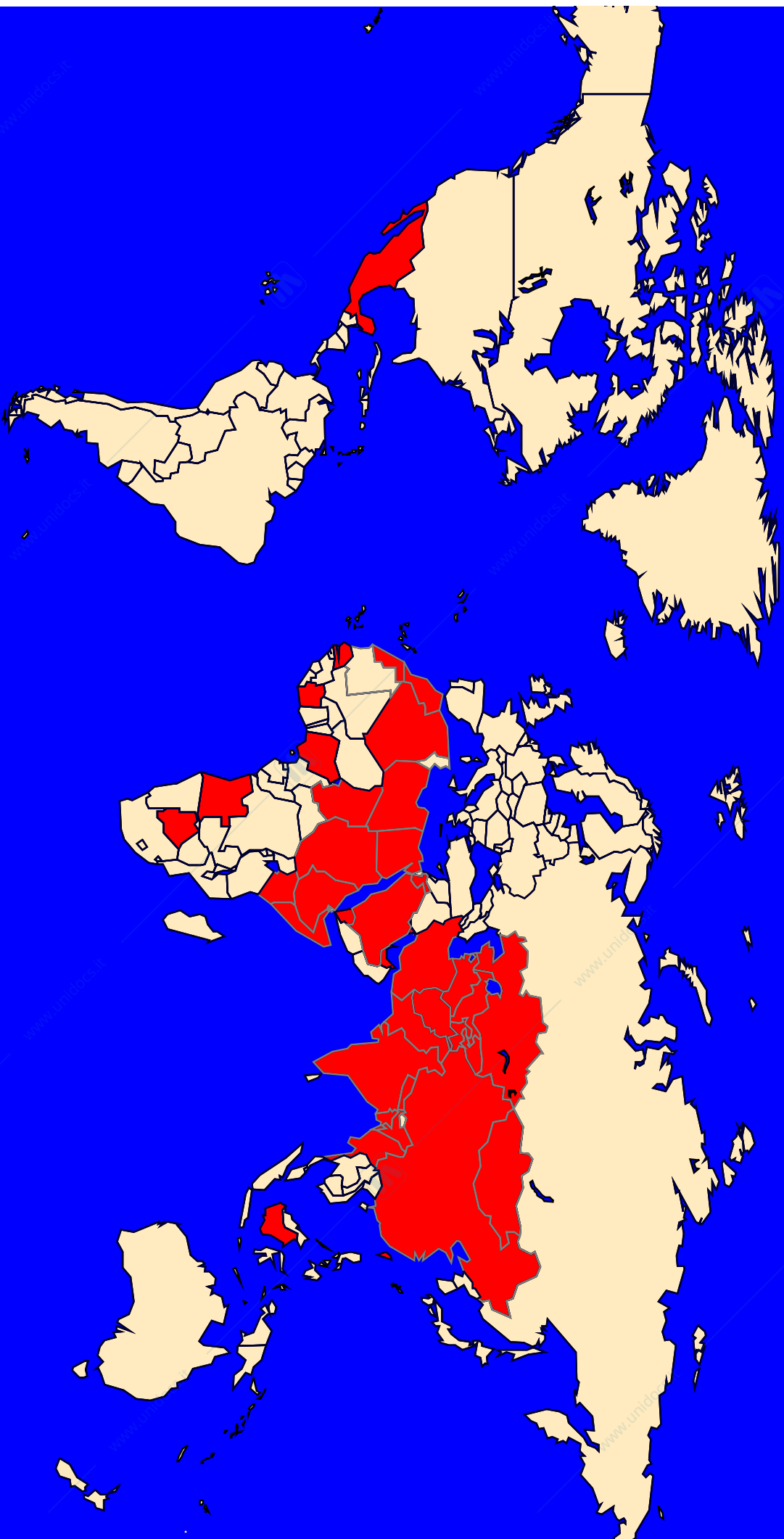
Trends in Molecular Medicine, Volume 16, Issue 6, 2010, 277 - 286

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2010.04.003>

Hepatitis E

- Virus Nudo ss RNA+
- Assomiglia a calicivirus o Norwalk virus
- Malattia simile a quella provocata da HAV, Alta mortalità in donne gravide

Geographic Distribution of Hepatitis E



Hepatitis E -

Dati Epidemiologici

- La maggior parte degli episodi epidemici dovuti a acqua contaminata da materiale fecale
- Minima trasmissione uomo-uomo
- Circola in zone endemiche

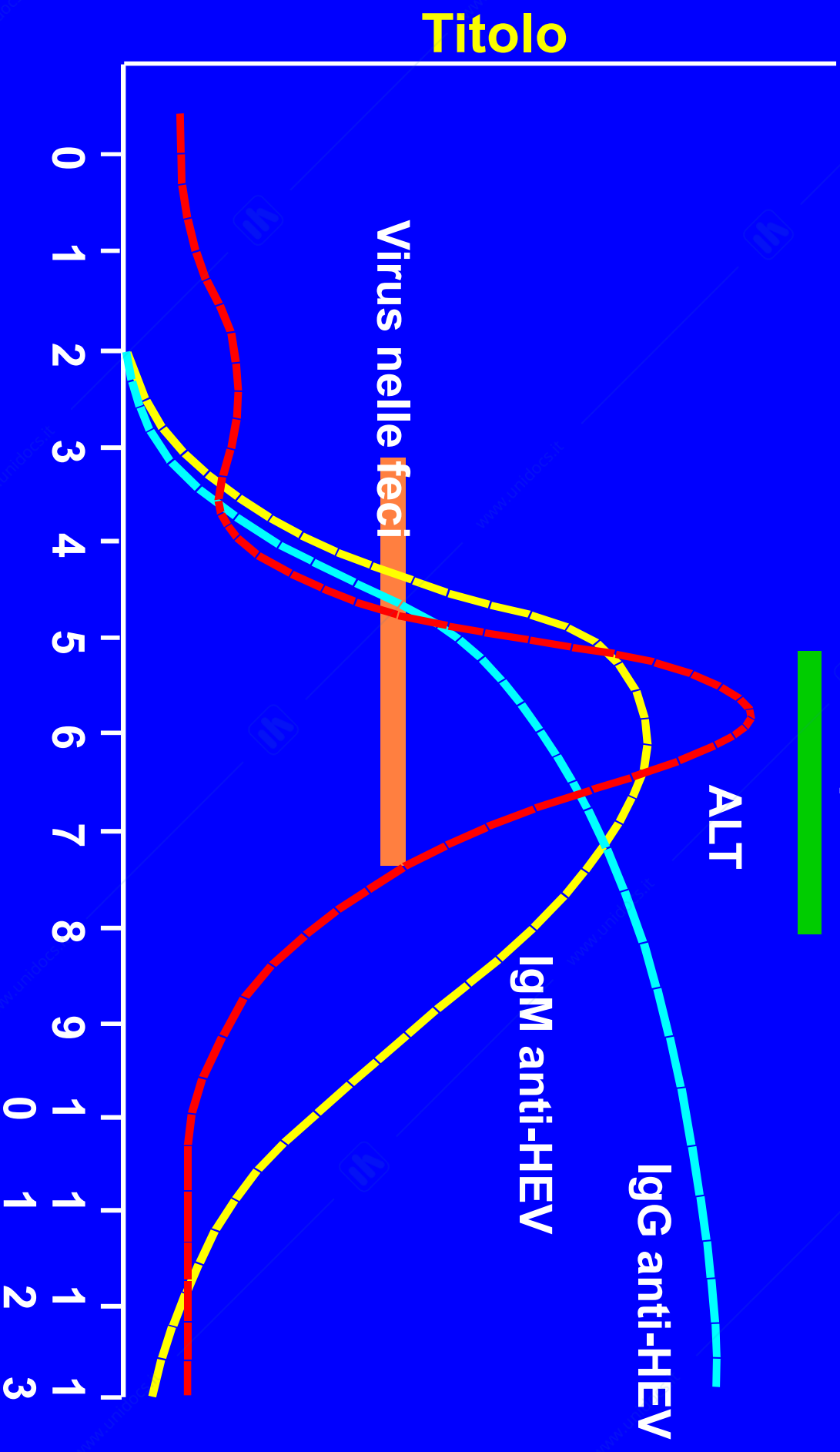
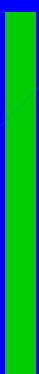
Hepatitis E - Clinica

- **Periodo Incubazione :** Media 40 giorni
Range 15-60 giorni
- **fatalità :** 1%-3%
donne gravide
- **Gravità della malattia:** aumenta con l'età
- **Non cronicizza**

Corso sierologico tipico in infezione HEV

HEV

Simptomi



Settimane dopo esposizione

TABELLA 62-1

Caratteristiche dei virus dell'epatite

CARATTERISTICA	EPATITE A	EPATITE B	EPATITE C	EPATITE D	EPATITE E
Nome comune	"Infettiva"	"Da stero"	"Post-trasfusionale non-A non-B"	"Agente delta"	"Enterica non-A non B"
Struttura del virus	Picornavirus; capside, RNA	Hepadnavirus; "envelope", DNA	Flavivirus; "envelope", RNA	Simile a viroide; "envelope", RNA circolare	Simile ai calicivirus; capside, RNA
Trasmissione	Oro-fecale	Parenterale, sessuale	Parenterale, sessuale	Parenterale, sessuale	Oro-fecale
Esordio	Improvviso	Insidioso	Insidioso	Improvviso	Improvviso
Periodo d'incubazione (giorni)	15-50	45-160	14-180	15-64	15-50
Gravità	Lieve	Occasionalmente grave	Di solito subclinica	Coinfezione con HBV di solito grave; super-infezione con HBV spesso grave	Pazienti normali, lieve; donne in gravidanza, grave
Mortalità	< 0,5%	1%-2%	0,5%-1%	Da elevata a molto elevata	Pazienti normali, 1%-2%; donne gravide, 20%
Cronicità/stato di portatore	No	Si	Si	Si	No
Altre patologie associate	Nessuna	Carcinoma epatocellulare primario, cirrosi	Carcinoma epatocellulare primario, cirrosi	Cirrosi, epatite fulminante	Nessuna
Diagnosi di laboratorio	Sintomi e IgM anti-HAV	Sintomi e livelli sierici di HBsAg, HBeAg e IgM anti-HBc	Sintomi e ELISA anti-HCV	ELISA anti-HDV	-

IgM, Immunoglobuline M; HAV, virus dell'epatite A; HCV, virus dell'epatite C; ELISA, dall'inglese "Enzyme-linked immunosorbent assay"; HDV, virus dell'epatite D.

Trasformazione cellulare virus- mediata

Introduzione di alterazioni genetiche che comportano cambiamenti nella regolazione della crescita e immortalizzazione

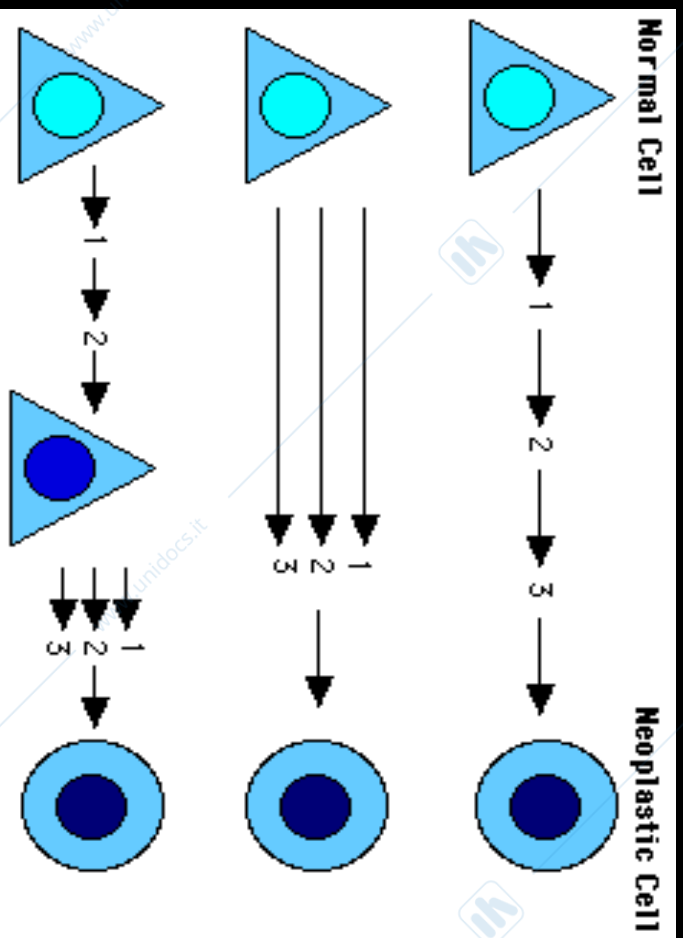
La trasformazione *in vitro* è il corrispettivo della formazione di tumori *in vivo*

- ❖ Alterazioni di crescita (es. no inibizione da contatto, ridotto fabbisogno di siero, crescita in agar, crescita su più strati)
- ❖ Alterazioni di superficie (es. cambi Ag, secrezione proteasi, giunzioni meno strette, cambiamenti tintoriali)
- ❖ Alterazioni intracellulari (cambiamenti citoscheletro, variazioni messengeri)

Oncogeni e trasformazione

Gli oncogeni sono geni cellulari essenziali implicati nei meccanismi di regolazione della crescita e del differenziamento

La trasformazione è il risultato di una serie di alterazioni a carico di oncogeni cellulari il cui effetto ultimo è la perdita del normale controllo della divisione cellulare (processo MULTISTEP)



Fattori responsabili dell'alterazione degli oncogeni:

Fisici (es. UV)

Chimici (es. nitrosammine)

Biologici (es. virus)

Infezioni trasformanti / Oncogenesi da virus

Trasformazione: processo per cui una cellula perde il controllo della proliferazione e diventa tumorale. Consiste nell'induzione a livello genetico di alterazioni morfologiche, biochimiche e biologiche stabilmente trasmissibili alla progenie cellulare.

Processo multifattoriale (agenti chimici, fisici e virali) suddiviso in 2 fasi

- **immortalizzazione:** moltiplicazione cellulare indefinita con formazione di linee o cloni
- **crescita disordinata** in maniera impietata con perdita della inibizione di contatto con possibilità di causare la formazione di un **tumore** se inoculata in un ospite appropriato.

Il Tumore è il risultato finale di vari effetti cumulativi che modificano il controllo della proliferazione cellulare. In alcuni casi le cellule esprimono alla loro superficie antigeni tumorali (**T**).

La proliferazione cellulare normale è sotto il controllo di geni regolatori positivi (oncogeni) e negativi (geni oncosoppressori), che possono determinare la trasformazione neoplastica in seguito a varie alterazioni.

Gli **oncogeni** sono geni regolatori assolutamente normali e necessari.

Scoperti nel genoma dei retrovirus (**v-*onc***). Successivamente identificati geni molto simili in cellule normali (**c-*onc***).

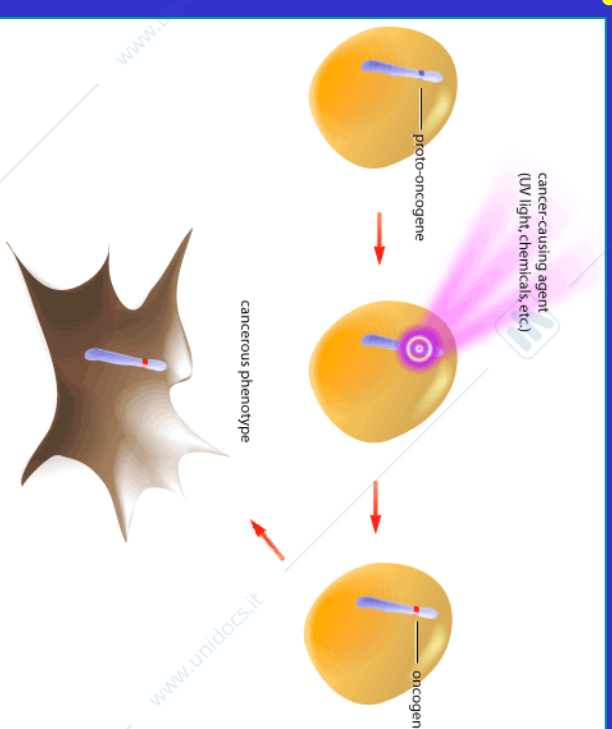
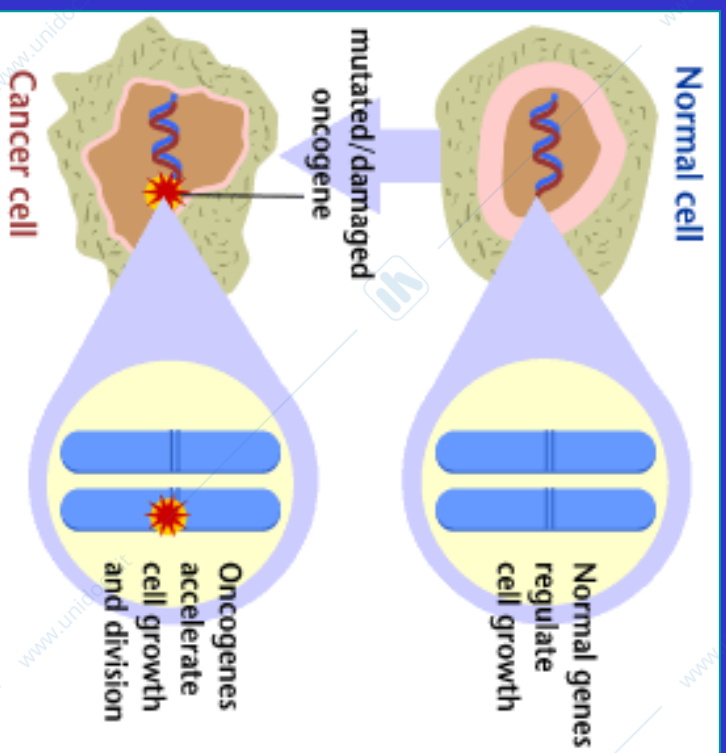
Le **proteine codificate dagli oncogeni** possono essere:

- fattori di crescita
- recettori di membrana per fattori di crescita
- tirosin-proteinchinasi
- proteine leganti il GTP
- proteine nucleari

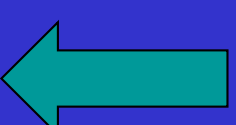
Le **proteine codificate dai geni oncosoppressori**, come Rb e p53, controllano negativamente la crescita.

ONCOGENI

I proto-oncogeni codificano per proteine coinvolte nel controllo della crescita cellulare. Mutazioni in questi geni determinano la loro attivazione costitutiva.



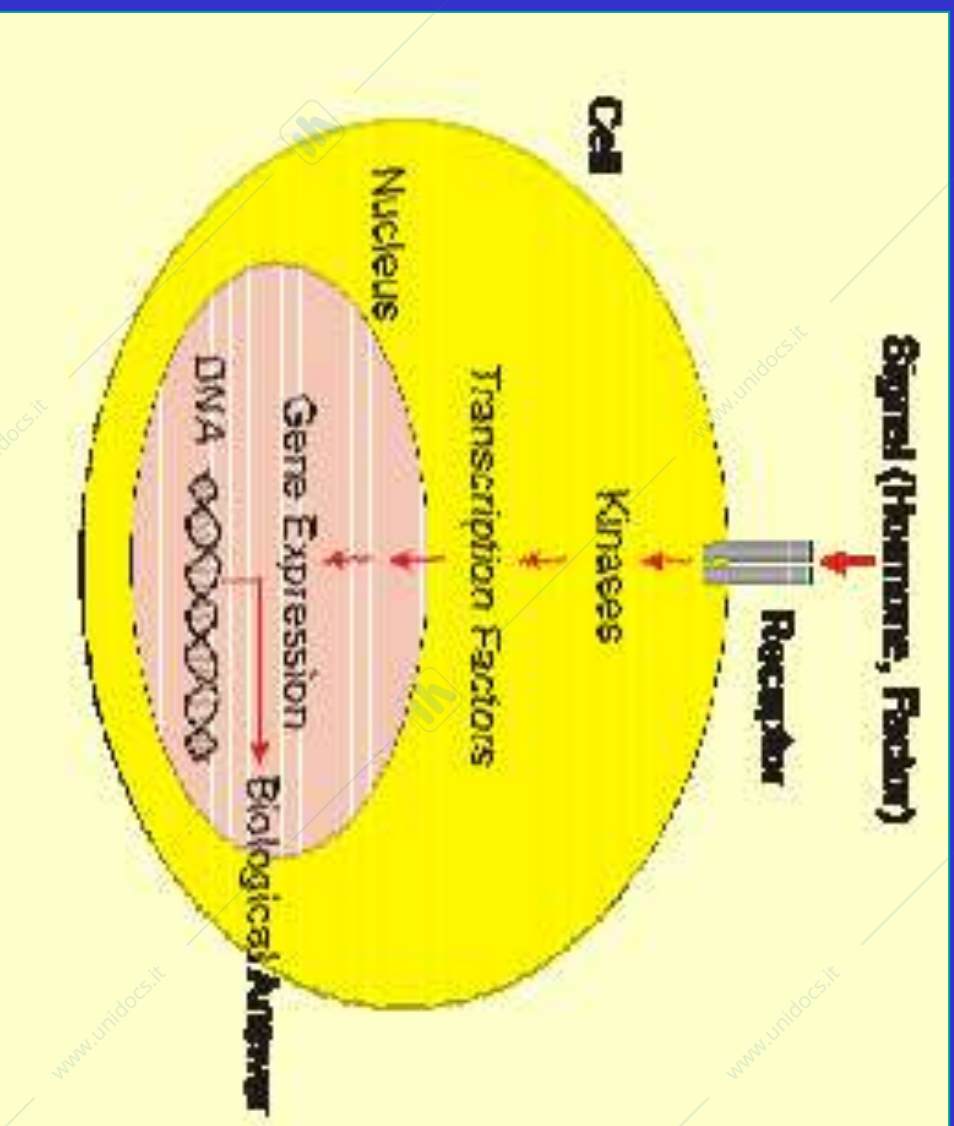
Una mutazione in una sola copia del gene è sufficiente a conferire un vantaggio proliferativo



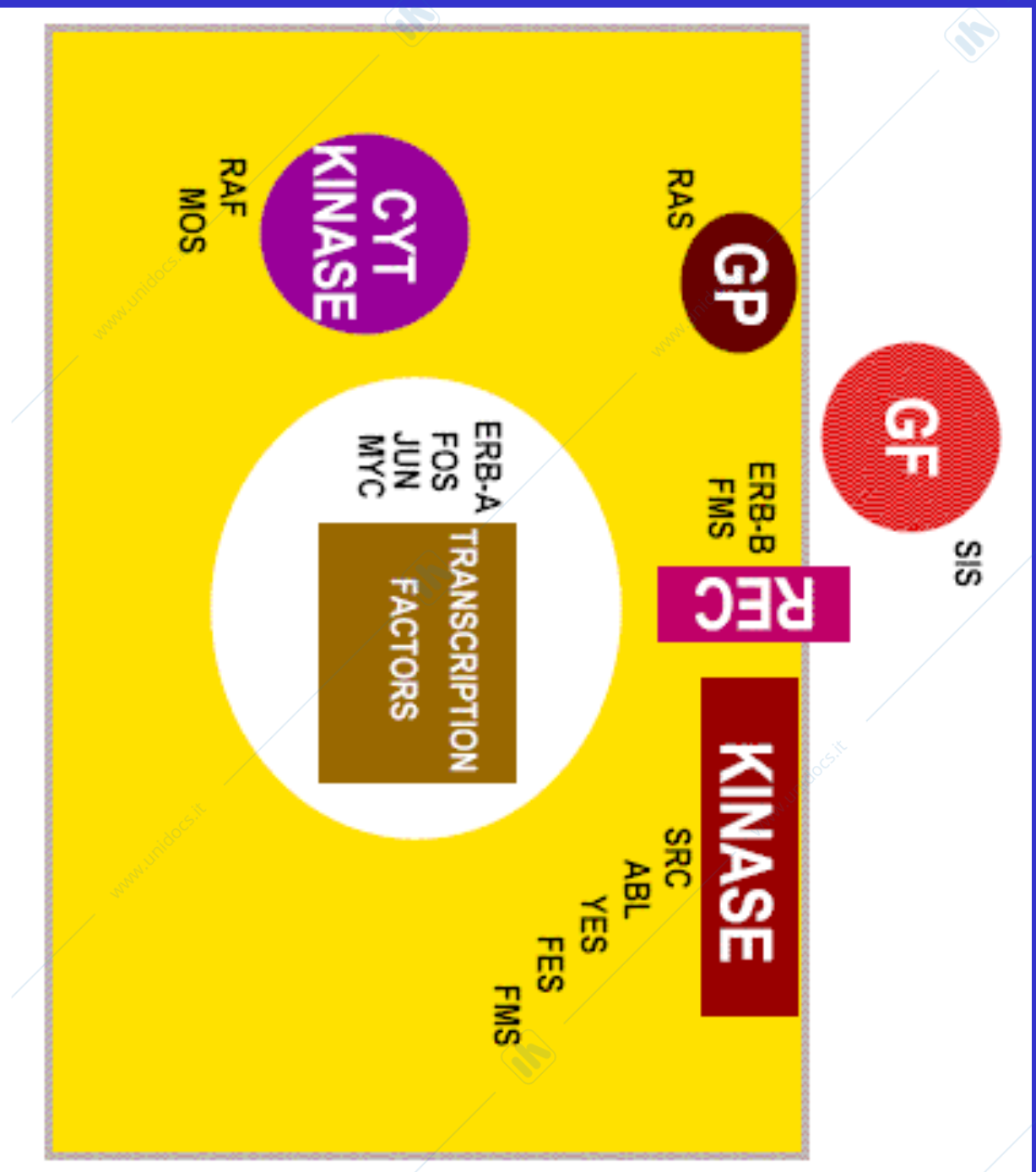
EFFETTO DOMINANTE

FUNZIONE DEGLI ONCOGENI

- Fattori di crescita
- Recettori di fattori di crescita
- Trasduttori del segnale
- Proteine nucleari/fattori di trascrizione



Attività dei prodotti degli oncogeni cellulari



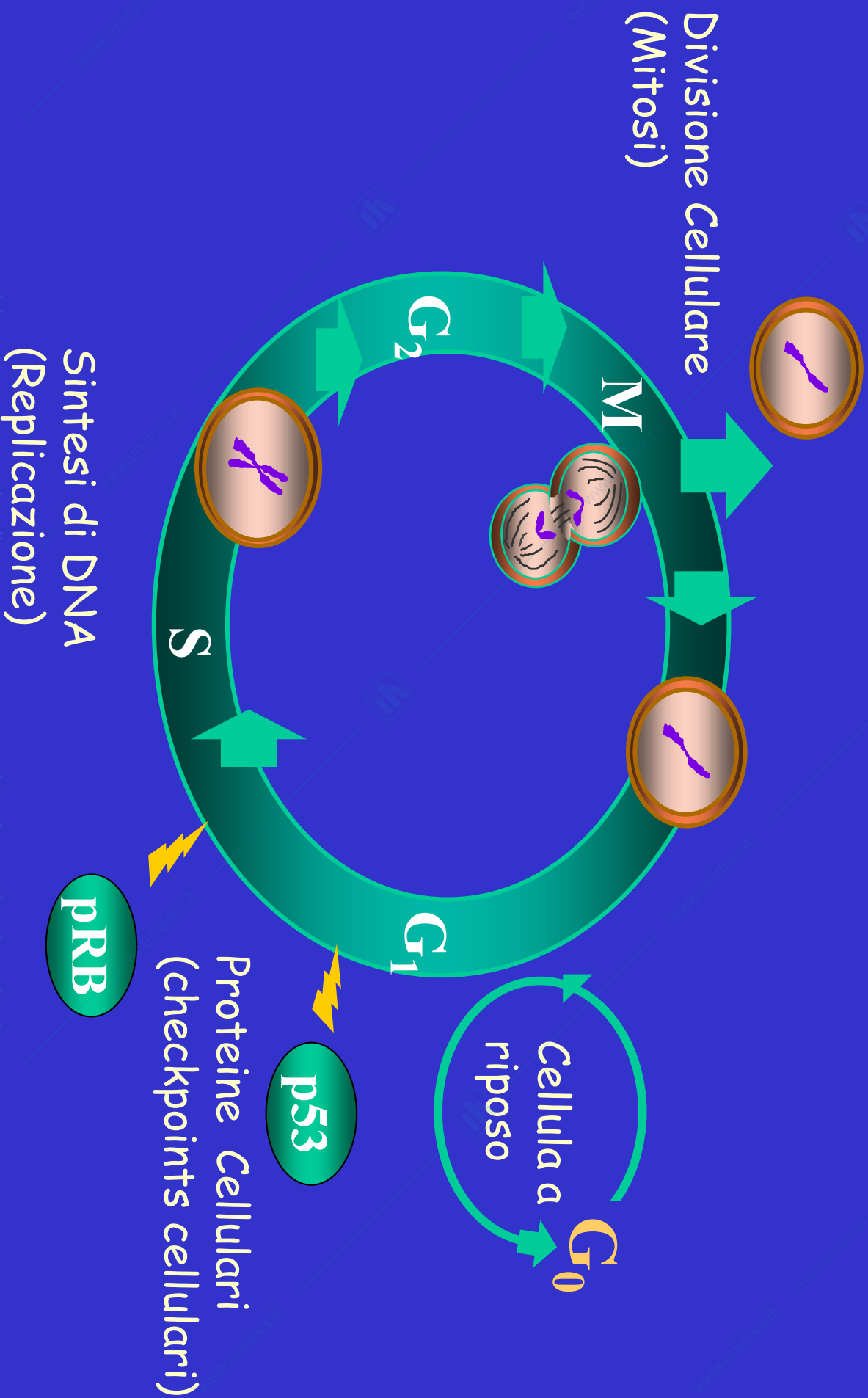
ATTIVAZIONE PROTO-ONCOGENI

- **AMPLIFICAZIONE GENICA**
- **TRASLOCAZIONI CROMOSOMICHE**
- **MUTAZIONI PUNTTIFORMI**

Anti-Oncogenes

- **Retinoblastoma Rb**
- **p53**

CICLO CELLULARE

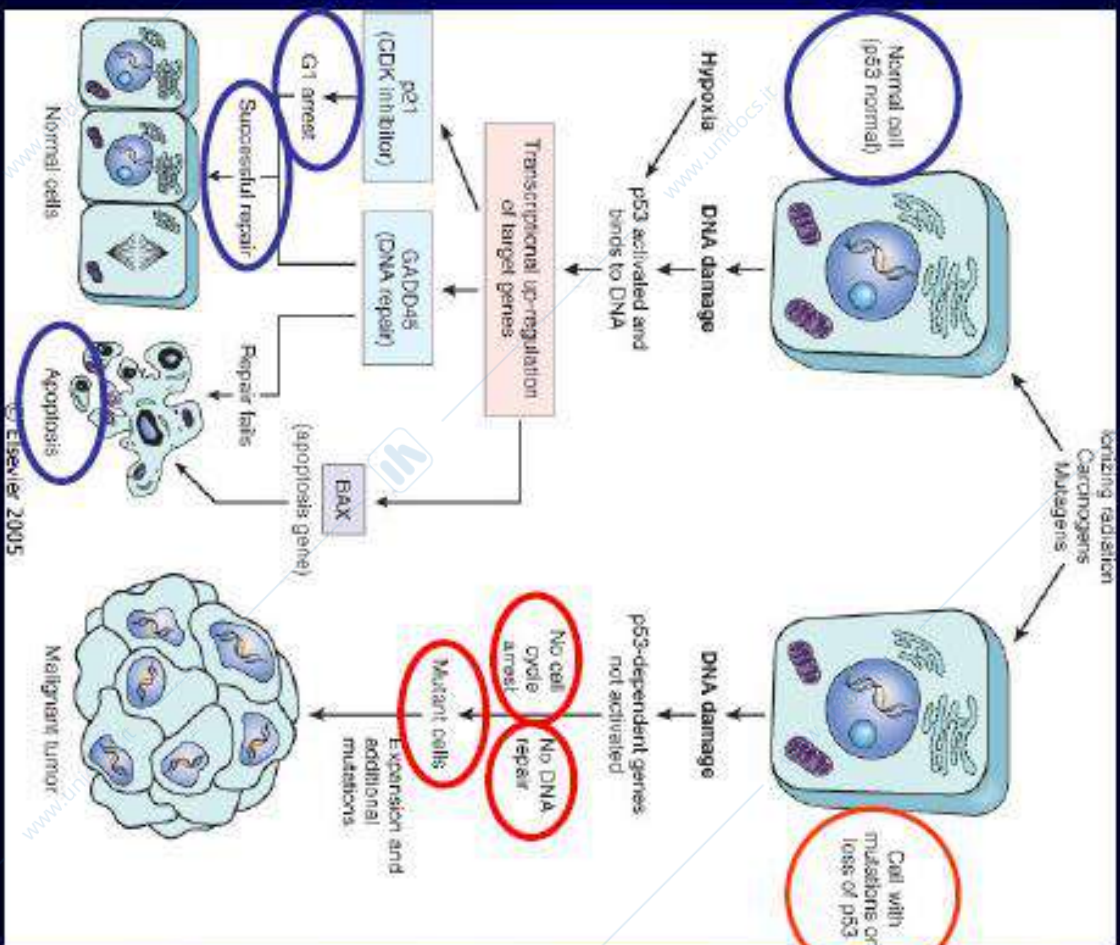


La proteina p53:

- E' indotta rapidamente in risposta a DNA danneggiato.
- Regola la progressione del ciclo cellulare (attivando la trascrizione dell' inibitore delle Cdk chiamato **p21**).
- La perdita di p53 impedisce l' arresto del ciclo e aumenta la frequenza di mutazione.

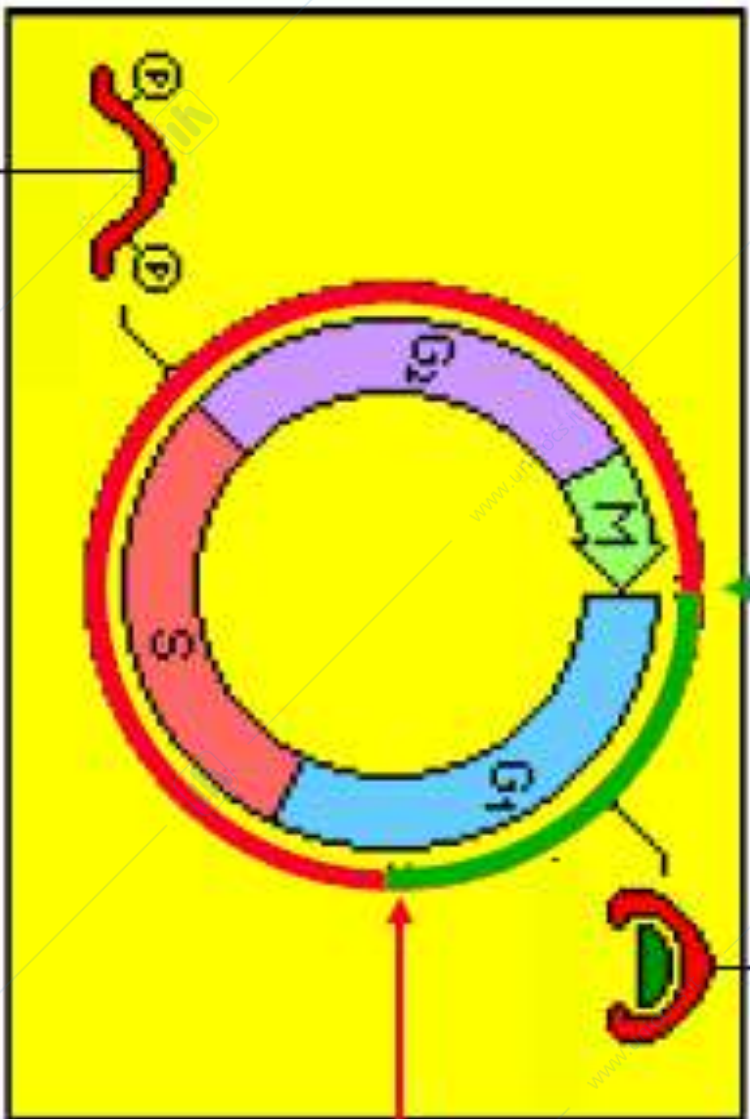
L'oncosoppressore p53: il "guardiano del genoma"

Come agisce?



Inattivazione di p53: oltre il 60% dei tumori

**Rb inattiva
fosforilata**



**Rb viene
de-fosforilata**

**Rb attiva
(sequestra E2F)**

**START-chinasi
fosforila Rb**

**E2F viene
liberata e attiva
la trascrizione
di 20-30 geni**

VIRUS ONCOGENI

Alcuni virus a DNA o a RNA (Retrovirus) sono in grado di indurre *in vitro ed in vivo* la trasformazione cellulare e/o tumore. Essi possiedono nel loro genoma **oncogeni**.

Meccanismi inducenti la neoplasia

- **Via intrinseca:** le cellule devono essere direttamente infettate
 - Proteine virali possono interagire con geni cellulari oncosoppressori inducendone l'inattivazione o la degradazione es. antigene T dell' SV40, proteina RB, E1a degli adenovirus, EBV codifica per fattori anti-apoptotici
 - Inserzione di sequenze genomiche virali con induzione di mutazioni.
 - Inserzione di sequenze genomiche virali in punti critici del genoma cellulare (promotori trascrizionali)
- **Via estrinseca:** le cellule non necessitano di infezione, ma l'insorgenza del fenotipo trasformato è il risultato dell'infezione di altre cellule
 - Immunosoppressione es. HIV, citomegalovirus, HTLV
 - Stimolazione della proliferazione cellularerigenerazione dei tessuti danneggiati dall'infezione virale (epatocarcinoma);
produzione di fattori di crescita ad opera delle cellule infettate (sarcoma di Kaposi);
i virioni possono mimare recettori per fattori di crescita

Virus oncògeni

a RNA causano trasformazione nell'infezione permissiva

Retrovirus (HTLV-1): leucemia a cellule T dell'adulto (ATLL); *Tax*

Possono

- introdurre nella cellula normale v-onc sotto il controllo di promotori virali (**trasducenti**)
- integrarsi in prossimità di c-onc e ne alterano l'espressione (**attivatori in cis**)
- codificare proteine dis-regolatorie nei confronti di c-onc o v-onc (**attivatori in trans**)

a DNA in genere causano infezioni litiche e inducono trasformazione in condizioni di non permissività.

Virus dell'epatite B (HBV): associato a carcinoma primario epatocellulare (HCC)

Virus dell'epatite C (HCV): associato a (HCC)

Virus di Epstein-Barr (EBV): agente eziologico di linfoma di Burkitt, traslocazione dell'oncogene c-myc.

Virus herpes simplex tipo 2 (HSV-2): associato a tumori cervicali

Herpesvirus umano 8 (HHV8): cofattore o agente eziologico Sarcoma di Kaposi, linfoma primario effusivo (BCLB)

Adenovirus: associati a neoplasie animali; codificano geni E1A, E1B trasformanti cellule umane

Poliovirus: non inducono tumori nell'ospite permissivo; codificano 3 antigeni T (importanti per l'inizio e mantenimento della trasformazione, es SV40 antigene largo T)

Papillomavirus (HPV) associati a tumori ano-genitali, tumore dell'utero, e epidermodisplasia verruciforme.

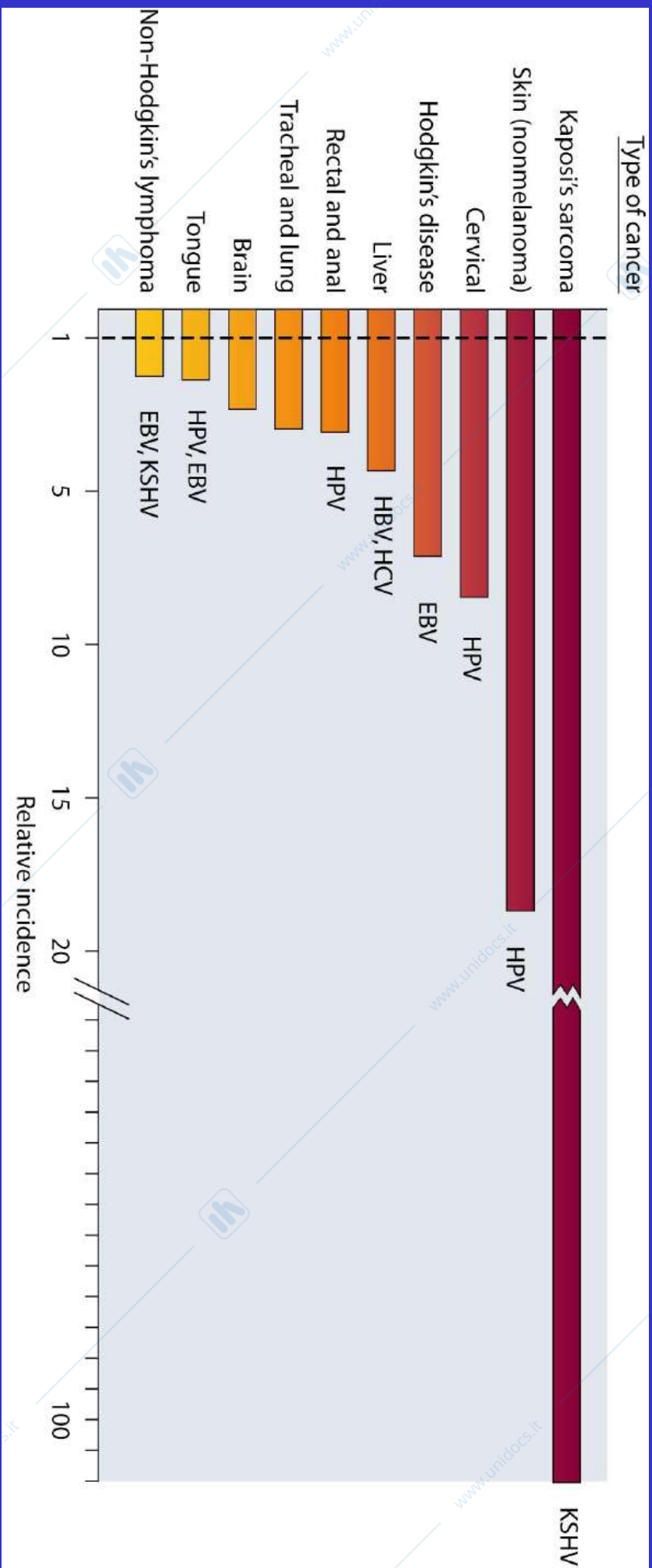
Virus, oncogeni e trasformazione

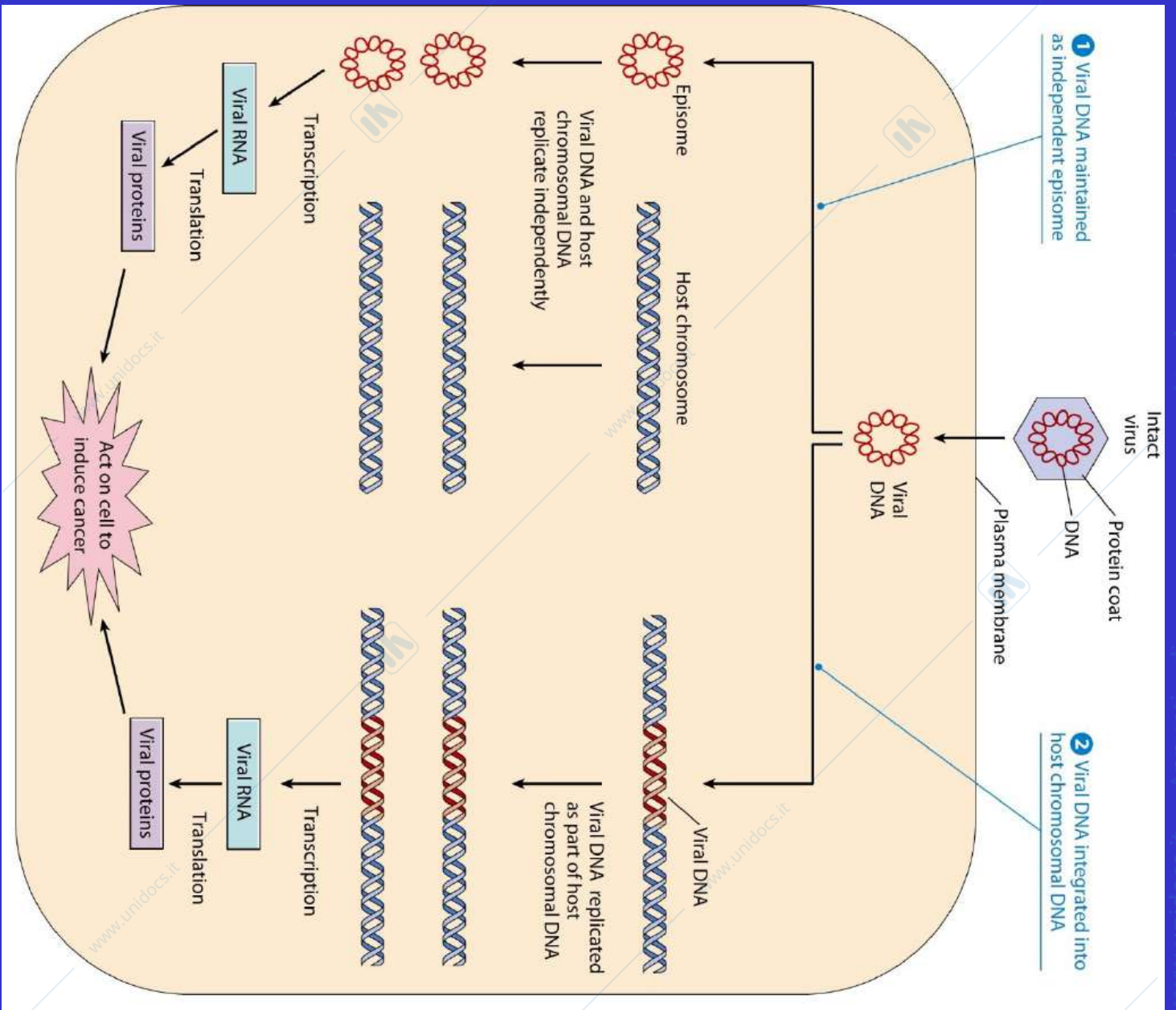
Possibilità di trasformazione rapida grazie all'attività polifunzionale di alcuni loro geni ('oncogeni' virali) (es. retrovirus con oncogene)

- ❖ Alterata espressione di oncogeni cellulari
- ❖ Inattivazione di proteine ad attività anti-oncogena

Virus	Cancro
HSV	Carcinoma cervice uterina
EBV	Linfomi, carcinoma nasofaringeo
HHV-8	Sarcoma di Kaposi
HPV	Carcinoma cervice uterina
HBV	Carcinoma epatocellulare
HCV	Carcinoma epatocellulare
HTLV	Leucemia T

Incidenza relativa delle patologie umane neoplastiche ad eziologia virale





Oncogeni di virus a DNA

- Adenovirus
E1A region 2
- SV 40
Large T Ag
- Polyoma
Large T Ag
- BK virus
Large T Ag
- Human papilloma Virus-16
E6, E7
- HBV
Proteina X

Il papillomavirus (HPV) e il cancro della cervice

Lo sviluppo del cancro della cervice è fortemente associato all'infezione da human papillomavirus (HPV).

Studi epidemiologici evidenziano che circa 80-90% dei tumori della cervice contengono DNA di HPV. (Boshart et al., 1984; Durst et al., 1983)

Alcuni studi hanno mostrato una correlazione tra l'infezione da HPV, l'assenza della proteina p53 e la mutazione della proteina pRB. (Crook et al., 1991; Wrede et al., 1991)

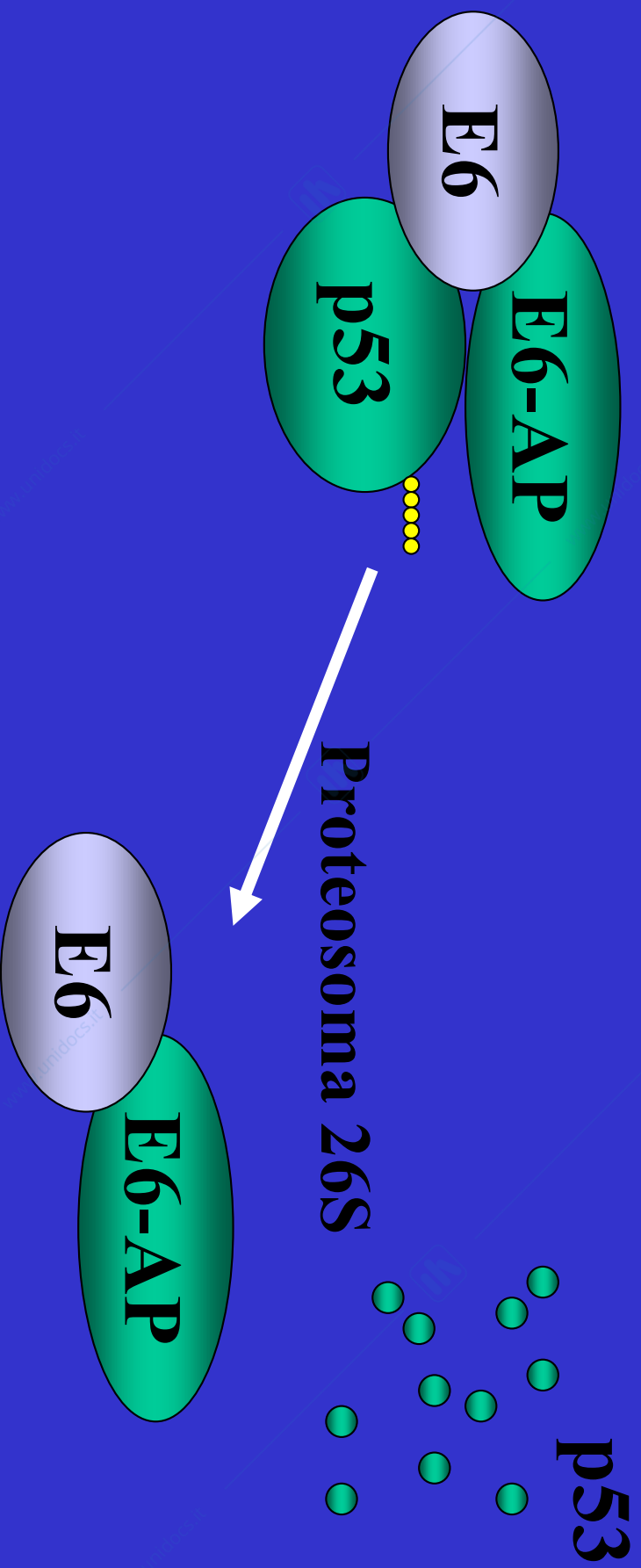
L' oncoproteina E6 promuove la degradazione della proteina regolatrice p53

L' oncoproteina E6 lega la p53 mediante la proteina cellulare E6AP che segnala al proteosoma 26S la presenza di una proteina da degradare.

E6 ed E6AP vengono rilasciate senza essere alterate nella loro attività “catalitica” della degradazione della p53.

Effetti delle proteine virali E6 ed E7 sul ciclo cellulare

L' oncoproteina E6 promuove la degradazione della proteina regolatrice p53



L' oncoproteina E7 sequestra la pRB dal normale ciclo cellulare

Nell' infezione cellulare da HPV, la pRB risulta inattiva in quanto viene legata dalla proteina virale E7.

L' inibizione dell' attività della pRB permette il rilascio dei fattori trascrizionali necessari per la sintesi del DNA e quindi la promozione della divisione cellulare.

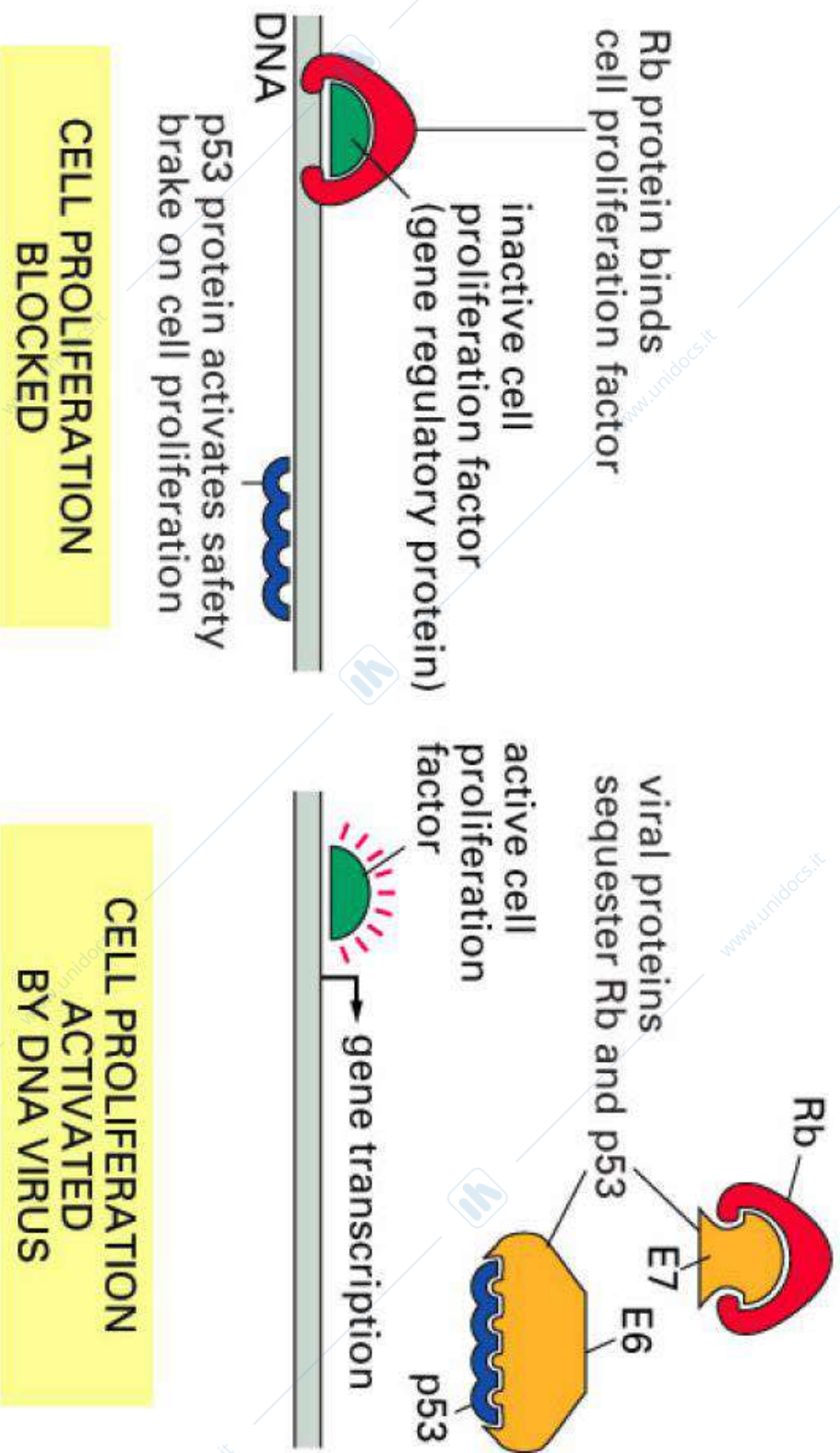
DNA Viruses Inactivate Tumor Suppressor Gene Products

Rb protein is a repressor of genes for cell proliferation

p53 is an activator of genes exerting negative controls on cell division

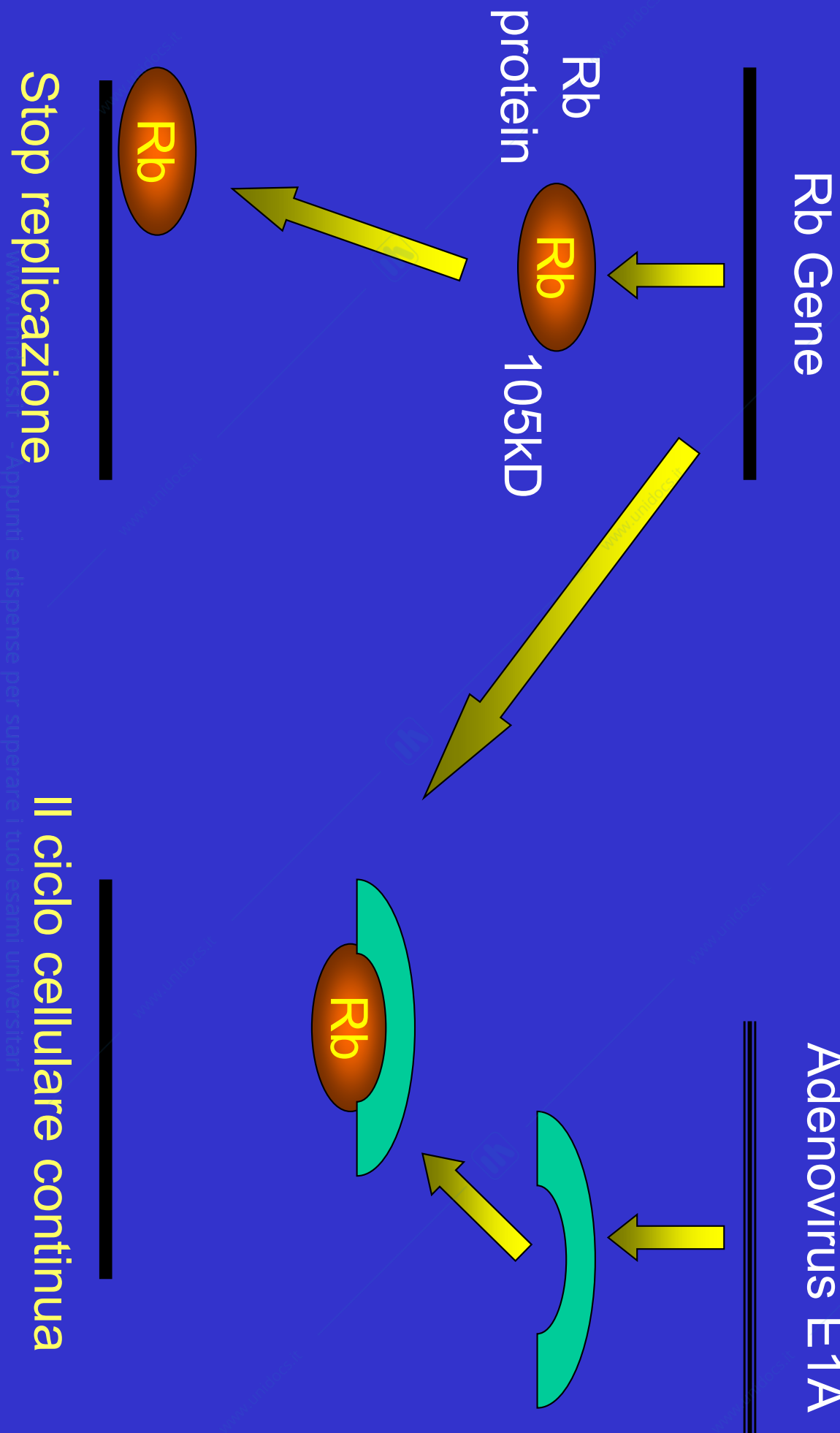
E7 and E6 proteins of *Papillomavirus* sequester Rb and p53

Large T antigen of *Simian Virus SV40* does the same



Anti-Oncogenes

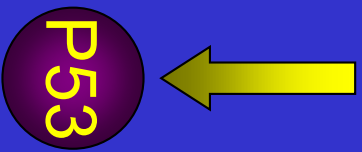
Retinoblastoma



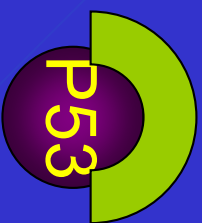
Anti-Oncogenes

p53

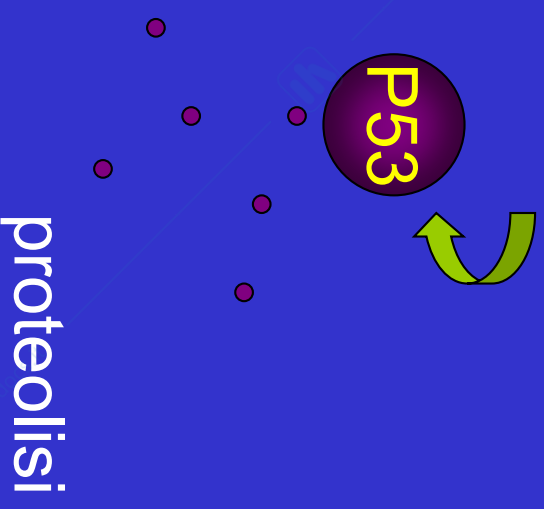
P53 gene



SV40 T

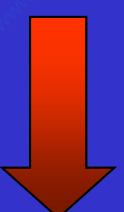
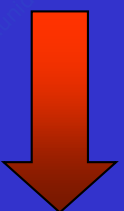


HPV E6



P53

DNA



Stop replicazione

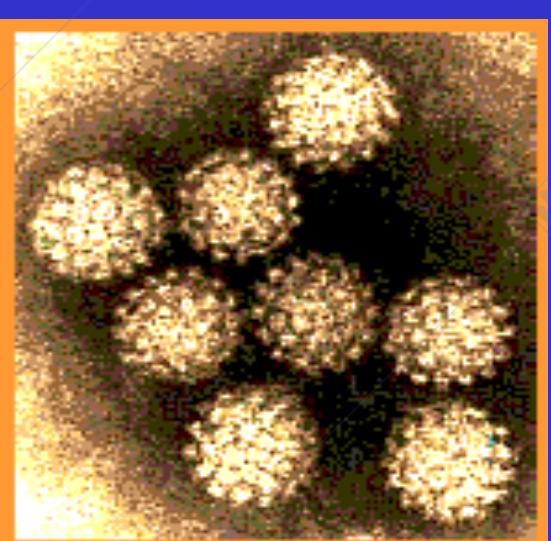
replicazione

replicazione

DNA Tumor Viruses In

Human Cancer

Papilloma Viruses
cancro urogenitale



Papilloma virus sono stati trovati nel 91% di donne con tumore alla cervice

carcinoma:
Laringe
Esofago
istologicamente
Polmone

tutti simili

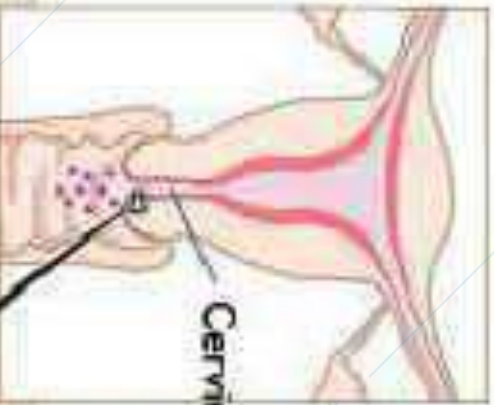
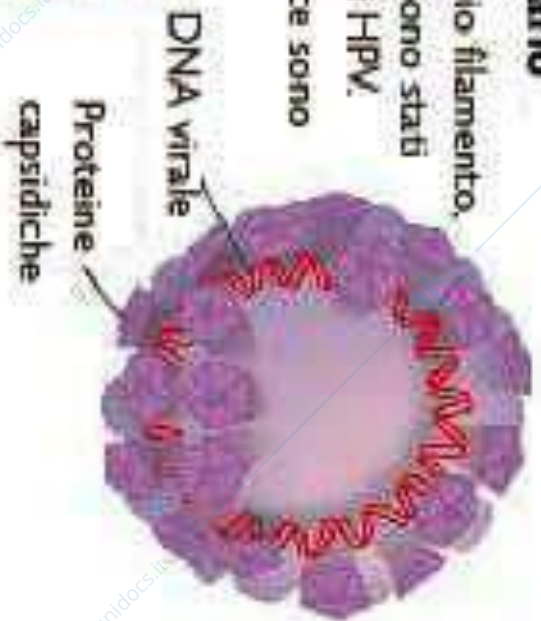
10% of tumori umani possono essere collegati ad

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

HPV

HPV papilloma virus umano

HPV ha un DNA circolare a doppio filamento, protetto da proteine capsidiche. Sono stati identificati oltre 100 tipi diversi di HPV. Il 70% di tutti i tumori della cervice sono causati dai tipi 16 e 18.



Cervice

Infezione da HPV

HPV infetta le cellule epiteliali della mucosa cervicale. Il suo DNA può integrarsi nel genoma delle cellule infettate e causare il cancro.



Replicazione virale

90% di guarigioni entro 2 anni



Settimane

Scoperta del DNA di HPV nelle cellule tumorali

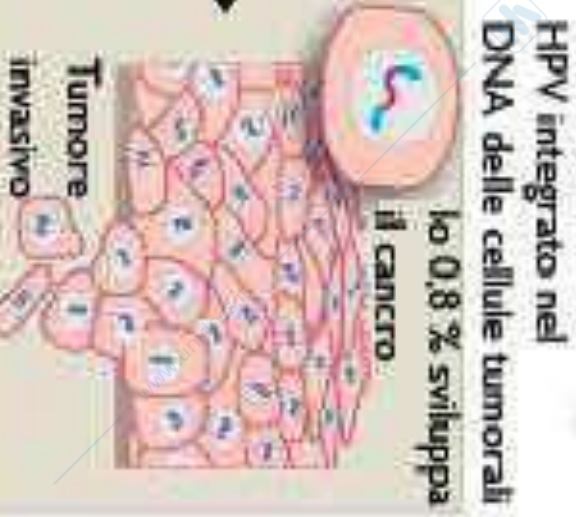
1	2	3	4
+	+	-	+

1981 PNAS

DNA del paziente

Sonda per il DNA di HPV

Harald zur Hausen trovò il DNA di HPV nel DNA dei pazienti (+).

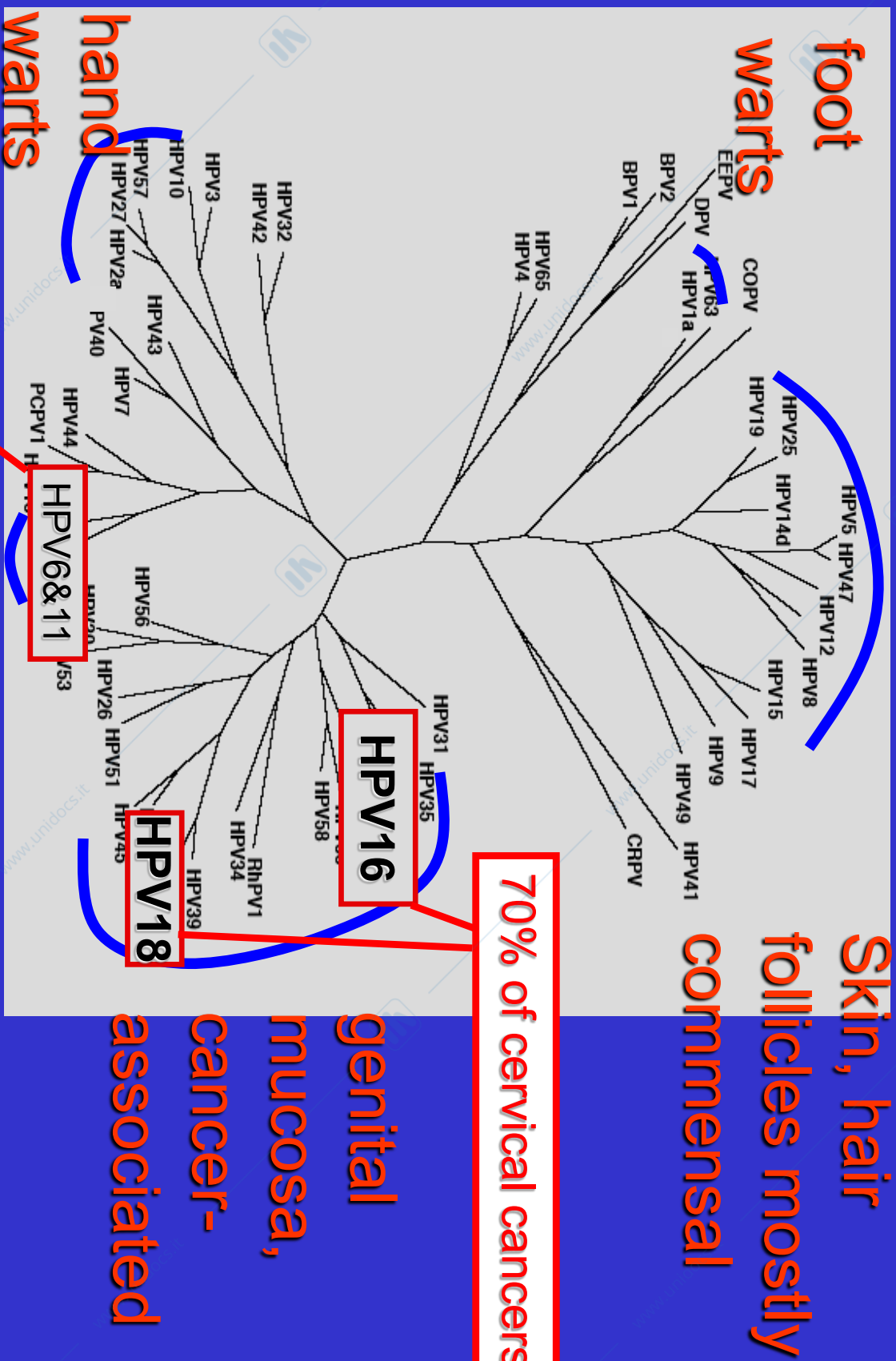


HPV integrato nel DNA delle cellule tumorali
In 0,8% sviluppa il cancro

10-30 anni

Tumore invasivo

HPVs Are a Diverse Family



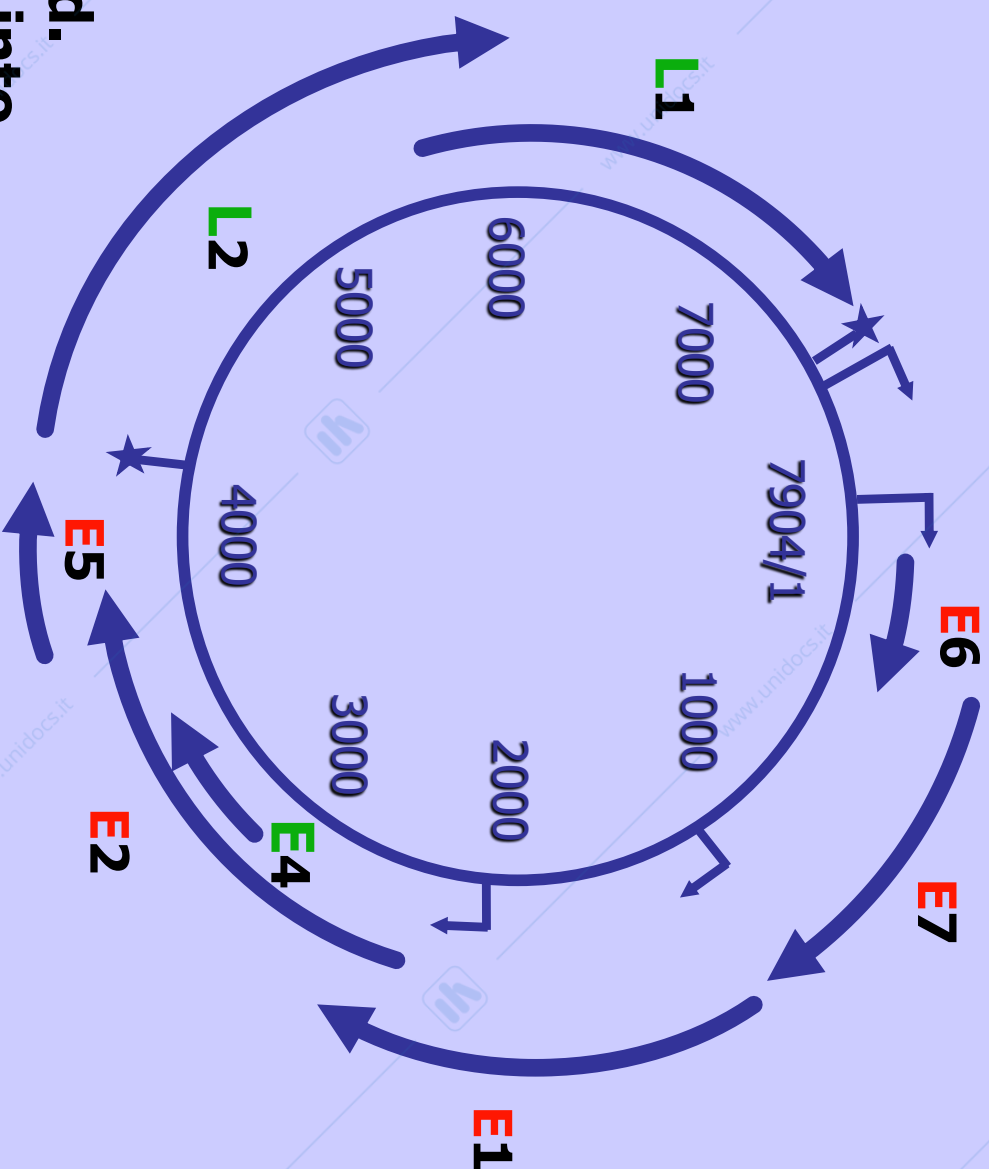
90% of genital warts

70% of cervical cancers

>75% lifetime infection risk!

Genome

- 8 kilobase circular dsDNA.



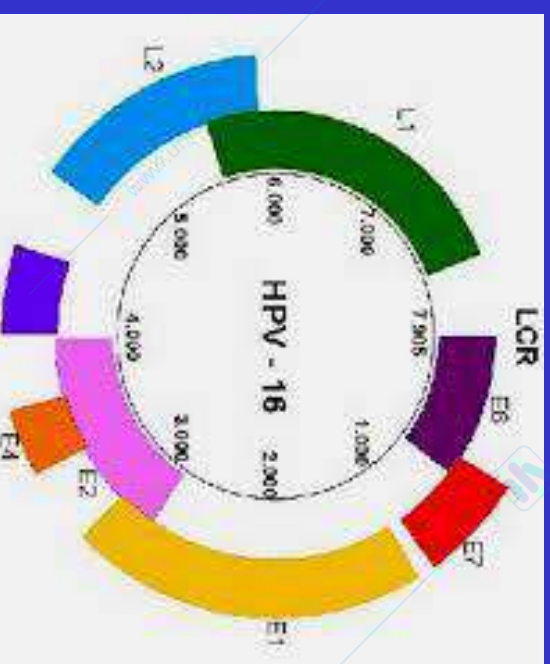
- One coding strand. Genome is divided into Late and Early regions

REPLICAZIONE VIRALE

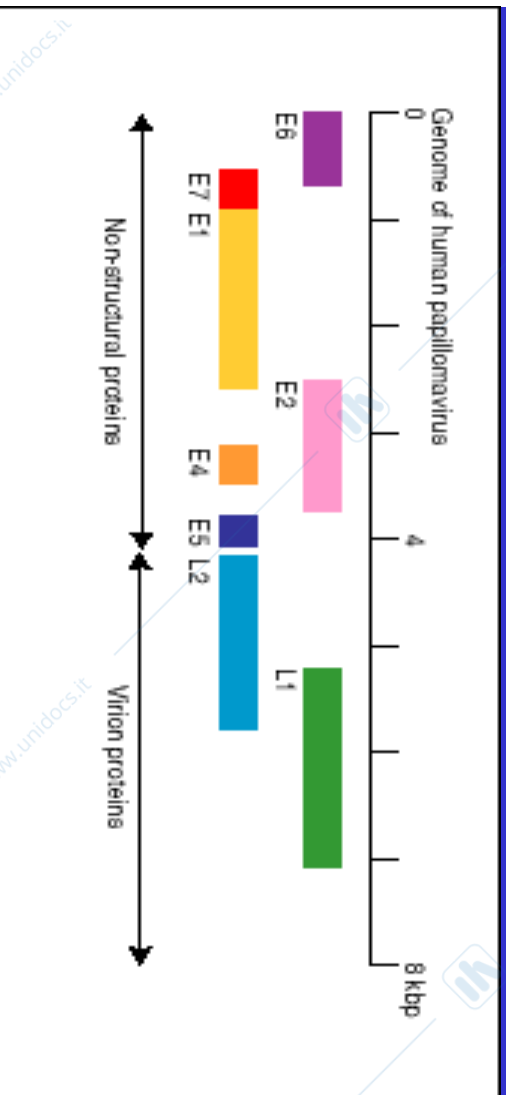
Il genoma si replica in forma episomale, come un plasmide nucleare multicopy.

Per integrarsi, il genoma deve linearizzarsi.

Il punto di rottura è all'estremo 5' del gene E2 che regola l'espressione dei geni E6 e E7.



HPV6 e HPV18



Può integrarsi nel genoma o rimanere in forma episomica permanente

È l'agente etiologico del carcinoma della

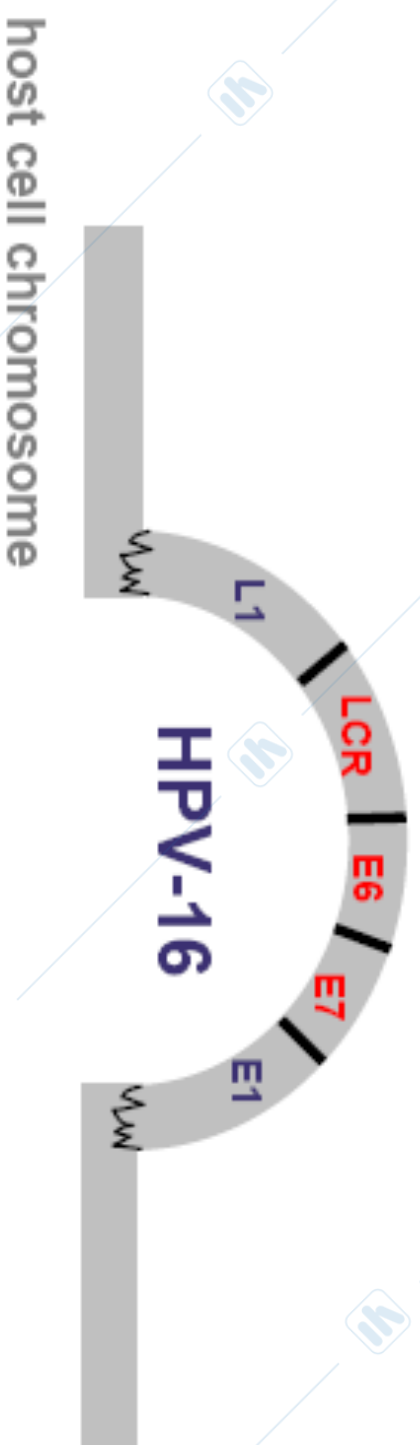
cervice uterina così come delle verruche cutanee e genitali

Gene:	Funzione:
E1	Iniziazione della replicazione del DNA (elicasi)
E2	Regolazione della trascrizione genica/replicazione del DNA
E3	???
E4	Proteine non strutturali tardive; Distruzione del citoscheletro?
E5	Proteina trasformante, interagisce con recettori per fattori di crescita, es. PDGF
E6	Proteina trasformante, si lega a p53 avviandolo alla degradazione
E7	Proteina trasformante, si lega a pRB
E8	???
L1	Proteina capsidica maggiore
L2	Proteina capsidica minore

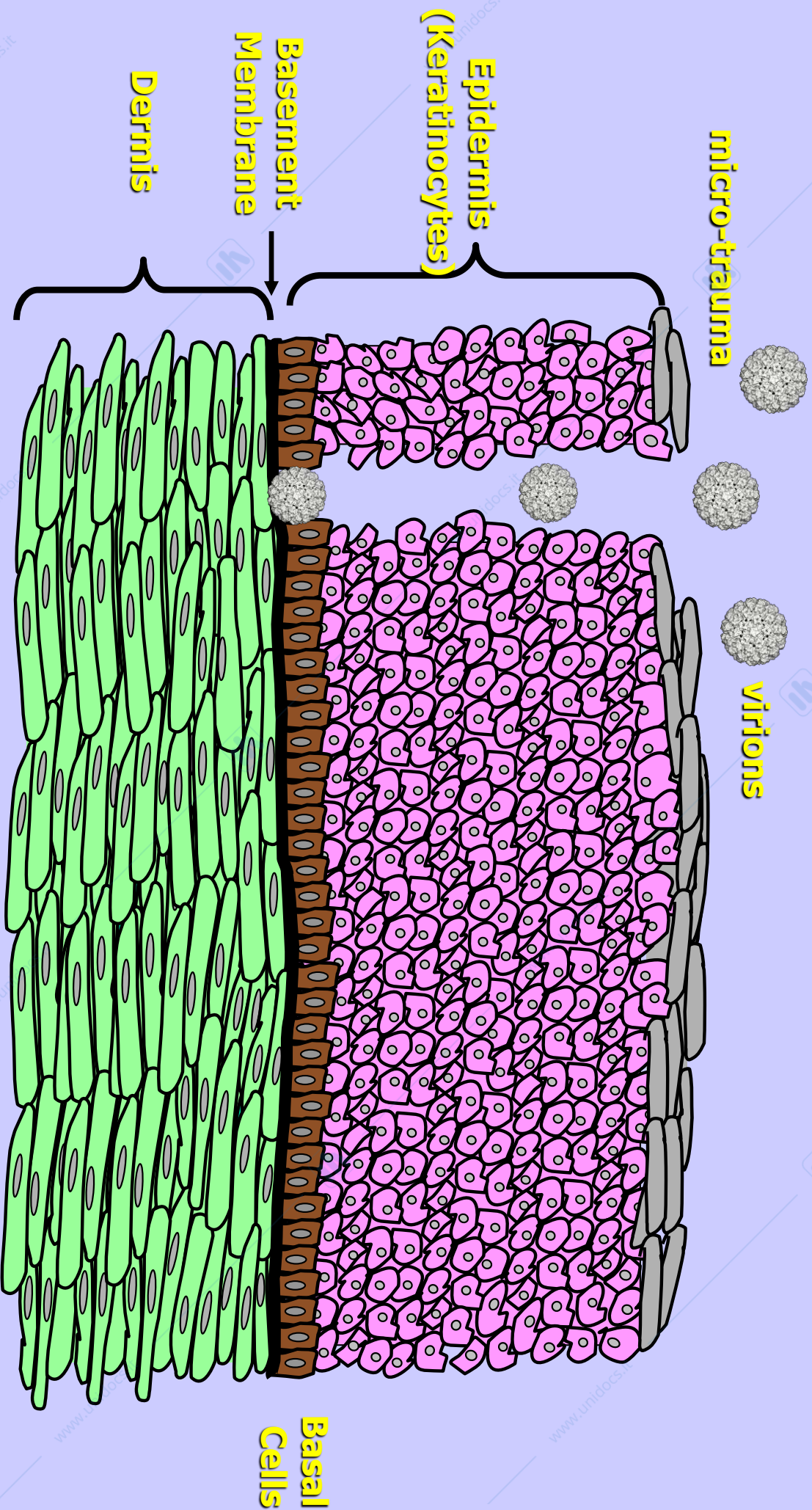
Basic biology of HPV infection

Virus integration

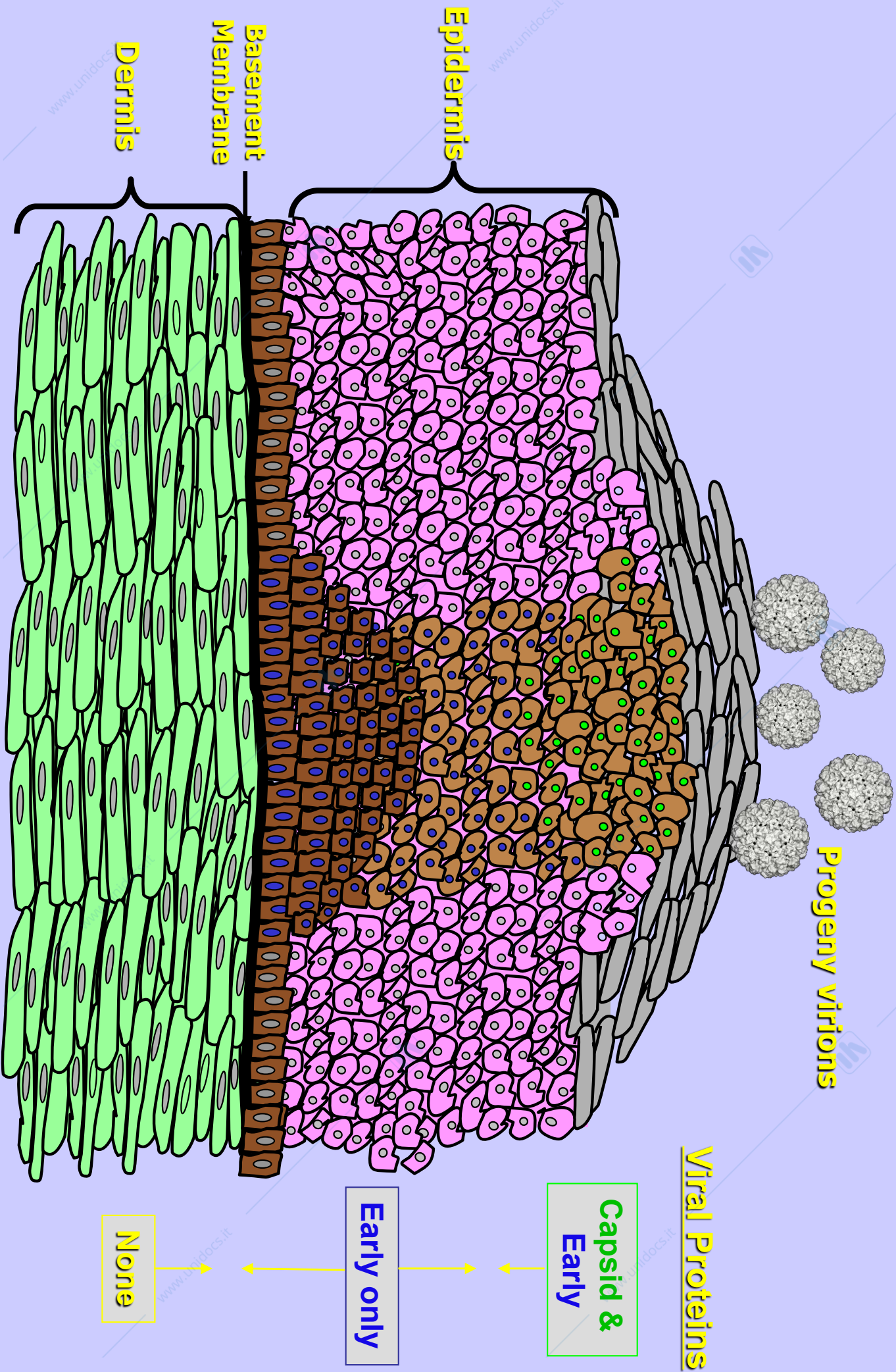
Only two the two viral oncoproteins **E6** and **E7** are expressed in cervical cancer as a consequence of virus integration



Life Cycle - Initial Infection (Skin)



Gene Expression (Wart)

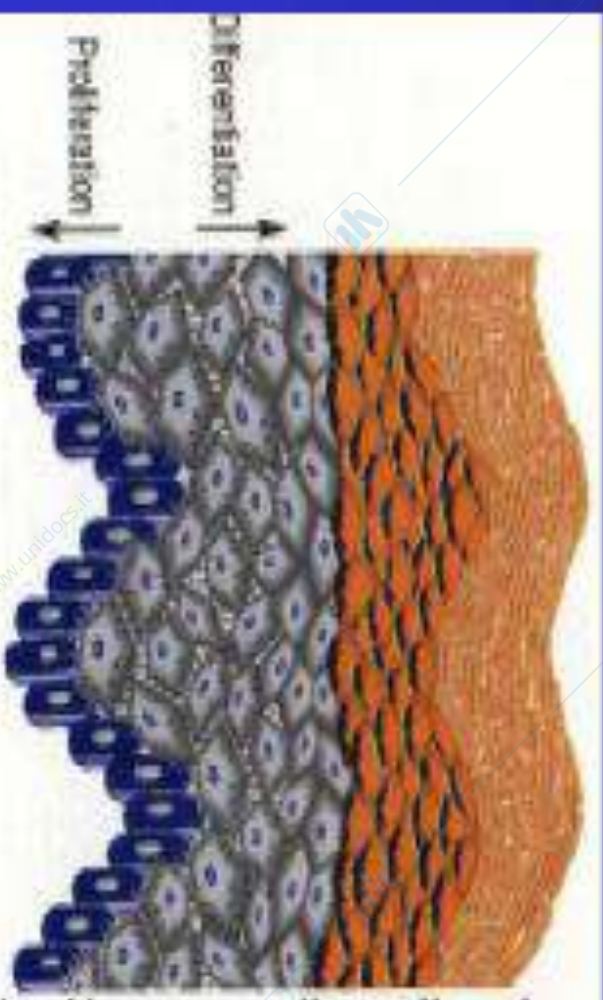


SIRATO CORNEO
GRANULOSO
SPINOSO
BASALE

SINTESI DNA

SINTESI CAPSIDE

-	+
+++	+++
+/-	-
+/-	-



Stratum Corneum
 Granular Layer
 Spacious Layer
 Basal Layer

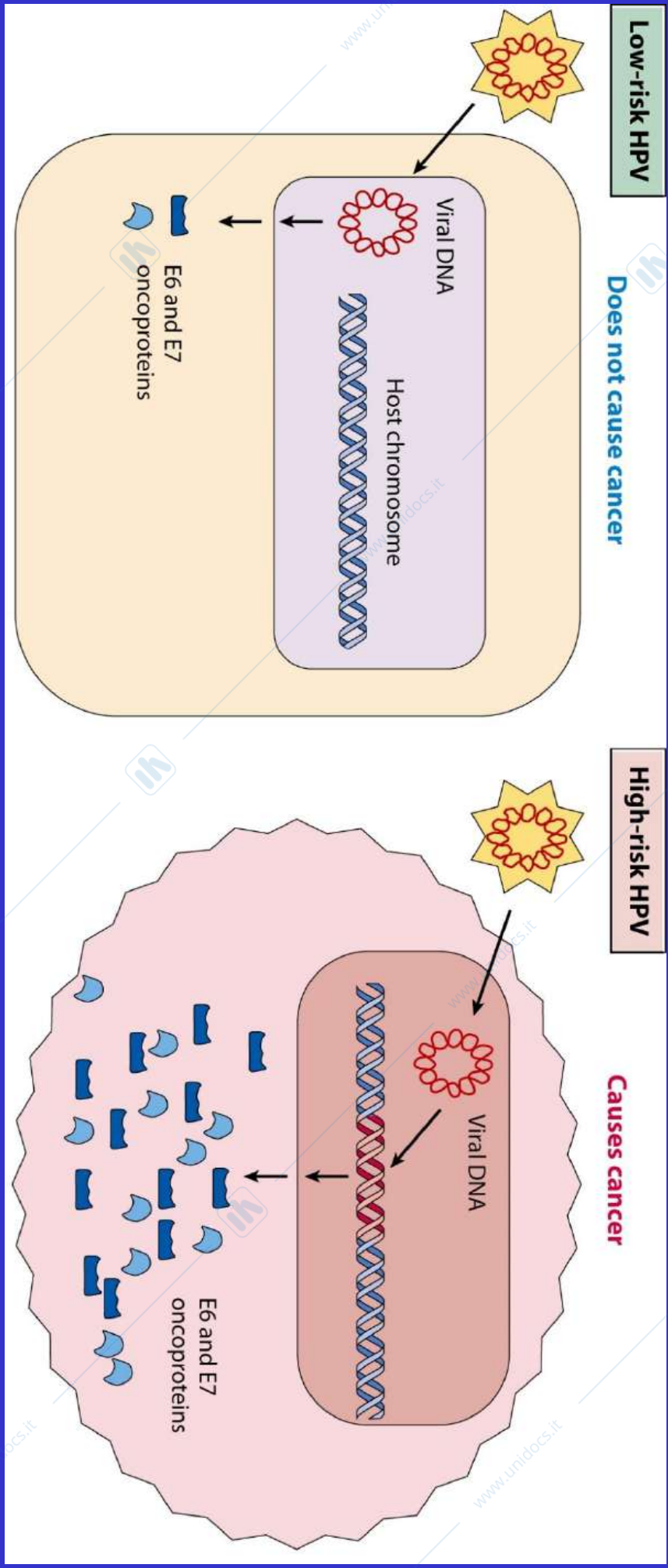
Production of Virion
 Expression of Capsid Proteins
 Assembly of Virion
 Nuclear Breakdown
 Viral Release

Steady-State Viral DNA Replication
 Production of Early Proteins

HPV Infection
 Uptake (p6g4 Integrin)
 Nuclear Transport
 Production of Early Proteins

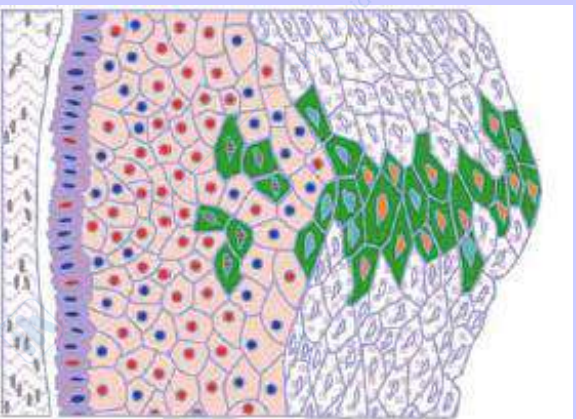
La verruca è una proliferazione benigna autolimitante della pelle, stimolata dal virus, che regredisce col tempo. Si manifesta in 3-4 mesi. L'infezione virale rimane localizzata, in genere regredisce spontaneamente.

- Nelle verruche e nei condilomi (escrescenze benigne) il genoma virale si trova in forma episomiale.
- Nel carcinoma della cervice uterina e in carcinomi squamosi (un tumore che può svilupparsi in pazienti colpiti da una rara malattia ereditaria, l'epidermodisplasia verruciforme), il genoma virale è stato ritrovato integrato nel DNA della cellula tumorale.

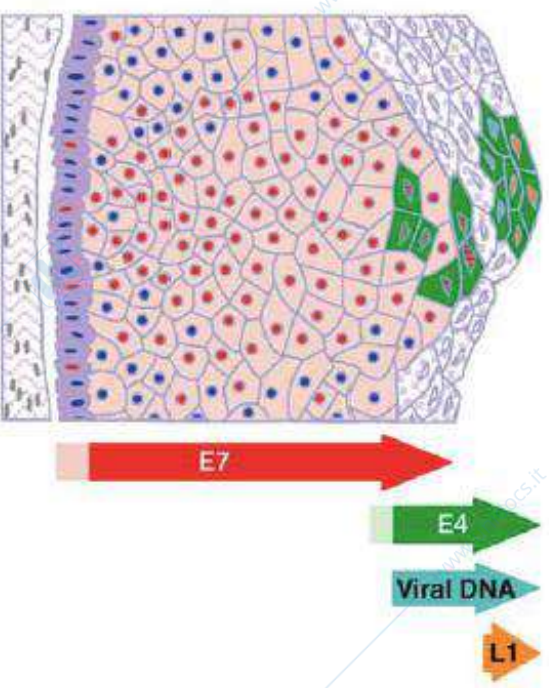


Progression to Cancer is Accompanied by Deregulation of Viral Gene Expression

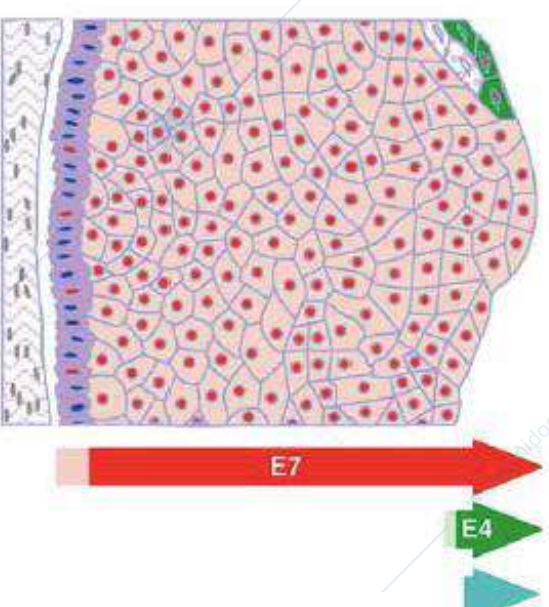
CIN 1



CIN 2



CIN 3



Common molecular events:

- **Viral genome integration into cellular DNA**
- **Loss of E2 leads to increased E6/E7 expression**
- **Loss of L1, L2 expression. Therefore, current vaccine can't clear pre-cancerous lesions.**

**CIN: neoplasia
cervicale
intraepiteliale**

HPV-associated diseases

Common warts/plantar warts



Condyloma acuminata



Cervical carcinoma



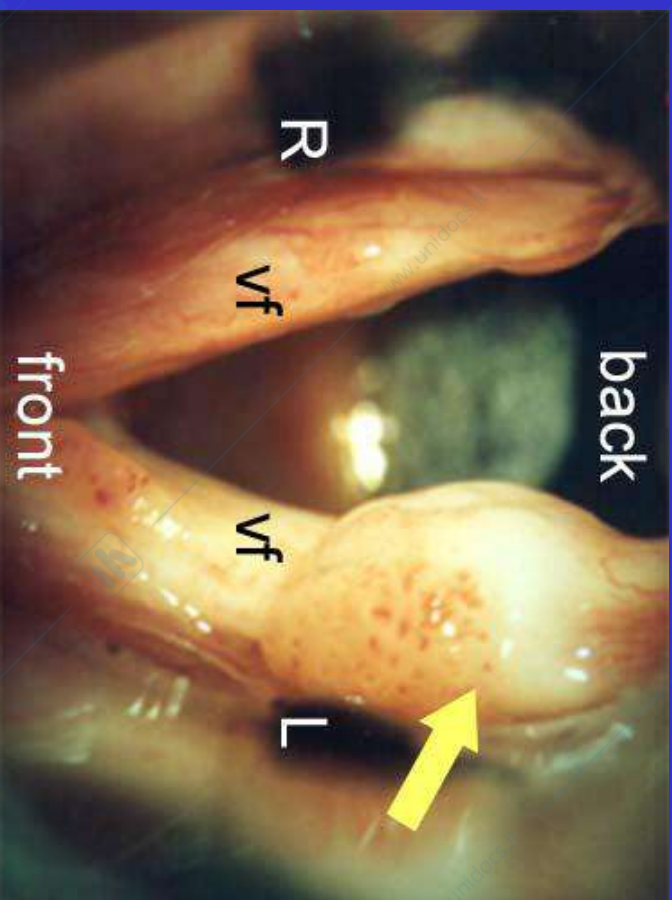
Anal carcinoma



Oral cancer



Oral and Laryngeal HPV Lesions



Source: Voiceproblem.org

Source: www.infocompu.com

Papillomavirus Diagnosi

- No sierologica
- No isolamento culturale
- Clinica
- Colposcopia
- Citologica
- Istologica
- Immunocitochimica (gruppo specifica)
- PCR DNA (tipizzazione tramite sequenziamento) -
Microscopia elettronica

Si può differenziare tra infezioni oncogeniche e non oncogeniche da HPV

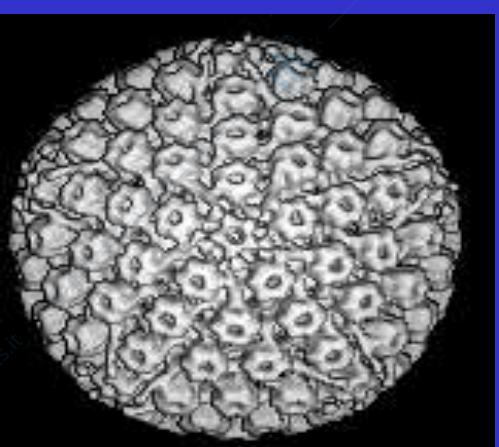
PREVENZIONE

- HPV 2, the bivalent vaccine (Cervarix®), covers types 16 and 18 and is US Food and Drug Administration (FDA) approved only for females (aged 9 through 25 years).
- HPV 4, the quadrivalent HPV vaccine (Gardasil®), covers HPV strains 6, 11, 16, and 18 and is FDA approved for both males and females aged 9 through 26 years.
- HPV 9, a nine-valent HPV vaccine, (Gardasil® 9), FDA approved on December 11, 2014, covers types 6, 11, 16, and 18 (just like HPV 4) but also covers five additional high-cancer-risk strains: 31, 33, 45, 52, and 58

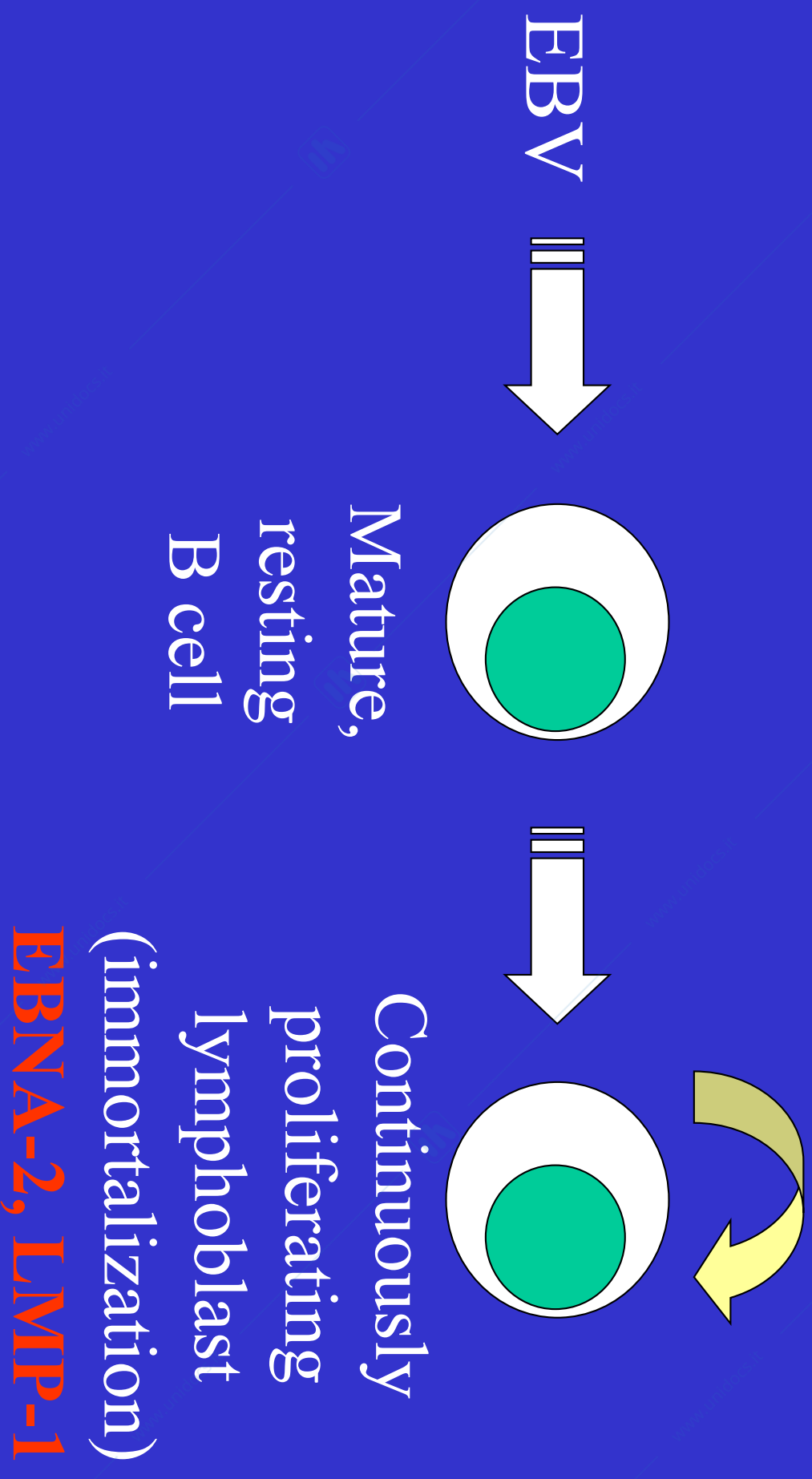
DNA Tumor Viruses In Human Cancer

Epstein-Barr Virus

- **Burkitt's Lymphoma**
- **Nasopharyngeal cancer**
- **Infectious mononucleosis**
- **Transforms human B-lymphocytes in vitro**



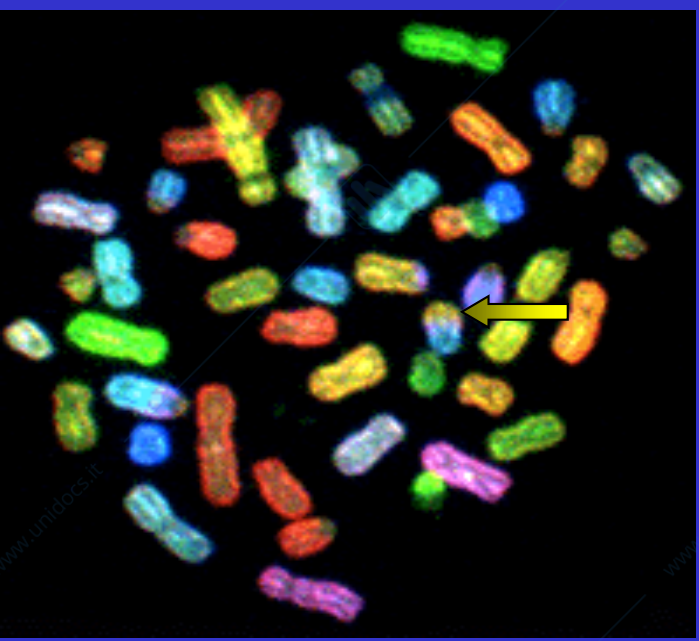
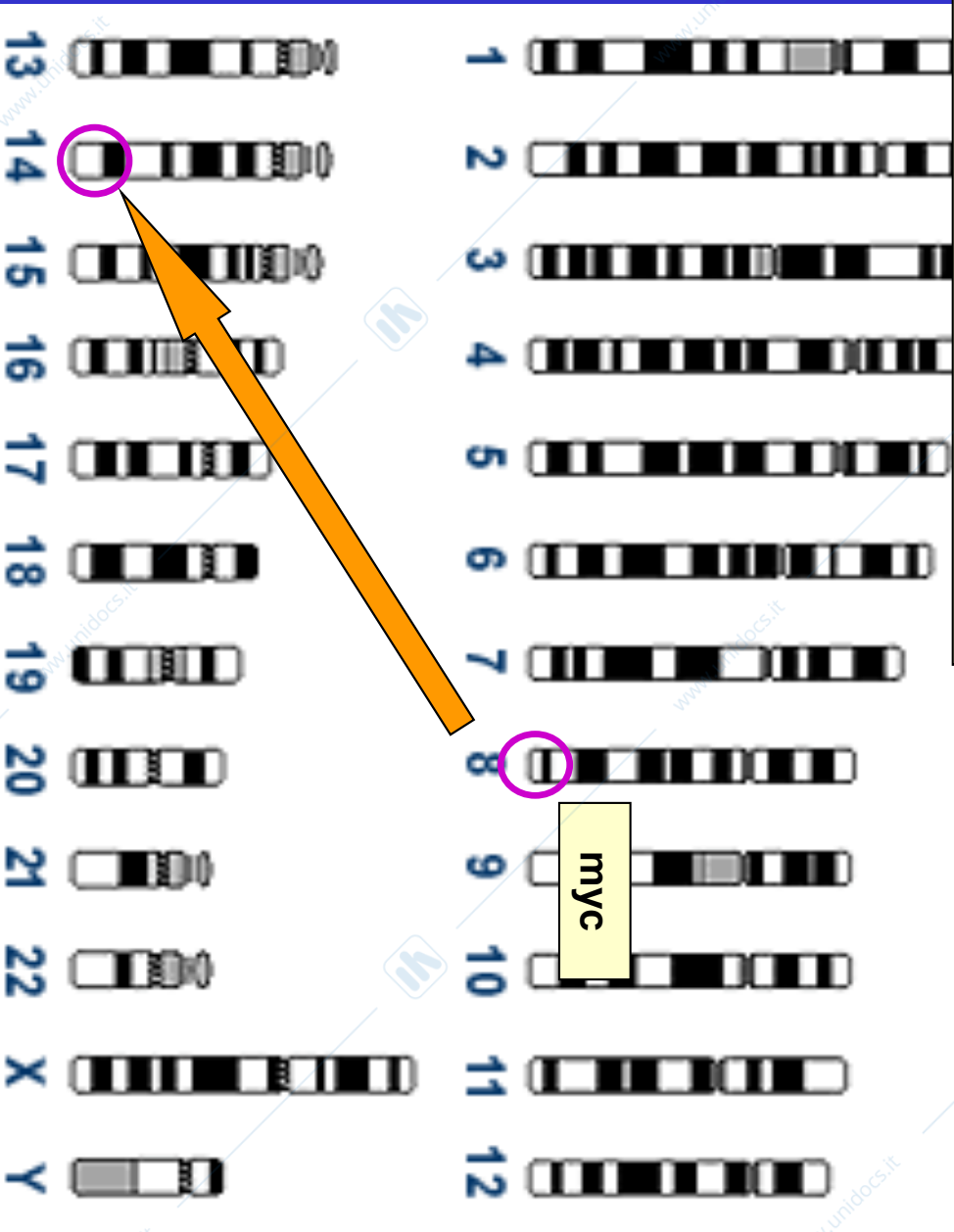
EBV Infections *In Vitro*



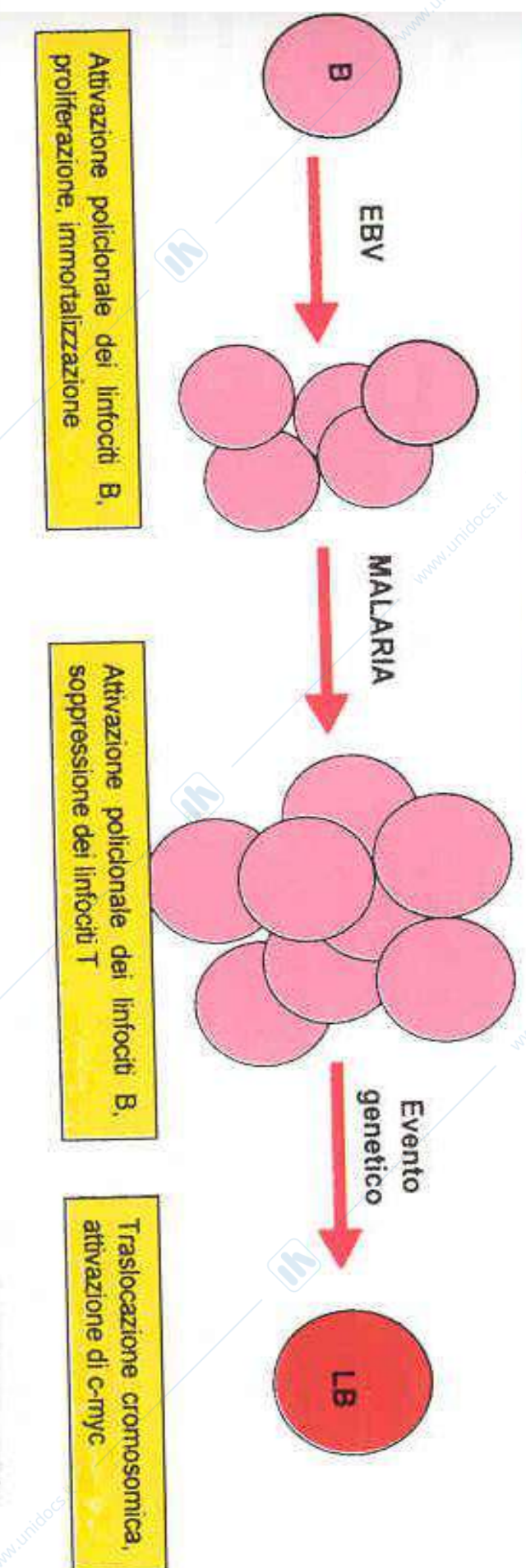
Traslocazione cromosomica nel

linfoma di Burkitt

Burkitt's Lymphoma
translocazione 8:14,
8:22



LINFOMA DI BURKITT e malaria



Linfocita quiescente

Linfociti B attivati,
proliferanti

Cellula tumorale

History of Kaposi's Sarcoma

- 1872: Moritz Kaposi (Hungarian dermatologist) described 5 men with “idiopathic multiple pigment skin lesions”
- 4 clinical variants subsequently identified
 - sporadic (classic) form
 - endemic (African) form
 - epidemic (AIDS-related) form
 - form associated with immunosuppression (e.g. transplant patients)
- epidemiology of KS (esp. AIDS-related form) suggested an infectious, possibly sexually-transmitted etiology
- 1994: Yuan Chang et al. identified DNA fragments of a previously unknown gammaherpesvirus from skin lesion of AIDS-KS patient



Produzione di proteine omologhe cellulari da parte di virus

KSHV CELLULAR HOMOLOGS

CELL CYCLE CONTROL

vCyclin

ANTI-APOPTOSIS

vIL-6

vBcl-2

vFLIP

vIRF

IMMUNE MODULATORY

v-IRF

v-CBP

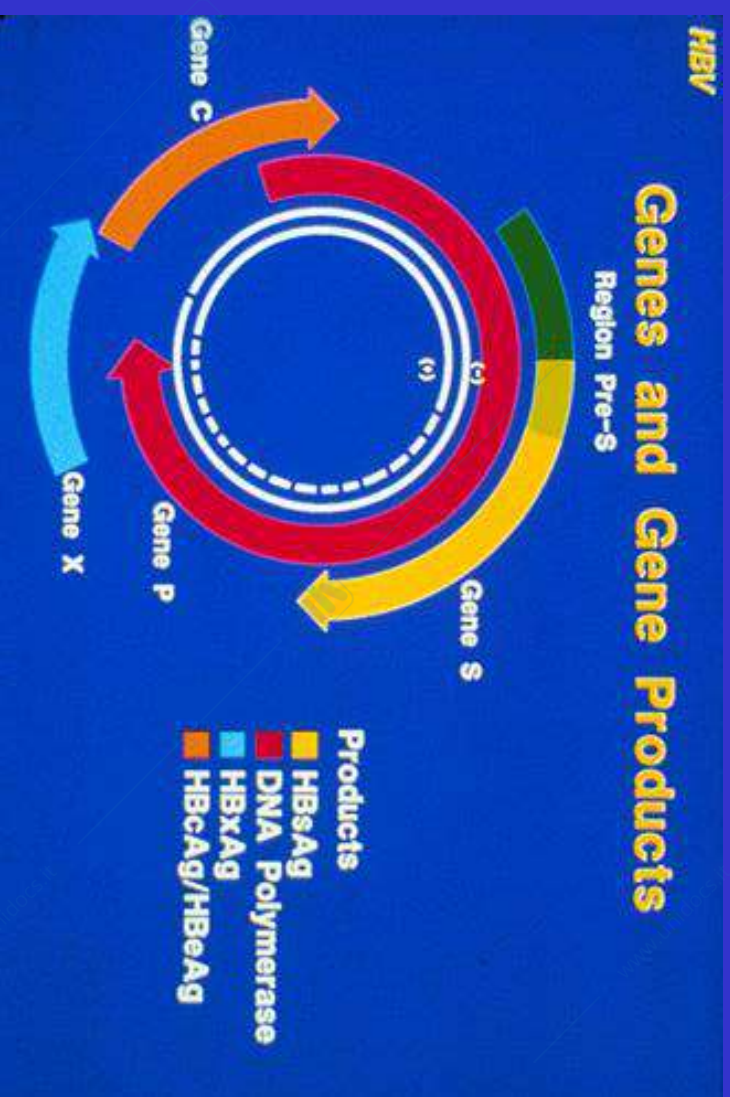
PROLIFERATION

vIRF

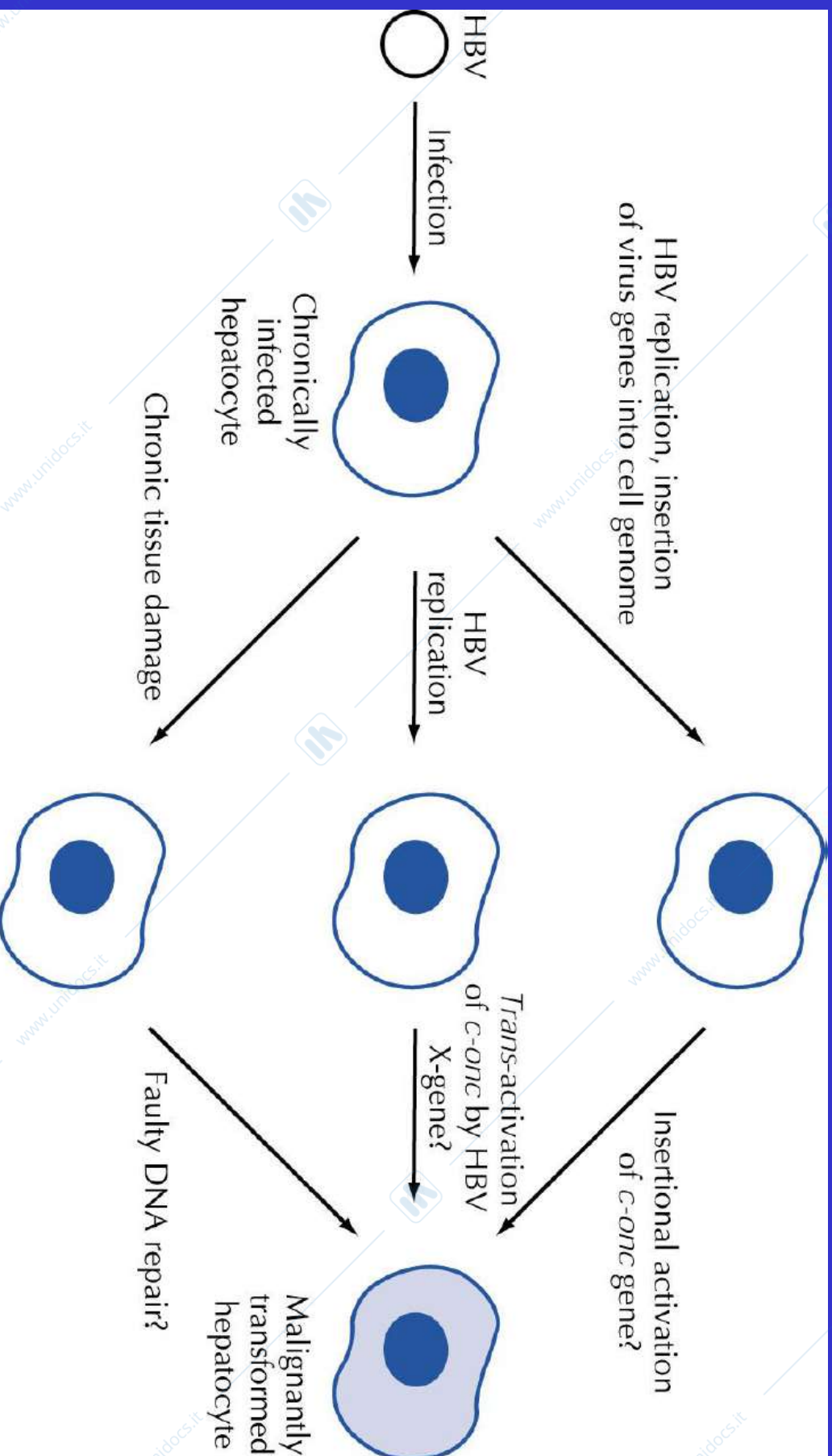
vGPCR

Virus dell'epatite B umana HBV

- **Causa il carcinoma epatico (30-50 anni dopo l'infezione)**
- **Aspettativa media di vita dopo la diagnosi di carcinoma 6 mesi**
- **Virus a DNA virus che codifica per 4 geni**
 - Pol – DNA polimerasi
 - Env -- envelope
 - pre-core – capsid virale
 - X – proteina non strutturale che attiva geni della cellula ospite ed induce l'insorgenza del fenotipo trasformato.



HBV & Hepatocellular Carcinoma (HCC)

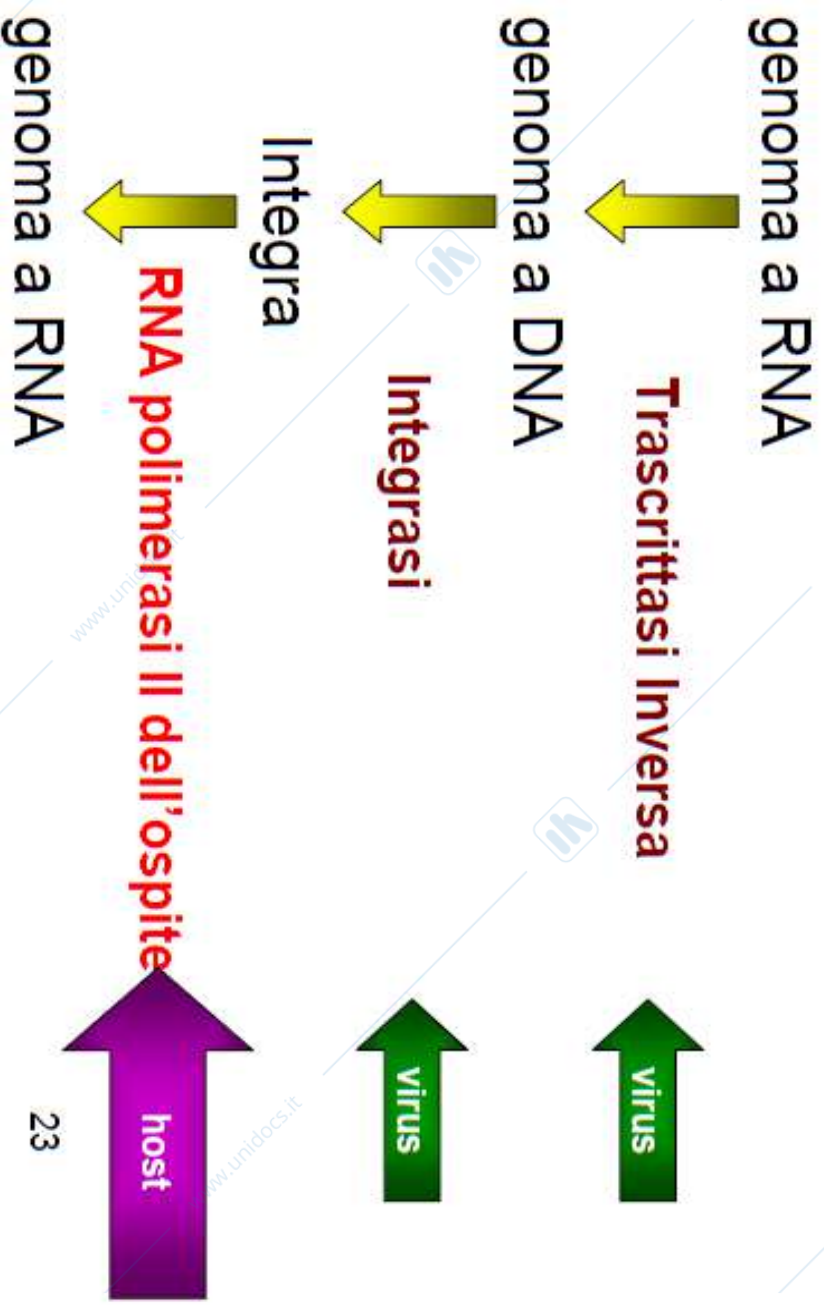
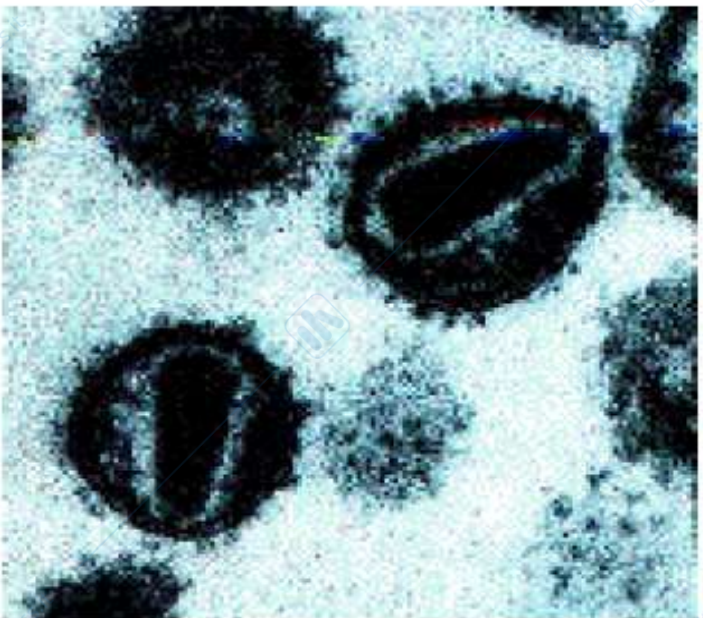


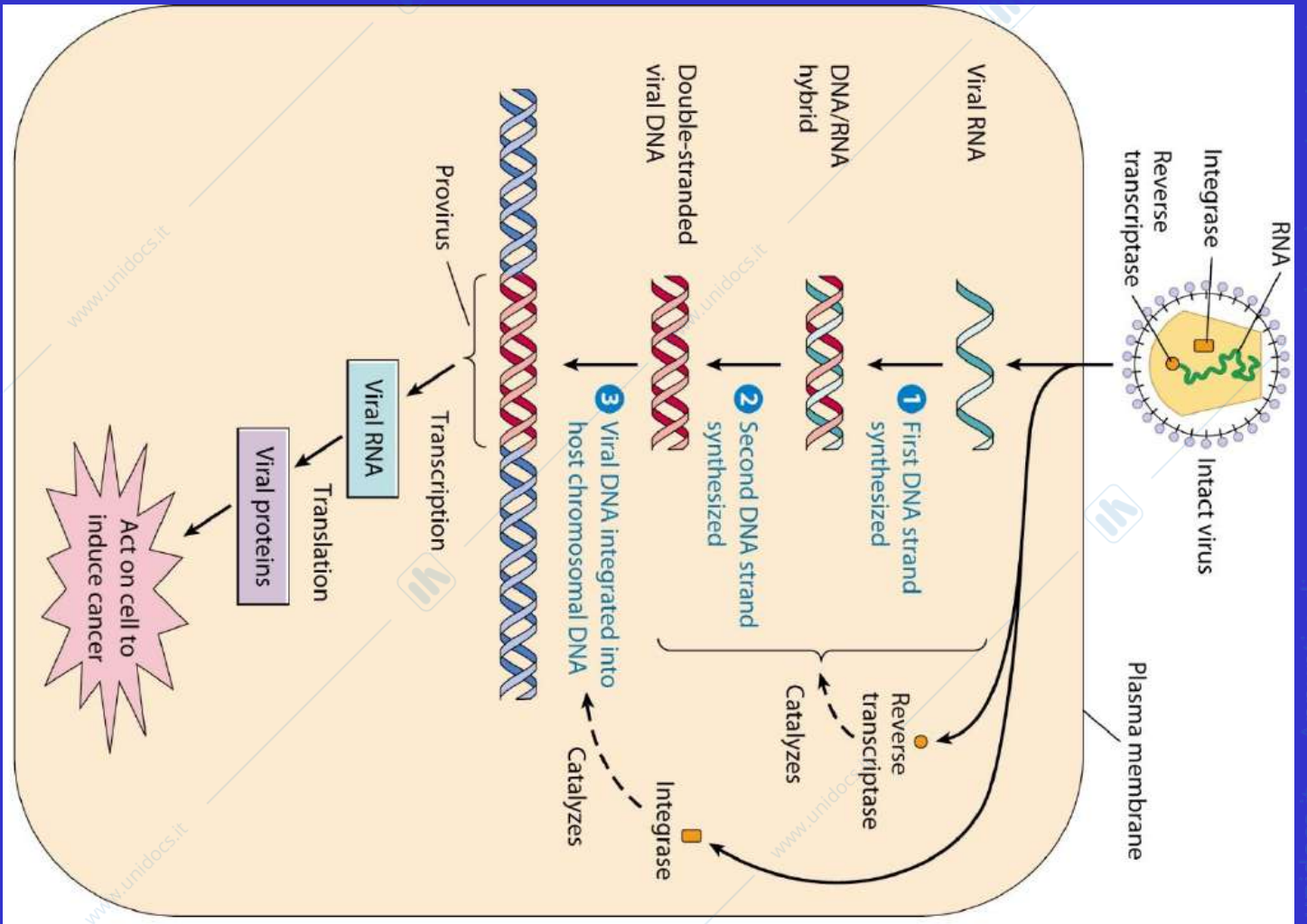
Virus Oncogeni a RNA

Genoma a RNA - Retrovirus

DNA Polimerasi RNA-dipendente codificata dal virus

TRASCRITTASI INVERSA





Virus Oncogeni a RNA

Gruppi di Retrovirus

- **Oncovirinae**



HTLV-1 e HTLV-2

- **Lentivirus**



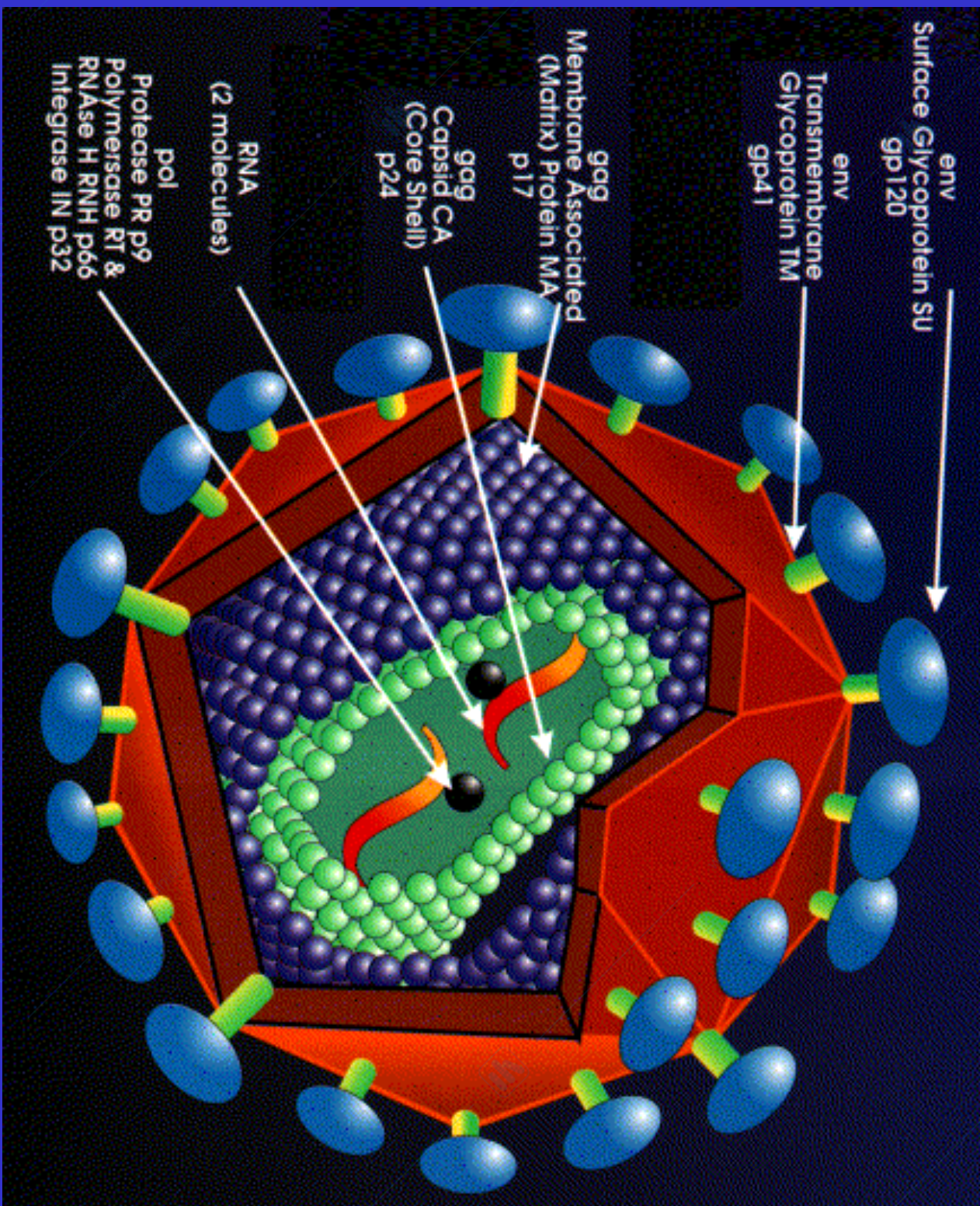
Lungo periodo di latenza

Malattia cronica progressiva

Visna, HIV

- **Spumavirinae**

RNA Tumor Viruses



Virus Oncogeni a RNA

Retrovirus noti causare tumori umani

- Virus linfotropico umano delle cellule T -1 (HTLV-1)

Leucemia delle cellule T nell'adulto, Leucemia delle cellule

T di Sezary in Africa, Caraibi, alcune isole Giapponesi

- Virus linfotropico umano delle cellule T -2 (HTLV-2)

Leucemia a cellule capellute

- HIV?

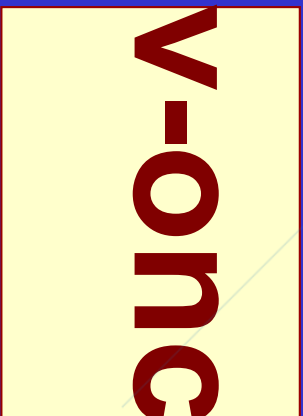
Virus Oncogeni a RNA

Proto-oncogene

Un gene cellulare (dell'ospite) omologo ad un gene analogo presente in un virus trasformante

Un oncogene cellulare può indurre trasformazione soltanto in seguito a:

- **mutazione**
- **un'alterazione del genoma cellulare**

The logo consists of the text "V-onc" in a bold, dark red, sans-serif font. The text is centered within a yellow rectangular box that has a thin red border. The background of the slide is a solid blue color with faint, light blue arrows pointing towards the center.

Un oncogene può essere trasmesso da un virus, nel
tal caso si parla di **ONCOGENE VIRALE**

Virus Oncogeni a RNA

Cosa codificano gli oncogeni?

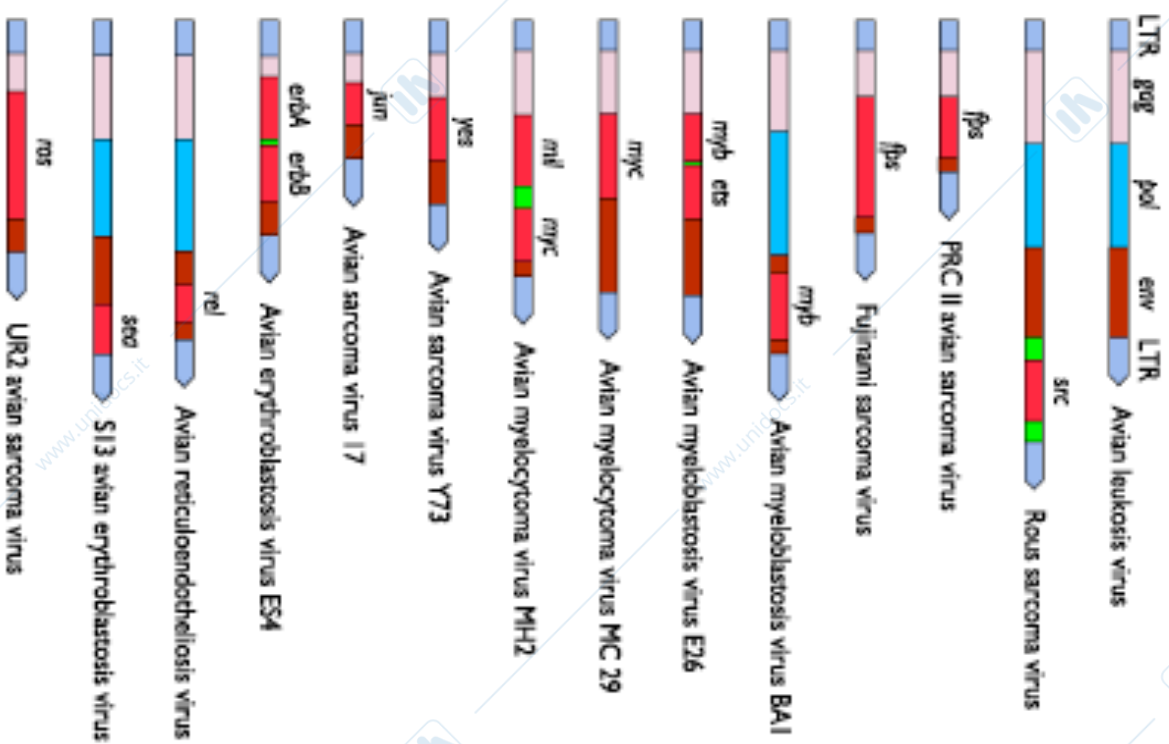
Proteine coinvolte nel controllo della crescita e nel differenziamento



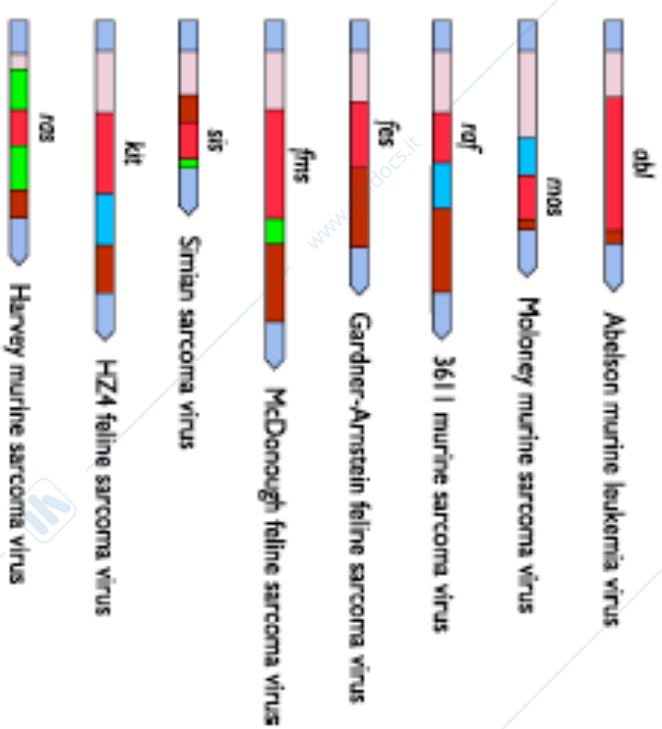
Fattori di crescita
 Recettori di fattori di crescita
 Proteine trasduttrici del segnale
 Fattori di trascrizione

RETROVIRUS

Avian transducing retroviruses



Mammalian transducing retroviruses



Alcuni retrovirus hanno un gene extra

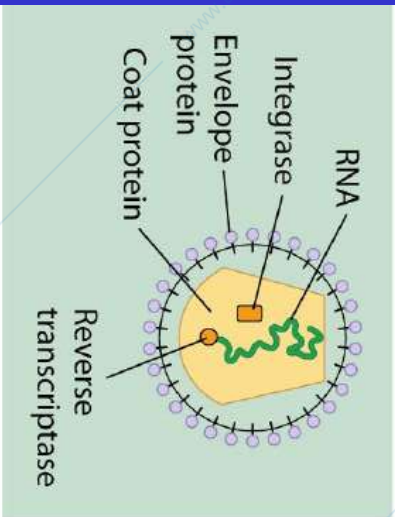
“tipico retrovirus”

R U5 GAG POL ENV U3 R

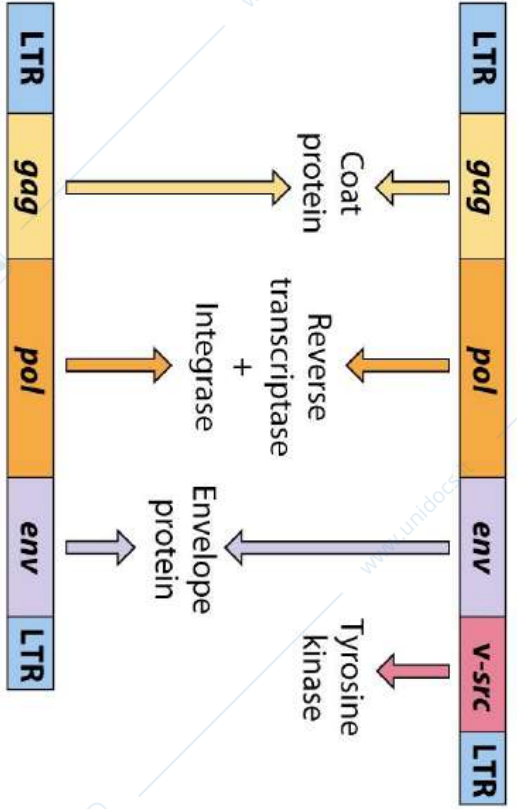
Rous Sarcoma Virus

R U5 GAG POL ENV SRC U3 R

Rous sarcoma virus



Genome of Rous sarcoma virus



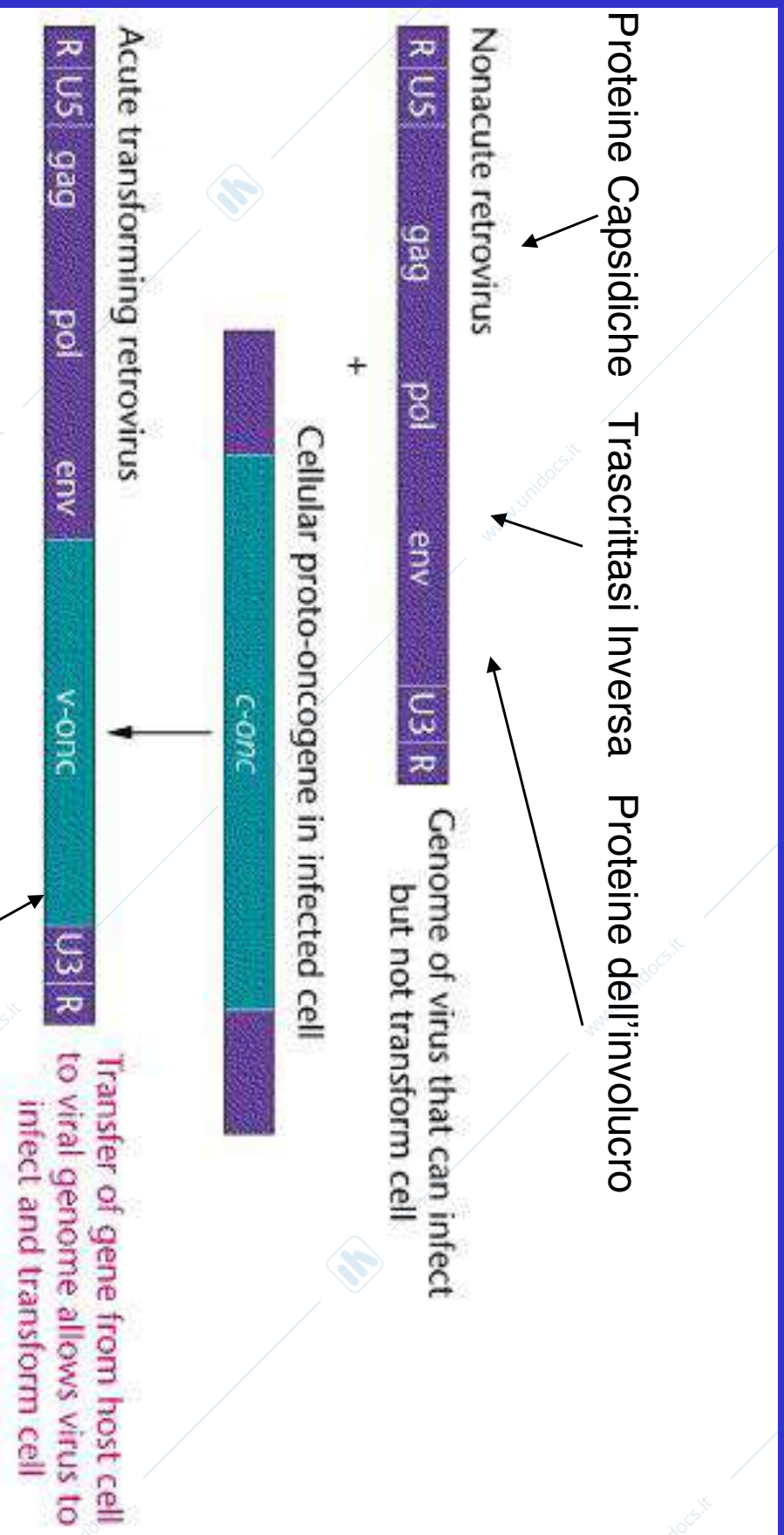
- Infects cells and replicates
- Causes cancer

Genome of mutant form of Rous sarcoma virus



- Infects cells and replicates
- No cancer

Origine dei Retrovirus Oncogeni (Trasduzione Virale)



Cancro indotto da Retrovirus

- 1) Alcuni retrovirus hanno ottenuto v-onc dalla cellula ospite (c-onc)
- 2) V-onc sono spesso mutati per aumentare la loro capacità di promuovere la crescita cellulare
- 3) In certi casi, l'incorporazione di genomi virali nel genoma cellulare altera l'espressione di c-onc che crea condizioni favorevoli all'induzione del cancro.

