

Microbiologia Applicata (CTF)

Prof. De Giuli Morghen

- Appunti originali da autore ignoto¹ (A.A. '06-'07) integrati da Dario (A.A. '09-'10)² -

*** Per le simulazioni dei quiz visita <http://ctf.netsons.org/test/MicroTest> ***

Indice Appunti

Microbiologia Applicata (CTF).....	1	Coltivazioni virali su uova embrionali di	
Introduzione.....	3	pollo.....	19
Cellule eucariote (funghi).....	3	Culture cellulari.....	19
Cellule procariote (batteri).....	4	Scelta del substrato cellulare.....	20
Genoma batterico, cenni.....	4	Amplificazione, Purificazione e	
Antibiotici, cenni.....	4	Titolazione virali.....	20
Classificazione di Gram.....	5	Composizione terreni coltura.....	20
Micoplasmi.....	5	La cellula procariote: i batteri.....	21
Rickettsie (e Chlamydiae).....	5	Membrana citoplasmatica.....	21
Agenti Acellulari.....	5	Struttura.....	21
Prioni.....	5	Diffusione semplice e trasporto.....	22
Virus.....	5	Trasporti.....	22
Patogenicità, introduzione.....	6	Canali.....	22
Colture batteriche.....	7	Parete cellulare.....	22
Riproduzione batterica.....	8	Parete Gram positiva.....	23
Polymerase Chain Reaction (PCR).....	8	Parete Gram negativa.....	23
Terapia Genica.....	9	Il peptidoglicano.....	24
Postulati di Kock.....	9	Rimozione parete.....	24
Tecniche di coltivazione batterica.....	9	Il citoplasma.....	24
Fattori influenzanti la crescita batterica.....	11	Gli inclusi citoplasmatici.....	25
Tecniche diagnostiche e dintorni.....	11	Colorazione di Gram.....	25
Test ELISA.....	11	Colorazione di Ziehl-Neelsen.....	25
Goccia pendente.....	12	Ribosomi.....	25
Titolazione Batterica.....	12	Capsula e Glicocalice.....	26
Microscopio Ottico.....	12	Ruolo della capsula nell'elusione della	
I virus.....	12	risposta immunitaria.....	26
Virologia: un'introduzione.....	13	Sfruttamento del capsido nello sviluppo	
Morfologie virali.....	15	di vaccini.....	26
I retrovirus.....	15	La capsula al microscopio ottico.....	27
Meccanismo d'azione della		I flagelli.....	27
retrotrascrittasi.....	15	Disposizione.....	27
Proprietà dei retrovirus.....	15	Composizione.....	28
I batteriofagi (o fagi).....	16	Morfologia.....	28
Infezione virale.....	17	Fonte di energia per il movimento.....	28
Risposta cellulare all'infezione virale.....	17	Biosintesi dei componenti flagellari.....	29
Coltivazione di Virus.....	18	Movimenti flagellari.....	29
Introduzione storica.....	18	Batteri aflagellati.....	30

1 Se sei il primo autore degli appunti e vuoi comparire nella sezione riconoscimenti contattaci sul sito.

2 Per le condizioni di ridistribuzione vedi l'apposita sezione al termine della dispensa.

Fimbriae o pili.....	30	I vaccini.....	51
I pili comuni.....	30	Le malattie a trasmissione aerogena.....	51
I pili sessuali.....	30	Legionellosi (non c'è?!?).....	51
Genoma batterico.....	31	Morbilli.....	51
DNA Cromosomiale.....	32	Decorso clinico.....	51
DNA Extracromosomiale.....	32	Rosolia.....	52
Plasmidi.....	32	Scarlattina.....	52
Coniugazione.....	33	Varicella Zoster.....	55
Ruolo dei plasmidi.....	33	Vaiolo.....	57
Ulteriori metodi di trasferimento genico		Parotite epidemica.....	59
.....	33	Influenza.....	60
Episomi.....	33	Meningite da meningococco.....	64
Colorazione DNA genomico.....	34	Pertosse.....	64
Duplicazione DNA batterico.....	34	Decorso clinico.....	64
Plasmidi come vettori di resistenza agli		Malattie a trasmissione sessuale.....	65
antibiotici.....	35	Sifilide.....	65
Batteri HFR (High Frequency of		Gonorrhea o blenorragia.....	67
Recombination).....	35	Papillomatosi.....	68
Test di resistenza agli antibiotici.....	36	Linfogranuloma venereo.....	69
Morfologia batterica.....	37	Epatite virale.....	69
Le endospore.....	38	AIDS.....	69
Sporulazione.....	38	Malattie a trasmissione oro-fecale.....	73
Germinazione.....	38	Tifo Addominale (salmonellosi).....	73
Struttura e contenuto.....	39	Colera.....	75
Proprietà strutturali.....	39	Altre Malattie.....	76
Patogenicità batterica.....	39	Poliomielite.....	76
L'invasività.....	40	Peste.....	76
La tossicità o virulenza.....	40	Intro.....	76
Fattori di virulenza.....	41	Agente eziologico.....	76
Il tropismo.....	42	Decorso Clinico.....	76
Fattori di tropismo aspecifici.....	42	Rabbia.....	77
Le Tossine.....	42	Decorso clinico.....	77
Endotossine.....	42	Profilassi.....	77
Esotossine.....	43	Chikungunya.....	77
Tossina tetanica.....	45	Malaria.....	78
Tossina Botulinica.....	45	Tetano.....	78
Tossina Colerica.....	45	Decorso Clinico.....	79
Tossina Difterica.....	45	Carbonchio.....	79
Risposta Immune.....	46	Difterite.....	79
Immunologia: introduzione.....	46	Tubercolosi.....	79
Attività di presentazione (MHC).....	48	SARS.....	82
Gli Anticorpi.....	48	Copyright.....	83

Introduzione

Gli agenti patogeni possono appartenere a diverse categorie biologiche:

- Cellule **eucariote** come protisti, funghi, piante ed animali
- Cellule **procariote**, i batteri
- Agenti **particolari** acellulari, come virus e prioni (*proteinaceous infectious particles*)

E' importante ricordare il ruolo chiave svolto dai batteri nelle prime fasi dell'evoluzione della vita sulla terra. L'ossigeno dell'atmosfera grazie alla quale si sono sviluppati gli organismi superiori è, infatti, il prodotto dell'azione dei cianobatteri, batteri anaerobi sviluppatisi tra i 2,5 e i 3 miliardi di anni fa (l'età della Terra è di 4,6). Le cellule eucariote si ritiene che si siano differenziate, a partire dai batteri, circa 1,4 miliardi di anni; la teoria più accreditata a tal proposito è l'ipotesi endosimbiontica per la quale l'eucariote ancestrale si sarebbe generato per fusione di un archea con un batterio.

Cellule eucariote (funghi)

Anche le cellule umane ed animali sono eucariote ma gli unici microorganismo potenzialmente patogeni tra gli eucarioti sono lieviti e muffe, appartenenti al regno dei funghi.

- LIEVITI (unicellulari), DNA + RNA, si riproducono per divisione binaria
- MUFFE (pluricellulari), DNA + RNA, si riproducono con gemmazione

Le mutazioni, unite alla selezione naturale operata dall'ambiente, portano all'evoluzione della specie, in accordo con la teoria evoluzionistica darwiniana. E', infatti, l'ambiente a selezionare le mutazioni favorevoli, generando di fatto adattamento. Es: nascita orso bruno al polo nord = mutazione sfavorevole.

I lieviti possono causare candidosi o patologie al cavo orale (mughetto)



Illustrazione 1:
Un'amanita muscaria,
un fungo estremamente
velenoso

Famiglia	Acidi nucleici	Dimensione (in b.p.*)	Moltiplicazione	Antibiotico-sensibile	Colorazione
LIEVITI	Dna+rna	2000-5000	Divisione binaria	Amfotericina B	Varia
MUFFE	Dna+rna	2000-5000	Gemmazione	Ketokonazolo	Varia
BATTERI	Dna+rna	500-3000	Divisione binaria	Penicillina, streptomicina	Gram
MICOPLASMI**	Dna+rna	150-1000	Divisione binaria	Ciprofloxacina, tetracicline	Povera
RICKETTSIE	Dna+rna	250-4000	Divisione binaria	Tetracicline, penicillina	Gram
CLAMIDIE	Dna+rna	250-400	Divisione binaria	Vari	Gram
VIRUS	Dna/Rna	15-250	Replicazione	Resistente	Pb/U
PRIONI	Proteina prp	?	Enzimatica	Resistente	Istologica

* b.p. = base pair, paia di basi nel genoma

** un antico nome dei micoplasmi (Mycoplasma) è **PPLO** (Pleuro Pneumonia Like Organism)

Poiché le cellule eucariotiche hanno struttura esterna molto spessa è difficile controllarle e eliminarle. Fortunatamente le patologie funginee sono rare e non provocano mortalità. L'eccezione è data dall'**aspergillosi** che colpisce gli individui immunodepressi. Le cause dell'immunodepressione possono essere varie:

- genetiche (ad esempio mutazioni su geni che codificano per proteine dei linfociti, per le quali sono in fase di sperimentazione clinica avanzata delle terapie geniche, in Europa a Milano e Parigi)
- farmaci immunosoppressori somministrati per evitare il rigetto in pazienti trapiantati
- patologie tumorali e leucemie
- patologie infettive come l'HIV

Cellule procariote (batteri)

Le cellule procariote sono caratteristica dei batteri, i quali possono essere suddivisi in diverse categorie a seconda delle loro caratteristiche, abbiamo così, tra gli altri, **batteri, micoplasmi, rickettsie e calmidie**.

Tutti accomunati dall'avere un genoma a DNA+RNA e replicazione per divisione binaria.

Genoma batterico, cenni

A differenza delle cellule eucariote, nei batteri abbiamo un solo cromosoma costituito da DNA circolare chiuso a doppia elica superavvolto attorno a particolari proteine. Se tale cromosoma è presente in una sola copia il genoma è detto aploide. Per la sua semplicità, quella batterica è stata la prima genetica ad essere studiata.

Grazie all'assenza di organuli e membrane citoplasmatiche, nei batteri è possibile una comunicazione immediata e l'mRNA è dotato di grande libertà di movimento. Questi fattori consentono alle cellule batteriche di **replicarsi in 20 minuti**, mentre il ciclo cellulare di una cellula eucariotica impiega da 12 ore a diversi giorni (ed esistono cellule che non si duplicano mai).

Grazie a questa elevata velocità di riproduzione le infezioni batteriche si evolvono rapidamente, più di quelle virali.

Antibiotici, cenni

Esistono però delle sostanze in grado di controllare la crescita o provocare la morte delle cellule batteriche: sono gli **antibiotici**, che possono essere divisi in:

- BATTERIOSTATICI che inibiscono la duplicazione batterica
- BATTERICIDI che uccidono il batterio

Il primo antibiotico ad essere scoperto fu la penicillina (individuata per serendipità da Fleming). Fu una grande scoperta poiché è un ottimo battericida. Essa inibisce la sintesi della parete dei batteri, e conseguentemente provoca la morte del battere in seguito all'aumento della sua pressione osmotica.

I batteri, col tempo, esercitano una funzione difensiva contro l'ambiente avverso costituito dall'antibiotico, ovvero sviluppano resistenza al principio attivo (PA). Nota che anche la resistenza ai farmaci è un processo di adattamento frutto delle mutazioni nella duplicazione del genoma. Tali mutazioni sono particolarmente comuni nei batteri in quanto la loro polimerasi non è proof-reading. Se una delle molteplici mutazioni spontanee conferisce al battere proprietà di resistenza all'antibiotico, in un ambiente in cui l'antibiotico è presente, tale mutazione sarà favorita e creerà una colonia di batteri resistenti.

Cenni sulle principali classi di antibiotici

Antibiotico	Meccanismo d'azione
Penicillina	Attraverso un anello β -lattamico agisce sulle cellule che stanno crescendo e quindi sintetizzando peptidoglicani (v. parete) uccidendole. Agisce solo in batteri con parete (no micobatteri). Non è la terapia d'elezione in praticamente niente perché ad oggi quasi tutti i batteri sono resistenti alle penicilline. E poi l'1-5% della popolazione è allergica.
Tetraciclina	Classe di antibiotici caratterizzati da 4 cicli nella struttura (da cui il nome). Si legano e inibiscono una subunità ribosomiale (la 30S) dei batteri, inibendo la sintesi proteica. Poiché i ribosomi umani sono diversi virtualmente non ci sono effetti tossici. Solo batteriostatico quindi è una buona idea solo se poi il sistema immunitario riesce a distruggere i batteri rimasti.
Sulfamidici	Sono molecole simili all'intermedio di una via metabolica batterica (ac. folico), quindi sono competitori agonisti per i siti attivi di tali enzimi e bloccando il normale metabolismo microbico. Non hanno effetti sull'uomo perché le cellule umane non sintetizzano folati.
Eritromicina	Lattone a 12 o 22C, si lega al ribosoma e previene l'allungamento della catena peptidica in formazione, inibendo di fatto la sintesi proteica. Antibiotico a largo spettro funziona su Gram positivi, micobatteri e alcuni G-
Vancomicina	Da 'Vanco', conquistatore. Uno degli ultimi scoperti, da usare solo per emergenze e patologie resistenti ad altri farmaci, ma ormai esistono già batteri resistenti anche alla vancomicina.

Classificazione di Gram

La colorazione di Gram (v. oltre) è un utile strumento per catalogare e riconoscere i batteri all'interno delle due grandi categorie: **Gram+** (G+) e **Gram-** (G-). Vedi la sezione 'Colorazione di Gram' a pag. 25 e quella sulla parete.

Micoplasmi

I **micoplasmi** sono una classe di batteri con caratteristiche particolari, in quanto privi dello strato di acido murico della parete. Per questo motivo si colorano molto poco con la colorazione di Gram (che agisce sulla parete) e sono pleiomorfi (ovvero non hanno forma definita) in quanto la parete è la struttura che definisce la morfologia batterica. Uno di loro, il *M. pneumoniae*, è l'agente eziologico del 10-20% delle polmoniti contratte in ambiente extraospedaliero.

Le piccole dimensioni (0,3-0,8 µm) dei micoplasmi ed il loro pleiomorfismo, poi, fanno sì che essi **non** siano **trattenuti** dalle **membrane batteriostatiche** filtranti comuni i cui pori sono di $\varnothing$ 0,45 µm. (Nota che molti liquidi usati per soluzioni iniettabili endovena vengono filtrati con filtri batterici, e pertanto non trattengono i micoplasmi). A causa delle loro dimensioni, inoltre, sono visibili solo al microscopio elettronico (SEM e TEM) mentre a quello ottico solo con particolari tecniche di contrasto di fase.

La mancanza di parete, infine, fa sì che la penicillina non svolga alcuna azione su di loro. Alcuni secernono emolisina, il che li rende facilmente individuabili con test diagnostici che sfruttano terreni di coltura contenenti sangue, come l'agar-sangue o l'agar-cioccolato.

Rickettsie (e Chlamidia)

Questi batteri sono **incapaci** di sintetizzare **ATP** e pertanto **parassiti obbligati**, ovvero devono infettare delle cellule eucariotiche da cui trarre ATP. Per questo si crescono in colture cellulari, come i virus.

Le tetracicline sono antibiotici d'elezione, sono **Gram negativi**, **piccoli** (0,3-0,5µm).

Agenti Acellulari

Prioni

Per quanto riguarda i prioni il loro stesso nome è un'esplicitativo acronimo: “**p**roteinaceous **i**nfective **o**nly particle” ovvero particella infettiva solamente proteica. Si tratta di agenti infettivi non convenzionali privi di acidi nucleici quindi di patrimonio genetico ma formati solo da proteine.

Il più noto è l'agente eziologico della BSE (Bovine spongiform encephalopathy) ovvero la cosiddetta “mucca pazza” la cui variante umana prende il nome di morbo di Creutzfeldt-Jakob. In pratica si tratta di una proteina normalmente presente nel SNC umano, ma la cui forma fisiologica ha una conformazione secondaria ad α -elica. Tale proteina come tutte ha un suo ciclo con sintesi e degradazione. Il prione della BSE, invece, è in pratica la stessa proteina ma nella conformazione a β -sheet. Quando questa entra in contatto con la versione 'normale' la trasforma sua volta in β -sheet sottraendola de facto ai processi degradativi cellulari. A questo punto l'accumulo di proteina a livello nervoso dà encefalopatia spongiforme con sintomi di carattere neurologico prima e morte poi, tanto nella versione animale (BSE) che nell'analoga variante umana (Creutzfeldt-Jakob). Tale patologia è stata segnalata per la prima volta nelle mucche nel 1986.

Causano anche la scrapie (c'è un quiz).

Virus

I virus, come i prioni, non hanno nessuna attività al di fuori delle cellule. Essi, infatti, sono pacchetti di informazioni genetiche, e come tali agiscono solo nelle cellule dove trovano ribosomi ed enzimi necessari alla replicazione del loro corredo genico. Un virus circolante nel corpo che non infetti alcuna cellula può solo provocare risposta immune (a causa delle sue proteine di superficie, es. emoagglutinine).

Abbiamo visto come le patologie aventi come agenti eziologici dei batteri siano controllabili con antibiotici, per le **patologie virali**, invece, esistono solo pochi farmaci (gli antibiotici non funzionano perché hanno come bersaglio strutture tipiche delle cellule procariote, come la parete, che sono assenti nei virus). Lo scarso numero di antivirali esistenti è dovuto alla difficoltà nell'ottenere sostanze capaci di aggredire selettivamente i virus e non le cellule eucariote umane. Le strutture virali, infatti, sono semplici e presentano analogie con elementi cellulari eucarioti; non ci sono, in altre parole, elementi caratteristici come la parete dei procarioti. Per combattere questo genere di patologie, invece, risulta determinante l'apporto dei **vaccini**, in quanto spesso anche virus inattivati sono capaci di suscitare risposte immunitarie.

Nota che fa eccezione il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) per il quale sono disponibili svariati farmaci ma, nonostante gli sforzi della ricerca in tal senso, non è ancora disponibile un vaccino.

I virus per moltiplicarsi devono infettare una cellula (ovvero entrare nella cellula o immettere in essa il loro corredo genomico ed alcuni enzimi). Per legarsi alle cellule i virus utilizzano degli **antirecettori** o ligandi, delle strutture capaci di legarsi a specifici recettori cellulari. Questa specificità fa sì che i virus possano riuscire ad infettare un tipo di cellule ma non un altro. Si discrimina il virus a seconda del bersaglio cellulare. La capacità di penetrazione di un virus dipende, pertanto, dalla presenza o meno del recettore sulla membrana cellulare. La composizione recettoriale della membrana è, come detto, funzione del tipo di cellula: ciò è reso possibile anche se il genoma delle cellule dei diversi tessuti è il medesimo dal processo di differenziamento che silenzia alcuni geni (e pertanto le proteine da essi trascritte) e ne accende altri. Particolarmente soggette ad infezioni sono, quindi, le cellule sottoposte ad un processo di differenziamento continuo, come le cellule staminali emopoietiche o quelle embrionali (es. il virus della rosolia fa danni gravi al feto perché lì sono presenti cellule non totalmente differenziate con recettori per la rosolia; tali recettori non sono presenti nelle cellule già differenziate della madre che quindi non contrae il virus).

Esistono poi virus ubiquitari che si trovano ovunque.

Esistono i virus specifici che vanno ad attaccare solo una determinata specie (es animali, piante, funghi). Nota i **virus dei batteri** sono detti **batteriofagi** (o fagi).

La trasmissione dei virus può avvenire tramite **vettori** (es. insetti trasportano virus da una pianta all'altra). Questi vettori non permettono la replicazione del virus (altrimenti il vettore morirebbe) ma lo trasportano soltanto (fa eccezione il virus della malaria che compie una fase determinante per la patogenicità all'interno del vettore, una zanzara).

Quando il virus entra nella cellula, essa muore.

Fanno eccezione i **virus oncogeni**: questi trasformano la cellula in cellula immortale e in seguito in cellula tumorale (cellula che prolifera indefinitamente).

Per far sì che la cellula diventi tumorale deve verificarsi l'integrazione, ovvero il genoma del virus viene trasferito nella cellula aggiungendosi (integrandosi) al corredo genetico della cellula. A seconda della porzione di DNA in cui il genoma virale si è integrato si può generare o meno un tumore, in genere ciò avviene quando la porzione integrata va ad inibire l'espressione dei geni del controllo del ciclo cellulare o ad amplificare (enhancer) geni precursori della duplicazione cellulare.

Normalmente il virus entra nella cellula e la uccide (la cellula non è più in grado di produrre le sue proteine) mentre quelle oncogene vivono in simbiosi. I virus oncogeni più efficienti sono quelli che contengono come genoma solo RNA e vengono definiti retrovirus (in quanto per integrarsi fanno uso della retrotranscriptasi).

Patogenicità, introduzione

L'attività del **virus** è sempre correlata ad una attività patogena che può condurre:

- alla morte della cellula perché infettata.
- ad una situazione in cui la cellula perde le sue caratteristiche fisiologiche e, venuto meno il controllo del ciclo cellulare da' tumorigenesi; in questo caso l'attività patogena è correlata con l'incapacità della cellula di autoregolarsi nella sua capacità proliferativa (non risponde a inibizione da contatto delle cellule adiacenti e si sottrae al controllo d'organo).

Per quanto riguarda i **batteri** l'attività patogena può essere correlata a due meccanismi diversi:

- il meccanismo tipico dell'invasione di un organo (ed eventualmente successiva batteremia).
- l'attività biosintetica secretiva della cellula batterica che può sintetizzare delle sostanze tossiche per l'organo e l'organismo (endo ed esotossine).

La quantità minima di batteri capace di provocare una patologia non è costante ma varia da batterio a batterio ed in funzione dalle condizioni ambientali. (es. il tifo addominale si può contrarre solo ingerendo una quantità elevata di salmonella e comunque sempre in relazione alla contemporanea assunzione di cibo perché il cibo stimola la secrezione gastrica che elimina la maggior parte delle salmonelle. In caso si ingerisca acqua o gelato contaminato basta una dose minore di salmonella per contrarre il tifo perché la bassa temperatura mantiene le salmonelle vive. Nel caso del tetano, invece, bastano 500-1000 batteri per uccidere una persona perché la tossina che essi secernono è molto precisa. Però il tetano essendo anaerobio per essere infettivo ha bisogno di una condizione molto particolare, l'assenza di ossigeno e per ciò deve situarsi in profondità nell'organismo e non sulla cute, sulle ferite superficiali o nell'ipoderma).

La sintesi di sostanze tossiche da parte di batteri può avvenire anche in colture in vitro. La coltivazione consiste nella preparazione di un adatto terreno di coltura che si inocula con la popolazione microbica o con un singolo microrganismo.

Culture batteriche

Coltivare i microrganismi significa farli crescere in un sistema avulso rispetto al normale sistema in cui noi li troviamo come sistema patologico.

Le colture batteriche possono essere preparate per fini diagnostici o di una caratterizzazione del microrganismo. Non tutti i microrganismi possono essere cresciuti in cultura, anzi, la **coltivazione** è possibile per **meno dell'1% dei microrganismi** presenti in natura. Tuttavia poiché i microrganismi patogeni per gli animali presentano caratteristiche note e comuni riusciamo a coltivarli quasi tutti.

Inizialmente questa possibilità di coltura era limitata perché non si avevano conoscenze dirette sulla possibilità di preparare terreni di cultura in vitro e pertanto l'unica possibilità era quella di utilizzare degli animali suscettibili. Ancora adesso alcuni microrganismi vengono fatti replicare in vivo perché sono esigenti e non conosciamo le condizioni di cui necessitano. (es. virus del papilloma che causa il tumore della cervice uterina). Successivamente sono stati sviluppati terreni di coltura naturali a base di brodo di carne filtrato e sterilizzato. Questi terreni era adatto per molti microrganismi ma avevano dei limiti: una volta inoculati i batteri questi si moltiplicavano efficacemente per un certo tempo, poi la replicazione si arrestava. Tale sospensione della replicazione non era dovuta all'esaurimento delle sostanze nutritive ma era causata dall'incremento di acidità della soluzione dal pH ottimale di 7 a 5, frutto della diffusione cataboliti. Ciò era comprovato dal fatto che neutralizzando il terreno con un tampone la moltiplicazione ricominciava.

La diminuzione di pH (acidificazione) agiva da batteriostatico, cioè arrestava irreversibilmente la capacità riproduttiva dei batteri, senza però ucciderli. **Batteriostasi** si contrappone al concetto di battericida, che indica l'uccisione del batterio.

Un ulteriore inconveniente delle colture a base di brodo di carne era la grande variabilità esistente in base alla carne dell'animale usata nella produzione. Si inventarono, quindi, i primi dadi di brodo concentrato per creare terreni identici di concentrazione desiderata. Un altro limite di tale coltura era la sua **non selettività**: non era discriminante per i vari tipi di batteri. In molti casi, infatti, la sola presenza di un batterio può essere correttamente correlata con la patologia, ed è presente solo un batterio, è il caso delle infezioni dei liquidi corporei sterili (sangue, linfa, liquido cefalorachidiano, urina). Nel caso, invece, di organi o distretti esposti all'ambiente esterno, ove è già presente una flora microbica saprofita (è il caso delle mucose genitali o respiratorie, cute ed orofaringe) l'agente patogeno è mescolato alla flora naturale, e compete con essi, pertanto sarà necessario purificare con ambienti di coltura selettivi il microrganismo che si intende studiare. Nota che ad es. a livello delle mucose degli organi genitali è più facile contrarre infezioni se si fa un uso eccessivo di detergenti, perché questi rimuovono la naturale carica microbica di difesa, come il lactobacillis vaginale, e quindi funghi, come la candida, e microrganismi patogeni possono proliferare senza incontrare la naturale resistenza della flora batterica saprofita. Nel caso della candida l'assenza dei lactobacillis fa diminuire l'acidità che solitamente inibisce i funghi. Un effetto secondario delle cure antibiotiche, poi è la distruzione della flora batterica a livello gastrointestinale, che pertanto facilita la diffusione di patogeni nel lume intestinale.

Per identificare una patologia dell'apparato respiratorio, come una laringotracheite di natura batterica bisogna isolare il microrganismo che l'ha causata e per fare ciò è necessario ricorrere ad un tampone faringeo. Se genericamente con uno stick, un cottonfioc sterile, si preleva un po' di flora microbica dal fondo della gola, flora in cui sicuramente si troverà anche il patogeno, e lo stick è inserito in un adeguato terreno di coltura, il risultato è che si ottiene la moltiplicazione di tutti i microrganismi, patogeni e naturali. Risulta nuovamente determinante l'importanza di coltivare selettivamente l'elemento patogeno. Per osservare un batterio si può:

- modificare la composizione del terreno liquido di coltura aggiungendo o sottraendo dei componenti, rendendolo selettivo
- di fronte ad una patologia fungina possiamo utilizzare un antibiotico a largo spettro molto potente che ucciderà tutti i batteri e farà sopravvivere i funghi (es. gli aspergilli)
- nel caso di batteri possiamo preparare dei terreni di coltura adatti a far sopravvivere solo determinati batteri (es. nel caso di batteri situati nell'orofaringe, che contiene ossigeno, e che quindi sono aerobi, posso preparare un terreno solo per organismi aerobi escludendo così gli anaerobi) oppure terreni che stimolano la moltiplicazione solo dei patogeni. In caso si aggiunga una sostanza inibitoria per i non patogeni il terreno è detto **selettivo**; nel caso dell'aggiunta di una sostanza facilitante la riproduzione dei patogeni il terreno è detto **elettivo**. Questi metodi non sono semplici ma ci permettono di arricchire la popolazione dei microrganismi in esame (es. nel caso di colture miste con batteri tubercolari, che sono resistenti ai sali biliari, basta aggiungere sali biliari per inibire gli altri batteri e favorire la sola riproduzione dei batteri della tubercolosi)

Successivamente sarà necessario isolare delle colonie del batterio.

- I batteri vengono fatti moltiplicare su un terreno semisolido o solido, invece che in un terreno liquido. Dal punto di vista biochimico questi tre terreni non hanno differenze, pertanto i batteri crescono bene in tutti i terreni. Il terreno solido (o semisolido) consente però l'isolamento: inoculando un terreno liquido i batteri si riproducono e si diffondono in tutto il recipiente; inoculando un terreno solido soprattutto in superficie e con un adatto spatolamento è possibile ottenere la crescita separata dei singoli batteri che danno origine a colonie singole che per definizione sono dette **cloni** (ovvero tutti i microrganismi che formano la colonia derivano dal

medesimo battere). Per ottenere un terreno solido dobbiamo aggiungere al terreno liquido una sostanza chiamata **agar**, che è ottenuta da un polisaccaride, estratto da particolari alghe che crescono in Africa, purificato e ridotto in polvere. L'agar ha caratteristiche molto particolari: se lo si mescola a temperatura ambiente con il brodo di coltura non si scioglie, per **sciogliersi** ha bisogno di una temperatura superiore a **90°C**; l'agar sciolto nel brodo diminuendo di diversi °C rimane liquido e quindi può essere trasferito in una capsula. A temperatura di **46/47°C** l'agar con il brodo comincia a **gelificare** dando quindi il terreno di coltura solido o semisolido. (Le concentrazioni di agar usato variano da 1 a 1,5gr per 100ml di brodo). La solidificazione crea una superficie su cui possiamo inoculare i batteri. Se riscaldiamo il terreno di coltura esso rimane solido fino a 95-100°C: questo permette di coltivare batteri termofili o ipertermofili che crescono a temperature elevate (es. i batteri dei fanghi e delle fonti di acqua calda che vivono a 70-90°C o quelli degli uccelli che hanno una temperatura corporea di 40-41°C).

Riproduzione batterica

Il processo di moltiplicazione dei batteri è detto di divisione o fissione binaria. Ma perché i batteri si moltiplicano? Attualmente la teoria più avvalorata e accettata è quella secondo cui i batteri soddisfano, con la divisione, la necessità di ripristinare delle condizioni metaboliche ideali. Approssimando un batterio ad una sfera si deve valutare il rapporto tra superficie e volume: questo rapporto diminuisce linearmente con il reciproco del raggio, cioè man mano che il batterio si accresce dimensionalmente. Nei batteri la funzione respiratoria non è affidata ai mitocondri, che nella cellula eucariota si trovano in numero proporzionale alle esigenze respiratorie cioè energetiche, poiché i batteri non possiedono organuli citoplasmatici. Nei procarioti la respirazione è svolta da enzimi respiratori (es. la catena dei citocromi) posizionati sulla faccia interna della membrana plasmatica. Quindi l'attività respiratoria di un batterio è direttamente proporzionale alla dimensione della superficie della membrana e, poiché l'attività batterica è proporzionale al volume plasmatico, di conseguenza maggiore sarà il rapporto superficie/volume, maggiore sarà la capacità respiratoria. Quando il batterio si accresce eccessivamente per soddisfare le esigenze respiratorie deve ridiversi.

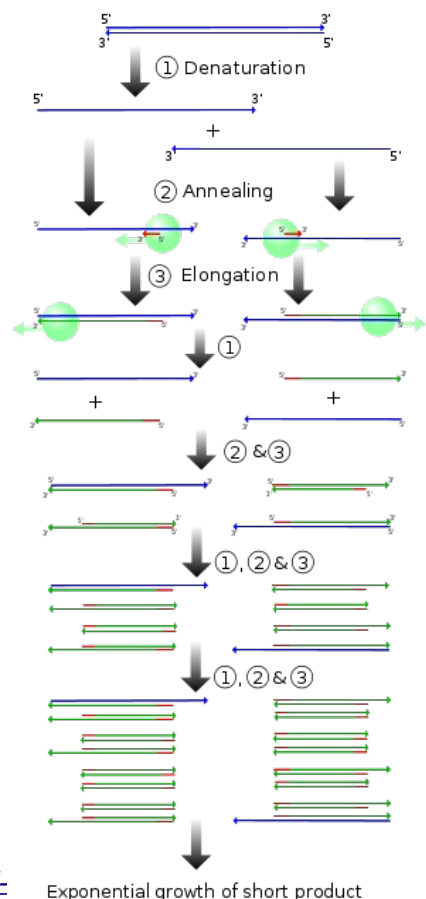
Polymerase Chain Reaction (PCR)

In realtà oggi più che le colture batteriche spesso per fini tassonomici/diagnostici si ricorre alla PCR che permette maggiore velocità e precisione, presentando anche molte problematiche in meno rispetto alle tradizionali colture. Si tratta di una tecnica capace di moltiplicare selettivamente una o poche copie di genoma generandone miliardi di repliche. Nonostante da questa descrizione possa non sembrarlo si tratta di una tecnica fondamentale per la biologia molecolare e l'ingegneria genetica. Le sue potenzialità amplificative sono tali da poter rilevare la presenza di un singolo virus o di distinguere tra genotipi tra cui vari una sola base azotata. Si tratta di una complessa catena di reazioni polimerasiche, da cui il nome; si tratta di una metodica relativamente nuova (1986) che valse al suo ideatore il premio Nobel soli 7 anni dopo per l'enorme impatto. Oggi esistono macchine capaci di automatizzarne quasi completamente l'esecuzione.

Per poter moltiplicare il genoma la PCR deve usare i mattoni fondamentali del DNA, i nucleotidi ATGC nella loro forma difosforilata, un'enzima DNA polimerasi, dei primer a monte e a valle del segmento che si intende copiare ed infine deve agire su DNA aperto, ovvero denaturato quindi riscaldato. Questo rappresenta il limite più grande in quanto la temperatura di denaturazione del DNA (95°C) è tale da inattivare anche gli enzimi capaci di leggerlo e copiarlo quali la DNA polimerasi. L'elemento chiave che ha reso possibile la PCR, pertanto, è l'isolamento a partire da un batterio termofilo (il *Thermus aquaticus*) di una DNA-pol termostabile ovvero capace di resistere ad alte temperature (per la sua origine è stata detta Taq Pol).

Le fasi del processo quindi saranno:

1. **Denaturazione** DNA con una T di 94-96°C, la doppia elica si 'apre' in due eliche singole
2. **Annealing**, a ca. 65°C (ma dipende dai primers) in 20-40 secondi i primers (della composizione di AT/GC) si legano alla sequenza genica complementare, successivamente con la DNA-Pol termostabile inizia la trascrizione
3. **Estensione** alla temperatura ottimale della polimerasi termostabile scelta, generalmente tra 65 a 70°C, in questa fase avviene la sintesi di un nuovo filamento di DNA complementare al precedente. L'efficienza è di circa un migliaio di basi sequenziate al minuto



Questo processo si ripete qualche decina di volte fino ad ottenere quantità significative del segmento genico scelto (la scelta è effettuata con la selezione dei primers, i quali dovranno avere una lunghezza sufficiente a conferirne specificità assoluta).

Tutti questi passaggi sono validi anche per moltiplicare un frammento di RNA con trascrittasi inversa, ma dovrò inserire le basi azotate giuste.

Terapia Genica

(Un [video](#) tratto da una conferenza sul tema della terapia genica è disponibile sul sito ctf.netsons.org, nella sezione di Patologia)

La terapia genica, o gene therapy, è una tecnica che prevede l'inserzione di materiale genetico (per ora sempre DNA) 'sano' all'interno di cellule con mutazioni al loro genoma tali da causare patologie. Tale processo analogo alla transfezione sui batteri, però, non è attualmente clinicamente diffuso in quanto presenta diverse criticità. Le cellule più facili da trattare, ovviamente, sono quelle circolanti, le quali possono essere rimosse trattate e trasfuse nuovamente al paziente. Tale trattamento prevede l'impiego di retrovirus, privati di ogni capacità patogenica e sfruttati unicamente come vettori di materiale genico all'interno delle cellule. Grazie alle integrasi e alle retrotrascrittasi, infatti, tali virus possono aggiungere sequenze geniche arbitrarie nel genoma della cellula infettata. Ovviamente per evitare oncogenesi il sito in cui avviene l'integrazione del genoma è cruciale e va se possibile controllato. Una volta introdotto il gene mancante o mutato non si annulla la sintesi della proteina errata ma la si affianca a quella funzionante ottenendo una guarigione più o meno lunga a seconda del tipo di cellula che si tratta.

La terapia genica può essere eseguita anche con vettori diversi dai retrovirus come adenovirus o altri virus capaci di integrare il proprio genoma nella cellula ospite.

Postulati di Kock

L'attività patogena correlata a microrganismi non è stato un concetto immediato, ma è stato acquisito nel corso del tempo. Inizialmente si pensava che le patologie fossero dovute a qualcosa che circolava nell'aria e che contaminava l'organismo. Per lungo tempo la correlazione tra microrganismi e attività patogena non è stata chiara perché si isolavano molti microrganismi e non si capiva se e quale fosse l'agente eziologico della patologia. Kock nel 1880 stabilì i 4 postulati cui deve soddisfare un microrganismo per essere considerato agente eziologico di una determinata patologia. In alcuni casi, ancora oggi, questi non vengono del tutto soddisfatti (es. BSE) soprattutto da patologia causate da prioni, ma in generale sono soddisfatti da patologie virali, batteriche e fungine. 4 Postulati di Kock:

1. The microorganism must be present in every case of the disease but absent from healthy organisms.
2. The suspected microorganism must be isolated and grown in a pure culture. (Questo punto può presentare problematiche nel caso delle malattie causate da prioni, es BSE)
3. The same disease must result when the isolated microorganism is inoculated into a healthy host.
4. The same microorganism must be isolated again from the diseased host.

Per esempio prelevando da un topo malto o morto di una patologia sconosciuta, che si sospetta essere peste, un campione di sangue o di organi e coltivandone l'eventuale microrganismo su un terreno di coltura: isoliamo delle colonie microbiche che usiamo per infettare un altro topo, sano. Se il nuovo topo non si ammala o non muore significa che il microrganismo che abbiamo isolato non è l'agente eziologico della patologia del primo ratto. Se invece si ammala o muore con la stessa sintomatologia del primo, allora possiamo ipotizzare che l'agente eziologico isolato è quello della malattia. Quindi si preleva come prima il microrganismo, lo si ricoltiva. La coltura matura deve contenere lo stesso microrganismo che è stato isolato la prima volta.

Tecniche di coltivazione batterica

Oltre che per scopi diagnostici le colture possono essere create per fini tassonomici. La tassonomia è l'identificazione di tutte le particolari sottospecie di microrganismi che sono presenti all'interno di una famiglia. L'utilità dell'isolamento e dello studio tassonomico è ricollegata all'identificazione di una cura specifica per ciascun battere, poiché anche all'interno di una stessa famiglia batteri diversi rispondono a cure antibiotiche diverse. Il classico metodo di isolamento e identificazione è stato in parte sostituito da metodi molecolari più veloci in cui non c'è più coltura ma si identifica il microrganismo per sequenziamento del suo genoma (utilizzando la PCR, *Polimerase Chain Reaction*, che consiste nell'aumentare milioni di volte una sequenza di nucleotidi attraverso un enzima termostatico). Questa tecnica è molto utile per la tassonomia perché capace di evidenziare anche minime differenze genomiche.

Nel metodo classico di isolamento un ruolo chiave è ricoperto dai terreni di coltura: ce ne sono diverse centinaia, con caratteristiche diverse, alcuni specifici altri generici. Per stabilizzare il più possibile le condizioni del terreno, sono stati creati terreni di coltura semisintetici, che accanto a un brodo di base naturale sono costituiti da aggiunte particolari: tutti gli amminoacidi, vitamine, sali di magnesio, potassio, sodio, glucosio e zuccheri, e le basi di DNA/RNA: adenina,

guanina, citosina, timina. Le composizioni variano, ma generalmente il pH è mantenuto neutro, anche se esistono batteri che crescono meglio a pH leggermente basico. Questi componenti sintetici sono aggiunti a una componente di base comune ottenuta con **triptoni**, proteine vegetali (es. proteine della soia) che sono tagliate dall'enzima tripsina in polipeptidi più corti che posso meglio penetrare nella cellula batterica.

Spesso al terreno vengo aggiunte anche sostanze che sono in grado di evidenziare particolari capacità specifiche di alcuni batteri; ad esempio degli eritrociti possono essere aggiunti al terreno creando il cosiddetto agar-sangue o agar-cioccolato se scaldato (v. immagine 3). Questo serve per evidenziare i batteri emolitici che secernono emolisina che distrugge l'emoglobina dei globuli rossi producendo attorno alla loro colonia un alone bianco (i batteri non emolitici in un terreno al sangue non producono aloni) oppure per evidenziare i batteri che denaturano l'emoglobina in metaemoglobina formando un alone rosso scuro-verdastro. Un'altra sostanza è l'acido solforico che a contatto con alcuni batteri li colora da bianchi a rossi per una variazione di pH. Una volta preparato il terreno semisolido in una capsula o il brodo di coltura in un contenitore bisogna preparare un'ansa con un filo di Pt, che è facilmente sterilizzabile su fiamma, anche se attualmente si utilizzano anse in plastica pre-sterilizzate. L'ansa si tuffa nel liquido che vogliamo analizzare contenete batteri.

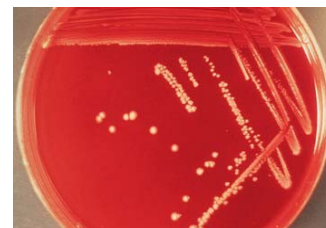


Illustrazione 3: Spatulamento su coltura agar-sangue

Quindi seguono diverse tecniche:

- **SPATOLAMENTO**. L'ansa si appoggia sul terreno solido così che il liquido da analizzare vi ricada sopra. Con una bacchetta di **vetro** si fa una specie di **spatola** ripiegando la bacchetta tre volte come a triangolo con una fiamma. Con questa spatola si distribuisce il liquido da analizzare uniformemente sul terreno. Il risultato sarà una distribuzione uniforme dei batteri
- **STRISCIAMENTO** l'ansa di Pt con i microrganismi viene strisciata a zig zag sul terreno: dopo un incubazione di 18h si nota all'inizio dello **strisciamento** una crescita indistinguibile delle colonie perché esse sono troppo numerose ravvicinate; procedendo nello strisciamento la carica microbica si riduce per il continuo depositarsi e alla fine ci saranno delle colonie poco numerose e distinte tra loro così da poter essere osservate per colore, forma dimensione... Lo strisciamento permette diluizione e isolamento (v. immagine 4)



Illustrazione 4: Colonie di tre colori (rosso, bianco, giallo) separate con spatolamento

L'ansa di Pt con i batteri viene usata per distribuire uniformemente i batteri sul terreno ma questo non permette di poterli analizzare distintamente se sono troppo numerosi. Lo **spatulamento** permette la localizzazione separata e diffusione delle colonie

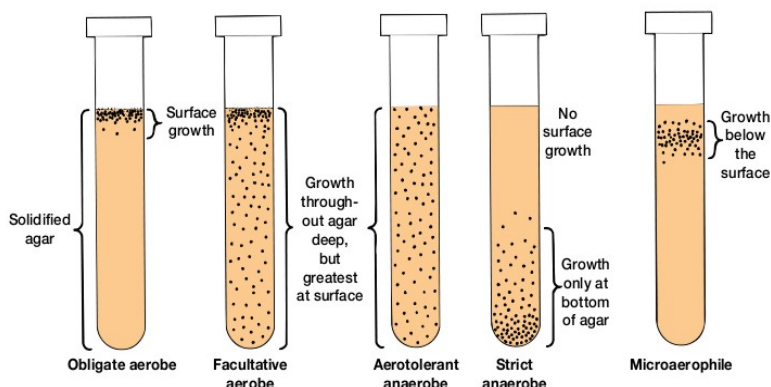


Illustrazione 5: Coltura batteri aerobi/anaerobi

- **INFISSIONE** l'ansa di Pt con i microrganismi viene infissa come un ago in una provetta col terreno semisolido. In questo caso il terreno nella provetta ha una diversa concentrazione dell'ossigeno sul fondo della provetta (poco ossigeno) rispetto alla superficie (ossigeno alla pressione atmosferica). Quindi il filo di Pt contaminato infilato presenterà un gradiente di crescita microbica a seconda delle caratteristiche del batterio:

se i microrganismi sono aerobi la crescita sarà maggiore in superficie e minore in profondità; se i batteri sono anaerobi strettamente viceversa; se i batteri sono anaerobi facoltativi crescono in presenza e assenza di ossigeno (v. illustrazione sopra).

- **INCLUSIONE** prevede l'aggiunta di agar liquido a 47°C al terreno liquido, in seguito alle moltiplicazioni batteriche (circa 18h) si creeranno colonie incluse nel terreno semisolido.

Nonostante le colonie generate da due batteri possano successivamente fondersi sulla piastra Petri, per definizione si assume che ogni colonia sia un clone, ovvero sia costituita da innumerevoli copie del medesimo microorganismo. Una volta isolata (rimossa dalla piastra originaria e fatta sviluppare autonomamente) una colonia può generare spontaneamente mutanti. L'incidenza percentuale di tali mutazioni può essere indotta da particolari sostanze mutagene (es. metilcolantrene, sostanza tumorale).

Per isolare e coltivare funghi si usano terreni di coltura simili a quelli per i batteri.

Fattori influenzanti la crescita batterica

Tra i fattori capaci di influenzare, favorendola od inibendola, la moltiplicazione batterica, ricordiamo:

1. **Presenza di nutrienti**, indispensabili per le esigenze metaboliche
2. **Fattori ambientali** quali
 - **Temperatura**, si distinguono in particolare:
 - 0 – 20° C *psicrofili* o *criofili*
 - 25 – 40° C *mesofili*, la maggior parte dei batteri tra cui tutti i patogeni per l'uomo (37°C)
 - 41 – 80° C *termofili*, generalmente in acque termali o ambienti costantemente caldi
 - >80°C *ipertermofili*. Questi, come i criofili, sono detti anche 'estremofili' per le condizioni estreme cui possono adattarsi.
 - **Acidità**, che distingue:
 - *acidofili*, che prediligono o richiedono ambienti (quindi terreni di coltura) acidi
 - *neutrofili*, che preferiscono pH prossimo alla neutralità
 - *basofili*, capaci di resistere a pH basici
 - **Presenza di ossigeno**, da cui si suddividono:
 - *aerobi*, che si sviluppano in presenza di ossigeno
 - *anaerobi*, che necessitano o sopportano l'assenza di ossigeno (rispettivamente *stretti/obbligati* e *facoltativi*)
 - **Concentrazione salina**
 - *aloofili* se richiedono alte concentrazioni saline e assenza di acqua
 - *alotolleranti* se sopportano alte concentrazioni saline
 - *non aloofili* se, come la maggior parte, richiedono acqua per il loro metabolismo
 - **Pressione osmotica**: *osmofili*, *osmotolleranti*, *non osmofili*

Tecniche diagnostiche e dintorni

Test ELISA

Il test ELISA (Enzyme Like Immuno-Sorbent Assay) è un versatile metodo di analisi immunologica usato in biochimica per rilevare **presenza e quantità** di un dato antigene, tipicamente appartenente a un microorganismo patogeno (es. HIV), grazie all'uso di uno specifico anticorpo monoclonale. Il test elisa può essere eseguito in due modi: **diretto** ed **indiretto**. Il test Elisa si articola in diverse fasi:

- Si fanno aderire al fondo delle celle di una piastra gli **anticorpi** monoclonali primari **specifici** per l'antigene che si intende identificare.
- **Aggiunta** della soluzione con il liquido corporeo/siero in cui si sospetta la presenza dell'**antigene**. Per misurazioni quantitative si aggiungono in pozzetti diversi diverse concentrazioni della soluzione. L'antigene se presente si lega all'anticorpo, l'eccesso viene lavato via
- A questo punto si aggiunge un ulteriore anticorpo, detto **anticorpo secondario specifico** a cui è **associato un enzima**. Questo enzima si lega, se presente, all'antigene, altrimenti il complesso anticorpo-enzima viene rimosso dal lavaggio. A questo punto quindi se nel siero aggiunto al secondo punto era presente antigene si avrà la presenza nel pozzetto dell'enzima associato all'anticorpo secondario, altrimenti no. Questo è il punto chiave (da cui deriva il nome del test) perché ora la presenza dell'enzima può essere facilmente rilevata, come mostrato al prossimo punto

- Aggiunta del substrato dell'enzima (generalmente p-nitrofenilfosfato) che viene convertito dall'enzima in una sostanza la cui concentrazione può essere facilmente misurata strumentalmente. Es il p-nitrofenilfosfato con enzima fosfatasi alcalina da' p-nitrofenolo, giallo, la cui intensità è misurabile con uno spettrofotometro.
- Dopo un tempo t uguale per tutti i pozzetti si aggiunge una sostanza (nel es. NaOH) che blocca la reazione enzimatica in modo da avere valori coerenti e confrontabili. Nota che per avere informazioni quantitative è necessario il confronto con standard interni a concentrazioni note.

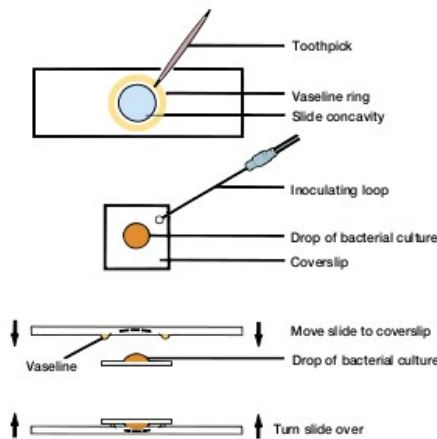


Illustrazione 6: Procedimento esame goccia pendente

Goccia pendente

Per studio motilità batterica spesso si ricorre all'esame della goccia pendente (*hanging drop slide*) peraltro ricorrente nei quiz -.-. Per questo esame si utilizzano due vetrini, il primo con una concavità mediale che si circonda di vaselina. Sul secondo, quadrato, piatto, più piccolo, si depone (con ansa Pt sterile) una goccia del liquido nel quale sono contenuti i batteri che si intendono osservare. Successivamente si uniscono i due vetrini che aderiscono tra loro e tra i quali resta la goccia pendente, da cui il nome. Infine si osserva il tutto al microscopio, meglio se a contrasto di fase.

Titolazione Batterica

Per il conteggio dei batteri vivi

Microscopio Ottico

Il potere di risoluzione del microscopio ottico è di **0,2 μ m**, ed è dato dal prodotto di obiettivi ed oculare (quindi il quiz "il potere di risoluzione è dato dalla somma di.." è *falso*).

I virus

I virus costituiscono un particolare gruppo di agenti patogeni le cui caratteristiche sono la semplice organizzazione acellulare ed il loro meccanismo di riproduzione. Una particella virale o virione contiene una o più molecole di DNA o RNA (mai entrambe!) rinchiusi in un rivestimento di proteine e, in alcuni casi, altri strati. I virus non sono visibili al microscopio ottico, si ricorre quindi al **microscopio elettronico** con sali di **metalli pesanti** (U, Pb), che si legano ai virus e li rendono 'visibili' al fascio elettronico essendo i metalli pesanti elettrondensi.

I virus possono esistere in due fasi: extracellulare ed intracellulare. Nel primo caso sono detti virioni, posseggono pochi o nessun enzima e non possono riprodursi senza una cellula viva da infettare. In fase intracellulare i virus esistono principalmente come acidi nucleici in replicazione che inducono la cellula ospite a sintetizzare le componenti virali che successivamente si autoassembleranno e saranno rilasciate come virioni (per gemmazione o con la lisi conseguente alla morte della cellula). Per queste loro caratteristiche sono particelle infettive autonome.

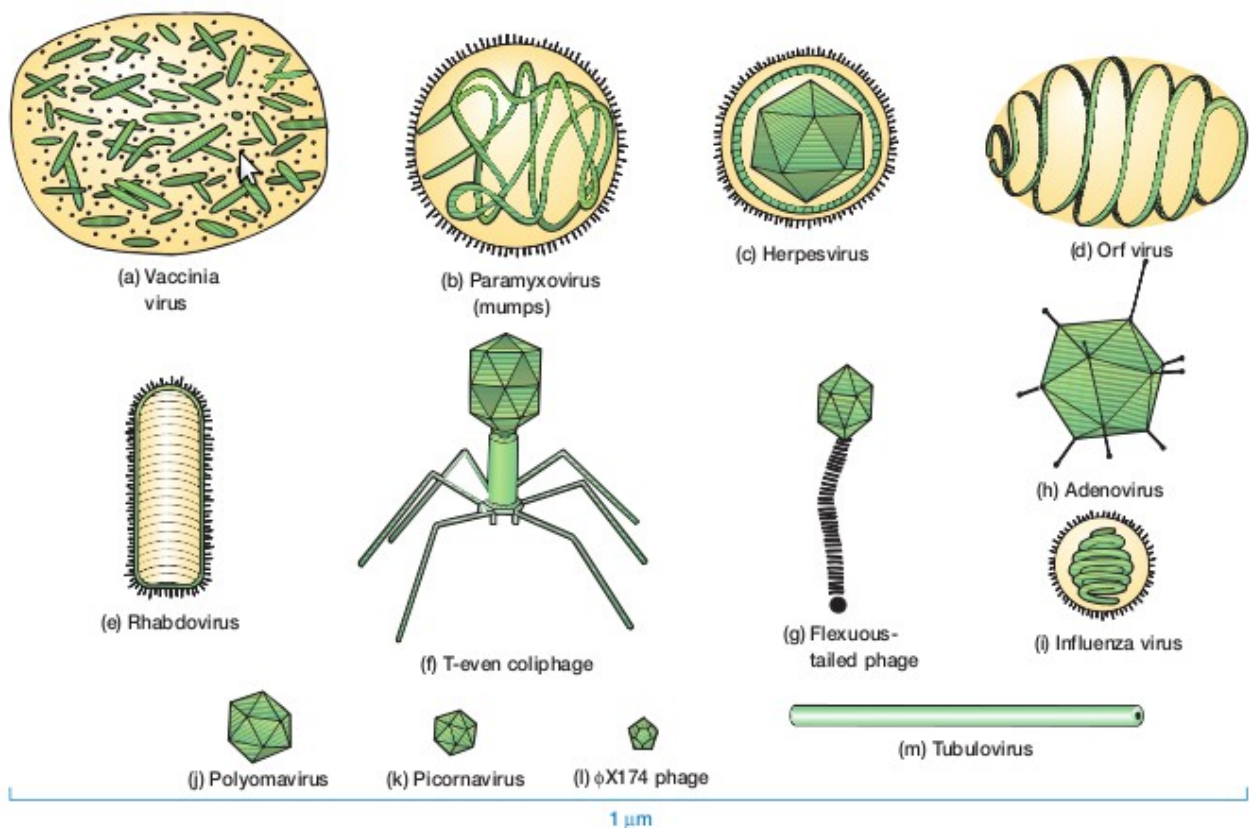


Illustrazione 7: Diverse morfologie virali. In basso la scala a 1μm

Rispetto a una cellula batterica, mediamente lunga 6μm, i virus sono molto più piccoli. Gli unici virus che hanno dimensioni sub-microscopiche, ma non visibili al microscopico ottico, sono i POPSVIRUS e LIPSOVIRUS. Il virus del vaiolo (1. nell'immagine), appartiene alla categoria dei poxvirus con dimensione del genoma di circa 250 000bp (base pair). Le dimensioni del genoma determinano le dimensioni del virus. Il virus più piccolo, tipo quello poliomielitico, ha un genoma formato da solo 6 000bp. Non vi è alcuna relazione tra morfologia, dimensioni e patogenicità; Ci sono virus piccoli altamente patogeni, virus grandi e poco patogeni. Sussiste, invece un rapporto tra la lunghezza del genoma e la capacità codificante. I virus con corredi genici meno ricchi (ovvero i più piccoli) hanno la capacità di codificare un numero inferiore di proteine rispetto ai virus più grandi e ricchi di geni. Il virus del vaiolo, che abbiamo visto essere relativamente grande, codifica per circa 200 proteine, mentre L'HIV possiede solo nove geni.

Per sfruttare al massimo il loro corredo genico i virus ricorrono a diversi escamotage. Uno di essi è il frame shifting, reso possibile dalla ridondanza nell'associazione tra terne di codoni (4^3) e gli amminoacidi (20). Iniziando a trascrivere la stessa sequenza genica partendo da basi diverse, infatti, possono essere codificate diverse proteine. Inoltre i virus piccoli che hanno genoma corto sequenziano proteine che vengono successivamente tagliate, o più propriamente **clivate**, in modo che da una proteina più grossa si ottengono 3 o 4 proteine più piccole. Infine all'interno della stessa proteina ci possono essere più funzioni, correlate o non correlate tra loro (es retrotrascrittasi proteina che ha 3 funzioni: un dominio funge da DNA-pol RNA dipendente; un altro dominio che è una nucleasi degrada l'dna e un altro pezzetto funziona come DNA-pol DNAdipendente).

Tra virus diversi intercorre una maggior varietà di forme rispetto ai batteri, e a queste diverse morfologie corrispondono anche capacità diverse replicative, funzionali ecc. Alcuni virus non penetrano nemmeno nelle cellule direttamente. Per esempio il batteriofago T-2, un virus che attacca l'E. Coli., non penetra nella cellula del battere, ma riesce ugualmente a replicarsi, inoculando come una siringa il proprio genoma che una volta entrato sequenzierà autonomamente per tutte le componenti virali. La ragione per la quale alcuni virus penetrano o non penetrano nella cellula ospite è dovuto al fatto che nelle cellule eucariotiche la membrana cellulare ha può endocitare il virus, mentre la parete batterica, semi rigida, non permette l'endocitosi: i virus che penetrano nei batteri dovranno forarla.

Virologia: un'introduzione

Come evidenziato dall'immagine sopra che li mostra in scala, i virus hanno **dimensioni** diverse, variabili dai 25nm di un picornavirus ai 350 di uno smallpox.

Il loro **genoma** può essere formato da DNA o RNA, ad elica singola o doppia. Attualmente, però, non si conoscono ancora virus presentanti contemporaneamente DNA ed RNA. Sono quindi possibili le seguenti combinazioni:

- DNA a elica doppia (d.s. = double strand)
- DNA a elica singola (s.s. = single strand)
- RNA a elica doppia (o d.s.)
- RNA a elica singola (o s.s.)

Ciò li divide due grandi categorie: virus a DNA e virus a RNA.

La **struttura** di un virus (v. morfologie virali pag. 15) è generalmente geometrica semplice in quanto frutto di autoassemblamento di monomeri semplici.

Si ricorda come i virus non siano attaccati agli antibiotici (v. pag. 4) ed esistano solo pochi farmaci antivirali. Oltre ai farmaci contro i virus dell'AIDS e dell'herpes di tipo 1 l'unica classe di antivirali capace di qualche effetto sono gli interferoni, molecole a basso peso molecolare prodotte da cellule infettate da virus; l'efficacia sull'uomo di tali sostanze appare tuttavia piuttosto limitata. L'approccio più valido resta la prevenzione con vaccini.

La loro **riproduzione** può avvenire solo in cellule vive, quindi si coltivano su colture cellulari (v. pag. 19)

La classificazione dei virus in base al loro genoma è stata possibile solo recentemente, prima erano suddivisi in base alla loro capacità o meno di conservare l'infettività in seguito a trattamento con solventi organici, quali l'etere.

I primi erano detti virus etere-resistenti i secondi virus etere-vincibili. Successivamente si scoprì come tale resistenza fosse dovuta alla presenza, oltre alla struttura capsidica, di un'ulteriore struttura denominata envelope. Oggi, quindi, tale distinzione è compiuta tra **virus nudi** (privi di envelope) e **virus envelope**.

L'envelope, pertanto, è una struttura che il virus acquisisce quando, in seguito alla sua riproduzione in una cellula, fuoriesce per gemmazione ovvero venendo estruso dalla cellula per esocitosi quindi avvolto dalla membrana della cellula che lo ha prodotto. E' opportuno precisare che tale membrana perde e modificata dal virus e pertanto perde le caratteristiche proprie della cellula che l'ha originariamente prodotta; in altre parole il corredo di proteine di membrana è controllato dal virus che rimuove quella originarie e raggruppa le proprie (ciò è reso possibile dalla struttura a mosaico fluido della membrana). Generalmente la gemmazione interessa la membrana plasmatica, ma talvolta l'envelope può derivare da sistemi membranali interni quali il complesso di Golgi, in reticolo endoplasmatico o il nucleo. E' infine importante precisare che non vi è alcuna correlazione tra la presenza dell'envelope e le altre caratteristiche del virus: ad esempio a prescindere dalla presenza o meno di envelope un virus potrà indifferente avere genoma a RNA o DNA.

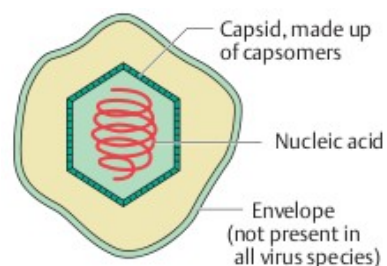


Illustrazione 8: Morfologia generale virus

Il virus dotato di envelope ha un core capsidico (identico a quello dei virus nudi, v. oltre), attorno al quale si forma un doppio strato fosfolipidico nel quale si inseriscono le proteine codificate dal virus con funzione di recettori-ligandi. Saranno loro a stimolare la risposta immunitaria, a riconoscere e legare le cellule-bersaglio e a caratterizzare il virus. Altre proteine presenti sull'envelope possono essere, invece, il residuo di strutture proteiche della cellula originaria che non sono state rimosse. Questo da ragione del fatto che facendo riprodurre lo stesso virus erpetico in cellule di mammifero o di uccello si ottengono virioni differenti, non per quanto riguarda il genoma, né per la presenza di diversi antirecettori ma per quanto riguarda il loro corredo proteico di membrana secondario. Le proteine virali aggiunte sull'envelope sono di natura glicoproteica, ovvero glicosilate, legate a carboidrati. La glicosilazione assume particolare importanza (può rappresentare anche il 30 % del peso molecolare della proteina), in quanto altera la conformazione tridimensionale della proteina, fattore chiave per il riconoscimento dei recettori cellulari e per le interazioni con il sistema immunitario (v. sez. Risposta Immune pag. 46)

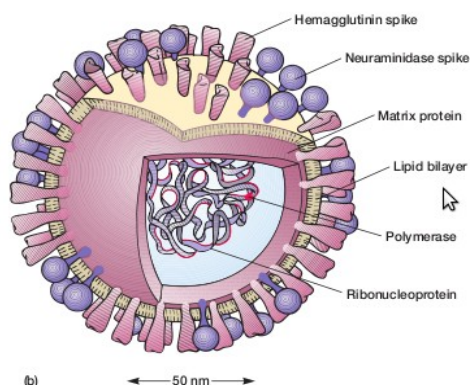


Illustrazione 9: Il virus influenzale è dotato di envelope. Si notino H (viola) e N (blu)

Come già accennato l'eziologia dell'envelope è la gemmazione, pertanto un'ulteriore differenza tra virus nudi e virus envelope riguarda il meccanismo di rilascio:

- I virus nudi sono rilasciati in seguito alla lisi e morte della cellula in cui si sono riprodotti.
- I virus envelope vengono rilasciati per gemmazione.

La quantità di virus prodotti dipende dalla cellula, più la cellula è sana, più virus saranno prodotti; per il virus la cellula è solo la fabbrica di altri virioni. Con la morte cellulare cessa anche la produzione di virus.

Morfologie virali

Il virus nudo contiene il genoma protetto unicamente da una struttura proteica detta capside formata da subunità (capsomeri) che si autoassemblano formando spesso strutture a geometria icosaedrica, talvolta elicoidale raramente più complesse. Poiché essa è la struttura più esterna determina anche le diverse morfologie virali.

I virus hanno varie forme a seconda del capside:

- **Icosaedrica**
- **Elicoidale**
- **Complessa**

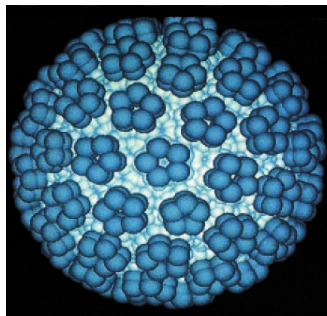


Illustrazione 11: Capside icosaedrico (polyomavirus, simulazione computerizzata)

I costituenti del capside, i capsomeri, sono monomeri tutti uguali tra loro capaci di autoassemblarsi grazie a carica elettrostatiche. Questa particolarità consente l'assemblamento dei virioni anche in condizioni di assenza di energia, ovvero quando la cellula è prossima alla morte. Questo è stato dimostrato introducendo in una cellula i geni che codificano per i capsomeri e in un'altra cellula i geni che codificano per il genoma virale o per le altre strutture (quali proteine della piastra basale o proteine del colletto). Successivamente sono state rotte le membrane delle due cellule, mescolati i prodotti ed il virione è stato capace di autoassemblarsi.

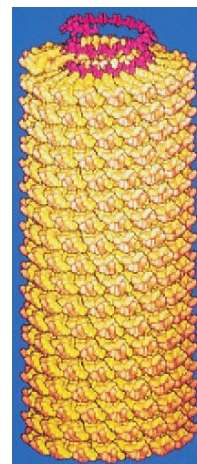


Illustrazione 10: Capside ad elica

I retrovirus

I retrovirus sono una particolare famiglia di virus caratterizzati dall'avere un'enzima, la retrotrascrittasi, capace di trascrivere dell'ssRNA in dsDNA (al contrario della più comune trascrizione DNA $\rightarrow$ RNA, da cui il nome).

Tale enzima fu scoperto nel 1970 da 3 ricercatori, e destò scalpore nella comunità scientifica proprio perché agiva in direzione opposta rispetto al normale. In condizioni fisiologiche le cellule eucariote presentano nel nucleo il genoma, sotto forma di DNA, che viene trascritto in una sequenza complementare di RNA che dal nucleo migra nel citoplasma come mRNA e, in seguito a modifiche post-trascrizionali, va sul sistema protosintetico, i ribosomi, che associano all'informazione genica i vari aminoacidi che formano le proteine. La retrotrascrittasi, invece, trasforma l'RNA in DNA. Grazie alle sue caratteristiche la retrotrascrittasi da un lato ha aperto le porte all'ingegneria genetica, dall'altro è una potente arma per virus quali l'HIV.

Meccanismo d'azione della retrotrascrittasi

La prima tappa di questo processo è la creazione di un ibrido (RNA-DNA) basato sull'RNA ad elica singola. Tale ibrido, tuttavia, non manifesta alcuna attività, e deve pertanto essere convertito in un DNA completo. Anche quest'azione RNA-asicaH è compiuta dalla retrotrascrittasi (in un altro sito di legame) quindi l'RNA viene digerito e la seconda elica di DNA viene generata, come in una comune DNA-polimerasi, usando come stampo la prima elica.

La retrotrascrittasi, pertanto, svolge 3 funzioni principali:

1. DNApolimerasi-RNAdipendente: ovvero è capace di copiare partendo dall'RNA una sequenza complementare di DNA (mediante idrolisi del ribosio in desossiribosio). A questo punto nel virus si è formato un ibrido (RNA + DNA) a elica singola.
2. RNA-asicaH: L'enzima digerisce l'RNA
3. DNApolimerasi-DNAdipendente, sintetizza la seconda elica di DNA complementare alla prima per formare un DNA ad elica doppia.

Grazie alla retrotrascrittasi possiamo 'ricreare' il gene codificante per un certo RNA: estraendo l'RNA da una cellula, aggiungendo la retrotrascrittasi e le 4 basi fosforilate si ottiene, infatti, gene originario che ha dato luogo a quell'RNAm. E' intuitivo che il DNA costituito sarà diverso da quello originale, in quanto nel DNA originale ci sono sequenze codificanti e non codificanti, mentre nell'RNAm sono presenti solo le parti codificanti. (Il gene originario è 10 volte più grande dell'RNAm). Il gene così ottenuto mantiene però la stessa funzionalità, pur essendo più compatto.

Proprietà dei retrovirus

E' opportuno chiarire che non tutti i virus con genoma ad RNA sono retrovirus, anzi, la maggior parte dei virus con genoma ribonucleico posseggono una RNApolimerasi-RNAdipendente (ad es. i poliovirus. Essi non riescono a

duplicare il loro RNA in un altro RNA sfruttando le strutture della cellula ospite perché nelle cellule eucariote non esistono RNAPolimerasi-RNAdipendenti).

Il fine ultimo dei retrovirus è integrare il proprio genoma nel DNA della cellula ospite; ciò avviene in un punto casuale del DNA, e questo fatto può conferire ai retrovirus capacità oncogeniche. Il DNA virale integrato, poi, viene riconosciuto dalla RNAPolimerasi (da qui RNAPol) della cellula infettata ed inizia a duplicarsi come i normali geni della cellula.

Poiché il gene virale presenta nella parte iniziale un **promoter** l'RNAPol continuerà a trascrivere quella sequenza genica ininterrottamente, si ottiene pertanto una **replicazione costitutiva**, ovvero la cellula continua a produrre virus. L'infezione da retrovirus è permanente, la produzione di virus continua per tutta la vita e cessa solo con la morte della cellula. Le persone infette da retrovirus, quali l'HIV, lo saranno per tutta la vita, poiché il genoma virale si è integrato con il corredo genico delle cellule eucariote. Sebbene i pazienti affetti da patologie causate da retrovirus non possano essere guariti, si possono curare affinché la quantità di virus prodotto sia minima, ed il paziente non infettante.

Attualmente le metodiche per rilevare i retrovirus hanno un limite di sensibilità di 50 virioni, mentre il rapporto tra il numero di virus infettanti sul totale dei virioni circolanti è maggiore, ad esempio nel caso dell'AIDS esso è compreso tra

$$\frac{1}{1000} \text{ e } \frac{1}{5000}$$

. Pertanto, in seguito a trattamento statistico dei dati, si ottiene che la probabilità che ci sia un virus infettante con test negativo (un falso negativo) per quanto teoricamente possibile è estremamente bassa e si assume nulla per definizione³.

I batteriofagi (o fagi)

I batteriofagi o fagi sono virus che infettano i batteri, all'interno dei quali si riproducono, sono pertanto parassiti obbligati. Essi possono genoma di un tipo, o RNA o DNA, sono privi di sistemi enzimatici per la produzione di energia (come i citocromi batterici) e sono incapaci di sintetizzare autonomamente proteine. Benché siano possibili diverse classificazioni dei batteriofagi, le più importanti sono quelle in base alla morfologia del fago o secondo le proprietà del genoma. La maggior parte dei batteriofagi noti possiede un DNA ad elica doppia, mentre le forme più diffuse sono quella icosaedrica senza fibre, con fibre contrattili, con fibre non contrattili e filamentosa.

Un potenziale utilizzo dei fagi come strumenti per controllare infezioni batteriche fu proposto inizialmente quando vennero scoperti, successivamente però tale strada fu abbandonata in quanto ai promettenti risultati ottenuti in vitro non corrispondevano successi in vivo, inoltre la scoperta degli antibiotici rese del tutto inutile questo loro impiego, solo i medici tedeschi e giapponesi li hanno impiegati con qualche successo durante la seconda guerra mondiale, per combattere il colera.

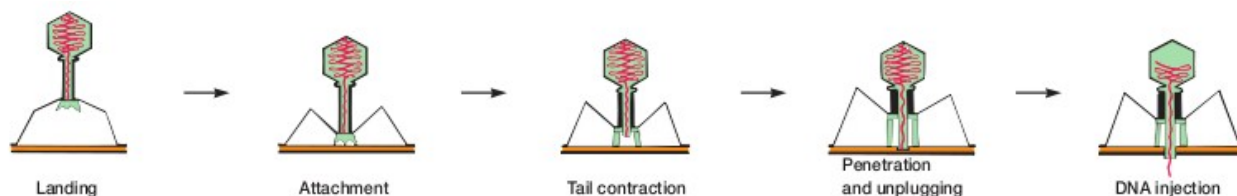


Illustrazione 12: Meccanismo di infezione di un fago

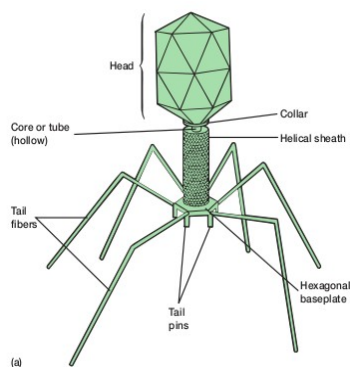


Illustrazione 13: Un batteriofago

I batteriofagi, sono formati da proteine ed acidi nucleici. A prescindere dal meccanismo con cui si legano e attaccano la cellula ospite tutti i batteriofagi provocano la lisi del batterio infettato come fase culminante del loro processo riproduttivo, il quale può durare da 20 a 60 minuti.

I fagi possono avere colletto (la porzione sottostante la testa) lungo o corto, ed un numero variabile di fibre della piastra basale. In tutti i casi queste fibre hanno funzione recettoriale, riconoscono molecole complementari sulla superficie del battere. Alcuni fagi riusciranno a entrare in un battere e non in altri. Una volta riconosciuto la molecola complementare, le fibre si piegano e pongono a contatto la piastra basale contenente l'enzima proteolitico lisozima (o altri più complessi) con la superficie del battere (v. figura 12). Tale enzima rompe i legami beta 1-4 glicosidici e fora la parete. Il genoma passa attraverso il colletto del virus (dove è decondensato) il quale si contrae come una molla, e immette il suo contenuto all'interno del battere con un processo noto come inoculazione. In questo caso l'infezione è avvenuta senza l'ingresso del virus nella cellula.

³ Tale probabilità **non** è data dalla probabilità composta di $50/5000=1\%$ ma è molto inferiore in quanto la presenza di un virus infettanti sul totale dei virioni è una variabile a distribuzione normale: la probabilità di presenza di un virione infettante può essere ricavato, semmai, con Poisson

A prescindere dalla morfologia del fago, le fibre permangono la struttura con funzione **recettoriale**, cioè in grado di riconoscere e legarsi ai recettori della cellula batterica, questo ne consente la specificità.

Per riassumere le fasi della riproduzione fagica sono:

- **“Aggancio”** (*Adsorption*) delle fibre ai recettori batterici
- **Penetrazione** enzimatica della parete cellulare
- **Riproduzione** del genoma a partire dalle proteine utili 'di servizio' quali replicasi fago-specifiche e successivamente sintesi delle componenti strutturali quali testa e coda che si assembleranno autonomamente durante il processo di maturazione
- **Lisi e rilascio** dei fagi nell'ambiente, favorito da enzimi fagici che idrolizzano la parete mureinica

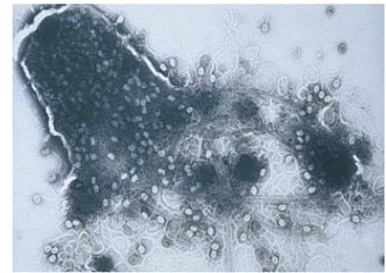


Illustrazione 14: Rilascio dei fagi

Alcuni fagi possono integrare il loro genoma all'interno di quello batterico generando un **profago** capace di riattivarsi in caso di particolari stimoli esterni (raggi UV, o sostanze chimiche). Durante tale processo il genoma fagico è exciso ed il ciclo del virus riprende con riproduzione e lisi cellulare. Le cellule contenenti profagi, pertanto, sono dette lisogeniche in quanto possiedono informazioni geniche per la lisi. La lisogenia avvantaggia sia il batterio che evita la lisi immediata che il virus la cui riproduzione diventa passiva e concorrente con quella batterica.

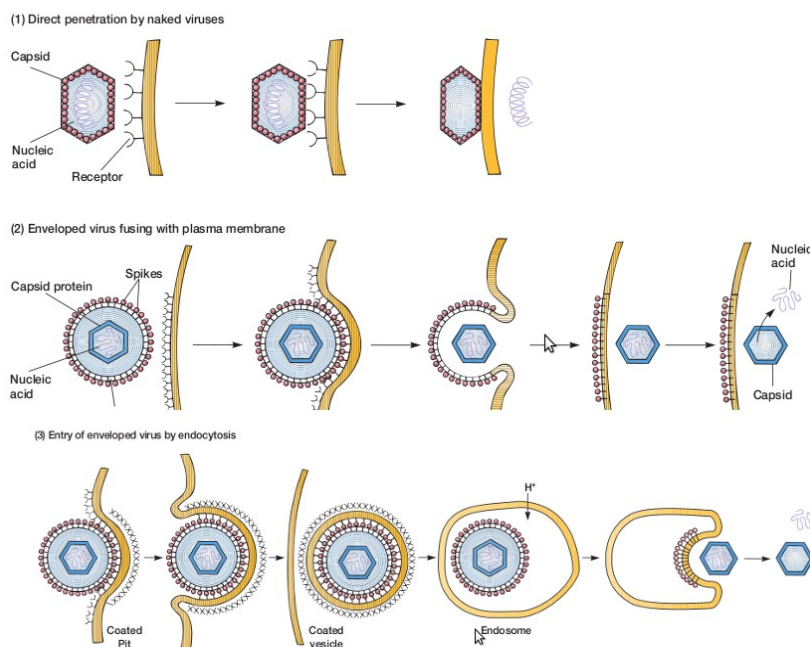


Illustrazione 15: Diversi metodi di infezione: 1-diretta (legame recettore)

2-fusione virus con envelope 3-endocitosi virus con envelope

Una volta si pensava che all'interno della testa dei batteriofagi ci fosse solo genoma avvolto su proteine, racchiuso dal capsid. Successivamente è stato scoperto come molti virus oltre al genoma possedevano ed inoculino anche enzimi. Es. il poxvirus del vaiolo contiene delle nucleasi capaci di rompere il DNA della cellula infettata e sfruttarne i nucleotidi per replicare il proprio DNA. Il virus dell'AIDS oltre all'RNA contiene la retrotrascrittasi e l'integrasi, enzima che permette l'integrazione del genoma virale in quello della cellula infettata ed anche una proteasi. Quando L'HIV infetta una cellula, inizia a generare DNA citoplasmatico per azione della retrotrascrittasi (già presente nel virus). Per poter essere espresso, questo genoma, deve integrarsi con quello della cellula ospite: risulta evidente il ruolo dell'integrasi virale.

Infezione virale

L'infezione virale, ovvero l'invasione della cellula da parte del virus, e la sua eventuale riproduzione ed espulsione, avviene attraverso un pattern comune e ripetitivo:

- **Legame** tra virus e superficie cellulare mediante gli anti-recettori virali
- **Penetrazione** del virus all'interno della cellula
- **Biosintesi** di nuove componenti virali con polimerasi proprie o della cellula ospite
- **Assemblamento** delle subunità virali a creare il virione
- **Rilascio** dei virus neoformati per lisi o gemmazione

Non sempre si verificano tutte queste fasi, talvolta il processo può interrompersi in diversi punti.

Risposta cellulare all'infezione virale

Le cellule possono rispondere in diverso modo alle infezioni virali, anche a seconda delle caratteristiche del virus che le ha infettate.

Le possibili conseguenze di un'infezione virale su una cellula, infatti, sono:

- **infezione litica: necrosi**, quando la replicazione virale conduce direttamente alla distruzione cellulare.
- **Infezione litica: apoptosi**, quando il virus innesca la cascata di eventi cellulari che portano a morte programmata, interrompendo anche il ciclo di riproduzione virale. Questi primi due sono detti effetti **citopatici totali** (è il caso dei balloons da HIV).
- **infezione non citopatica**, la replicazione virale in quanto tale non distrugge la cellula ospite (il virus, enveloped, fuoriesce per gemmazione), la cellula ospite può comunque essere distrutta da reazioni secondarie.
- **infezione latente**, quando all'interno della cellula è presente genoma virale inespresso. Non essendo codificate proteine il virus è 'invisibile' al sistema immunitario e potrà tornare attivo in particolari condizioni, oppure integrerà il proprio genoma in quello della cellula ospite
- **trasformazione in cellula tumorale**, se l'infezione virale trasforma la cellula ospite in una cellula tumorale. In questo caso la replicazione virale può / può non verificarsi. Questi virus sono detti oncogeni.

Nota: alcuni virus possono dare infezioni latenti in un tessuto ed infezioni litiche in altri. (es. EBV, Epstein-Barr, infetta prouttivamente, ovvero con lisi, le cellule epiteliali mentre latentemente infetta i linfociti B).

Alcuni virus (soprattutto paramyxovirus e myxovirus) sono capaci di agglutinare eritrociti umani ed animali, ovvero generano sulle cellule che infettano: **emoassorbimento**.

Quando una cellula è infettata da questi virus elabora una proteina, l'emoagglutinina, che una volta esposta sulla parete cellulare attira e lega i globuli rossi. Tale proteina poi sarà trasferita con gemmazione alla envelope del virus.

Anche i virus influenzali presentano sulla superficie una emoagglutinina (oltre alla neuroaminidasi). L'**Emoagglutinazione** può essere sfruttata per saggi virali quantitativi o come segno diagnostico. Esistono, infatti, diversi genotipi di emoagglutinine, con proprietà diverse, es alcuni possono legare solo eritrociti di coniglio, altri umani o di vertebrati etc. La proteina poi è diversa nei vari virus.

Una dimostrazione dell'effetto citopatico di alcuni virus può essere ottenuta dalle colture cellulari in vitro. Per esempio un intero virus che replica nelle cellule di polmone umano causerà delle aree di morte cellulare, poiché in seguito alla morte della cellula ospite può infettare quelle adiacenti. Queste aree sono dette **placche di lisi** ed il loro numero è indice della quantità di virus infettanti.

Se cellule umane vengono infettate con un virus respiratorio sinciziale, questo ne causa la fusione. Esso infatti sintetizza una proteina che causa la fusione della cellula che ha infettato con quelle vicine. Ciò porta alla formazione di **sincizi**, cioè di cellule polinucleate (come quelle muscolari). Un virus capace di dare sincizi è, ad esempio, l'herpes genitalis (virus erpetico di tipo 2). L'herpes labialis (tipo 1), invece, è citopatico: questa differenza può essere sfruttata a fini diagnostici. Infettando una coltura cellulare con virus erpetico di tipo ignoto, infatti, la presenza di placche di lisi sarà sintomo di virus erpetico di tipo 1, mentre la formazione di sincizi è indice di virus erpetico di tipo 2.

(Nota: anche il virus dell'AIDS può formare sincizi su particolari cellule)

Coltivazione di Virus

Introduzione storica

I virus sono parassiti intracellulari obbligati, quindi possono sopravvivere all'esterno delle cellule, come virioni, ma non possono esprimere alcuna attività biologica. Per isolare, identificare e studiare i virus dobbiamo preparare delle colture cellulari, ovvero farli riprodurre su substrati cellulari.

Inizialmente le colture cellulari non si sapevano fare e quando si cercava di coltivare le cellule dopo 1 o 2 moltiplicazioni le cellule morivano perché si adoperavano terreni di coltura per i batteri, non adatti a far crescere le cellule (privi, ad es. dei fattori di crescita). Pertanto per riprodurre la malattia virale si utilizzavano animali: già nel 1911 da animali malati si estraeva un campione infetto che era filtrato attraverso filtri batteriologici, cioè il campione era sterilizzato, e inoculato in animali sani che si ammalavano. Solo a partire dal 1945-50 si riuscì a iniziare la coltura in vitro delle cellule tumorali, definite immortali perché continuavano a riprodursi al di fuori dell'organo dal quale erano state estratte. Iniziò una collezione di cellule tumorali diverse tra loro per origine (prima animali poi umane), morfologia e aventi come unica caratteristica comune, appunto, la capacità di accrescimenti indefinito.

Il problema delle cellule tumorali è che perdono le caratteristiche del tessuto d'origine (es. una cellula derivata da un epatoma, il tumore del fegato, è diversa da un'epatocita). Tra le caratteristiche che spesso sono perse nel processo di tumorigenesi vi sono capacità particolari d'organo (secrezione di sostanze particolari) e le proteine di superficie, indispensabili siti di legame per i virus.

Alcune di esse, però, talvolta mantengono tali caratteristiche ed una volta isolate si ottenne la possibilità di coltivare ed isolare anche i virus. La virologia, pertanto, è successiva alla batteriologia per ragioni tecniche.

In molti casi le culture cellulari hanno permesso di discriminare tra virus che infettano e si moltiplicano nelle cellule nervose, in cellule epatiche, nelle cellule della cute, o muscolari etc. Oggi abbiamo molte linee cellulari, appartenenti a tessuti diversi. Alcune sono tumorali, altre rese immortali in vitro.

Coltivazioni virali su uova embrionali di pollo

Abbiamo visto come i virus per riprodursi necessitano di substrati cellulari da infettare. Pertanto la loro coltivazione presenta problematiche maggiori rispetto a quella batterica. Se agli albori della virologia venivano sfruttati degli animali suscettibili, successivamente si osservò che era possibile far moltiplicare i virus nelle uova embrionali di pollo. Alcuni virus (come gli erpetici, i respiratori sinciziali, influenzali, della rabbia) erano in grado di moltiplicarsi in strutture diverse dell'uovo embrionale (ovvero fecondato).

La **membrana corioarantoidea (CAM)**, esterna) è la sede dove possono moltiplicarsi il virus erpetico, del vaiolo, vaccinico, respiratorio sinciziale.

La **cavità amniotica** (interna, a contatto con l'embrione di pollo) è sede di replicazione del virus influenzale (il vaccino anti-influenzale infatti viene fabbricato inoculando le uova embrionali, pertanto contiene tracce di ovo-albumina, potente allergene che nei soggetti allergici può dar luogo a manifestazioni gravi e shock anafilattici).

La **cavità arantoidea** (attorno al sacco vitellino) è infettabile con virus influenzale, ed con i coronavirus (tipo il virus della SARS).

Il **sacco vitellino** (propaggine del cordone ombelicale) può essere sede di replicazione del virus della rabbia, e di batteri. L'uovo embrionale è stato quindi il primo terreno di coltura dei virus, quando non erano ancora disponibili le colture cellulari, ed è ancora oggi, grazie alla sua economicità, l'ambiente d'elezione per la fabbricazione del virus influenzale. Ovviamente le uova devono essere certificate e provengono da allevamenti con animali dal genoma noto.

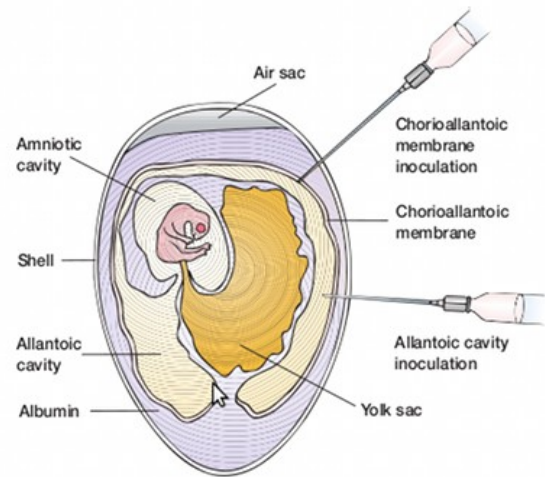


Illustrazione 16: Uova embrionale di pollo, siti utili per la replicazione virale

Ad oggi, tuttavia, non siamo in grado di coltivare alcuni virus, ad esempio i papilloma virus (HPV), che causano le verruche ed il tumore della cervice uterina. Il problema è che tale virus è epiteliotropo (ovvero ha come tropismo le cellule epiteliali mucosali) e si riproduce sulle cellule epiteliali in differenziamento, condizione attualmente irriproducibile in coltura. Per ovviare al problema si studiano papillomi simili a quello umano ma di altre specie (es. bovine). Oppure analizzando campioni prelevati da tessuti infettati da HPV.

Inizialmente si opponevano problematiche simili anche alla coltivazione dell'HIV, che si replica solo nei timociti. Le cellule T di scimpanzè prima, nelle quali si riproduceva senza dare patologia, e la disponibilità di linee cellulari linfoidi poi hanno ovviato al problema.

Colture cellulari

Storicamente, le prime colture cellulari rese disponibili derivavano da tumori animali, successivamente si isolarono con successo cellule tumorali (immortali) umane ed attualmente sono disponibili diverse centinaia di linee cellulari. Inizialmente erano culture cellulari da tumore di animali, poi umane.

Le prime cellule tumorali umane sono state le cellule HeLa, dalle iniziali della donna dalla quale furono isolate (Henrietta Lacks, morta di tumore della cervice uterina). Una volta isolate e osservato che si riproducevano indefinitamente vennero diffuse in tutto il mondo come substrato cellulare per colture. (Per inciso una decina di anni fa, ad oltre 50 anni dall'isolamento, è stata scoperta la ragione di tale immortalità, dovuta alla presenza nel genoma del papilloma virus umano. Il HPV non si moltiplicava più ma le cellule erano diventate tumorali). Oggi sono disponibili due tipi di colture cellulari:

1. **Cellule di coltura primarie.** Ottenute direttamente dai tessuti che s'intendono isolare, le cellule sono fatte separare con particolari enzimi e sono messe in coltura, dove si moltiplicano. Es. cellule cute. Non essendo cellule tumorali si possono moltiplicare solo un numero limitato (10-20) di volte (telomeri!). Per far sviluppare queste cellule in genere si aggiunge siero fetale di vitello in quanto esso contiene fattori di crescita capaci di promuovere la moltiplicazione cellulare.
2. **Linee cellulari tumorali.** Talvolta a partire dalle colture primarie si possono derivare delle cosiddette linee cellulari immortali (es. cellule le HeLa o le Vero, derivate da rene di scimmia). Tali cellule sono caratterizzate

da una capacità di coltura in-vitro illimitata. Per scopi diagnostici sono generalmente cresciute in modo monostratificato. Il limite di queste cellule è che in taluni casi possono non mimare fedelmente il processo replicativo come avviene in vivo a causa delle loro caratteristiche tumorali, in questi casi saranno da preferire colture primarie.

Scelta del substrato cellulare

Alcuni virus, soprattutto quelli di dimensioni maggiori (quindi con corredi genici più ampi) sono in grado di infettare un ampio spettro di cellule, altri hanno target molto ristretti. Ad esempio il virus vaccinico, (che deve il suo nome agli animali da cui per primo fu isolato) usato per vaccinare contro il vaiolo, infetta molte cellule. Questo perché può sfruttare i diversi recettori di cui è dotato (cfr. dimensioni v. vaccinico a pag 13). L'HIV, invece, è capace di infettare solo le cellule T aventi recettore CD4. (In realtà è il virus dell'AIDS si lega, oltre al CD4 anche ad un corecettore cxcr4, questa particolarità ha decretato il fallimento del tentativo di creare una linea cellulare suscettibile per L'HIV a partire da cellule epiteliali forzate ad esprimere la proteina CD4).

Le cellule vengono coltivate in **terreni di coltura** posti in **incubatori** a 37°C che contengono miscele di aria e CO₂ 5-10% (mantiene il pH a 7 – 7,2 in presenza di bicarbonato, CO₂ è in equilibrio con H₂CO₃)

Le caratteristiche di superficie della cellula cambiano durante la differenziazione, pertanto della popolazione cellulare che forma un terreno di coltura in un certo istante solo alcune saranno suscettibili di subire infezione virale. Per potersi moltiplicare le cellule devono contenere siero; generalmente viene impiegato il siero fetale di vitello, che veicola fattori crescita senza essere contaminato da fattori frutto di risposte immunitarie che potrebbero ostacolare o combattere la riproduzione batterica. L'incubazione avviene alla temperatura di 37°C che è quella ideale per cellule e virus umani in condizioni che facilitano la vita delle cellule.

Terreni di coltura diversi sono suscettibili a virus diversi, e l'effetto dell'infezione sulla coltura cellulare può già costituire una prima informazione sul tipo di virus che le ha infettate. Ad esempio

Gli *Adenovirus* infettano le cellule *HeLa*, Il *virus del morbillo* causa cellule giganti mononucleate.

Le cellule *Vero* (rene di scimmia) sono infettate da *CMV virus* e *Virus vaccinico*, che provoca le *placche di lisi*

Le cellule *RD.MK* sono infettate da *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Poliovirus*

Amplificazione, Purificazione e Titolazione virali

I metodi di purificazione sfruttano diverse proprietà fisiche dei virus, tra cui le loro dimensioni mediamente superiori a quelle delle comuni proteine e la loro stabilità, spesso superiore a quella degli altri organuli cellulari. I quattro metodi di purificazione più sfruttati sono, quindi:

- centrifugazioni differenziali o a gradiente di densità
- precipitandoli come sali d'ammonio
- denaturandone i contaminanti (es con pH, solventi organici etc)
- con digestione enzimatica dei componenti cellulari (es. tripsina)

Gli scopi della coltivazione virale sono

1. Identificazione
2. Verifica dell'effetto citopatico
3. Isolamento di mutante o ricombinante
4. Preparazione di vaccini
5. Test sperimentali in laboratorio
 - Neutralizzazione
 - Linfoproliferazione
 - Citotossicità

Composizione terreni coltura

Le caratteristiche di un terreno per colture virali sono diverse da quelli dei terreni per colture batteriche

1. Soluzione saline iso-osmolare per equilibrare la pressione intracellulare esercitata sulla membrana
2. Sorgente di energia (di solito glucosio 4.5 g/L)
3. Complessi polivitaminici
4. fattori di crescita (siero mammifero / siero di vitello neonato / siero fetale)
5. antibiotici ed antifungini (penicillina, streptomycin, anfotericina) per evitare la contaminazione batterica
6. indicatori pH (es. rosso fenolo)
7. sistema tampone NaHCO₃ / CO₂

Durante infezione non produttiva il genoma virale può

- integrarsi nel genoma cellulare
- permanere sotto forma episomiale cioè rimanere sulla superficie della cellula

L'integrazione nel genoma cellulare avviene tramite integrasi virale modulata da funzioni della cellula ospite. Nella proliferazione del virus dopo circa 24-48 ore si raggiunge un plateau, cioè un valore max stabile.

Poiché i virus sono visibili solo al microscopio elettronico la titolazione può essere fatta solo al TEM o SEM.

La cellula procariote: i batteri

Gli elementi fondamentali della cellula batterica sono:

- membrana citoplasmatica
- parete cellulare
- citoplasma
- genoma

Quelli facoltativi:

- Capsula
- Flagelli
- Pili o Fimbrie
- Inclusi citoplasmatici
- Spore

Membrana citoplasmatica

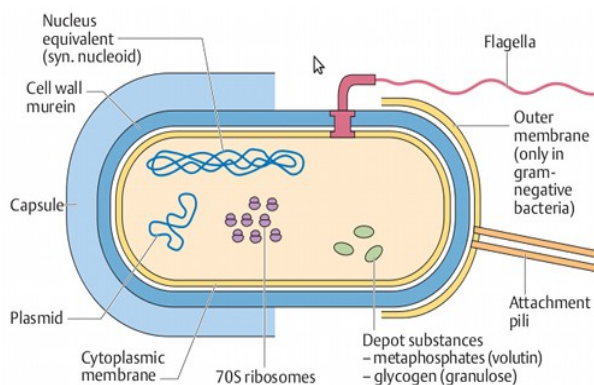


Illustrazione 17: Schema di un generico batterio Gram- (a sinistra) e di un Gram+ (destra)

la parete cellulare, la quale presenta significative differenze tra Gram- e Gram+. Si noti che a differenza delle cellule umane quelle batteriche non presentano steroli (es. colesterolo) per rendere più fluida la membrana cellulare ma hanno molecole simili, gli opanoidi che recentemente sono stati quantitativamente individuati nei combustibili fossili e si stima che siano la biomolecola più presente sulla Terra (10^{12} tonnellate).

Le principali funzione della membrana cellulare batterica sono:

1. **Barriera permeabile:** la membrana della cellula batterica è una barriera selettiva. Come tale essa è attraversata passivamente da poche piccole molecole liposolubili mentre la maggior parte delle sostanze sono sottoposte a trasporti mediati da speciali proteine che consentono alla cellula il controllo dei flussi in entrata ed uscita. Anche la struttura più esterna rispetto alla membrana, la parete, è soggetta a permeabilità per sostanze con peso molecolare minore o uguale a 10 000Dalton. Essa però è priva di canali o proteine di trasporto, pertanto vi è solo diffusione passiva regolata dalle dimensioni delle molecole. Al contrario la membrana cellulare ha potere selettivo in quanto può decidere se interiorizzare determinati ioni o espellerne altri, a seconda delle necessità metaboliche.
2. **Ancoraggio proteico:** La membrana è sito di numerose proteine. Tra di esse ricordiamo:
 - Permeasi che regolano i trasporti attivi, ovvero quelli contro gradiente elettrochimico.
 - Enzimi biosintetici, necessari per la sintesi della parete cellulare, secernendo mureina.
 - Proteine del sistema secretivo, espellono le sostanze di rifiuto. Esse possono essere anche tossine, pertanto il batterio ha la capacità di regolare la sua attività tossica.

Struttura

La membrana citoplasmatica è una caratteristica indispensabile per gli organismi viventi, in quanto consente selettività nelle interazioni con l'ambiente. Si tratta di una struttura che circonda completamente la cellula e separa il citoplasma dall'ambiente esterno. Se la membrana si rompe, l'integrità cellulare viene persa ed il contenuto della cellula si diffonde nell'ambiente.

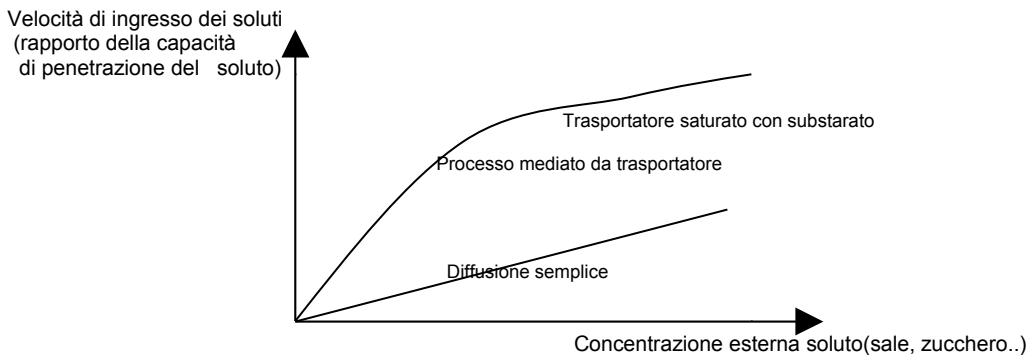
La membrana citoplasmatica è costituita da un **doppio strato fosfolipidico** composto da una regione interna, idrofobica, formata da acidi grassi ed una regione esterna, idrofilica, costituita da glicerolo e fosfolipidi, il tutto per uno spessore di circa 8nm.

Oltre alla membrana cellulare gli organismi procarioti hanno

- Proteine sensori, capaci di rilevare la presenza di condizioni sfavorevoli (pH, sostanze chimiche) o favorevoli (nutrienti) alla proliferazione batterica. In risposta a questi stimoli, poi, il battere potrà muoversi verso l'ambiente a lui più congeniale.
 - Catena degli enzimi respiratori, i citocromi. Indispensabili ai batteri aerobi.
3. **Conservazione dell'energia:** poiché per la generazione di energia è necessario un gradiente protonico positivo tra interno ed esterno della cellula, generato da idonee pompe protoniche, la membrana funge anche da setto di separazione tra l'esterno positivamente e l'interno negativo.

Diffusione semplice e trasporto

Il rapporto tra cattura (uptake rate) e concentrazione esterna nella diffusione semplice e nel trasporto



Il grafico illustra sinteticamente ed efficacemente la differenza tra due diversi metodi di flusso transmembrana: diffusione semplice e trasporto mediato.

Il flusso netto, nel caso della diffusione semplice, dipende direttamente dal gradiente di osmolarità del soluto tra l'interno e l'esterno della cellula. Il trasporto mediato da un trasportatore, invece, è molto più rapido per differenze di concentrazione anche minime, ma è saturabile, in quanto il numero dei trasportatori ed il tempo necessario al trasporto sono entità finite. E' evidente come le proteine di trasporto transmembrana facilitino significativamente i flussi di sostanze sia verso l'interno sia verso l'esterno.

Trasporti

Esistono diversi tipi di trasporti:

- trasporto semplice
- traslocazione di gruppo
- trasporto attivo (pompe ATP-asiche)

Canali

I canali trasportatori sono strutture transmembranaliformate da alfa eliche strutturate a cerchio intorno al canale centrale che permette il passaggio delle sostanze. I canali trasportatori indipendenti dal tipo di trasporto possono essere:

1. **Uniporti:** è un canale che si apre solo in un senso. (es. Ingresso ioni potassio)
2. **Antiporti:** per ogni molecola che entra c'è una molecola diversa che fuoriesce. (es. Canale sodio-protonico)
3. **Simporto:** una molecola può entrare solo se è accompagnata da un'altra molecola. (es. Ingresso di sostanze che devono essere fosforilate)

Parete cellulare

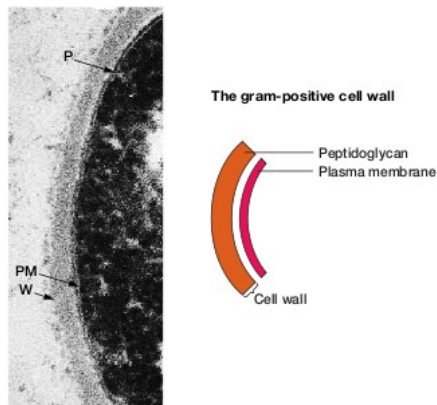


Illustrazione 19: Parete di un Gram⁺,
W=parete, PM=membrana plasatica, P
spazio periplasmico

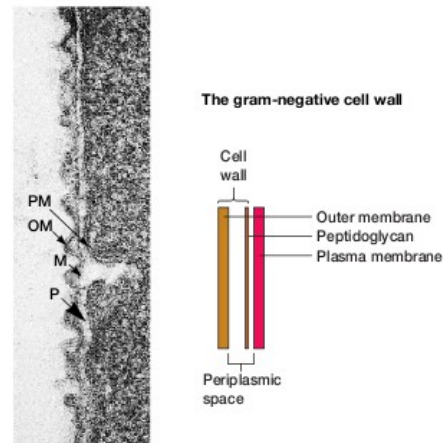


Illustrazione 18: Parete Gram⁻,
M=strato mureina (o peptidoglicano)
OM=outer membrane

La parete cellulare è uno strato generalmente resistente posto esternamente rispetto alla membrana plasmatica della cellula batterica con diverse funzioni. Innanzitutto essa **definisce la forma** del batterio, inoltre lo preserva dalla **lisi osmotica**. Inoltre essa può ospitare **componenti patogeniche** quali l'LPS dei Gram negativi che hanno un ruolo nella patogenicità del microorganismo. Inoltre è un **target** di alcune classi di farmaci **antibiotici** ed infine essendo una struttura simile quella delle cellule vegetali giustifica storicamente nomi quali "flora batterica" in riferimento alla popolazione saprofita intestinale.

A partire dalla messa a punto nel 1884 dell'eponima colorazione da parte di Christian Gram, è stato possibile distinguere due macroclassi di batteri: i cosiddetti Gram positivi (viola) ed i Gram negativi (rosa) [Per la colorazione di G. vedi oltre]. La vera differenza tra queste due classi, identificata solo in seguito, grazie al microscopio elettronico, è dovuta alla diversa struttura della loro parete cellulare.

Illustrazione 20: Composizione parete Gram positiva. Acidi teicoici (forse) ancorano i peptidoglicani alla membrana cellulare

Parete Gram positiva

La parete di un G⁺ è costituita da un unico, omogeneo strato di peptidoglicani (o mureina) spesso dai 20 agli 80nm posto tra membrana cellulare ed ambiente extracellulare (v. img 19). Lo spazio periplasmico, così è detta la distanza tra parete e membrana cellulare, è minimo ed è occupato dal gel detto periplasma. Nella **composizione** della parete G⁺, sebbene il componente principale sia sempre il peptidoglicano, si riscontrano spesso grandi quantità di acido teicoico e lipoteicoico. La funzione degli acidi teicoici non è ancora chiara ma probabilmente giocano un ruolo nel mantenimento della struttura della parete, ad esempio collegandosi grazie a domini lipofili sia alla parete che alla membrana (acidi lipoteicoici). Gli acidi teicoici sono polimeri di glicerolo o ribitolo connessi con gruppi fosfato; amminoacidi o monosaccaridi possono essere legati ai residui di glicerolo/ribitolo rendendoli antigenicamente riconoscibili.

Parete Gram negativa

A differenza di quella dei G⁺, la parete dei batteri Gram negativi presenta uno strato di peptidoglicani molto più ridotto (da 2 a 7nm, cfr img 18!) circondato da una membrana esterna (outer membrane) ne deriva uno strato bilaminare asimmetrico. Nei G⁻ uno spazio è spesso visibile tra outer membrane e parete mureinica. A causa del più sottile strato di peptidoglicani la parete G⁻ è meno

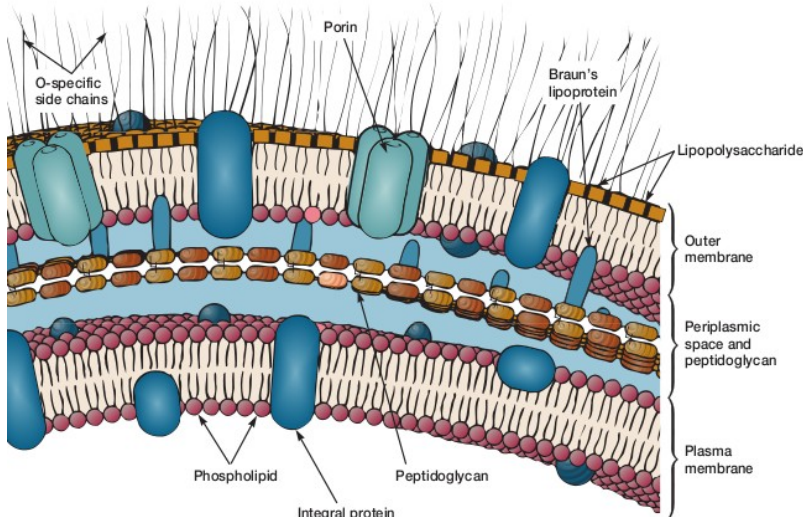


Illustrazione 21: Composizione parete Gram negativa
Appunti scaricati da ctf4u.netsons.org - Riusciti secondo [CC-BY-NC-SA](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) veai Copyrightu

resistente rispetto a quella dei G⁺. Il componente più particolare dell'outer membrane dei Gram negativi sono i suoi lipopolisaccaridi (LPSs). Si tratta di molecole grandi e complesse formate da tre parti: lipide "A", core polisaccaridico, la catena laterale o antigene "O". Per quanto la catena polisaccaridica che forma l'antigene O sia efficacemente riconosciuta dal sistema immunitario, i batteri ne variano la composizione continuamente in modo da sfuggire alle difese immunitarie. L'LPS oltre a stimolare la risposta infiammatoria e a poter veicolare endotossine (tramite il lipide A) è importante per la protezione che conferisce, come outer membrane nel suo complesso, alla cellula batterica. Tale strato, infatti, rallenta o previene l'ingresso di sali, antibiotici o altre sostanze dannose per la cellula (es. lisozima). Per poter superare i limiti di impermeabilità imposti dalla outer membrane e permettere una rapida permeabilità a glucosio e altre sostanze, poi, la cellula Gram- presenta proteine dette porine.

Nota che tutti gli strati esterni alla membrana cellulare (come la outer membrane ed eventuali capsule o glicocalici) sono detti nel loro insieme **envelope**, pertanto il quiz "l'envelope è responsabile di patogenicità" è vero, grazie alla endotossina dell'LPS.

Il peptidoglicano

Il peptidoglicano è un polimero presente solo nei batteri. I suoi monomeri sono formati da due derivati zuccherini, N-acetilglucosammina ed acido N-acetilmuramico, e diversi amminoacidi tra cui anche alcuni che non sono presenti nei 20 che formano le proteine (il D-glutammico, la D-alanina e l'acido meso-diamminopimelico). La presenza di a.a. D preserva questa struttura da quasi tutte le proteasi. A stabilizzare questa struttura, poi, si aggiungono legami peptidici crociati.

Il processo di biosintesi dello strato di peptidoglicani (PG) è complesso e multifase con reazioni inter ed altre extracellulari, i punti principali sono:

- Acido N-acetilmuramico (NAM) e N-acetilglucosammina (NAG) sono sintetizzati nel citoplasma
- Amminoacidi sono aggiunti sfruttando ATP a NAM (senza usare tRNA/ribosomi, non sono proteine!)
- NAG si unisce a NAM formando il monomero base del PG
- il monomero si unisce in coda ad un filamento di PG in formazione
- formazione di legami crociati con transpeptidazione

In realtà il processo è più complesso e coinvolge un carrier (bactoprenolo) che trasferisce i monomeri di PG dal citoplasma alla parete etc.

Rimozione parete

La parete può essere rimossa in seguito a trattamento con lisozima (enzima presente nella saliva) o con EDTA.

Con coltura in terreni privi di acido diaminopimelico (per i gram negativi)

Si possono generare così:

- **protoplasti**, ovvero batteri completamente privi di parete
- **sferoplasti**, batteri con solo tracce residue di parete, derivano dai Gram- perchè se tolgo tutti i PG nei G⁺ ottengo batteri nudi, i protoplasti, nei G⁻ mi resta qualcosa che è lo sferoplasto (c'è un quiz)

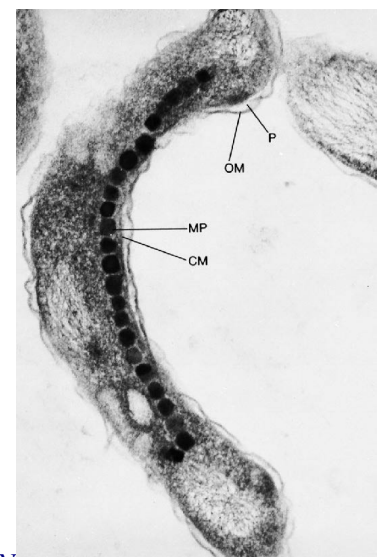
I microorganismi geneticamente privi di parete (quali i micoplasmi) sono detti, invece, **micoplasti**

Il citoplasma

All'interno della membrana plasmatica non vi è compartimentazione ma un ambiente unico; in questo modo i componenti sono a stretto contatto tra loro ed per questo che i processi biologici in una cellula procariotica avvengono molto velocemente dato, non essendoci il passaggio tra i diversi compartimenti cellulari tipico degli eucarioti.

Le strutture batteriche del citoplasma sono principalmente:

- Inclusioni citoplasmatiche
- DNA (gnoma + materiale extracromosomiale)
- Ribosomi immersi nel citosol
- Povero di elementi morfologici



Gli inclusi citoplasmatici

Le inclusioni citoplasmatiche (o inclusi citoplasmatici) sono sostanze di varia struttura presenti come granuli nel citoplasma batterico. Si tratta per lo più di riserve di materiali, organici ed inorganici che vengono sfruttati in caso di necessità per generare energia o sintetizzare nuove strutture. Poiché gli inclusi rappresentano sostanze di riserva la loro quantità varia in funzione delle disponibilità energetiche della cellula. Tra gli inclusi citoplasmatici principali ricordiamo il glicogeno e l'amido (polimeri del glucosio), poli- β -idrossi-butarato (PHB), magnetite (usata da alcuni batteri per orientarsi con il campo magnetico terrestre es. *Aquaspirillum magnetotacticum*), zolfo elementare e polifosfati. I granuli di polifosfati sono talvolta detti granuli **metacromatici** in quanto mostrano metacromasia, ovvero si colorano di un colore diverso da quello del colorante con cui sono trattati; ad esempio appaiono rossi colorando il battere con blu di metilene. Essi inoltre hanno importanza tassonomica.

Colorazione di Gram

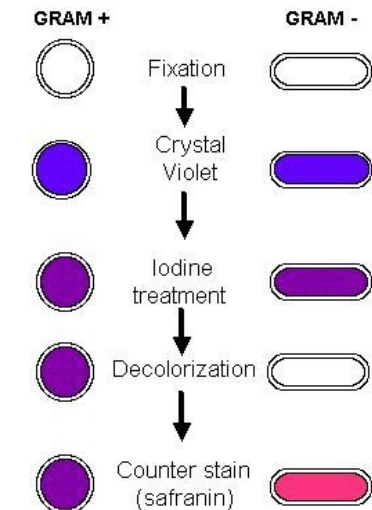


Illustrazione 23: Colorazione di Gram

La colorazione di Gram fu ideata e messa a punto nel 1884 dal fisico danese Christian Gram, ed è ancora oggi la colorazione differenziale più diffusa in microbiologia. Differenziale in quanto permette di distinguere due classi di batteri, i cosiddetti Gram+, che mantengono la colorazione al cristal violetto, ed i Gram-

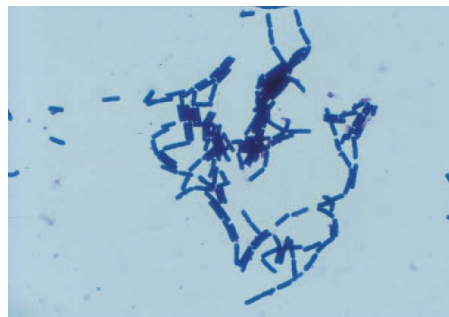


Illustrazione 24: Batteri colorati con cristal-violetto

che si decolorano. Le fasi chiave di questo trattamento sono la colorazione preliminare con cristal violetto la successiva mordenzatura con ioduro e la decolorazione con acetone e alcool. L'aggiunta di fucsina alla fine serve solo per rendere nuovamente visibili i Gram-. Le fasi della colorazione di Gram sono:

1. Stesura, essiccamento e fissazione (preparazione campione)
2. Colorazione con **cristal violetto** (violetto di genziana fenicato secondo Nicolle). Attendere ca. 2 min
3. Lavaggio con acqua
4. Aggiungere come **mordente** una soluzione di ioduro (soluzione di Lugol) Attendere ca. 1 min
5. **Decolorare** per 10-30 sec con **alcool** etilico e **acetone** (rapporto variabile, circa 4:1) al 95%.
6. Lavare con acqua
7. Aggiungere un contro-colorante per i batteri che si sono decolorati, generalmente **fucsina** basica (rosa)
8. Lavare

Colorazione di Ziehl-Neelsen

La colorazione di Ziehl (o sistema di Jinis) è utilizzata per quei batteri, come i micoplasmi, che non si colorano con il metodo di Gram (in quanto posseggono parete cerosa). Per questi microorganismi si può utilizzare un trattamento più aggressivo, con HCl diluito. Anche questa è una colorazione differenziale e distingue tra batteri che trattengono (+) o meno (-) la fucsina basica fenicata (di Ziehl) nella parete e resistono alla decolorazione con acidi e basi. La colorazione di Ziehl si articola in:

1. Stesura, essiccamento e fissazione
2. Colorazione con la fucsina basica fenicata di Ziehl
3. Lavaggio con acqua
4. Decolorare per circa 10 secondi con alcool(95%)/acido cloridrico (3-4%)
5. Lavaggio
6. Trattamento con blu di metilene come controcolorante
7. Lavare con acqua

In realtà attualmente tale trattamento è stato sostituito in quasi tutti i laboratori microbiologici da un test a fluorescenza.

Ribosomi

I ribosomi delle cellule procariote sono diversi da quelli che troviamo nelle cellule eucariotiche, e questo dato è molto importante in quanto rende i ribosomi batterici target ideali per gli antibiotici. I

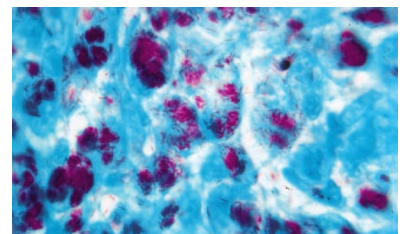


Illustrazione 25: *Mycobacterium lapre*, in rosso nelle cellule ospite (blu). Colorazione di Ziehl

ribosomi sono formati da RNA ribosomiale (60%) e proteine (40%), articolati in due subunità asimmetriche. I ribosomi batterici hanno un coefficiente di sedimentazione di 70 Svedberg (30S la subunità minore e 50S la maggiore⁴), mentre per i ribosomi eucarioti tale valore è di 80S.

Sappiamo come nelle cellule animali i ribosomi liberi codificano per le proteine citoplasmatiche mentre quelli associati al reticolo sono i precursori delle proteine di membrana. Nei batteri, privi di organuli cellulari quali il reticolo endoplasmatico, le proteine di membrana sono codificate da ribosomi associati alla membrana cellulare.

I ribosomi hanno funzione proteosintetica e pertanto sono componente fondamentale della vita. Le sequenze geniche che codificano per l'RNA ribosomiale, quindi, sono spesso sfruttate in indagini filogenetiche.

Come accennato prima i ribosomi batterici sono il bersaglio di molti antibiotici; questo non solo per la loro specificità quanto perché colpendo il sistema proteosintetico si ottiene la morte della cellula procariote (effetto battericida) o quantomeno l'inibizione della sua moltiplicazione (batteriostasi). Fortunatamente la tossicità per i ribosomi eucarioti degli antibiotici aventi per target ribosomi batterici, dovuta all'analogia dei substrati, è, per quanto esistente, molto bassa.

Capsula e Glicocalice

Alcuni batteri presentano sul lato esterno della cellula uno strato polisaccaridico.

Quando questo strato è organizzato in modo organico e non è facilmente asportabile costituisce una delle strutture facoltative della cellula batterica: la **capsula**.

Quando la capsula aderisce solo in modo lasso, invece, è definita **glicocalice**. Essa è facilmente visibile al microscopio ottico con coloranti specifici, quali l'inchiostro di china. Tale struttura, prodotta dalle secrezioni del batterio, esternamente alla parete è spesso presente in batteri patogeni. Essa, infatti, conferisce alla cellula batterica caratteristiche di ulteriore patogenicità, in quanto:

1. costituisce una difesa nei confronti della fagocitosi quindi verso i macrofagi ed il sistema immunitario. (ad es. *S. pneumoniae* è patogeno solo se capsulato)
2. incrementa la resistenza ad agenti esterni quali detergenti e disidratazione
3. favorisce l'adesione ai substrati (es. mucose) impedendo ai fluidi a contatto con le mucose di staccare il batterio (ad es. l'agente eziologico della gonorrea che attacca l'apparato urinario se fosse privo di capsula verrebbe eliminato)
4. la sua composizione con associazioni di proteine e polisaccaridi è scarsamente immunogenica

Ruolo della capsula nell'elusione della risposta immunitaria

La ricopertura della capsula nasconde il batterio alle cellule che sono deputate a eliminare il batterio. Quando i macrofagi trovano un batterio privo di capsula possono riconoscerne facilmente come estranee le proteine esterne e può fagocitarlo. Viceversa il batterio incapsulato ha le proteine della parete che però non sono accessibili al macrofago, in quanto immerse in una matrice polisaccaridica; pertanto il macrofago non riconosce quel batterio incapsulato come un "complesso proteico estraneo" e non è immediato a fagocitarlo attraverso un processo di fagocitosi.

Un'altra funzione della capsula è di permettere l'adesione del batterio, mediandone la patogenicità. Un battere adeso, infatti, rimane localizzato sulla mucosa o su altre strutture e secernere in loco le proprie eventuali tossine. Questo ovviamente non vale solo per le mucose: alcuni batteri, grazie al proprio glicocalice, sono in grado di aderire anche a strutture estremamente lisce come lo smalto dei denti (es. *S. mutans* che causa la carie dentaria).

Sfruttamento del capsido nello sviluppo di vaccini

Spesso si sono ottenuti dei vaccini evidenziando la componente proteica delle casule batteriche, ovvero andando a rimuovere con trattamenti biochimici e/o enzimatici la porzione polisaccaridica di protezione. Il risultato sono stati vaccini acellulari (non formati da cellule batteriche) ma composti da componenti batteriche, in questo caso parti della capsula. Ad es. il vaccino contro uno dei ceppi di meningococchi che causano la meningite è di questo tipo e fornisce una protezione intorno al 80-85%.

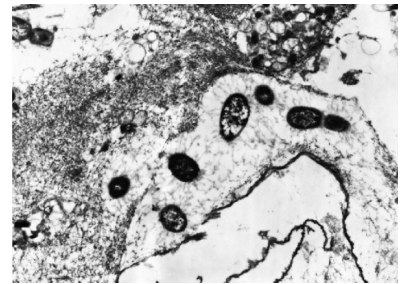


Illustrazione 26: Il glicocalice aiuta questi batteri ad aderire alla parete intestinale

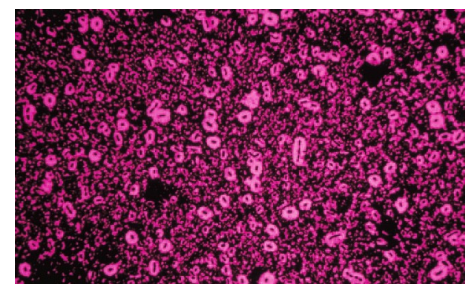


Illustrazione 27: *K. pneumoniae* con colorazione negativa, evidenziate le capsule

4 Come risulta evidente gli Svedberg non rappresentano una grandezza additiva. La velocità di sedimentazione di una sostanza in centrifuga, infatti, dipende dal suo peso molecolare, dalla forma e dal volume.

La capsula al microscopio ottico

Per poter evidenziare colorare e riconoscere le strutture capsidiche dei batteri al microscopio ottico è necessario ricorrere a particolari colorazioni:

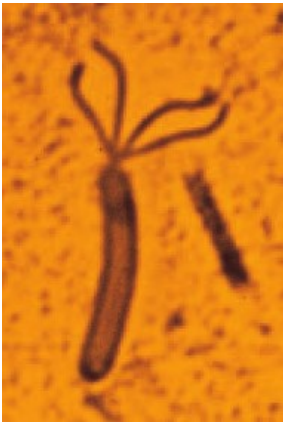


Illustrazione 28: Batterio lofotrico

1. Colorazione convenzionale. Ad es colorazioni di Gram in cui però è necessario effettuare una mordenzatura con acido tannico. Essendoci la capsula non ci può essere colorazione pertanto è necessario aggredire la capsula attraverso un mordenzante come l'ac tannico, in modo che il colorante possa aderire.
2. Colorazione negativa. È in realtà un metodo di visione più che una vera colorazione. È in contrasto perché i batteri non sono colorati. Si osserva un fondo scuro e i batteri appaiono come macchie chiare. Il batterio è una striscia sottile mentre la parte attorno bianca (o colorata, nell'immagine a lato è stato usato inchiostro indiano) rappresenta la capsula. La capsula è almeno due volte più spessa di tutta la struttura del batterio. È uno strato enorme rispetto alle dimensioni del batterio e può essere 300-400 volte più spessa della parete che risulta quindi un sottile strato. (v. img. 27)
3. Decorazione. Consiste in una reazione con antisiero specifico. Si vede un alone bianco intorno alla capsula. Esso è rappresentato dall'accumulo di anticorpi che fanno una barriera intorno al batterio. È per questo che è necessario un antisiero specifico, ovvero diretto esattamente con la componente proteica della capsula di quel batterio. Non si può utilizzare un siero qualsiasi proprio perché non c'è una grossa affinità tra i vari sieri. I sieri degli anticorpi devono riconoscere esattamente

la proteina che è localizzata sulla parete stessa.

I flagelli

La maggior parte dei batteri capaci di movimento deve la sua motilità ai flagelli, appendici frustiformi locomotrici che si estendono all'esterno di membrana e parete cellulare. Si tratta di strutture larghe 20nm e lunghe fino a 15-20µm, presentanti simmetria elicoidale e di composizione proteica (flagellina).

Si tratta quindi di strutture particolarmente lunghe (fino a 5-10 volte la lunghezza del batterio) la cui disposizione sulla cellula batterica varia.

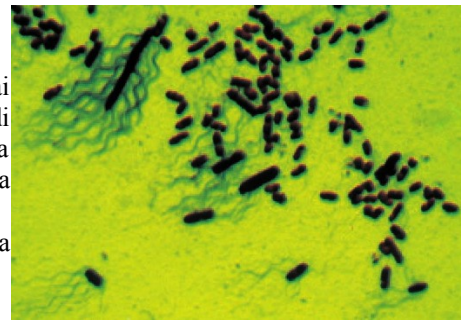


Illustrazione 29: Flagelli peritrichi

Disposizione

La localizzazione dei flagelli ha importanza anche dal punto di vista tassonomico, sono possibili 4 diverse disposizioni:

- Monotrica: il batterio ha *un unico* flagello in posizione terminale. (v. img. 30)
- Peritrica: il batterio è *circondato* da flagelli in modo più o meno uniforme su *tutta* la sua superficie. (v. img. 29)
- Lofotrica: il batterio presenta *un ciuffo* di flagelli ad *una sola* estremità (v. img. 28)
- Anfitrica: il batterio presenta *due ciuffi* di flagelli alle *due* estremità.

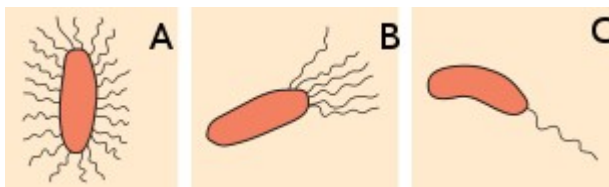


Illustrazione 31: Diverse disposizioni di flagelli.
A-peritrica, B-lofotrica, C-monotrica

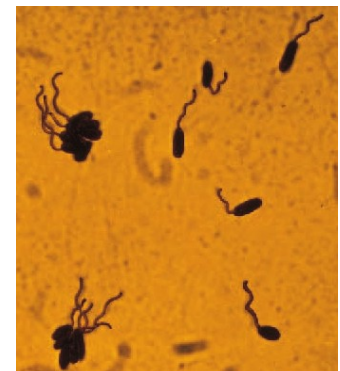


Illustrazione 30: Batteri con flagelli peritrichi

Nota che non esistono cocci flagellati, ovvero i flagelli sono prerogativa dei batteri allungati, i bacilli.

Composizione

I flagelli sono costituiti da una proteina, la **flagellina**, strutturata in monomeri. Il flagello è un polimero di flagellina avvolto a spirale, con struttura flessuosa, elastica la cui capacità motoria è conferita da un motore posto nella sua origine intracellulare. La flagellina è una proteina altamente immunogenica: il nostro sistema immuno-competente è capace di sintetizzare facilmente anticorpi anti-flagellina. La struttura elicoidale del flagello, dovuta all'avvolgimento spiraliforme di flagellina è facilmente visibile al microscopio elettronico.

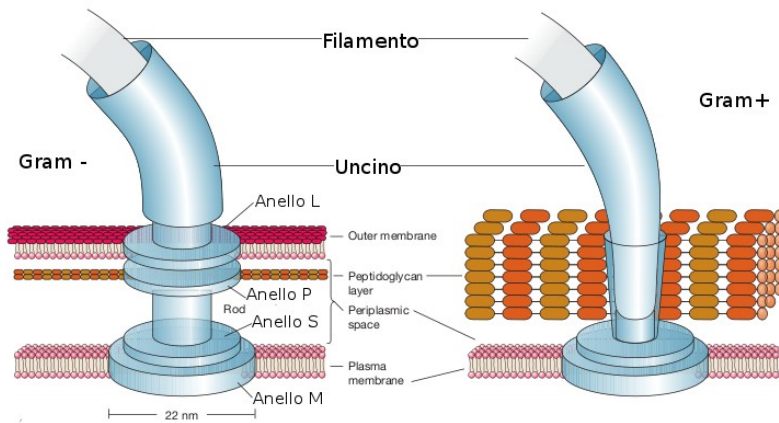


Illustrazione 32: Struttura della base del flagello nei Gram- e nei Gram+

saldamente ancorata alla membrana e parete cellulare. Tali anelli sono 4 nei batteri gram negativi (L-P-S-M) e tre nei batteri gram positivi (P-S-M). Alla punta del flagello può essere presente una struttura di protezione, ad esempio il *V. cholerae* presenta uno scudo lipopolisaccaridico.

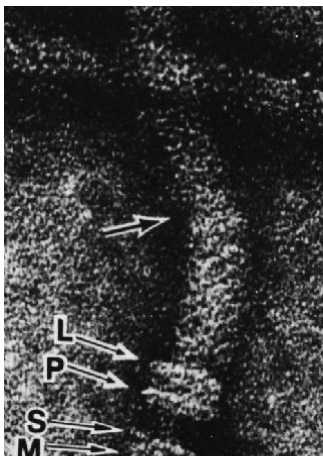


Illustrazione 33: Un flagello di un batterio Gram-.

La porzione esterna è chiamata **filamento** ed è formata da monomeri di flagellina. Il diametro di un flagello è circa 14 nm (molto piccolo). Il filamento si inserisce nella parete attraverso una struttura detta **uncino**. Esso è piegato a circa 90 gradi perché questa struttura imprime al flagello un movimento a elicodiale, simile al moto di una frusta azionata dalla rotazione del polso. Il flagello ha un sistema di ritenuta mobile: se si prende un batterio flagellato e lo si agita vigorosamente, infatti, tale agitazione non uccide i batteri ma ne spezza i flagelli. I flagelli si rompono a livello più o meno distante, ma spesso vicino, fra il filamento e l'uncino perché l'uncino è molto resistente. Dall'esterno verso l'interno si trova un anello L e un anello P. L'**anello L** è presente solo nei gram negativi perché è inserito nello spessore del lipopolisaccaride parietale, cioè nella componente lipidica più esterna, cosiddetta "membrana esterna della parete", peculiarità dei Gram-.

Più sotto c'è l'**anello P** (che sta per peptidoglicano), seguono **anello M** e l'**anello S**, entrambi inseriti nella membrana. Tutto questo fa parte della porzione inserita all'interno della struttura batterica. Uncino e filamento, invece, restano all'esterno.

Fonte di energia per il movimento

A lungo si è pensato che questa energia derivasse dall'ATP e che addirittura la flagellina avesse attività ATPasica, cioè di dissociazione dell'ATP in ADP e fosfato.

Non è così. Il movimento dei flagelli è dovuto alla presenza di un "motore", localizzato alla base del flagello, che per generare movimento sfrutta l'energia connessa al gradiente elettrochimico transmembrana di ioni H^+ (di fatto protoni, da cui *motore protonico*). Come tutti i motori è formato da due componenti, una parte fissa (statore) ed una mobile (rotore).

Le **proteine MOT** rappresentano lo statore, sono proteine di trasporto per gli H^+ che trasformano il passaggio dei protoni in movimento. I protoni necessari per far compiere al flagello un giro completo sono $256 H^+$, la rotazione è oraria o antioraria a seconda della direzione del flusso protonico. Il passaggio dei protoni può essere più o meno intenso e provoca la rotazione della parte centrale che è caratterizzata da altre proteine, dette **proteine FLI**.

A seconda delle caratteristiche dell'ambiente in cui si trova il batterio (viscosità del fluido, concentrazione salina etc) il movimento può essere più o meno facile e trasmettere al batterio più o meno forza propulsiva. Alcuni batteri possono passare da un ambiente ad un altro e pertanto hanno la

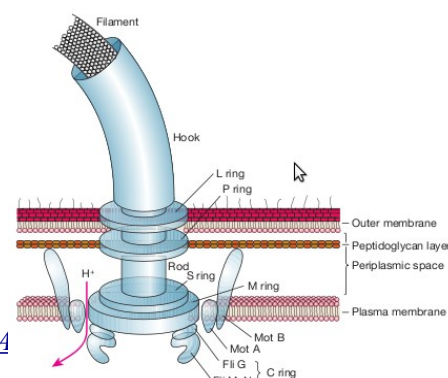


Illustrazione 35: Il flagello di un Gram-. Si noti il flusso di H^+ , in rosa

Illustrazione

34:

Flagello, struttura elicoidale (SEM)

capacità di adattare il proprio numero di giri alle diverse condizioni, variando la velocità di rotazione da 200 a 1000rpm (rotazioni per minuto). Se il moto è troppo vigoroso il flagello si può spezzarsi o staccarsi, in ogni caso i flagelli si ricostituiscono ad alta velocità tramite un processo di auto-assemblamento dei monomeri di flagellina.

Esistono batteri più ed altri meno veloci, in particolare i più veloci saranno i lofotrichi. I batteri possono muoversi con una velocità lineare compresa tra i 20 ed i 90µm/s. Per capire *quanto* veloci siano si confronti la loro velocità con quella ad esempio di un ghepardo. Esso corre a 110 km/h, circa 30m/s quindi approssimativamente copre la propria lunghezza 25 volte al secondo. Un batterio, 'nuotando', arriva a percorrere da 2 a 100 volte la lunghezza del suo corpo in un secondo. Grazie alla forma estremamente aerodinamica.

Biosintesi dei componenti flagellari

La biosintesi dei flagellari è un processo di autoassemblamento a partire da monomeri creati nel citoplasma, mediante la consueta azione da parte dei ribosomi. Tali monomeri sono poi traslocati prima a livello della membrana e della parete. L'intero processo è caratterizzato da un andamento centrifugo frutto di successive aggiunte in posizione apicali.

La sintesi comincia con l'assemblaggio dell'**anello MS**, il più interno, parte della struttura motrice. Seguono gli altri **anelli**: quello **P** (peptidoglicano) ed infine (nei Gram-) l'**anello L** (lipopolisaccaride parietale).

A questo punto comincia a strutturarsi il cosiddetto **uncino** e, al termine della sua formazione si forma un **Cap**, una porzione di accrescimento sul quale si legano uno dopo l'altro i monomeri di flagellina, permettendo l'allungamento del flagello. Il flagello che ne risulta è una struttura cava di cui la flagellina costituisce le pareti. L'accrescimento parietale avviene dall'estremità apicale. In pratica si allungano prolungando la punta e non allungandosi dalla radice. Questo allungamento non avviene sempre per lungo tempo ma si interrompe di solito quando il batterio si divide perché è rallentata o inibita la trascrizione del gene che codifica per la flagellina. Il tempo impiegato dal flagello per allungarsi dipende da batterio a batterio. Il flagello è capace di ricostituirsi in tutta la sua lunghezza nel giro di una generazione, cioè 20 minuti. La velocità di assemblaggio di ristrutturazione di monomeri è estremamente elevata e spesso consuma gran parte dell'energia del flagello. Questo ancora di più quando anziché un flagello c'è un ciuffo di flagelli. L'accrescimento apicale avviene attraverso monomeri che non arrivano in punta circolando intorno ma scorrendo all'interno del flagello, che è cavo, e si assemblano poi in superficie.

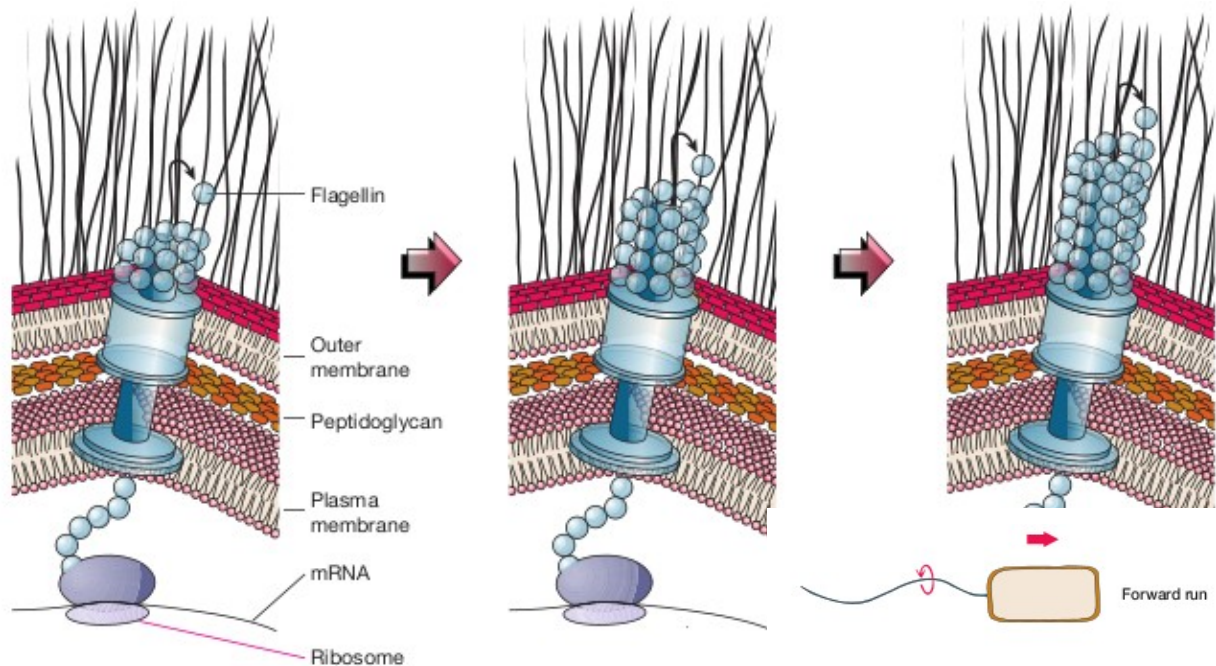
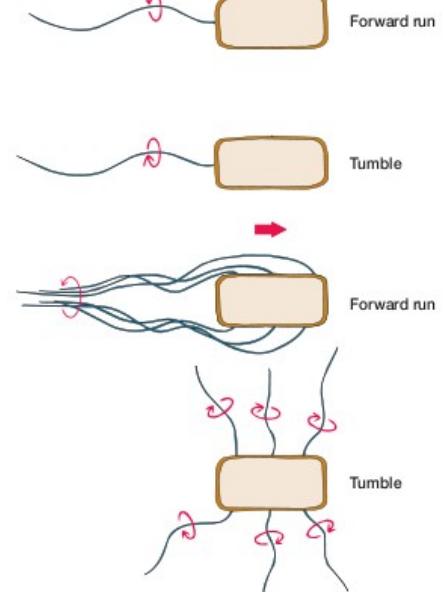


Illustrazione 36: Il processo di biosintesi del filamento del flagello

Movimenti flagellari

Batteri caratterizzati con diverse disposizioni flagellari sono caratterizzati da sistemi di movimento diversi. Essi sono principalmente di 3 tipi:

1. peritrico
2. polare
 - a. reversibile
 - b. unidirezionale



I batteri che hanno **flagelli peritrichi** (es. salmonella, agente eziologico del tifo addominale) raggruppano tutti i flagelli in un'estremità e ne fanno una matassa (v. img. 37). La rotazione è antioraria (counterclockwise, ccw). Il senso di rotazione chiaramente varia se si osserva il batterio frontalmente o posteriormente rispetto al ciuffo di flagelli; per convenzione si assume una vista frontale, ovvero con i flagelli sull'estremità opposta del batterio. Per cambiare direzione il batterio raggruppa i flagelli, li sposta all'altra estremità riparte sempre con rotazione ccw: il verso non è mai invertito.

I batteri con **flagelli polari reversibili**, invece per indietreggiare invertono il verso di rotazione (secondo disegno img. 37). Il loro motore, infatti può introdurre ma anche espellere protoni.

Nei batteri con **flagelli polari unidirezionali**, invece il senso di rotazione è orario (clockwise, cw). Per cambiare direzione il batterio adotta una tecnica analoga a quella dei peritrichi.

Batteri aflagellati

I flagelli sono strutture facoltative: i batteri che ne sono privi possono però muoversi ugualmente, sebbene in modo passivo. I batteri, infatti, non sono mai immobili per il risultato delle diverse interazioni elettrostatiche che agiscono su di essi e per i moti interni (Browniani) al mezzo fluido in cui si trovano. Il vantaggio del movimento mediato da flagelli è quindi la direzionalità. Altri batteri, infine, sono capaci di muoversi grazie ad altri organi deputati al movimento, quali microfibrille localizzate al di sotto della parete batterica. Ad es. il *T. pallidum*, agente eziologico della sifilide, è un batterio motile aflagellato. Il suo movimento è paragonabile a quello di un serpente, capace di avanzare anche senza gambe.

Fimbriae o pili

Le fimbriae (lat. sing. fimbria) o pili sono strutture filamentose di dimensioni minori rispetto ai flagelli ($\varnothing$ ca 3-10 nm), privi di funzioni di movimento che si trovano spesso nei batteri Gram-. Per quanto essi possano anche essere molto numerosi (>1000) in una cellula, sono visibili solo al microscopio elettronico a causa delle loro dimensioni ridotte. Esistono due tipi di pili:

- pili **comuni**
- pili **sessuali**

Come i flagelli si tratta di appendici cellulari di natura proteica (pilina) a simmetria elicoidale, lunghi fino a qualche μ m. Le loro funzioni dipendono dal tipo di pilo (comune o sessuale), e sono rispettivamente:

- Adesione di tessuti (mucose) dell'ospite
- Comunicazione tra cellule batteriche

I pili comuni

I pili comuni hanno funzione di adesiva alternativa rispetto a capsula/glicocalice, envelope o acido teicoico. Esistono però batteri, quali la *L. meningitis* sono dotate sia di pili comuni che di capsula, possiedono quindi un doppio sistema di adesione

I pili sessuali

I pili sessuali costituiscono un sistema di comunicazione tra due cellule batteriche, creando un legame detto **coniugazione**. I pili sessuali hanno generalmente dimensioni maggiori rispetto ai pili comuni e sono costituiscono un tubo cavo all'interno del quale possono passare dei plasmidi. Nota che i pili comuni, pur essendo formati dalla stessa proteina, la pilina, non sono cavi. Il fine ultimo di questo ponte citoplasmatico è il trasferimento di geni da un batterio ad un altro.

Il trasferimento di geni avviene a partire da cellule definite F+ verso cellule F-, dove la F sta per "capacità fertilizzante". Vengono definiti F+ quei batteri che hanno la sequenza di geni necessaria per codificare il pilo sessuale. Per cui vi sono batteri F+ e batteri F-. Il pilo sessuale si legherà ai recettori complementari presenti su cellule F-. I batteri F+ possono essere considerati batteri "maschi", mentre gli F- batteri "femmina". Nel processo di coniugazione batterica, però, i batteri F- possono diventare F+ (qualora, ad esempio venga passato il gene che codifica per le fimbriae). Per cui alla fine ci può essere un "trasferimento della sessualità". Questo è un evento molto raro che si manifesta con una bassissima frequenza perché se si manifestasse con alta frequenza adesso si avrebbero solo batteri F+.

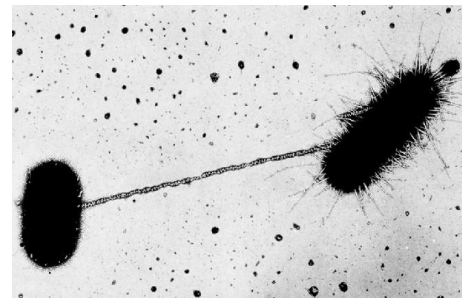


Illustrazione 38: Coniugazione batterica.
A destra la cellula F+, con fimbriae

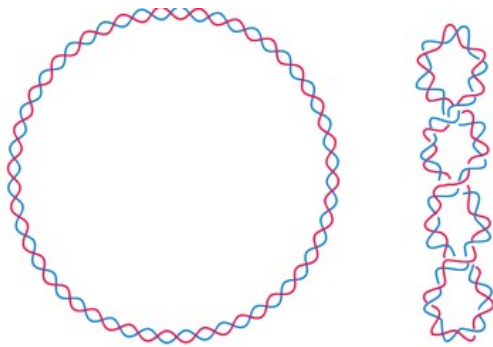


Illustrazione 39: Dna circolare e superavvolto

Inizialmente si riteneva che il processo coniugativo potesse avvenire solo tra batteri della stessa specie, si è scoperto che non è così, semplicemente la coniugazione inter-specie è meno efficiente e frequente. Essa ricopre tuttavia un ruolo chiave nella diffusione delle resistenze ai farmaci: qualora si abbia l'insorgenza della resistenza ad un dato principio attivo (evento teoricamente altamente improbabile ma di fatto comune frutto di mutazioni) ad esempio in uno degli oltre 400 miliardi di batteri della flora saprofita del nostro intestino questi può diffondere il plasmide che ne conferisce la resistenza agli altri batteri, creando una popolazione di batteri resistenti. Anche assumendo che il trattamento antibiotico sia andato a buon fine quindi, qualora si sia verificato un fenomeno di resistenza, anche in un

batterio saprofita, in una successiva infezione non potremo più usare il medesimo principio attivo in quanto i batteri resistenti possono trasmettere il gene della resistenza al farmaco al nuovo patogeno.

In ogni caso la trasmissione di geni da una cellula F⁺ ad una F⁻ non significa, per la prima cellula, la perdita di quell'informazione genica in quanto quello che viene scambiato è un duplicato (all'ingresso del pilo è presente una DNA/RNA-polimerasi. Si noti che generalmente i geni trasferiti non sono geni strutturali, anche per questo a trasformazione di un batterio da F⁻ a F⁺ è un evento molto raro.

Genoma batterico

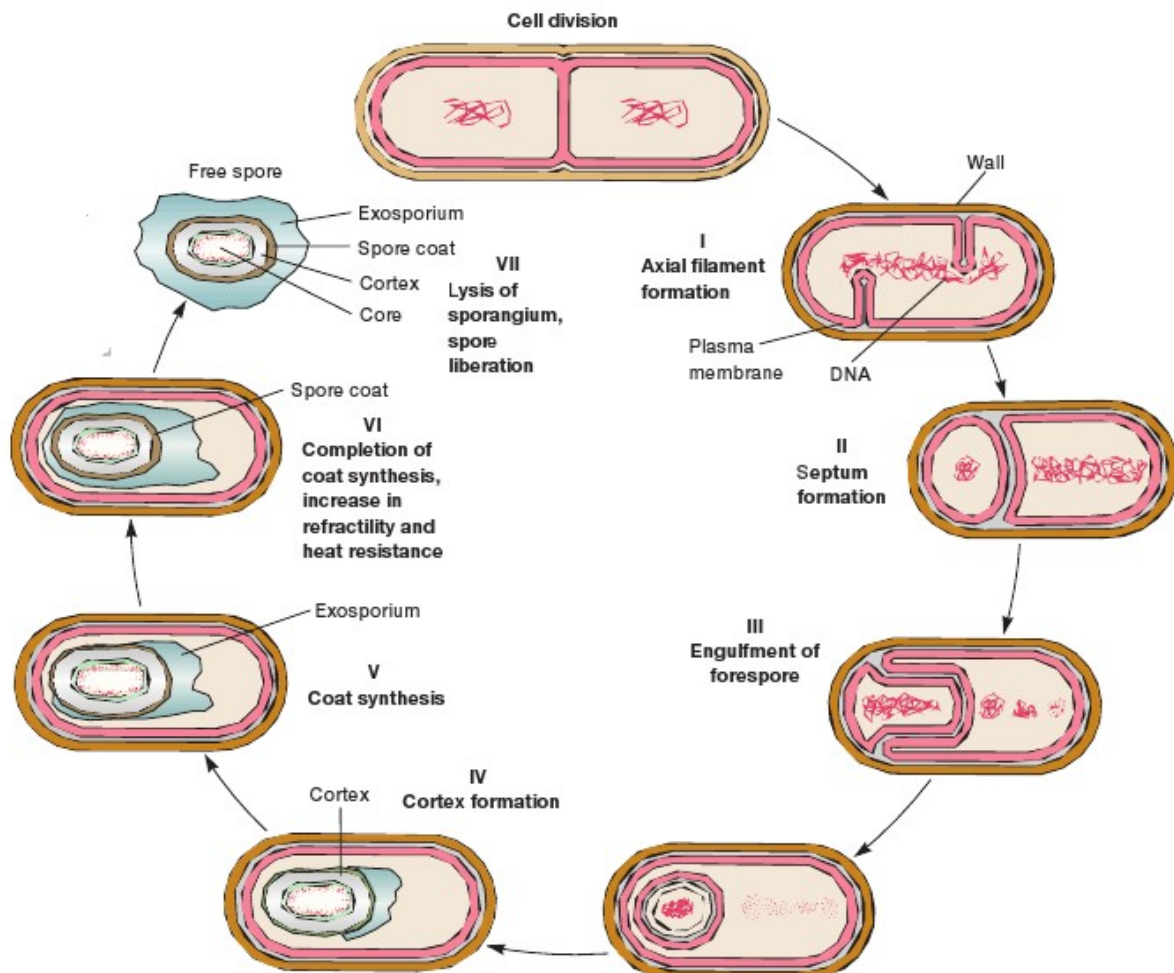


Illustrazione 40: Diverse fasi della sporogenesi, un'overview

In una cellula batterica possiamo individuare due tipi di dna, che codificano per diverse categorie di geni:

- dna **cromosomiale**
- dna **extracromosomiale**

DNA Cromosomiale



Illustrazione 41: Organizzazione interna di un nucleosoma

Il DNA cromosomiale contiene il genoma formato da geni essenziali per la replicazione, la moltiplicazione e per l'espressione delle varie funzioni connesse con la vita del batterio stesso. E' un DNA di notevoli dimensioni che contiene fino a 2000 geni che codificano per 2500/2800 proteine. Il materiale genetico non è protetto dal nucleo come negli eucarioti ma è distribuito nel citoplasma sotto forma di nucleosomi, cioè ammassi di dna superavvolto (supercoils) attorno a proteine che ne mantengono la forma. Successivamente i vari nucleosomi si associano in ulteriori aggregati filamentosi, le fibre di cromatina.

Quello batterico è un cromosoma unico, ovvero il corredo genico è **apolide** e circolare, quindi **chiuso**. Essendo il corredo cromosomico aploide nei batteri ogni mutazione si traduce in un cambiamento nelle proteine codificate, sempre che

le base modificata non crei una terna "sinonimo" della prima.

Pur essendo circolare il DNA ha un suo inizio detto *origin*, che è il punto in cui inizia la duplicazione del DNA. Il processo duplicativo, così come quello replicativo che codifica m-RNA, avviene svolgendo porzioni successive del genoma. Il genoma viene definito **supersvolgens**: il DNA batterico, infatti, è avvolto tre volte e non si apre mai completamente, ma porzioni di DNA si svolgono successivamente e svolgendosi vanno incontro a duplicazione e, talvolta anche contemporaneamente, a trascrizione.

Un cromosoma batterico ha peso molecolare nell'ordine dei $3 \cdot 10^9$ Dalton, ovvero circa 1,5 milioni di b.p.. Ne segue una lunghezza complessiva di circa 2mm, che deve essere contenuto in una cellula lunga circa $2\mu\text{m}$: risulta quindi evidente la necessità di conservarlo in forma compattata.

Il DNA batterico è **completamente funzionale**: sequenze non codificanti, gli introni, sono delle eccezioni raramente presenti (mentre negli eucarioti gli introni rappresentano anche il 90% del corredo genico). Inoltre tutte le proteine codificate vengono espresse, con rare eccezioni, questo dato è coerente con l'assenza di differenziamento, dovuto alle dimensioni unicellulari dei batteri. Esistono, tuttavia, delle sequenze geniche che esprimono proteine solo in condizioni particolari, ad es. i geni che codificano per la formazione della spora, nei batteri sporigeni, sono espressi solo in condizioni sfavorevoli.

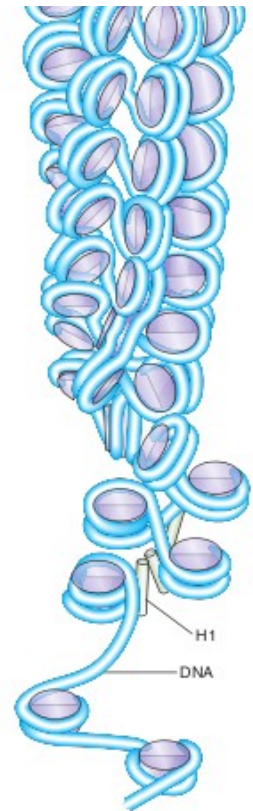


Illustrazione 42: Fibra di cromatina

DNA Extracromosomiale

Il DNA extracromosomiale potrebbe sembrare prerogativa degli organismi procarioti, in realtà è presente anche negli eucarioti sotto forma di DNA mitocondriale. In ogni caso il DNA extracromosomiale procariota è diverso, ed è dato da tutte quelle porzioni di genoma esterne all'unico cromosoma circolare. Esso, in particolare, esiste sotto due forme:

- dna **plasmidico**
- dna **episomiale**

Plasmidi

I plasmidi sono strutture estremamente importanti sia per la cellula procariote che per l'ingegneria genetica, per la quale hanno costituito il primo vettore. Essi sono formati da una doppia elica di DNA di forma circolare, chiusa e con una propria origine di replicazione; a differenza del cromosoma batterico però non sono superavvolti, al più parzialmente attorcigliati. Essi sono costituiti da pochi geni, al più 30, con funzioni non strutturali. Un plasmide può anche essere espulso dalla cellula che lo ospita spontaneamente o sotto l'effetto di particolari agenti (es. radiazioni UV). Esistono diverse categorie di plasmidi a seconda delle informazioni genetiche che contengono, ad esempio plasmidi metabolici, di virulenza, di resistenza. Il plasmide più 'famoso' è probabilmente il pBR322 che veicola informazioni per la resistenza all'ampicillina ed alle tetraciline. I plasmidi sono elementi transolubili o trasferibili: cioè possono essere trasferiti da un batterio ad un altro e questo trasferimento può avvenire attraverso diversi metodi:

- per **coniugazione**, avviene naturalmente, tra batteri capaci di creare/accettare pili sessuali
- per **trasformazione**, ovvero assumendo genoma direttamente dall'ambiente extracellulare
- per **trasduzione fagica**, ovvero tramite intervento di batteriofagi
- per **transfezione**, ovvero introducendo materiale genetico dall'esterno

Coniugazione

La **coniugazione** batterica è un processo fisiologico con il quale due batteri si scambiano del materiale batterico generalmente extracromosomiale.

I batteri che presentano plasmidi e che al loro interno contengono il fattore sessuale F⁺ sono in grado cioè di creare un filo sessuale e di far passare attraverso esso le sequenze geniche localizzate sul plasmide, trasferendole così alla cellula F⁻.

Perciò un plasmide potrà essere totalmente trasferito da una cellula *donatrice* F⁺ ad una cellula *ricevente* F⁻. Questo evento è abbastanza frequente, ma raro è che un plasmide completo possa essere trasferito; in genere tutto il plasmide non fa in tempo a passare perché le due cellule sono interconnesse dal filo sessuale, ma dal momento che questo processo avviene in un ambiente liquido, le due cellule batteriche difficilmente rimangono attaccate il tempo necessario a permettere l'intero passaggio dell'informazione genica. Generalmente solo una piccola parte di plasmide riesce a passare prima che questo ponte si interrompa. Talvolta però il tempo di coniugazione è sufficientemente lungo per il trasferimento completo del plasmide: se ciò avviene la cellula ricevente acquista tutte le caratteristiche della cellula donatrice, cioè diventa da F⁻ a cellula F⁺; si tratta di un evento molto raro, che si stima si verifichi, sul totale delle coniugazioni, con una frequenza di 10^{-7} .

Ruolo dei plasmidi

I plasmidi non contengono geni essenziali per le condizioni normali di crescita di un batterio ma, ad esempio i geni per la resistenza agli antibiotici.

I geni di resistenza agli antibiotici possono avere funzioni diverse alla loro capacità di impedire l'attività dell'antibiotico: possono avere attività:

- **diretta**. Quando il plasmide contiene un gene che agisce direttamente sull'antibiotico, inattivandolo. Ad esempio un plasmide che codifichi per l'enzima pennicillinasi, una beta-lattamasi capace di scindere l'anello beta-lattamico della penicillina è **direttamente** responsabile della resistenza all'antibiotico.
- **indiretta**. Se invece il plasmide conferisce al battere una situazione fisiologica tale da poterne permettere la resistenza all'antibiotico, pur senza agire direttamente sull'antibiotico, ma ad esempio modificando la permeabilità della parete cellulare per far sì che esso non possa agire. In questo caso il plasmide non è direttamente responsabile dell'acquisita resistenza al farmaco, ma l'**effetto indiretto** è il medesimo.

I plasmidi hanno **dimensioni** variabili: vi sono plasmidi piccoli e plasmidi grossi, che sono quelli che contengono più geni, e perciò si va dalle 15-20k b.p. fino alle 60k: tanto maggiori sono le dimensioni del plasmide tanto più tempo sarà necessario per permetterne la trasmissione per coniugazione e tanto meno probabile sarà il suo completo trasferimento.

Ulteriori metodi di trasferimento genico

Oltre al metodo alla coniugazione sono possibili altre modalità con cui le cellule procariote possono acquisire materiale genico estraneo (eterologo). Questi sono:

- **trasformazione**. Consiste nell'acquisizione di DNA “nudo” dal medium in cui è immersa la cellula. E' un processo casuale la cui importanza è più che altro storica. Nel 1928 Griffith, con un esperimento che prevedeva la “trasformazione” (così la definì) provò il ruolo del DNA come portatore delle informazioni geniche⁵. Come **metodica di laboratorio** consiste nel modificare la cellula ricevente rimuovendone la parete e sottoponendola a shock termico. Il DNA può quindi essere introdotto con relativa facilità e la cellula diventerà così *trasformata*. Con il termine trasformato si intende una cellula che ha ricevuto materiale non suo, che prima era di un'altra cellula o di un altro organismo. Artificialmente viene eliminata la parete e inserito il nuovo materiale genetico, che invece viene introdotto naturalmente nella trasduzione e nella coniugazione.
- **trasduzione fagica**. Questo metodo fa uso di batteriofagi (o fagi) come vettori. Si crea quindi un virus contenente la sequenza genica che vogliamo aggiungere e con questo infettiamo delle cellule batteriche. Chiaramente per impedire la successiva proliferazione di virus e la morte delle cellule batteriche per lisi sarà necessario utilizzare dei fagi lisogeni ed il cromosoma della cellula procariota trattata conterrà il profago.

Episomi

Gli episomi sono dei plasmidi che possono essere integrati nel cromosoma batterico. Come tali la loro esistenza extracromosomiale è temporanea.

5 Griggith dimostrò come inattivando con calore dei batteri di *S. pneumoniae* ed inoculandoli in delle cavie da laboratorio esse rimanevano vive, mentre infettando i topi con un'associazione di batteri virulenti uccisi e batteri vivi non virulenti si otteneva la morte degli animali.

Lo stato episomiale è riscontrabile anche nelle cellule eucariote, ad esempio quando un Papilloma Virus (HPV) infetta una cellula eucariota può o rimanere nello stato episomiale, cioè staccato dal genoma, oppure integrarsi: nei casi di tumore il genoma del papilloma si è integrato. Nelle cellule eucariote, quindi, il concetto ha una sfumatura diverse ed indica lo stato (integrato o meno) di sequenze virali.

Colorazione DNA genomico

Il dna genomico può essere identificato con una colorazione specifica, che viene definita reazione di Feugen. Si tratta di una colorazione che si ottiene con fucsina basica o base di schiff (un'immina): nella cellula batterica ci sono però due acidi basofili (ovvero affini a coloranti basici), DNA ed RNA, mescolati insieme. Per mettere in evidenza selettivamente il DNA bisogna eliminare l'attività di legame con RNA, ovvero è necessaria un'**idrolisi acida** a 60°C per ca 10 minuti. Tale trattamento dissocia le molecole ribonucleiche ma non quelle desossiribonucleiche.

Al microscopio ottico a scansione il DNA si presenta come una nebulosa chiara circondata da una restante parte più scura rappresentata da rna e ribosomi. Il filamento di dna è stato denaturato, precipitato con metalli pesanti in modo da essere più evidente: infatti il suo spessore è molto inferiore rispetto a quello osservabile con il microscopio ottico. In alcuni punti vi sono delle anse che corrispondono ai frammenti in cui i due filamenti di dna non sono appaiati e questo può avvenire per delezioni che può interessare solo una delle due eliche.

Il DNA è avvolto per tre volte e questi tre avvolgimenti lo rendono più compatto, tuttavia per duplicarsi deve essere sciolto, pertanto ci sono sempre delle porzioni del genoma aperte.

Duplicazione DNA batterico

La duplicazione del dna del cromosoma batterico avviene, a partire dall'origine di replicazione, in entrambe le direzioni ovvero si creano due forcelle di duplicazione (una in direzione 5' l'altra 3') le quali, a causa della circolarità del genoma, si rincontreranno al termine della duplicazione. Poco dietro l'elicasi le due semieliche, aperte, sono completate da una DNA-polimerasi. La DNA-polimerasi, però, potendo agire solo in direzione 5' → 3' può sequenziare direttamente un filamento (il leading strand), mentre per l'altro ricorre ai frammenti di Okazaki.

Nel batterio è stato individuato un punto in cui il dna cromosomiale è legato alla membrana del batterio: è un punto che nei bacilli è situato a circa metà della membrana, il DNA, pertanto, non è completamente libero ma è ancorato alla membrana.

Quando inizia il processo di duplicazione la cellula si allunga e aumenta di dimensioni; il punto a cui il dna è legato è il punto da dove ha inizio l'allungamento della membrana. Quando il dna si duplica questo punto si scinde in due nuovi punti: perciò, dato che la membrana si allunga, i due punti di attacco si separano e con essi anche i due cromosomi

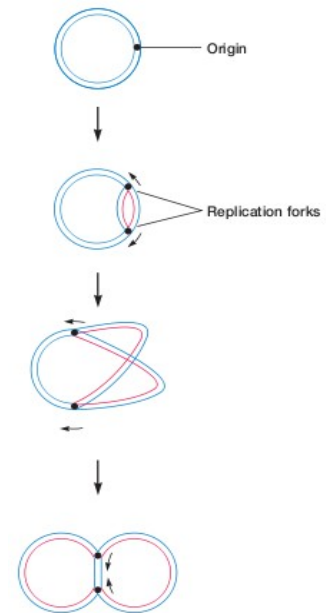


Illustrazione 43:
Replicazione DNA batterico

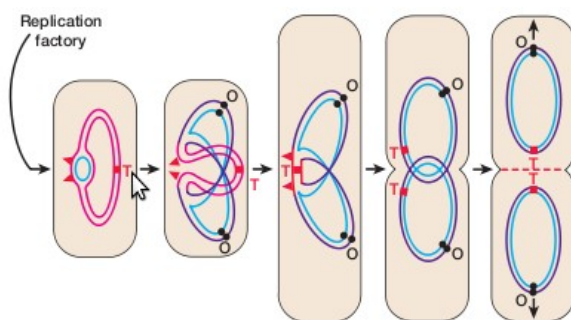


Illustrazione 44: Duplicazione cellulare

respiratori. Lo stadio successivo consiste nella fusione delle vescicole tra di loro, dando così origine al setto: la cellula batterica inizia a dividersi. All'interno del setto si inseriscono i costituenti della parete; prima che le vescicole si fondono completamente e i due batteri si separano la cellula ha un genoma diploide.

In molti casi i batteri non si separano completamente e danno origine a colonie fuse come streptococchi o streptobacilli.

Plasmidi come vettori di resistenza agli antibiotici

La resistenza dei batteri agli antibiotici è stata riconosciuta sin da quando iniziarono ad essere impiegati in campo clinico i primi farmaci. I solfonamidici furono introdotti nel 1935 e circa 10 anni dopo il 20% delle *N. gonorrhoeae* isolate in laboratorio erano divenute resistenti. La penicillina fu impiegata per la prima volta nel 1941, quando meno dell'1% degli *S. aureus* erano resistenti alla sua azione. Entro il 1947 il 38% dei casi mostrava resistenza ed attualmente tale quota supera il 90%. L'incidenza dei fenomeni resistivi varia da specie a specie, ad esempio l'*E. coli* sottoposta ad una pressione selettiva presumibilmente simile a quella dello *S. aureus* ha mantenuto nel tempo un tasso di resistenza del 30-40% con lieve incremento mentre ad oggi non sono riportati casi di resistenza alla penicillina per gli *S. pyogenes*. La resistenza agli antibiotici può essere intrinseca o acquisita. Trascurando le resistenze intrinseche (dovute ad esempio alla presenza di envelope) per quelle acquisite un ruolo chiave è svolto dalla coniugazione batterica quindi dai plasmidi. E' già stato detto come il plasmide pBR322 sia capace di fornire resistenza all'ampicillina ed alle tetraciline, ma non è il solo.

Un caso interessante è il plasmide RP4 il quale oltre a contenere contemporaneamente la resistenza per ampicillina, tetraciline, neomicina e kanamicine possiede anche il plasmide F+ con le informazione per il trasferimento del plasmide da un batterio all'altro.

C'è un plasmide particolare BCC86 che oltre a contenere geni di resistenza per la tetraciclina contiene geni di resistenza per i sulfamidici, per il mercurio e infine presenta geni che codificano per tossine: ci sono delle patologie in cui l'agente eziologico provoca la malattia perché la tossina, causa della malattia, viene codificata non dal genoma del battere, ma dal plasmide. Pertanto per curare la malattia bisogna trovare una cura in grado di eliminare il plasmide.

I plasmidi infatti possono veicolare diverse informazioni, non solo la resistenza ai farmaci ma anche nuove funzioni metaboliche. Essendo la coniugazione un sistema anche interspecie, poi, per ogni infezione sarà necessario usare dosi più alte di principio attivo o somministrare antibiotici diversi. Consideriamo, ad esempio, una patologia infettiva (*prima infezione*) che sia stata curata a livello intestinale con degli antibiotici che hanno eliminato la patologia. Sicuramente gli antibiotici hanno anche selezionato dei batteri saprofiti, per es. scleriacori, che sono diventati resistenti a quel antibiotico. La resistenza è un meccanismo di selezione: il microorganismo era già resistente all'antibiotico prima di venire a contatto, perché la resistenza è un fenomeno correlato alla mutazione, semplicemente il trattamento antibiotico seleziona i mutanti resistenti. I batteri saprofiti sopravvissuti all'antibiotico lo sono perché hanno dei plasmidi di resistenza: in molti casi ad una *seconda infezione* non si è più sensibili all'antibiotico, siamo quindi costretti a cambiare cura, oppure a somministrare una dose molto più elevata della precedente, confidando nella scarsa efficienza del processo coniugativo.

In un esperimento volto a chiarire i meccanismi di comparsa delle forme di resistenza due ceppi batterici (A e B) venivano posti in un terreno privo delle sostanze necessarie alla loro proliferazione. Né il ceppo A né il ceppo B erano in grado di proliferare. Ponendo invece entrambi i ceppi nella medesima piastra Petri con una frequenza molto bassa si formavano colonie adattate all'ambiente sfavorevole. Tali colonie si erano potute formare grazie alla casuale **ricombinazione genetica**. Per accertare se tale ricombinazione fosse frutto di un contatto diretto od indiretto i due ceppi furono posti in un contenitore ad U con una membrana semipermeabile che ne impediva il contatto diretto ma permetteva il passaggio di soluti. Si osservò in questo modo che in assenza di contatto diretto fra i batteri non avviene ricombinazione, non essendoci scambio di materiale genetico; si è così dimostrato che solo attraverso il contatto fisico è possibile la ricombinazione. Questo perché la ricombinazione è frutto della coniugazione.

Nell'ambito delle resistenze multiple agli antibiotici (MAR, multiple antibiotic resistance) particolare importanza rivestono da qualche anno a questa parte le MDR (multidrug resistance pumps) ovvero dei plasmidi con geni che codificano per delle proteine che rimuovono attivamente i principi attivi dalle cellule batteriche, fornendo loro resistenza diretta.

Batteri HFR (High Frequency of Recombination)

Gli studi su coniugazione e plasmidi sono stati condotti, per motivi di semplicità manipolativa, principalmente su *E. Coli* ed altri batteri Gram negativi, ed hanno portato ai risultati su fattori di fertilità e capacità di generare pili sopra descritti. In alcuni Gram+, però, si sono trovate tracce di un processo di trasferimento di plasmidi diverso, in quanto pur essendo frequente ed efficiente non porta la popolazione cellulare a diventare tutta F+. Tali batteri sono stati definiti HFR da High Frequency of recombination.

Essi presentano una sequenza plasmidiale, legata al cromosoma batterico. Il plasmide, pertanto, simile ad un episoma, è in grado di staccarsi dal cromosoma batterico e di trasferire anche i geni cromosomiali della cellula donatrice alla ricevente. Successivamente la cellula ricevente integra il genoma ricevuto nel proprio cromosoma, compiendo di fatto una ricombinazione genica che spiega il nome di questa particolare categoria di batteri.

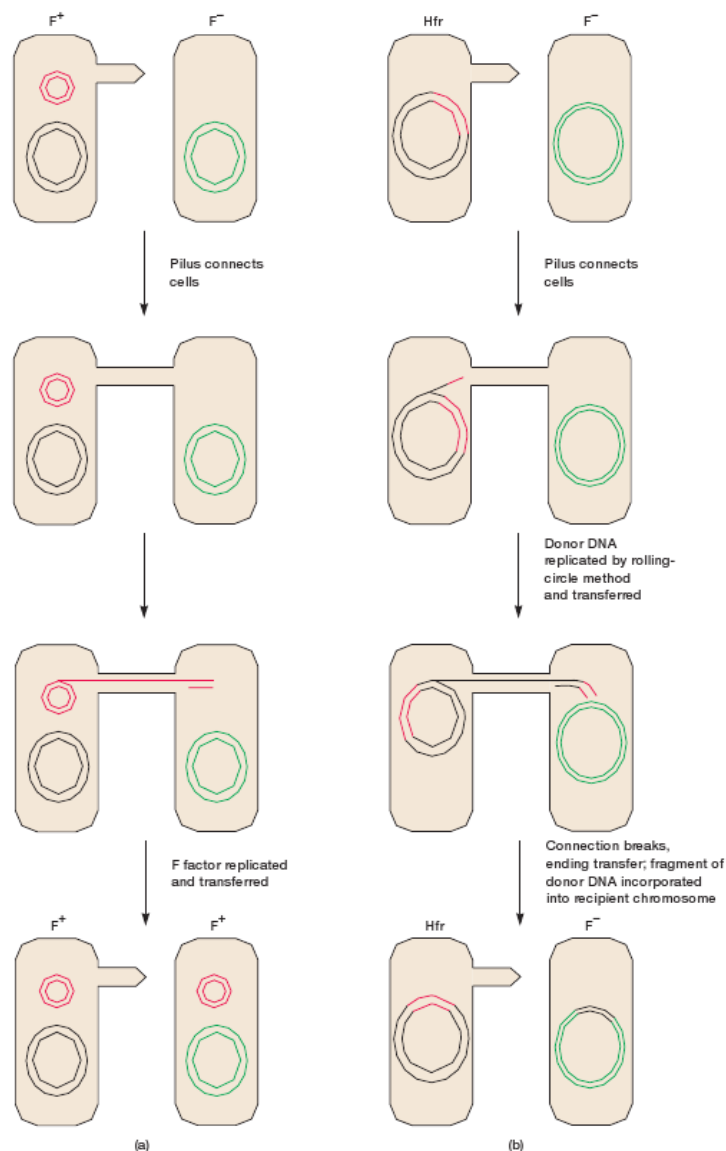


Illustrazione 45: Schema riassuntivo differenze tra HFR e Coniugazione F^+/F^-

Il processo di duplicazione del genoma tramite il pilo è iniziato da un particolare sito di legame della sequenza F del gene HFR donatore, pertanto solo una parte (quella iniziale) dell'operone F HFR è trasmessa alla cellula ricevente la quale non acquisirà le capacità F^+ HFR della donatrice se non in seguito alla trasmissione dell'intero cromosoma al termine del quale c'è la seconda parte, quella finale, dell'operone F della donatrice. Anche qui generalmente la trasmissione si rompe prima che l'intero genoma sia trasferito: per quanto questo sistema possa essere più efficiente, infatti, un cromosoma può contenere molte decine di migliaia di paia di basi. La replicazione del DNA iniziata dal gene F HFR può essere oraria o antioraria a seconda del suo orientamento ed il genoma trasmesso può essere degradato od integrato dalla cellula ricevente. In un caso così complesso un'immagine vale più di mille parole: v. img 45.

Test di resistenza agli antibiotici

Un utile test di laboratorio per verificare eventuali resistenze a farmaci è quello di porre diversi P.A. su un terreno semisolido in cui si è fatto proliferare l'agente patogeno che si intende studiare, e verificare se gli antibiotici sono in grado di generare aloni di inibizione e di che dimensioni. Tanto maggiori saranno le dimensioni dell'alone di inibizione, infatti, tanto minore sarà la concentrazione necessaria ad evitare la proliferazione batterica e quindi la dose di principio attivo da somministrare per debellare la malattia.

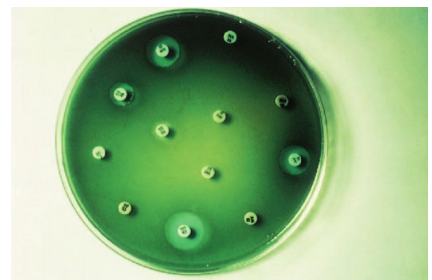


Illustrazione 46: Aloni di inibizione di diversi antibiotici

Per eseguire questo test si coltiva in piastra una colonia, successivamente si appoggia un disco di microcellulosa sterile, capace di trattenere le colonie, che posto in una nuova piastra genererà una replica, ovvero una copia del disco originale con le medesime colonie negli stessi posti. Nella seconda piastra, quindi, si aggiungono dei fattori di inibizione, ad esempio metalli pesanti o antibiotici. Su questo terreno non cresceranno tutte le colonie ma solo quelle con i batteri (mutati) resistenti al fattore inibente. Si può, inoltre, dimostrare come la **resistenza** sia un **fenomeno di selezione** e non sia **indotto** dall'agente inibente prelevando dalla prima piastra le colonie che nella seconda hanno manifestato resistenza, isolandole e verificare che le stesse erano già capaci di sopravvivere prima di 'incontrare' l'agente inibente.

Morfologia batterica

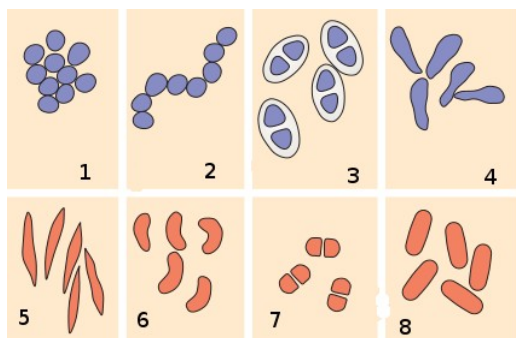


Illustrazione 47: Morfologie batteriche, Colori secondo Gram (+ blu - rosa).

I batteri sono caratterizzati da dimensioni cellulari variabili dagli 0,3 ai 5µm; per osservarli sono necessari, al microscopio ottico ingrandimenti di 500/1000X, vicini ai limiti strumentali. Poiché le strutture batteriche manifestano scarso contrasto nel visibile, poi spesso si ricorre a colorazioni (quali quella di Gram) le quali però possono essere effettuate solo su campioni morti.

In base alla loro forma distinguiamo, infatti:

- **cocchi**, batteri sferici
- **spirilli e vibrioni**, a spirale o piegati
- **bacilli**, con forma allungata

In alcune famiglie batteriche in seguito alla duplicazione cellulare le due cellule restano unite, possono formarsi così complessi di catenelle (img 47, 2) detti **streptococchi**, oppure ammassi irregolari di **stafilococchi** (1), cellule 'doppie' a chicco di caffè (es. *N. Gonorrhoeae*, 7). Tali aggregazioni dipendono dalla reciproca

disposizione dei piani di scissione in duplicazioni successive (paralleli, perpendicolari.. etc)

Queste forme fanno riferimento ai batteri nel loro stato **vegetativo**, ovvero la forma che mantengono quando sono vivi e vegetano.

In alcuni casi, però, possiamo trovare batteri in forma di **spora**, una particolare forma di resistenza adottata da alcuni Gram positivi. Pochi batteri sono in grado di passare dalla forma vegetativa a quella sporale mentre altri come il *B. Antracis*, agente eziologico del carbonchio, contengono regolarmente una spora. Più spesso, però, la spora è la risposta del batterio a condizioni sfavorevoli, quali temperatura non ideale, disidratazione, radiazioni, mancanza di nutrienti, variazioni di pH.



Illustrazione 49: Cocchi, al SEM

Ad esempio l'agente eziologico del tetano, il *C. Tetani*, essendo anaerobio stretto in presenza di ossigeno non può vivere e riprodursi, ma può dar luogo ad una spora che resiste all'ossigeno atmosferico e può tornare in forma vegetativa quando le condizioni ambientali tornano ad essere idonee.

E' importante precisare come la **spora** sia una forma **metabolicamente silente**, non ha, quindi, alcuna attività metabolica, e pertanto non potendo secernere tossine non è

patogena. Poiché le spore possono tornare a dare origine a batteri in forma vegetativa, però, possono essere una forma con cui il batterio è veicolato nell'organismo. Nell'esempio precedente una spora di *C. Tetani* può penetrare nell'organismo in seguito ad una ferita, qualora poi questa si trovi in ambiente privo di aria può diventare nuovamente attiva metabolicamente attiva, quindi secernere tossina e dare origine a patologie. Le spore sono la forma di resistenza dei batteri e possono rimanere attive anche per decenni.



Illustrazione 48: Bacilli, al SEM

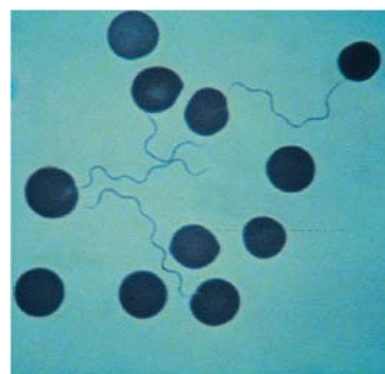


Illustrazione 50: Spirilli, microscopio luce

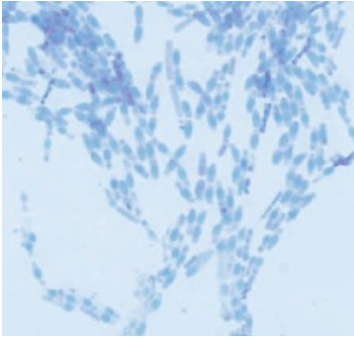


Illustrazione 51: Endospore (verdi) colorante dentro le cellule che le contengono

Le endospore

Le endospore sono forme di resistenza adottate dai batteri in risposta ad agenti sfavorevoli dell'ambiente esterno, in particolare sono tipiche di due famiglie: *Bacilli* e *Clostridii*, anche se possono essere prodotte anche da pochi altri batteri. Le spore hanno una particolare struttura, anidra, che permette loro di resistere efficacemente al calore, alle radiazioni ed alla disidratazione. Se, infatti, si portano batteri a temperature negative, come -10°C , la formazione di cristalli di ghiaccio provoca la lisi cellulare; la spora invece, essendo anidra, può resistere a temperature negative. Essa, però, contiene tutte le informazioni geniche e le strutture necessarie a ripristinare la forma vegetativa del battere. Le spore sono osservabili al microscopio ottico ed elettronico, non trattengono i comuni coloranti pertanto si prestano ad osservazioni in campo scuro oppure possono essere viste per rifrangenza o con coloranti appositi quali il verde malachite⁶. Si stima che le spore possano durare fino a 100 000 anni, ed alcune sono state isolate con ancora capacità vitali dopo 7500 anni.

Nel processo di sporulazione la cellula vegetativa va incontro a lisi ed estrude nell'ambiente l'endospora matura. Quando l'endospora si ritrova in un ambiente favorevole inizia il processo inverso, la germinazione e torna a dare il microorganismo in forma vegetativa metabolicamente attivo.

Sporulazione

Il processo di formazione della spora è noto come sporogenesi o sporulazione.²¹ Esso generalmente inizia quando la crescita cellulare è inibita dalla mancanza di nutrienti. Talvolta si tende ad interpretare la sporulazione come un processo differenziale, analogo in quanto tale a quello delle cellule eucariotiche. Tale chiave di lettura, molto discutibile, sottolinea come punto in comune l'espressione di una sequenza genica prima silente che porta a modificazione conformazionali significative nella cellula che la compie (talora detta 'sporangio').

In realtà durante la sporogenesi, e al contrario di quello che avviene nelle cellule eucariote, una volta che la spora si forma avviene il **silenziamento metabolico totale**. La cellula cessa di avere attività biologica e pertanto non consuma energia.

La sporulazione è un processo che si articola in 7 fasi.

La prima è una normale duplicazione cellulare (I, v. img. 40).

Successivamente si creano due setti che rappresentano l'inizio della formazione della spora (II). I due setti si allungano e alla fine segregano il citoplasma in due compartimenti diversi tra loro, uno sarà quello della cellula vegetativa, l'altro quello sporale.

Successivamente la spora si sviluppa, si addensa all'interno del citoplasma e va incontro ad un processo di calcificazione, cioè in pratica ispessisce la propria struttura esterna con la comparsa della corteccia (IV). Si forma così una cellula batterica contenente costantemente la spora.

I batteri che presentano sempre la spora nel loro citoplasma, come il *C. Tetani*, continueranno a moltiplicare la spora assieme alla cellula anche quando si trovano in condizioni ottimali.

Quando, invece, si verificano condizioni sfavorevoli, il processo di sporogenesi prosegue con la disidratazione della parte interna, e la formazione dell'esosporio, cioè della struttura più esterna (V).

La sporulazione passa ad un ulteriore stadio con ispessimento e deposizione di acido dipicolinico e la formazione degli strati corticali più esterni (VI). Dopo di che la cellula va incontro a lisi (VII), si rompe la parete, si rompe la membrana e la spora viene rilasciata nell'ambiente esterno.

Germinazione

La germinazione e la sporulazione sono ovviamente due eventi indipendenti. I tempi sono notevolmente diversi: il processo di germinazione (passaggio da spora a forma vegetativa) avviene in un tempo relativamente breve, in pratica si tratta del tempo necessario al batterio per dividersi, e consiste da 20 a 60 minuti; perché l'attivazione dei geni presenti nel DNA dato che l'ambiente è favorevole (es. terreno di coltura o per un clostridium un ambiente anaerobio in presenza di siero o di altre proteine) fa sì che si inneschino i processi di traduzione e trascrizione e la formazione della forma vegetativa. Il tempo di un ciclo per formare dalla spora una forma vegetativa è quindi relativamente breve (la spora non si divide ma si trasforma). Poi la forma vegetativa potrà moltiplicarsi e da un clostridium se ne formeranno due, poi quattro e così via sempre secondo il tempo di quella specie microbica.

⁶ Si tratta della colorazione di Schaeffer-Fulton: le spore sono scaldate con verde malachite, un potente colorante capace di penetrarle, successivamente si lavano via il colorante dal resto della cellula (endospore!) e si controcolora safranina. Il risultato in img. 51

Se invece viene innescato il processo inverso, cioè quello di sporulazione per cui dalla forma vegetativa si forma poi la spora, il tempo necessario è estremamente più lungo nel senso che ci vogliono circa 10-12 ore perché si formi la spora. Questo accade perché mentre il processo di germinazione implica solo attivazione di geni, (perché nella spora anche i geni che hanno codificato per la spora sono diventati silenti visto che la spora non ha processo trascrizionale né traduzionale), al contrario la formazione della forma vegetativa deve silenziare i 200 geni della spora e deve attivare tutti gli altri geni che sono necessari per la moltiplicazione dei batteri. Quindi il tempo necessario per dare luogo a ciò è molto più lungo, nel senso che devono essere repressi un numero elevato di geni e attivati un altro numero di geni. Il processo è quindi più complicato, per cui il primo ciclo della germinazione ci mette più tempo mentre ce ne metterà di meno nella fase successiva della moltiplicazione.

Struttura e contenuto

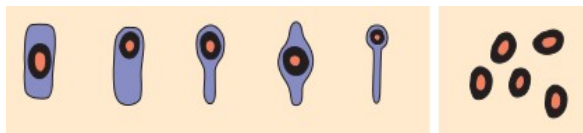


Illustrazione 52: Endospore, diverse disposizioni e spore libere

Le spore mature hanno forma generalmente sferica, al più ovoidale, la cui posizione all'interno della cellula può essere sfruttata a fini tassonomici. Ad esempio nel caso del *C. Tetani*, agente eziologico del tetano, la spora in posizione terminale conferisce alla cellula una particolare morfologia detta plettridio.

Una spora è formata per il 15% del suo peso secco da acido dipicolinico (v. struttura img. 53) complessato con ioni calcio, elemento a lungo sospettato di essere la causa delle particolari proprietà di resistenza della spora. Indubbiamente il calcio svolge un ruolo importante nella difesa da ossidazioni e disidratazione, recentemente, però, sono state scoperte piccole proteine sporali capaci di legare il DNA e prevenire la sua degenerazione in seguito ad insulti chimici e radiazioni. Inoltre enzimi capaci di riparare danni al DNA ed altri fattori incrementano ulteriormente la probabilità che la spora possa resistere a sistemi di sterilizzazione non estremi.

Poiché il fine ultimo della spora è ripristinare la normale vita vegetativa del battere, poi, essa dovrà contenere tutte le strutture necessarie a tale scopo, ovvero conterrà un corredo genico completo, il DNA, le indispensabili strutture proteosintetiche, i ribosomi, t-RNA e tracce di acqua.

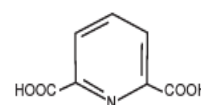


Illustrazione 53: pyridine-2,6-dicarboxylic acid

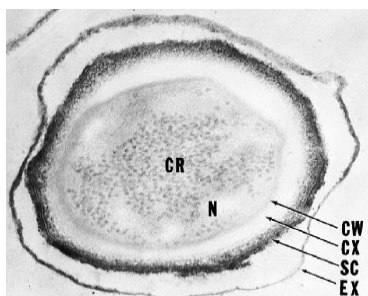


Illustrazione 54: Struttura interna spora

Un'osservazione al microscopio elettronico evidenzia 5 diverse componenti in una spora, che dall'esterno all'interno sono:

1. **esosporio** (EX, Exosporium), sottile e delicato
2. **mantello** (SC, Spore Coat), di natura proteica è impermeabile. Spesso tra esosporio e mantello c'è uno spazio virtuale, come nell'immagine
3. **corteccia** (CX, Cortex), formata da peptidoglicani può occupare fino a metà del volume della spora. E' una componente specifica delle spore
4. **parete del core** (CW, Core Wall), di fatto una membrana cellulare che circonda il core
5. **core** (CR), analogo a quello batterico con DNA e ribosomi

Proprietà strutturali

I diversi strati che compongono la spora svolgono un'azione protettiva verso diversi tipi di aggressione.

L'**esosporio**, la parte a contatto con l'ambiente esterno, protegge dalle radiazioni UV, ionizzanti.

Il mantello difende invece dalle radiazioni cosmiche gamma, a minor energia.

La **parete** e lo strato **peptidoglicanico** hanno funzione meccanica e permettono alla spora di resistere a pressioni anche molto elevate.

La **corteccia**, infine, conferisce alla spora resistenza al calore. Questo dato è importante in quanto fa sì che spore di batteri patogeni, quali il *C. Tetani*, possano contaminare l'acqua o altre sostanze senza essere distrutti da comuni procedure di sterilizzazione, come una semplice bollitura. La temperatura minima di sterilizzazione con acqua, infatti, è di 120°C, raggiungibile per ovvi motivi solo in autoclavi. (In particolare le autoclavi in ambienti di produzione raggiungono i 136° e pressioni interne di 3-4 atm.)

Patogenicità batterica

I meccanismi di patogenicità rappresentano tutte quelle **funzioni** che una **cellula** batterica **utilizza** o mette in atto **per causare virulenza**, ovvero malattia, intesa qui come un'alterazione dello stato di salute. Tale patogenicità può essere

provocata direttamente da sostanze tossiche (tossine) secrete dal batterio oppure può essere data da particolari strutture batteriche tossiche per l'uomo.

E' importante osservare come vi siano anche diversi fattori non direttamente implicati nel causare virulenza ma che sono indispensabili per far sì che il microorganismo possa essere patogeno quali la sua capacità di aderire a particolari substrati. L'adesione di per sé non è un fattore di patogenicità ma lo diventa quando è condizione affinché il batterio possa rilasciare una tossina in situ. Ad es. lo *S. mutans* è capace di aderire molto tenacemente a superfici lisce anche resistenti, come lo smalto dei denti, la capacità adesiva è un fattore di patogenicità in quanto gli permette di rimanere adeso allo smalto dei denti, metabolizzare gli zuccheri trasformandoli in acidi che corrodono la dentina ed iniziano una carie dentaria. Discorso analogo a quello per le proprietà adesive vale per la capacità di muoversi, di trasferirsi da un organo ad un altro organo o di strutture che aiutano a sfuggire al controllo immunologico.

Riguardo ai substrati sui quali si manifesta l'infezione, prima ed imprescindibile passo di ogni processo patogenetico, le mucose sono i tessuti più esposti all'attacco batterico. La cute, al contrario, offre buona resistenza alle infezioni, a meno di traumi che ne creino soluzioni di continuità, in quanto protetta dallo strato epidermico cheratinizzato e dalla competizione tra patogeni e la flora saprofita (fattore valido, questo, anche per la flora batterica intestinale). Poiché la flora microbica saprofita è una componente positiva per la protezione, essa deve essere preservata: in alcuni casi l'uso di detergenti troppo aggressivi o usati in dosi eccessive può modificare il pH del substrato nel quale vivono ed aprire la strada alle infezioni. E' questo il caso di taluni detergenti intimi i quali, in caso di abuso, possono eliminare la flora microbica vaginale e variarne il pH. La modificazione del pH non è dovuta al detergente ma è il detergente che rimuovendo la flora microbica la quale crea un ambiente acido in situ, apre la strada ad una situazione di neutralità che diventa favorevole per altri microrganismi.

L'invasività

L'invasività è un concetto diverso ed avulso dalla patogenicità: un batterio altamente invasivo può essere non patogeno per l'uomo mentre ci sono batteri altamente patogeni ma debolmente invasivi. L'invasività, in ogni caso, è prerequisite imprescindibile per ogni velleità patogenica.

Ad. esempio il *C. Tetani* è poco invasivo ma la sua tossina è estremamente tossica, al contrario la tbc è molto invasiva ma poco tossica

Per invasività, nel caso dei **batteri**, si indica la capacità del microorganismo di **penetrare nel corpo** umano, mentre per quanto riguarda i **virus** l'invasività prevede anche l'**invasione cellulare**. Il concetto di invasività per i virus, quindi, è più sottile in quanto potremmo avere dei virus a livello intestinale ma se questi non penetrano nelle cellule enteriche, ovvero qualora non vi sia invasività, non si potrà generare alcun processo patogenico, mentre la presenza di un batterio, ad es. l'agente eziologico della salmonellosi, nello stesso ambiente può secernere tossine capaci di generare patogenicità anche senza mai entrare nelle cellule umane. La possibilità di un contagio extracellulare da parte delle patologie batteriche giustifica la diversa definizione di invasività tra virus e batteri.

La tossicità o virulenza

Come detto la patogenicità è il risultato di invasività e tossicità. La tossicità o virulenza, infatti, è variabile ed è dovuta a diversi fattori tossine più o meno potenti, più o meno specifiche, alle caratteristiche dell'ospite etc..

Un parametro quantitativamente valido per appurare la tossicità di un microorganismo è l'LD50 (letal dose 50). Esso è dato dalla concentrazione di microorganismi necessaria per provocare la morte nel 50% delle cavie a cui è stato somministrato il patogeno. Una versione migliorata dell'LD50 è l>ID50 (infecture dose) che considera solo il numero di microorganismi vivi.

I meccanismi di patogenicità seguono quindi varie strade, varie tappe che consistono prima di tutto nell'esposizione al microorganismo patogeno, nel senso che se l'individuo non va incontro al microorganismo patogeno non avrà mai una patologia infettiva; per la patologia infettiva ci vuole un microorganismo che possa penetrare e che sia patogeno. Tanto è vero che persone che hanno difetti immunologici sopravvivono se vengono mantenuti in ambienti sterili.

Dopo di che anche l'esposizione al microorganismo può non essere sufficiente, all'esposizione ci vuole l'adesione da parte del microorganismo alla cute, alle mucose, all'apparato respiratorio oppure deve essere introdotto nel nostro organismo. Da questo punto di vista la via principale di infezione è rappresentata dalle mucose dell'apparato respiratorio, enterico, oro-genitale e le mucose oculari. Le mucose di una persona messe tutte insieme hanno una superficie superiore a quella di un campo da calcio, per cui è ovvio che i microorganismi hanno un'ampia porta d'entrata a livello mucosale, anche se in generale le mucose sono protette.

Una volta che il microorganismo è entrato, esso deve attuare un processo invasivo cioè si deve diffondere nell'epitelio o una volta che è passato dall'epitelio deve diffondersi negli strati sottostanti, entrare in circolo e dar luogo ad una batteriemia. La batteriemia o passaggio del microorganismo nel sangue, permette al microorganismo di diffondersi a tutti gli organi che sono irrorati. Ma in molti casi questo non avviene, per cui la diffusione del microorganismo non è una condizione essenziale per la patogenicità. È importante che un certo distretto venga colonizzato, non solo poi, ma che il microorganismo sia in grado di moltiplicarsi; questo è un punto che è stato a lungo dibattuto, cioè un microorganismo può

dare patogenicità anche se non si moltiplica? l'introduzione di un numero adeguato di microrganismi patogeni che per qualche ragione non si moltiplicano ma sono vivi e metabolicamente attivi può dare patologia? La risposta è sì, nel senso che non è necessario che un microrganismo si moltiplichi perché dia patologia ma è necessario che il microrganismo sia metabolicamente attivo; questo è perciò un punto importante anche se nella stragrande maggioranza dei casi il microrganismo patogeno penetra e si moltiplica nell'ospite, tanto è vero che in molti casi è l'ospite stesso che trasmette il microrganismo agli altri esseri viventi. Gli stadi sono quindi colonizzazione, crescita e patogenicità, la quale può essere espressa attraverso l'invasione fisica del tessuto con conseguente distruzione delle cellule oppure può essere dovuta al fatto che il microrganismo non invade le cellule però secerne sostanze tossiche che poi vanno in circolo.

Un punto importante è rappresentato dalla capacità invasiva, che accompagnata dalla crescita microbica permette che il microrganismo possa infettare di nuovo lo stesso individuo, e iniziare pertanto un ciclo che può portare l'individuo alla morte. È anche possibile che il microrganismo rimanga in situ e attraverso la sintesi di sostanze tossiche che rimangono in situ o che vengono trasportate a livello sistemico generalizzato danneggi alcuni tessuti; oppure il danno non è sempre obbligatorio, è sufficiente in alcuni casi l'atto della funzione (nel caso del tetano, della tossina botulinica, della tossina difterica non abbiamo un danno tissutale ma abbiamo un blocco della funzione di quelle cellule, ed è ciò che causa patogenicità).

Fattori di virulenza

Possono essere vari; schematicamente prendendo in considerazione il batterio Gram negativo come la salmonella (agente del tifo addominale) noi possiamo osservare che ci sono fattori di virulenza collegati con la struttura del microrganismo o fattori di virulenza legati a fattori genetici del microrganismo. Per es. sappiamo che in alcuni casi la virulenza, cioè l'attività tossica, è il risultato dell'attivazione, dell'espressione di geni che sono stati introdotti nel batterio da agenti estranei; sono geni che non appartengono al genoma del batterio ma che sono stati introdotti nel batterio con vari mezzi (per es. attraverso un processo coniugativo con un altro batterio). Questo è il caso del batterio difterico dove il gene che codifica per la tossina difterica è stato introdotto nel batterio della difterite trasportato da un fago (cioè il fago ha trasportato all'interno del batterio difterico il gene che codifica per la tossina difterica). In altri casi è invece un batterio che ha un gene tossico e che attraverso un plasmide in un processo coniugativo trasferisce il gene che codifica per la tossina da un batterio ad un altro batterio il quale sarà in grado a questo punto di sintetizzare la sostanza tossica; per cui fattori genetici regalati ad un batterio o situati nel genoma attraverso plasmidi che vengono detti plasmidi di virulenza, perché contengono geni che codificano per sostanze tossiche.

Nei batteri Gram -, come le salmonella, una componente tossica è data dal liposaccaride parietale cioè da una componente della parete del batterio stesso, indicata con LPS, è che si identifica come endotossina cioè una tossina correlata con la struttura del batterio stesso.

È intuitivo che nel caso di una endotossina l'attività patogena verrà espressa soprattutto quando il batterio va incontro a lisi, il batterio si rompe e le sostanze endotossiche vengono rilasciate per es. nel torrente circolatorio. Questa è la ragione per la quale in alcuni casi, l'utilizzo massiccio di antibiotici può essere più dannoso che non l'utilizzo di quantità limitate; l'uccisione di una quantità estremamente elevata di batteri Gram - può portare alla lisi di questi batteri e al rilascio di quantità rilevanti di endotossina.

Le endotossine hanno una capacità tossica nettamente inferiore alle esotossine, che non hanno un effetto organospecifico ma che è un effetto più generalizzato, per es. febbre, rallentamento delle pulsazioni ecc. non ci sono solo endotossine, ma anche tossine che vengono secrete come esotossine per es. le salmonelle che strutturalmente sono esotossine hanno geni che codificano per tossine che vengono secrete per es. la salmonella rilascia nell'intestino una tossina che viene chiamata enterotossina ed è la causa della diarrea tipica del tifo.

Sappiamo che però le salmonelle devono rimanere nell'intestino per cui se venissero eliminate con le feci la malattia non si presenterebbe; perciò il fattore di adesione come le *fimbrie di tipo 1* o *P* sono anch'essi correlati col fattore virulenza perché permettono l'adesione del microrganismo alle mucose intestinali.

Esistono altre tossine correlate alla superficie come le citossine e per es. l'antigene O-ossomatico e il flagello; queste due componenti, l'antigene o-ossomatico e l'antigene di virulenza detto anche antigene h-flagellare, sono anch'essi importanti perché l'antigene o-ossomatico ha la capacità di "rendere invisibile" la salmonella alle cellule incaricate di eliminare i microrganismi estranei cioè le cellule macrofaghe; ha la capacità di impedire che venga fagocitato e distrutto dai macrofagi che regolarmente accorrono in qualsiasi posto ci sia un processo infiammatorio o infettivo.

In modo simile, la flagellina componente del flagello sono in grado di evocare una risposta immune molto potente ma anche di inibire il processo di fagocitosi; per cui numerose componenti secrete (le enterotossine) e strutturali cooperano per conferire virulenza.

Nel caso dell'*escherichia coli*, batterio presente nell'intestino e che finché vi rimane non è patogeno, la componente patogena è rappresentata dalla capsula per es., tanto è vero che le infezioni da *escherichia coli* sono le più temute durante le operazioni intestinali, perché l'intestino è pieno di microrganismi, pieno di *escherichia coli* che se per caso fuoriescono dall'intestino e vanno in circolo o si localizzano fuori dall'intestino ma in ogni caso all'interno del nostro corpo possono dar luogo a patologie. Nel caso delle *fimbrie di tipo 2* (quelle di adesione) e dell'*escherichia coli* sono

anch'esse correlati con la patogenicità, poi i flagelli di cui abbiamo parlato; i pili sia quelli comuni che quelli sessuali che hanno la capacità di trasferire dei geni che sono correlati con la patologia.

Il tropismo

Un ulteriore fattore chiave nella potenziale patogenicità dei microorganismi è dato dal loro tropismo. Ad esempio se ingerisco una dose adeguata di cibo contaminato con il vibrione del colera contrarrò la malattia, mentre inoculando la stessa carica microbica in intramuscolo in un soggetto suscettibile non succederà nulla. Questo perché, come detto, per poter dare patogenicità i batteri devono legarsi ai recettori cellulari, ed essi possono essere specifici ovvero essere espressi solo da un certo tipo di tessuto. Ad esempio le salmonelle (agenti eziologici del tifo addominale) danno patogenicità solo sulle cellule epiteliali intestinali, mentre la *N. gonorrhoeae* agisce solo a livello dell'apparato urogenitale (il che ne giustifica il meccanismo di trasmissione sessuale). Analogamente la difterite si trasmette tramite droplets in quanto patologia dell'apparato respiratorio, ancora più particolare l'HIV che richiede come substrato replicativo i linfociti T CD4 positivi. Infine il plasmodio che trasmette la malaria ha come target gli eritrociti.

Come detto tale specificità tissutale è dovuta alla presenza su queste o quelle cellule dei recettori necessari per l'infezione, talvolta però la patogenicità può essere esplicata in un substrato cellulare diverso da quello infettato, è il caso del virus poliomielitico, una patologia orofecale, che viene introdotto nell'organismo nell'orofaringe e si localizza a dare la patologia a livello intestinale. Quello che ne deriva, però, non è una patologia enterica, come sarebbe lecito supporre, ma si ha paralisi infantile in quanto in seguito a viremia (ovvero invadendo il sangue) il virus va a colpire i neuroni motori. Esso quindi si moltiplica a livello intestinale perché quello è il suo tropismo, ma colpisce cellule del SNP. Quindi **spesso la patologia è correlata con il tropismo, ma non sempre.**

Fattori di tropismo aspecifici

Esistono poi diversi meccanismi aspecifici che giustificano trofismi particolari, ad esempio virus, come il coronavirus che causa il raffreddore, che si moltiplicano efficacemente solo a temperature di 31-32°C infetteranno le mucose nasali non tanto per la presenza di recettori diversi tra cellule epiteliali respiratorie tra cavità nasali e, ad es. orofaringe, quanto piuttosto perché solo nelle mucose nasali sono presenti quelle condizioni fisiche (nel nostro caso una temperatura più bassa di quella corporea) idonee a permetterne la riproduzione.

Tali fattori aspecifici comprendono, come detto:

- la **temperatura** delle cellule ospiti
- il **pH**, ad esempio l'acidità del pH epidermico non inibisce la flora saprofita ma evita altre infezioni. Oppure l'acidità dello stomaco che contribuisce a eliminare molte salmonelle (le quali, infatti, hanno più probabilità di dare patologia se veicolate con acqua piuttosto che con cibi solidi che stimolano la produzione di HCl)
- presenza di **nutrienti**, come nel caso della brucellosi su donne gravide le quali secernono estradiolo utile nutriente per le cellule batteriche
- presenza di **metalli**, come il ferro che favorisce le infezioni da plasmodi

Per quanto riguarda i meccanismi di patogenicità nei **batteri**, pertanto, ricordiamo:

- **fattori di virulenza extracellulari**,
- tossine: **endo** ed **esotossine**, sono il principale meccanismo attraverso cui i batteri esplicano le loro potenzialità patogeniche, endotossine se fanno parte della struttura microbica (LPS dei G-) o esotossine se sono prodotti secreti.

I meccanismi di patogenicità virali, invece, contemplan:

- effetto **diretto**
- effetto **citotossico**
- effetto **citocida**
- effetto **trasformante**

Le Tossine

Le tossine batteriche sono di due tipi: endotossine ed esotossine, diverse tra loro per dimensione, struttura fisica, specificità etc.

Endotossine

Le endotossine hanno struttura lipopolisaccaridica (sono l'**LPS** dell'outer membrane dei Gram negativi!), ovvero sono glicolipoproteine, formate da **proteine**, **zuccheri** ed il **lipide A**. A causa delle loro dimensioni non possono attraversare la membrana cellulare (800-900kDa!) ma hanno una blanda azione tossica non specifica in quanto stimolano la cascata

infiammatoria (cfr. Patologia, agiscono su monociti e macrofagi stimolando la produzione di interleuchine e TNF). La loro tossicità, pertanto, è bassa e danno **sintomatologie** generiche a **livello sistemico** (sono **pirogene** e danno rialzo febbrile, sudorazione, spossatezza, dolori articolari, difficoltà respiratorie ecc) e non d'organo. A causa della loro prevalente componente lipidica e zuccherina sono **scarsamente antigeniche** (inutile sviluppare vaccini perché comunque sarebbero poco efficaci).

Per individuare le endotossine è stato sviluppato un test, il test di lisi dell'amebociti di **Linulus (LAL – Limulus Amabocyte Lysate)**. Tale test si basa sull'osservazione che quando un endotossina viene in contatto con amebociti (delle cellule circolanti) di limulus (un pesce) si crea un gel, in quanto l'LPS attiva un enzima di questi amebociti che in seguito a diversi passaggi provoca la coagulazione di componenti insolubili. Si tratta di un test con sensibilità nella scala dei nanogrammi (c'è in un quiz... -.-").

Le esotossine quindi:

- sono **termostabili** grazie alla loro composizione lipidica;
- sono **tossiche** solo **in dosi massicce**, (mg/Kg peso);
- sono **scarsamente immunogeniche**;
- sono **simili tra loro**;
- danno **effetti sistemici** (pirogene, shock, coagulazione, diarrea infiammazioni);

Esotossine

Per le esotossine il discorso è completamente diverso: sono:

- molecole **piccole** (peso molecolare 40k - 70k Da), generalmente sono **proteine** talvolta enzimi, solubili, capaci di attraversare le membrane citoplasmatiche. Talvolta possono migrare dal sito di sintesi e svolgere la loro azione su diversi distretti cellulari.
- sintetizzate da batteri specifici anche in seguito ad acquisizione di plasmidi o infezioni con batteriofagi recanti i geni per la loro sintesi
- **Termolabili**; essendo proteine si denaturano tra 60 e 80° C
- Tra le sostanze più **tossiche** note (es. tossina botulinica, estremamente tossica)
- Associate a **specifiche patologie** e con meccanismi d'azione specifici (anche cellulospecifiche)
- **Altamente antigeniche**, stimolano la produzione di anticorpi detti **antitossine**
- **Facilmente inattivabili** con formaldeide, iodio o altro a dare le **anatotossine** (anglicismo: tossoidi)
- Incapaci di dare febbre direttamente
- Spesso hanno il nome della patologia che causano (antracica, difterica, botulinica, pertosse etc)

Ad es. se la tossina tetanica raggiunge la giunzione neuromuscolare vi si lega irreversibilmente in modo altamente specifico, bloccando il rilascio di glicina. La tossina botulinica, invece, blocca il rilascio di acetilcolina, la tossina difterica promuove il trasferimento di ADPR, quella colerica stimola la sintesi di cAMP.

Grazie alla loro antigenicità possono essere sviluppati vaccini per la profilassi da esotossine, sfruttando delle tossine inattivate chimico-fisicamente, le cosiddette anatotossine che però mantengono l'antigenicità.

<i>Confronto tossine</i>	Esotossine	Endotossine
COMPOSIZIONE	Proteine, generalmente 2 componenti (A e B)	LPS di outer membrane, la parte tossica è il lipide A
ESEMPI	Botulinica, difterica, tetanica	Infezioni da Gram negativi
EFFETTO	Altamente variabile in base alla tossina	Simile per tutte le endotossine
FEBBRE	Generalmente assente	Pirogeniche
GENETICA	Spesso codificate da geni extracromosomiali	Sintesi diretta da geni cromosomiali
RESISTENZA AL CALORE	Generalmente termolabili, inattivate a 60-80°C	Termostabili
RISPOSTA IMMUNE	Antitossine conferiscono immunità, altamente antigeniche	Pochi anticorpi prodotti, scarsa antigenicità

<i>Confronto tossine</i>	Esotossine	Endotossine
ORIGINE	Escrete extracellularmente	Parte della outer membrae
PRODOTTE DA	Sia G+ che G-	Solo G-
TOSSICITÀ	Altamente tossiche, talvolta fatali (anche a basse concentrazione)	Moderatamente tossica
ANATOSSINE	Sfruttate per immunizzazione	Assenti

Caratteristiche chimico-fisiche

Le esotossine, invece, dovendo essere secrete, devono passare attraverso la membrana cellulare pertanto il PM è inferiore (intorno al 40000-60000 dalton) e sono formate da proteine pure, sono quindi sensibili al calore: riscaldandole a temperature elevate o associando il riscaldamento ad un blando trattamento chimico possiamo inattivarle. Invece, essendo le endotossine glicolipoproteine, in cui la componente proteica è associata a quella lipidica e glucidica, sono stabili al calore tanto che l'ebollizione è spesso insufficiente ad eliminare l'attività tossica e inoltre sono difficilmente riconosciute dal sistema immunitario.

Sintomi

Le esotossine hanno attività specifica, altamente specializzata per i tessuti o cellule: sono in grado di colpire alcuni organi lasciando altri attivi.

Le endotossine portano una sintomatologia più generalizzata: febbre, diarrea, vomito, dolori articolari, shock. Hanno un'attività ampia e che non si esplica in un distretto ben definito.

Tossicità

Le esotossine sono spesso letali mentre le endotossine lo sono raramente. Si ha un diverso grado di sensibilità a seconda del corredo genetico (e a seconda dalle specie) perché i recettori di cui si servono le tossine possono essere espressi in alcune specie e non in altre.

Immunogenicità

Le esotossine possono essere inattivate a scopo vaccinale, cioè possiamo detossificarle mantenendone però l'immunogenicità che è elevata essendo strutture proteiche. Le anatoxine sono quindi capaci di stimolare la produzione di anticorpi efficaci anche sulle tossine. Una tossina evoca anticorpi in modo proporzionale al suo PM, alla sua lunghezza e ad altri fattori come la sua struttura secondaria o terziaria. Gli anticorpi neutralizzanti, neutralizzando la tossina, ne combattono la patogenicità. Per alcune patologie si ha un'eredità immunogenica perenne, per altre duratura, per altre nulla: questo dipende dal fatto che alcune malattie lasciano una memoria immunitaria.

Le endotossine, invece, sono pessimi immunogeni a causa della loro composizione.

Potenziale Tossico

Quando utilizziamo una esotossina detossificata per vaccinare, questa viene definita anatoxina (o tossoide dall'inglese toxoid). Se si utilizza come vaccino questa tossina, essa evocherà una risposta innunitaria che, se è di tipo protettivo, sarà umorale o cellulare cioè da parte di anticorpi o cellule del sistema immunitario definite antitossine. Il potenziale tossico è il potenziale di neutralizzazione della tossina che la rende utilizzabile per il vaccino. Bisogna che la anatoxina sia il più possibile simile alla tossina originale, per cui bisogna mantenere la struttura immunogenica della tossina togliendole selettivamente la tossicità. A questo scopo si può riscaldarle in modo blando e trattarle con aldeidi. Ciò è ovviamente valido solo per le esotossine.

Potenziale Pirogeno

Le endotossine sono capaci di far aumentare la temperatura corporea per la loro attività selettiva al centro della termoregolazione dei vertebrati. Hanno quindi attività piretica. Le esotossine non producono febbre nella misura in cui non agiscono direttamente sul centro di termoregolazione.

Esempi di esotossine

Ci sono due gruppi molto numerosi di microrganismi produttori di esotossine: stafilococchi e streptococchi.

Alcuni possono causare la scarlattina (*streptococcus pyogenes*) o lo shock anafilattico (*streptococcus aureus*).

Esempi di endotossine

Le endotossine sono liberate dalla lisi dei batteri G- (poiché sono parte della loro membrana) per cui il rialzo febbrile è, a volte, il risultato di un trattamento antibiotico che, portano alla lisi dei batteri enterici, nel libera i componenti della parete tra cui l'LPS. In condizioni normali la lisi è parziale e vengono liberate solo piccole quantità di tossine.

Meccanismo D'Azione

Esistono tre possibili meccanismi d'azione per le esotossine:

1. **Esotossine AB**, formate da due componenti subito assemblati in seguito all'esocitosi: componente A e B (light e heavy: componente leggera e componente pesante), di queste una (la A) è tossica (la vera tossina), l'altra riconosce e si lega al recettore o al bersaglio, è in pratica un antirecettore (B). Nessuna delle due componenti è, per se, tossica in quanto A non riesce ad esplicare la propria potenzialità patogenica senza B e B può legarsi al

recettore ma senza conseguenze. Solo il complesso A+B, quindi, è in grado di esprimere tossicità. Il complesso AB stabilizzato da ponti disolfuro;

2. **Esotossine specifiche al sito di legame**, tra cui neurotossine (tetano, botulino), enterotossine (colera), e citotossine (difterite)
3. **Esotossine membrana-lisanti**, es emolisine

Tossina tetanica

L'esotossina del *C. Tetani*, ha un PM di 150k Da. Dal punto della ferita, dopo che il microbo ha germinato, va in circolo fino a trovare il bersaglio: la giunzione neuromuscolare. Non ha attività biologica altrove. La tossina tetanica è detta **tetanospasmina** perché causa lo spasmo dei muscoli volontari, inibendo l'azione dei neurotrasmettitori inibitori a livello della terminazione postsinaptica. Il legame tra la tossina e il bersaglio è irreversibile: una volta sopraggiunto il tetano è difficile salvare il paziente, ma se la diagnosi è precoce si può trattare per via endovena con il siero antitetanico. Il siero antitetanico è costituito da antitossine (anticorpi contro la tossina) che si legano alla tossina se questa non ha ancora raggiunto il proprio target.

All'inizio vengono colpiti i muscoli del collo, del dorso e delle gambe, per cui la persona, incosciente a causa del rialzo febbrile, prende una posizione chiamata epistotomo, cioè una posizione curvata a ponte. La morte sopravviene in quanto vengono bloccati anche i muscoli coinvolti nella respirazione.

Tossina Botulinica

Nel caso della tossina botulinica, che nella stragrande maggioranza dei casi è una tossi-infezione alimentare, si ha il rilascio di una tossina di 150k Da, formata da due subunità che si legano alla presinapsi: il risultato è l'inibizione del rilascio di delle vescicole di acetilcolina. Ciò causa una paralisi flaccida, che quando arriva a colpire i muscoli respiratori provoca la morte.

La tossina viene utilizzata a scopo estetico per spianare le rughe, causando il blocco dei muscoli mimici facciali.

Tossina Colerica

Data da batteri gram negativi, ha un PM di 82k Da. Il meccanismo d'azione è più complesso. E' una tossina bicomponente formata da una componente A tossica e una B che riconosce il recettore gangliosidico a livello delle cellule intestinali. La tossina è costituita da 5 subunità B disposte attorno a due subunità: una A1 e una A2. Le due subunità A sono tossiche e cooperano all'effetto patologico quando vengono interiorizzate: A1 aumenta l'attività adenilciclasica, attività che porta alla perdita di H₂O, Na⁺, Cl⁻, K⁺, HCO₃⁻. Si ha, quindi, la fuoriuscita dei liquidi dalle cellule: questo causa diarrea profusa, shock elettrolitico e, se non curato, morte dell'individuo per acidosi.

Tossina Difterica

La tossina ha peso molecolare di 62k Da al quale la componente tossica A contribuisce per 21k Da, per cui la B è maggioritaria. Il recettore si trova sulle cellule mucose dell'apparato respiratorio (dall'orofaringe fino ai polmoni). Il legame del recettore con la subunità B causa l'endocitosi per cui ambedue le componenti A e B vengono interiorizzate. Poi solo A sfugge dalla vescicola e diffonde nel citoplasma andandosi a localizzare nel sistema protosintetico dove si lega ai fattori di allungamento della catena polipeptidica, inibendoli. Il risultato è la cessazione dell'attività proteosintetica e, di conseguenza, la morte cellulare.

La risposta immunocompetente

Le esotossine, dopo la detossificazione, possono essere utilizzate come vaccino. Tutti i vaccini hanno come funzione preventiva per cui vanno somministrati quando la persona è vergine dal punto di vista immunitario, quindi è meglio da bambini o, comunque, il più presto possibile. Quindi la persona deve essere sana perché la risposta immunocompetente è tanto più efficace quanto più la persona sta bene.

Il miglior vaccino è quello che mima l'infezione naturale, tanto che i migliori vaccini sono quelli costituiti da microrganismi vivi ma attenuati, per cui, le tossine detossificate non sono buoni vaccini con l'eccezione della tossina tetanica.

Il vaccino per il tetano è somministrato in età giovanile e andrebbe rifatto dopo 10 anni, se questo non succede, quando ci si ferisce, si viene trattati per via endovenosa con il siero antitetanico. Si inoculano, quindi, degli anticorpi contro la tossina provenienti da un donatore di sangue vaccinato contro il tetano. Il siero è la parte liquida del sangue senza fattori di coagulazione contenente gli anticorpi contro la tossina tetanica che sono in grado di riconoscere la tossina e neutralizzarla prima che essa si leghi al recettore. Il siero ha attività preventiva.

C'è un rapporto stechiometrico preciso tra anticorpi e tossine: ogni anticorpo lega minimo due tossine. Questo dipende dal tipo di anticorpo: le IGG (immunoglobuline G) ne legano due, mentre le IGM (immunoglobuline M), essendo

formate da 5 monomeri di IGG, ne legano 10. IGG e IGM vengono prodotte dalla stessa cellula: prima le IGM perché legano e neutralizzano il grosso delle tossine, poi le IGG perché neutralizzano le tossine nei posti più reconditi, dove le IGM non arrivano. Dopo aver combattuto l'infezione, le cellule che producono anticorpi muoiono perché non c'è più necessità, rimane però la memoria immunitaria che permette una risposta più veloce qualora si ripresenti la stessa tossina o lo stesso antigene.

Nessun vaccino è in grado di bloccare l'infezione: anche se siamo vaccinati, verremo infettati perché il vaccino evita solo l'insorgere della malattia, del quadro clinico. I vaccini che possono proteggere dall'infezione vengono chiamati sterilizzanti, ma non esistono ancora anche se si stanno cercando di produrre per malattie come l'AIDS.

Il sistema immune è fatto allo scopo di mantenere la propria integrità genetica. Per riconoscere il self e il not-self come, ad esempio, le cellule di un altro individuo nel caso di trapianti. Infatti in casi del genere bisogna abbassare la difesa immunitaria per bloccare il rigetto causato dal fatto che tutte le nostre cellule sono "marchiate" da molecole MHC (major histocompatibility complex) uguali tra loro, ma diverse per ogni individuo, ad eccezione dei gemelli omozigoti.

Esiste una popolazione di cellule, scoperte dal giapponese Torigawa, che non hanno corredo genetico uguale a tutte le altre: le cellule.....(suspance: lo dice durante la prossima lezione)

Risposta Immune

Immunologia: introduzione

Le plasmacellule (cellule B differenziate) derivano dalla maturazione di un precursore linfoide poi, una volta riconosciuto l'antigene in modo specifico si sviluppano in plasmacellule. Per produrre un anticorpo devono, però, subire un riarrangiamento genico e ciò coinvolge alcuni geni che costituiscono le immunoglobuline.

Le immunoglobuline (globulina in grado di dare risposta immune) sono gli anticorpi prodotti da un unico tipo di cellule: le plasmacellule che derivano dalle cellule B. Ogni plasmacellula sintetizza un solo tipo di anticorpo.

L'antigene è costituito da una porzione di proteina minima di 7 amminoacidi (possono essere anche di più); al di sotto non è in grado di essere riconosciuto. Gli antigeni si possono dividere in:

- *antigeni lineari*: riconosciuti in base alla loro sequenza amminoacidica;
- *antigeni conformazionali*: riconosciuti in base alla conformazione tridimensionale assunta.

Di conseguenza esisteranno anche *anticorpi lineari* e *anticorpi conformazionali*.

Essendo una proteina formata da centinaia di amminoacidi, essa è in grado di evocare diverse risposte per diversi antigeni che la compongono. Una proteina può, quindi, evocare un numero elevato di anticorpi, ma non tutti sono ugualmente importanti.

Per esempio se uso la tossina detossificata (anatossina) del tetano come vaccino, lo scopo è di ottenere una risposta immune neutralizzante per la vera tossina tetanica quando questa si presenti; di tutti gli anticorpi evocati dall'anatossina solo alcuni sono in grado di neutralizzare l'attività tossica, anche se tutti la riconoscono.

Un altro esempio è dato dall'infezione di virus o batteri: solo alcuni anticorpi saranno efficaci. Nel caso dell'AIDS la persona infettata diventa sieropositiva, in pratica ha anticorpi circolanti che però non sono in grado di neutralizzare il virus; il quale muta continuamente.

La risposta immune è quindi sintomo di infezione e non è detto che riesca a neutralizzare il virus e quindi proteggerci.

Quando si fanno i vaccini, si trova che il corredo anticorpale della persona che ha fatto il vaccino è lo stesso dell'individuo dal quale è stato estratto. Inoltre nel preparare il vaccino si eliminano, se possibile, quegli antigeni che evocano anticorpi inutili lasciando quelli utili. Per questo spesso per vaccinare si usano solo frazioni di proteine per evitare che il nostro corpo faccia del lavoro inutile, ma soprattutto ci sono meno effetti collaterali.

Ci sono anche altre cellule coinvolte nella risposta immune, come per esempio le cellule T, i macrofagi e i mastociti; questi contengono al loro interno granuli di istamina e, se vengono riconosciuti da anticorpi specifici, si degradano liberando l'istamina che dà luogo ad una risposta abnorme e di solito negativa.

Quando il nostro corpo incontra una sostanza estranea reagisce in modo differente a seconda del tipo di sostanza estranea presente; ci sono due tipi di immunogeni (= in grado di dare risposta immune)

- *sostanze morte*: cioè sostanze non in grado di replicarsi (es. anatossine, batteri e virus morti...). In questo caso la quantità inoculata deve essere di un certo livello, altrimenti non si ha la risposta immune sufficiente ad una protezione efficace.
- *Virus o batteri attenuati*: cioè virus o batteri vivi trattati per ridurre al minimo la patogenicità (vaccini attenuati). Questi danno luogo ad una risposta immune più efficace perché mimano al meglio quella che è l'infezione naturale.

Per creare un vaccino attenuato si può far replicare virus o batteri in ambienti poco adatti a loro per favorire le mutazioni. Nel caso dei virus è più facile creare attenuazioni perché hanno un genoma più piccolo e quindi le mutazioni

che modificano la loro attività patogena sono più probabili; nei batteri, invece, è più difficile poiché la patogenicità è associata a più geni e di conseguenza le mutazioni utili sono meno probabili. Inoltre contro l'infezione da parte di batteri si possono usare moltissimi antibiotici e ciò rende meno necessario trovare vaccini antibatterici. Un vantaggio dei vaccini rispetto agli antibiotici è che i primi possono dare una risposta immunitaria efficace per tutta la vita, mentre i secondi no (miglior rapporto costo/beneficio).

Il primo vaccino fu un antivirale. Fu creato nel 1788 ad opera di Jenner, il quale in Inghilterra riuscì a proteggere un bambino dal vaiolo. Jenner aveva osservato che le persone che non si erano ammalate durante l'epidemia di vaiolo erano perlopiù i mungitori di vacche che si erano precedentemente infettati con il virus del vaiolo delle mucche. Il virus del vaiolo delle mucche non dava patologia, ma provocava soltanto delle pustole sulle mani ed era in grado di generare una risposta immunocompetente sufficiente a proteggere anche dal vaiolo umano. Così, Jenner inoculò al bambino il contenuto delle pustole delle vacche e dopo un periodo di tempo adatto inoculò il virus del vaiolo: il bambino sopravvisse. Il virus del vaiolo delle vacche ha antigeni che evocano anticorpi cross-reattivi cioè gli anticorpi prodotti contro il virus del vaiolo vaccinale non discriminano dal virus del vaiolo delle vacche e dell'uomo. Quindi è stata anche questione di fortuna, infatti per molti altri virus questo non funziona.

Il punto importante per Jenner era che secondo lui ci si poteva proteggere da una malattia grave attraverso l'infezione di una malattia meno grave.

In Cina, già ai tempi di Marco Polo si variolizzavano le persone; cioè si prendevano le croste delle pustole vaiolose, si polverizzavano con della sabbia o quarzo e si aspirava tale polvere dal naso in modo che penetrasse attraverso le mucose respiratorie. Ciò comportava la comparsa di cicatrici sotto il naso ma proteggevano dalla malattia.

Per rispondere ai due tipi di immunogeni il nostro corpo agisce, almeno inizialmente, in due modi differenti:

- *risposta di tipo umorale*: se l'antigene è una sostanza non replicativa (es. anatoxina tetanica, polline...) questa viene immediatamente riconosciuta dalle cellule APC (cellule presentanti antigene). Le cellule APC sono macrofagi e sono presenti ovunque, ma soprattutto a livello delle mucose; non discriminano da sostanza a sostanza, ma catturano tutte le sostanze estranee. I macrofagi endocitano o fagocitano la sostanza estranea che viene interiorizzata, passando dall'esterno a dentro l'endolisosoma, dove viene degradata e ciò porta allo spezzettamento della proteina e all'associazione con le molecole MHC (complesso maggiore di istocompatibilità) di classe II. Queste molecole sono sintetizzate dai macrofagi e vengono caricate con la frazione di proteina frantumata (l'antigene); una volta caricato l'antigene, le cellule MHC II dal citoplasma vanno in superficie e mostrano l'antigene alle cellule che devono iniziare la risposta immune, ovvero le cellule T. Più in particolare l'antigene verrà riconosciuto dalle cellule T CD4+ che evocano una catena di eventi che porta all'attivazione delle cellule B e successivamente alla produzione di anticorpi.
- *risposta di tipo cellulare*: nel caso di microrganismi vivi, attenuati o non, il virus penetra in certe cellule (quelle che hanno il recettore per quel tipo di virus). In quel momento la cellula diventa una cellula APC, ma non è un macrofago, infatti il macrofago fagocita la sostanza estranea, mentre in questo caso è il virus che penetra nella cellula. Qui il virus si moltiplica e tende ad uscire. In tutte le cellule del nostro organismo c'è la presenza di MHC di tipo I (è differente per ogni individuo) e quindi anche in quelle infettate; a differenza di MHC di tipo II, MHC I è sempre in superficie della cellula e quando il virus tende ad uscire dalla cellula infettata MHC I lega l'antigene facendolo riconoscere alle cellule T. In questo caso saranno le cellule T CD8+ (dette anche cellule T citotossiche) ad individuare l'antigene. Oltre ad eliminare il virus bisogna eliminare anche le cellule che producono il virus; per far ciò servono cellule killer e proprio questo fanno i linfociti citotossici (CD8+) che, riconoscono gli antigeni del virus e interagendo con le cellule infette per mezzo di MHC I, le eliminano facendo buchi nella membrana cellulare attraverso particolari secrezioni.

L'efficacia di un vaccino è maggiore quando quel vaccino evoca entrambe le risposte: umorale attraverso MHC di tipo II e cellulare attraverso MHC di tipo I. Solo i vaccini attenuati sono in grado di evocare entrambe le risposte.

Nonostante ci siano numerosi vaccini, nessun vaccino è in grado di prevenire l'infezione, la protezione sta nel fatto che anche se veniamo infettati il nostro sistema immune blocca l'agente infettante e non manifestiamo la malattia; è da notare che spesso è la persona vaccinata che trasferisce l'infezione facendo ammalare individui non vaccinati.

Per attenuare i virus ci sono più modi: uno è quello di coltivare virus continuamente in diverse condizioni ambientali finché non si sviluppa la forma mutata che non genera patogenicità (il vaccino antipoliomelite è stato scoperto così); oppure si prende il virus e lo si uccide mantenendolo però la propria immunogenicità.

Un pericolo dei virus attenuati è che possano nuovamente mutare e dar luogo alla forma patogena. In certi casi si possono ottenere attenuazioni che non servono a nulla, per esempio inattivando il gene per la replicazione; infatti il gene per la replicazione è fondamentale perché simula il virus vivo vero ed inoltre, se questo gene è attivo, noi possiamo inoculare basse quantità di virus attenuato perché si riproduce nel nostro corpo e piano piano evoca la risposta immune protettiva.

Attualmente si stanno creando vaccini per mutazione genica specifica; con questa tecnica dell'ingegneria genetica si fanno mutare i geni che danno la patogenicità inattivandoli. Introducendo un maggior numero di mutazioni diminuiamo

la probabilità che il virus attenuato torni indietro attraverso retromutazioni (con tre mutazioni è praticamente impossibile che ci sia retromutazione al virus patogeno).

Attività di presentazione (MHC)

Esiste un'attività di presentazione che avviene grazie a MHC di classe I e II.

Le cellule APC vengono dette cellule presentanti l'antigene professionali in quanto è la loro funzione principale e presentano sia MHC di tipo I, che di tipo II (macrofagi). Le cellule bersaglio (target cell), invece sono dette APC non professionali perché, presentano anch'esse l'antigene, ma non è la loro funzione principale; queste cellule presentano solo MHC di tipo I.

L'infezione della cellula produce una o più proteine, le quali vengono associate immediatamente ad MHC di classe I; questo le carica e le porta in superficie per presentarle ad una cellula T CD8+. Questa cellula è tecnicamente chiamata CTL (linfocita T citotossica) e contiene la molecola TCR (recettore cellule T).

La molecola TCR non è un vero e proprio recettore, ma è un recettore che riconosce le MHC di classe I solo quando è associato all'antigene e attraverso interazione fisica riesce a leggere come è fatto l'antigene. Mentre legge l'antigene la cellula riarrangia il proprio corredo genomico e la cellula T citotossica una volta informata di come è fatto l'antigene (sinapsi immunitaria o immunologica) sarà in grado di riconoscere le cellule con presente quell'antigene e di ucciderle facendo buchi nella membrana cellulare.

Nel caso delle cellule APC, cioè nel processo endocitotico di una proteina esterna sconosciuta, la proteina viene interiorizzata, frammentata e associata con MHC di tipo II. MHC II di solito è bloccato da una proteina che lo rende fisso all'interno; quando arriva peptide estraneo avviene il taglio del legame che blocca MHC II liberandolo e permettendogli di legare la proteina estranea e migrare in superficie per farsi riconoscere e leggere dal TCR delle cellule CD4+. Questa, informata di come è fatto l'antigene, va ad interagire con una cellula B per informarla sulle caratteristiche dell'antigene. La cellula B riarrangerà i geni delle immunoglobuline per poter dare gli anticorpi adatti.

Finché c'è la stimolazione antigenica la cellula B produrrà sempre gli stessi anticorpi. Quando smette di produrre anticorpi la cellula muore, ma rimangono in ogni modo, non si sa quante, cellule B con memoria immunitaria (cellule immortali: rimangono sempre in circolo). La memoria immunitaria serve a reagire in modo velocissimo all'introduzione di uno stesso antigene: in 24h si rimonta una quantità di cellule che producono anticorpi in numero adatto per uccidere il virus (sempre che sia sempre lo stesso).

MHC di tipo I e MHC di tipo II sono differenti tra loro: MHC I è composto di tre subunità α ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$) e una β_2 globulina attaccate alla cellula tramite un'unica catena amminoacidica transmembranale; MHC II è un dimero composto di 4 subunità: $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$ ed ogni monomero è legato alla cellula tramite una catena transmembranale amminoacidica; di conseguenza MHC II è legato alla membrana più fortemente rispetto a MHC I.

Gli Anticorpi

Antigene _ macrofagi _ MHCII+antigene _ cellule T CD4+(helper) _ cellule B non informate _ riarrangiamento geni di cellule B – Plasmacellula produce anticorpo specifico.

STRUTTURA

Gli anticorpi o immunoglobuline (IG) sono glicoproteine. Possiedono una struttura ad "Y" costituita da catene pesanti (heavy H) e catene leggere (light L). Le seconde sono costituite generalmente da un numero di amminoacidi che è la metà di quelli presenti nelle prime.

Le immunoglobuline G (IGG) sono le più semplici; sono costituite da due catene L uguali (220 amminoacidi) e da due catene H anch'esse uguali tra loro (450 amminoacidi). Tra due catene H e tra catene H e L sono presenti ponti disolfuro rispettivamente intercatenali e intracatenali.

Entrambi i tipi di catena, H e L, possiedono una regione costante (uguale in tutte le IGG) ed una variabile situata all'estremità delle catene stesse. Un'IGG può legare 2 **epitoti** o **determinanti antigenici** (e di conseguenza due antigeni) per mezzo di un **riconoscimento lineare** o **conformazionale**.

La struttura delle IG è adattabile. Allargando in maniera diversa le proprie catene può legare epitoti che si possono in posizione distante tra loro sull'antigene. Più l'antigene è ingombrante più l'IG si apre al **cardine**. Minore è il numero di **ponti disolfuro** e maggiore è la capacità di adattamento dell'IG.

Il peso molecolare di un'IG semplice è di circa 150000 D, 50000 per la catena H e 25000 per la catena L. Oltre agli amminoacidi sono presenti gruppi CHO (componenti zuccherini). La percentuale di zuccheri in ogni modo varia in base al tipo di anticorpo.

Artificialmente è possibile diminuire le dimensioni delle IG mantenendo la loro capacità di legare l'antigene. Trattando con **papaina** si distruggono le catene H al di sopra dei ponti disolfuro e si libera il complesso catena H-catena L legati da un ponte intracatenale. In questo caso l'IG così modificata non è più riconosciuta dai macrofagi. Se invece si utilizza la **pepsina** si ottiene il taglio al di sotto del cardine e i macrofagi hanno ancora la possibilità di riconoscere l'IG.

SINTESI

Le immunoglobuline sono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico rugoso delle plasmacellule. Catene light e heavy sono sintetizzate distintamente. Maturano nel Golgi dove si ha l'unione delle catene L e H, la formazione dei ponti disolfuro del cardine e la glicosilazione. Dopo essere state inglobate nelle vescicole si dirigono verso la superficie cellulare per poi uscire dalle cellule stesse per esocitosi.

RAPPORTI CON ALTRE CELLULE

Gli anticorpi non sono in grado di penetrare nelle cellule. Per questo motivo se un antigene si "nasconde" dentro ad una cellula l'IG non può far nulla. L'azione delle IG è solo extracellulare.

Una plasmacellula produce un solo tipo di anticorpo. Le cellule B che si trasformano in plasmacellule che riconoscono l'antigene possono proliferare. Sono le cellule B a proliferare, non le plasmacellule. Per neutralizzare una grossa infezione oltre alla produzione di anticorpi si ha una proliferazione di cellule B informate, ossia di capaci di riconoscere quel determinato antigene. Di conseguenza in una persona infettata si nota una grande presenza di cellule B. Queste si moltiplicano finché l'antigene è presente. Le cellule B non producono anticorpi come le plasmacellule; ne fanno pochi e disponendoli sulla propria membrana riescono a percepire la presenza dell'antigene e di conseguenza continuare a proliferare per poi trasformarsi in plasmacellule.

I macrofagi riconoscono tutte le parti costanti (carbossiterminali) delle catene pesanti di tutte le IG per mezzo di appositi recettori. I macrofagi fagocitano solamente il complesso IG-antigene. Se l'IG non è legata all'antigene non può essere fagocitata. Una volta fagocitato il complesso la presenza dell'IG non evita al macrofago di legare all'antigene il MHCII.

Ricordiamo che i macrofagi non hanno specificità mentre le cellule B hanno specificità e **memoria immunologica** che gli permette di proliferare dopo aver riconosciuto un antigene che era già stato incontrato nel passato. In questo modo si ha una risposta immunitaria molto veloce.

CLASSIFICAZIONE

Le immunoglobuline sono divise in cinque classi differenti per struttura e funzione. Il nome della classe è dato dalla lettera greca che distingue le cinque catene pesanti che compongono le varie classi.

IGG

- Agiscono nelle zone extravascolari e penetrano anche negli organi
- Danno una **risposta secondaria**, più prolungata ed elevata della primaria (IGM). Dopo aver vaccinato si effettuano dei richiami che evocano solo la risposta secondaria; aumenta il numero di IGG nel sangue.
- Rispondono ad un evento infettivo
- 146000-165000 D di peso molecolare
- Ha 4 sottoclassi, IGG1, IGG2, IGG3, IGG4
- Hanno la capacità di attraversare la barriera feto-placentale e quindi sono gli anticorpi che passano dalla madre al figlio.
- La percentuale di carboidrati nella struttura è del 3%
- La catena pesante è la catena "γ" gamma
- È costituita da 4 domini per la catena H e vi sono da 2 a 11 ponti disolfuro nel cardine che unisce le catene pesanti
- La concentrazione nel siero è di 13.5 mg/ml
- La vita media dell'anticorpo circolante nel siero è di 7-21 giorni. Se lega un antigene e il complesso IGG-antigene è riconosciuto dal macrofago, subisce immediatamente fagocitosi.

Sottoclassi delle IGG

1. IGG1: peso molecolare di 146000 D e due ponti disolfuro
2. IGG2: peso molecolare di 145000 D e quattro ponti disolfuro
3. IGG3: peso molecolare di 170000 D e undici ponti disolfuro
4. IGG4: peso molecolare di 146000 D e due ponti disolfuro

Tutte le IGG hanno la capacità di attraversare la **barriera feto-placentale**.

Sono molto presenti nel sangue, nella milza, nel midollo e nelle tonsille (60% IGG1, 26% IGG2, 8% IGG3, 1% IGG4)

IGM

- Sono macro-immunoglobuline ed hanno la capacità di agglutinare

- Sono i fautori della **risposta immune primaria**. È la prima risposta immunitaria dopo la penetrazione di un antigene.
- Il peso molecolare si aggira intorno al milione di D
- Sono pentameri costituiti da 5 monomeri identici uniti da una catena J. Legano 10 antigeni e proprio per questo motivo sono i primi ad essere prodotti. Si può dire svolgano la il grosso della “pulizia”. Dopo di loro vengono prodotte le IGG che essendo più piccole compiono la “pulizia” di fine negli spazi più reconditi del corpo.
- Le IGM sono prodotte dalle stesse plasmacellule che producono anche le IGG. Inizialmente si ha la produzione di IGM poi si ha uno **shifting** e si producono IGG. Cambia la classe di IG prodotte ma non il tipo. Una plasmacellula produce un unico tipo di anticorpo che riconosce un solo determinante antigenico.
- Non hanno sottoclassi
- La catena pesante è la catena μ
- La percentuale di carboidrati nella struttura è dell'8%
- La concentrazione nel siero è di 1.5mg/ml. La concentrazione è circa dieci volte inferiore a quella delle IGG, ma le IGM sono cinque volte più abili nel legare antigeni (IGG legano 2 antigeni mentre IGM ne legano 10)
- Non sono in grado di oltrepassare la barriera feto-placentale

IGA

- Sono definite **immunoglobuline mucosali** in quanto si trovano prevalentemente legate alle mucose. Sono “catturate” dalle cellule epiteliali e portate nel lume delle mucose e tra i secreti mucosali.
- Sono dimeri costituiti da due monomeri uguali legati da un catena J.
- Sono le più importanti per la difesa primaria in quanto si trovano sulla porta d'ingresso per l'entrata nel nostro corpo. Le mucose infatti sono la principale via d'ingresso nel corpo per i microrganismi.
- Il peso molecolare è di circa 390000 D
- Non hanno sottoclassi
- La catena pesante è la catena μ
- La percentuale di carboidrati nella struttura è del 12%
- La concentrazione nel siero è di 3.5 mg/ml
- Hanno un'emivita di una settimana circa
- Non sono in grado di oltrepassare la barriera feto-placentale

IGD

- Sono presenti sulla membrana delle cellule B e stimolano le stesse a moltiplicarsi se percepiscono la presenza di antigeni. Si staccano dalla membrana solo quando le cellule B si trasformano in plasmacellule. Quelle che non si trasformano rimangono in circolo per sempre; sono le cellule della memoria immunitaria.
- Il peso molecolare è di 184000 D circa
- La catena pesante è la catena μ
- Hanno quattro catene pesanti e un solo ponte disolfuro. Questo permette un facile adattamento alla struttura dell'antigene
- Non hanno sottoclassi
- La percentuale di carboidrati nella struttura è del 13%
- La concentrazione nel siero è di 0.03 mg/ml
- La vita media è di soli tre giorni
- Non hanno la capacità di attraversare la membrana feto-placentale

IGE

- Sono le responsabili della **risposta anafilattica e allergica**, ossia di una risposta abnorme e generalizzata dovuta al riconoscimento di alcune sostanze.
- I loro bersagli sono i recettori dei mastociti che contengono **istamina** granulare. Una volta legati ai recettori si ha il rilascio di istamina che provoca fenomeni anafilattici quali modificazione del ritmo cardiaco, difficoltà respiratoria, perdita di coscienza ecc.
- Non hanno sottoclassi
- La percentuale di carboidrati nella struttura è del 12%
- La concentrazione nel siero è di 0.00005 mg/ml ma può salire fino a 0.010 per la risposta allergica
- La vita media è di due giorni

I vaccini

Un **vaccino** è una preparazione derivata da un agente patogeno somministrata ad umani od altri animali per indurre una risposta immunitaria protettiva. Esso può essere composto da microorganismi uccisi oppure vivi e attenuati, da tossine batteriche inattivate, da macromolecole purificate, a vettori ricombinanti (es. vaccinio modificato per la polio) oppure vaccini a DNA (nessuno dei quali, ad oggi, è stato ancora approvato).

I vaccini devono il loro nome al virus vaccinico (delle vacche) impiegato a partire dal 1798 da Edward Jenner per immunizzare la popolazione contro il vaiolo. Egli, infatti, aveva osservato come gli allevatori che avessero contratto il virus vaccinico fossero immuni dal vaiolo. Il virus vaccinico, inoltre, provocava solo piccole cicatrici nel luogo di inoculazione, generalmente sulle mani, mentre il vaiolo aveva una mortalità compresa tra il 10 ed il 40%, risulta chiara l'importanza di tale presidio. Con la scoperta di ulteriori vaccini, soprattutto ad opera di Pasteur (colera, antrace, rabbia), verso la fine dell'Ottocento si diffuse un generale ottimismo, rafforzato dai successi dei primi antibiotici, sulla possibilità di limitare o addirittura annullare le malattie derivanti da infezioni batteriche. Tale ottimismo era destinato a durare poco: ben presto comparvero nuovi agenti patogeni e si acquisì consapevolezza del fenomeno della resistenza agli antibiotici.

Le malattie a trasmissione aerogena

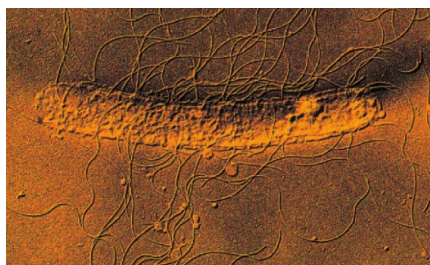


Illustrazione 55: Legionella pneumophila, agente eziologico della legionellosi



Illustrazione 56: Le droplets (goccioline) prodotte da uno starnuto

Morbillo

Il morbillo (en. *Measles*) è una malattia esantematica tipica dell'infanzia altamente contagiosa e diffusa nel mondo endemicamente. E' una malattia solo umana, ma esistono analoghi animali come la peste bovina o il cimurro nei cani.

L'agente eziologico del morbillo è un **paramixovirus** della famiglia dei Morbillivirus, da cui il nome italiano, che non è oncogeno in quanto la sua replicazione è citoplasmatica. Per quanto diversi virus di questa famiglia possano provocare il morbillo una volta subita questa patologia si sviluppa un'immunità duratura per il resto della vita grazie alle cellule di memoria del sistema immunitario. Il virus penetra nel corpo tramite le **vie aeree** o dalla congiuntiva degli occhi e si riproduce nell'epitelio dell'orofaringe.

Tra le sue proteine di superficie ci sono quelle di fusione, l'emoagglutinina e la neuraminidasi.

Il suo genoma è a **RNA ss**, è rilasciato con gemmazione (quindi è **enveloped**) e penetra per endocitosi, polimorfo (ma circa sferico). Le variazioni/mutazioni genotipiche sono trascurabili ed il vaccino è universale (identico nel tempo e in tutto il mondo). La patologia ha andamento epidemico (culmine tra gennaio e febbraio), tra le possibili complicanze si ricordano broncopolmoniti, laringiti, otiti ed encefalomieliti.

Decorso clinico

Come la gran parte delle patologie causate da virus ha un periodo di incubazione abbastanza lungo (perché diversamente dai batteri che si



Illustrazione 57: Esantema provocato da morbillo

replicano in 20' i virus, sfruttando le normali cellule eucariotiche, sono condizionati dai ritmi proteosintetici di queste per la loro replicazione). Le fasi sono quindi

- **incubazione**, da 10 a 20 gg. Questa lungo periodo di incubazione (la differenza tra la comparsa dei sintomi e l'infezione batterica) ne giustifica l'elevata diffusione.
- dopo circa 10 gg iniziano i primi sintomi (tosse, febbre, mal di testa, congestione nasale, congiuntiviti) e le caratteristiche **macchie di Koplik**, delle pustole medialmente biancastre prodromiche rispetto al caratteristico esantema
- **calo febbrile** per tre giorni
- **esantema** su tutta la cute con febbre
- Periodo post-esantematico con **desquamazione** e **guarigione**

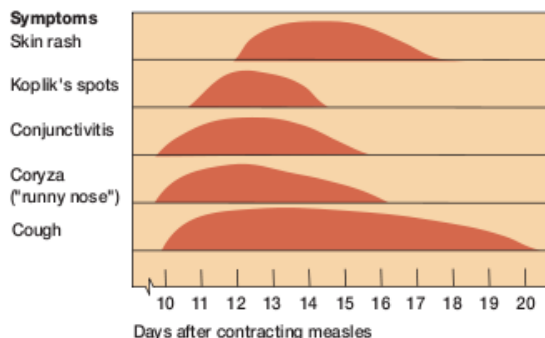


Illustrazione 58: Sintomi del morbillo durante il decorso clinico

Non essendo disponibile un trattamento specifico per il morbillo si consiglia la vaccinazione, generalmente associata con rosolia e parotite (malattie simili) nel cosiddetto vaccino **trivalente** (MMR – measles, mumps, rubella). Il vaccino ha drasticamente ridotto l'incidenza e la gravità di questa patologia nei Paesi sviluppati (10 morti l'anno in Italia), mentre nei Paesi meno sviluppati morbilità e mortalità restano alte (2,5milioni/anno?).

Rosolia

La rosolia (en. German measles o rubella dal lat. Rubellus, rossiccio) è una malattia descritta per la prima volta in Germania, nell'800 (da cui il nome inglese). Si tratta di una patologia moderatamente contagiosa che affligge i bambini da 5 a 9 anni. E' causata da un **α-togavirus**, diffuso in tutto il mondo ma con picchi epidemiologici in inverno e primavera. La trasmissione, aerogena, avviene tramite droplets e manifesta un decorso clinico simile al morbillo (senza macchie di Koplik) ma l'esantema dura solo tre giorni, per cui è talvolta detta morbillo dei tre giorni. In particolare l'esantema compare una volta che il paziente ha sviluppato le difese immunitarie e dopo la scomparsa del batterio dal sangue; è infatti un effetto immunogenico e non è causato dal virus.



Illustrazione 59: Edema da rosolia

E' un virus **teratogeno**, ovvero causa malformazioni nel feto se contratto da donne incinte, da' infatti la sindrome da **rosolia congenita**.

La terapia non prevede nulla di particolare non essendo una patologia particolarmente grave, la profilassi è effettuata col vaccino trivalente (v. morbillo).

Scarlattina

La scarlattina è una patologia causata dalla **esotossina** pirogena di un **batterio** (nota che morbillo e rosolia erano causate da VIRUS!), lo **streptococco pyogenes**, che può dare anche altre malattie. È una patologia infettiva ad andamento acuto, frequente nell'infanzia che dà luogo ad esantema maculo-papuloso. La scarlattina è una manifestazione di una patologia, chiamata laringofaringitestreptococcica. Questa patologia è causata dai ceppi degli streptococchi pyogenes beta emolitici contagiatati da un batteriofago lisogeno. Solo i ceppi di *S. Pyogenes* dotati di capsula manifestano patogenicità.

L' *S. Pyogenes* è un batterio **Gram positivo**, capsulato aerobio o anaerobio facoltativo. Penetra attraverso le vie respiratorie dando patologie a trasmissione aerogena.

La scarlattina dà eruzione cutanea a chiazze di color rosso scarlatto, il trattamento d'elezione è con penicillina.



Illustrazione 60: Bambino con scarlattina, malattia causata dagli streptococchi pyogenes

Streptococchi

Gli streptococchi richiedono terreni di coltura molto ricchi, contenenti siero o sangue; sono batteri in grado di fermentare gli zuccheri con produzione di acido lattico. Hanno una capsula formata da **acido ialuronico**. Il genere

streptococco è costituito da molti microrganismi diversificati tra loro, classificati secondo proprietà serologiche ed emolitiche.

Dal punto di vista **serologico**, cioè della capacità di evocare risposta immune, i vari ceppi evocano risposte simili, perché presentano antigeni gruppo specifici comuni, in tutto il gruppo di **Lancefield**⁷ a cui appartengono.

Le attività **emolitiche** (lisi delle emazie) sono dovute alla presenza di sostanze tossiche specifiche, in grado di perforare la membrana cellulare dei globuli rossi. In base alle attività emolitiche gli streptococchi vengono divisi in

- **Alfa-emolitici** (causano emolisi parziale dei globuli rossi con trasformazione dell'emoglobina in metaemoglobina di colore verde)
- **Beta-emolitici** (causano emolisi totale della membrana dei glob.rossi e la distruzione dell'emoglobina che diventa bianca; intorno alla colonia di streptococchi si forma un alone bianco)
- **Gamma-emolitici** (non causano emolisi)



Illustrazione 61:
Inflammation da *S. pyogenes*

E' possibile verificare l'attività emolitica inoculando nei terreni di coltura contenenti Agar dei globuli rossi, le cosiddette piastre all'Agar-sangue (sangue umano o animale). Si forma un terreno semisolido rosso in cui in corrispondenza della crescita delle varie colonie si possono identificare i vari tipi di emolisi: nessuna emolisi intorno alla colonia di batteri gamma; un alone biancastro intorno alla colonia di batteri beta; alone verdastro intorno alla colonia di batteri alfa .



Illustrazione 62: *Streptococchi alpha emolitici*



Illustrazione 63: *Streptococchi non emolitici (gamma)*



Illustrazione 64: *Streptococchi beta emolitici*

I principali streptococchi patogeni sono:

- **pyogenes**, beta-emolitico
- **agalactiae**, beta-emolitico; causa infezione neonatale a livello della cute
- **pneumoniae**, alfa-emolitico; agente eziologico della polmonite streptococcica

Lo streptococco *pyogenes* può causare anche l'**impetigine**, patologia acquisita col contatto con gli animali..E' una patologia che si diffonde in tutto il corpo, dà bollicine di qualche mm che formano delle vescicole contenenti un liquido denso, entro il quale si trovano miliardi di *pyogenes*. Si cura facilmente con eritromicina. L'infezione può interessare la cute o la mucosa

Antigeni gruppo specifici

Nel Gruppo A di Lancefield la specificità di gruppo è dovuta a enacetilglucosammina ?; per cui la caratteristica è quella di possedere questo ammino-zucchero. Non ci sono solo antigeni appartenenti al gruppo A, ma anche antigeni tipo-specifici per i batteri che appartengono al gruppo A (sottogruppo). Antigeni tipo-specifici sono dovuti alla presenza di tre proteine di superficie (sono stabili ma possono essere rimosse dal un enzima):

- proteina M
- proteina T
- proteina R

Questi due tipi di antigeni permettono ai batteri di sfuggire alla fagocitosi formando un involucro. Se la proteina M manca, i batteri non sono virulenti (se inoculati nell'animale,vengono fagocitati dai macrofagi), per cui si è pensato di creare streptococchi con inattivazione selettiva dei geni che codificano per la proteina M, ma senza che però questi dessero protezione perché incapaci di evocare anticorpi per la proteina M. altri antigeni servono per l'espletamento dell'attività tossica, cioè la sintesi di tossine.(esotossine).

Gli streptococchi possiedono tossine, non strutturali, in grado di innalzare la temperatura corporea. Queste tossine pirogeniche sono presenti in tre serotipi : A, B, C. si tratta di esotossine sintetizzate dal batterio, i cui geni vengono acquisiti dal batterio, mediante processo di lisogenizzazione (sono stati regalati al batterio dal fago). Le tossine

⁷ Da Rebecca Lancefield che nel '27 ne propose una prima catalogazione

pirogeniche sono responsabili dell'esantema o dell'eritema scarlattinoso dovuto alla penetrazione della barriera emato-encefalica. Le tossine aprono dei varchi nella barriera e possono causare aumento della temperatura agendo all'interno dell'ipotalamo.

Ci sono due tipi di tossine

- streptolisina S (presente sulla superficie del batterio; emolisina, ossigenostabile, causa della beta-emolisi)
- Streptolisina O (presente nello spessore della parete del batterio, detta anche somatica, emolisina ossigenolabile, antigenicamente attiva, usata solo a scopo diagnostico).

Quadro clinico della scarlattina

- periodo di incubazione breve (2-4 gg al max.) poiché è una patologia batterica
- periodo pre-esantematico (24-36 ore ca. in cui il batterio sintetizza le tossine) la cui sintomatologia generale (malessere generalizzato) non può indicare la patologia.
- periodo esantematico (1 settimana ca.). eritema maculo-papuloso presente su torace e braccia. Assenza di esantema sul volto, sui piedi e sulle mani (sul viso si ha in casi rari o gravi e lascia scoperte le orbite e intorno alla bocca)
- ingrossamento delle papille linguali
- periodo post-esantematico (2 settimane ca. con scomparsa della sintomatologia; desquamazione lamellare della pelle) durante il quale la persona è altamente contagiosa poiché il batterio è presente sulla superficie della cute. Possibilità di contagio diretto.

Questa patologia può portare complicazioni anche gravi, es. tonsilliti da streptococco recidive. Nei casi gravi si possono avere infezioni gravi al cervello, al cuore, alle ossa con danni alle cellule nervose, ai miociti, agli osteociti. Gli streptococchi possono colpire le persone anziane ai reni, o al miocardio (endocarditi), alle ossa (è stato dimostrato che le persone che soffrono di reumatismo articolare ?, ci sono anticorpi elevati contro il gruppo ABS). Gli streptococchi sono i microrganismi che devono essere controllati nelle persone cardiopatiche perché le streptolisine sono in grado di danneggiare le valvole cardiache o i tessuti tendinei di esse, causando insufficienza mitralica o della bicuspid. La patologia può essere trasmessa durante tutto il periodo della malattia, poiché lo streptococco è presente in vari distretti del corpo (orofaringe, sangue, cute, urine).

Andamento epidemiologico

Ha un andamento endemo-epidemico cioè, la patologia è sempre presente ma compare a gruppi isolati indipendenti tra di loro. Compare prevalentemente in autunno ad eccezione dell'impetigine che invece è estiva. La patologia colpisce prevalentemente i maschi tra i 2-9 anni.

Esistono varie forme di scarlattina:

- puerperale (la prima causa di morte nelle donne durante il parto, in assenza di sterilizzazione degli strumenti medici)
- da ferite (prima causa di morte durante la guerra o di invalidità tra i soldati)

Se si supera la patologia si ha immunità totale e duratura.

Profilassi

Non esiste un vero vaccino antistreptococco. È obbligatoria la denuncia di infezione sia per scarlattina che impetigine, seguita da isolamento domiciliare. Si può fare una verifica epidemiologica attraverso accertamento diagnostico per valutare la diffusione del microrganismo nella popolazione infantile. Viene fatta la prova di DICK in cui si inoculano 100microlitri di tossina eritrogenica (sintetizzata dal batterio) diluita mille volte in soluzione fisiologica in modo che l'attività sia molto bassa. La risposta può essere la comparsa locale della papula oppure nessuna reazione. Se c'è una reazione locale non c'è immunità cioè la persona non è mai stata infettata e non ha quindi gli anticorpi; oppure si ha la cosiddetta reazione di Dick in cui si verifica la reazione di anticorpi contro la tossina eritrogenica, l'attività tossica viene bloccata e non c'è una reazione.

Sono state provate varie profilassi usando le anotossine prodotte dal batterio (poiché è un Gram+ produce esotossine utilizzabili come vaccino); ma poiché gli streptococchi producono 40 tipi diversi di tossine specifiche non si può ottenere un vaccino efficace. Anche l'uso di siero di persone convalescenti con anticorpi non ha dato esito positivo.

Queste terapie possono essere usate con i bambini molto piccoli (6-7 mesi) in associazione alla terapia antibiotica. Gli antibiotici usati sono l'eritromicina o la penicillina c.

Varicella Zoster



Illustrazione 65: Tipico edema da varicella

È causata da un virus erpetico. I virus erpetici che infettano l'uomo sono 8 (erano 5 fino al 1981 fino alla comparsa l'aids):

- virus herpes simplex di tipo 1 o labialis HSV1 o HHV1 (ultima categorizzazione)
- virus herpes simplex di tipo 2 o genitalis HSV2 o HHV2
- virus varicella zoster VZV o HHV3 (lo stesso virus dà due forme patologiche diverse: la varicella nel bambino o adulto; lo zoster nell'adulto che ha già contratto la varicella)
- Virus di Epstein-Barr VEB o HHV4 (causa la mononucleosi infettiva; il carcinoma naso-faringeo; linfoma di Hotchkings. La mononucleosi è una patologia benigna che dura da 1-4 mesi ed è stato osservato che tutte le persone che hanno contratto il linfoma di Burkitt hanno avuto la mononucleosi; non vale il contrario)
- Virus citomegalico CMV o HHV5 Il primo isolamento del virus è avvenuto in persone trapiantate renali, non per il trapianto ma perché in persone che

hanno bisogno di trapianto eterologo si applica una terapia immunosoppressiva generale per impedire il rigetto dell'organo, e quindi possono svilupparsi patologie croniche dovute a virus permanenti. Il CMV può dare patologie oculari (cecità).

In persona affetta da aids, quindi immunodepressa, il virus citomegalico non ha ostacoli per provocare patologia. Anche i primi tre virus sono stati isolati da persone con l'aids.

- HHV6 causa l'esantema subitum (VI malattia) patologia infantile che può durare max. 1-2 gg
- HHV7 non è stato correlato ancora con nessuna patologia; isolato dal sangue di persone con l'aids
 - HHV8 causa il sarcoma di Kaposi, tumore dei vasi capillari (angioma tumorale) presente solo nelle persone con aids.



Illustrazione 66: Herpes simplex di tipo 1

Fa parte della famiglia degli herpes, che un tempo comprendeva solo 5 tipi di virus mentre adesso, con la comparsa del virus dell'HIV e le nuove tecniche di trapianto degli organi che prevedono una terapia di immunosoppressione, il loro numero è salito a 8.

Il virus dell'herpes di tipo 3 (sigla VZV – Varicella Zoster Virus), compare in due forme: una forma giovanile, responsabile della comune varicella, e la forma tardiva, responsabile dell'herpes zoster.

La maggior parte dei virus erpetici si trasmette attraverso il contatto delle mucose, e più raramente per via aerea (essendo localizzato sulle mucose, può capitare che la saliva faccia da veicolo al

virus).

L'herpes di tipo 1, Herpes Simplex, provoca lesioni transitorie che di solito si risolvono nel giro di una settimana e si possono ripresentare durante la vita dell'individuo a seguito periodi di immunodeficienza, in quanto il virus, una volta entrato nell'organismo vi permane per tutta la vita. Esiste una variante pericolosa, che colpisce i bulbi oculari provocando cheratiti da herpes simplex che sono molto difficili da eradicare e che spesso può portare a cecità.

La varicella si presenta in modo totalmente diverso, con un esantema varicelloso che colpisce il viso e il tronco in vari punti non attraverso un esantema omogeneo ma attraverso localizzazioni precise del virus. Questa eruzione cutanea ha un'evoluzione precisa, da papule a pustole a vescicole che si riempiono di un liquido contenente il virus, il quale può così passare dall'individuo ai suoi indumenti a causa di sfregamento.

L'herpes zoster è la forma che colpisce gli adulti, anche noto come fuoco di sant'antonio, è un'eruzione cutanea estremamente dolorosa, caratterizzata da vescicole localizzate in corrispondenza dei nervi toracici sottomammellari ed in alcuni casi anche inguinali, che persistono anche per mesi e si risolvono spesso spontaneamente.

Il VZV è comunque uno dei pochi virus verso i quali abbiamo dei farmaci, ma non dei vaccini efficaci.



Illustrazione 67: Herpes simplex di tipo 2

	Bersaglio principale	Latenza	Trasmissione
1 Herpes di tipo 1	Cellule mucoepiteliale	Attraverso le guaine di	Contatto diretto,

	(replicazione)	Schwann risale lungo il sistema nervoso e rimane latente nei neuroni del midollo spinale	raramente tramite contatto con indumenti o per via aerea
2 Herpes di tipo 2	Mucosa degli organi genitali	Radici sensitive dei neuroni spinali	Contatto diretto
3 Varicella-Zoster Virus			Contatto diretto
4 Virus di Epstein Barr. Causa la mononucleosi oppure tumore (Linfoma di Hodgkin, il carcinoma naso faringeo e il Linfoma di Burkitt) in regioni particolari della terra.	Cellule mucoepiteliali Replica nei linfociti B	Linfociti B	Contatto diretto
5 Virus citomegalico CMV (fa aumentare di dimensioni le cellule infettate)	Linfociti, Monociti, cellule muco epiteliale	Linfociti e monociti	Individui immunodepressi a causa di trasfusioni, trapianti, contatto diretto, saliva.
6 Virus erpetico 6	?	?	Vengono isolati da pazienti immunodepressi
7 Virus erpetico 7	?	?	Vengono isolati da pazienti immunodepressi
8 Virus erpetico 8	?	?	Vengono isolati da pazienti immunodepressi

Il virus di Epstein Barr è usato in biologia molecolare per immortalizzare le cellule B. Perché si sviluppino patologie come il linfoma di Burkitt ed il carcinoma naso faringeo è necessaria la presenza di co-fattori: nel primo caso è necessaria la presenza contemporanea del plasmodio della malaria, nel secondo un tipo di eczema particolare delle regioni del sud est asiatico.

La varicella è una malattia endemo-epidemicale, colpisce soltanto l'uomo, causa un esantema, è altamente contagiosa ed ha un andamento acuto.

È frequente nei bambini piccoli, di età compresa tra i 2 e gli 8 anni. L'agente eziologico è il VZV, che come tutti i virus erpetici ha un genoma costituito da DNA a doppia elica, di notevoli dimensioni, circa 120000 paia di basi. Ha forma sferica, al cui interno si trova una struttura capsomica di forma icosaedrica (formata da 162 capsomeri), il cui numero di capsomeri non varia all'interno del ceppo virale. Il capside in sezione appare esagonale.

È avvolto da un envelope, e non è patogeno per gli animali da laboratorio (diversamente da altri virus erpetici).

Il virus replica nel nucleo delle cellule (da qui la capacità tumorale di alcuni ceppi), e poi subisce una modificazione della sua forma, partendo prima con un capside a forma sferica, con un nucleo non condensato, per poi andare incontro ad un processo di condensazione del genoma.

Alcuni di questi virus, soprattutto l'herpes di tipo due, possono causare sincizi tra le cellule.

Ci sono tre stadi di penetrazione della cellula: nel primo il virus si avvicina alla cellula, viene endocitato dalla membrana cellulare e poi la membrana si chiude dietro al virus.

Il decorso dell'infezione:

È una patologia virale, quindi il periodo di incubazione è lungo, da un minimo di una settimana ad un massimo di due, durante le quali il soggetto non presenta sintomi, ma è già contagioso.

Segue una fase sintomatica pre-eruttiva che dura due giorni caratterizzata da una leggera febbre ed un malessere generalizzato.

Successivamente la febbre permane e ha luogo la fase esantematica tipica della varicella, che dura circa tre giorni, e questa fase è caratterizzata dalla progressione delle lesioni esantematiche.

Inizialmente compaiono le papule, definite come un arrossamento locale con una leggera rilevatezza della cute, che poi diventano vescicole che contengono liquidi, per poi evolvere in pustole che può aprirsi liberando il pus che contiene il virus.

Queste tre fasi non compaiono mai assieme nella stessa area del corpo.

Le ultime parti del corpo che vengono colpite da queste lesioni sono il volto e gli arti.

L'ultima fase è la fase involutiva, che comincia circa 7 giorni dopo la comparsa delle lesioni, quando le pustole si seccano.

Superare la varicella conferisce una immunità semipermanente, anche se dipende dalla quantità di virus con cui si viene a contatto.

I virus erpetici rimangono comunque latenti nelle radici dei nervi spinali e nel midollo osseo, e possono ricomparire in momenti di immunodepressione (dovuto a stress, radiazioni, mestruazioni, malattie immunodeficienti).

In alcuni casi la varicella può essere letale, e lo è sempre in pazienti immunodeficienti e leucemici. Negli altri casi la mortalità è circa dello 0.1% anche se la varicella può dare luogo ad encefaliti (in questo caso la mortalità sale a circa il 20%). Tutti i virus erpetici sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica.

La sorgente dell'infezione è sempre il malato, che è contagioso per tutta la durata della malattia. La malattia è sempre presente, si sviluppa in comunità di bambini (asili, scuole), la trasmissione avviene per contatto e via aerea, la penetrazione attraverso l'orofaringe, la replicazione nelle cellule mucoepiteliale.

L'eliminazione del virus avviene dall'orofaringe e dalla cute.

La profilassi prevede la denuncia obbligatoria, l'isolamento fiduciario e solo in alcuni casi ospedaliero se sono presenti bambini piccoli in famiglia.

Esiste un vaccino vivo attenuato, chiamato OCA, è stato isolato in Giappone, ma ha un'efficacia intorno al 20-25%.

Non esiste terapia farmacologia.

Vaiolo

L'agente eziologico è il pox virus ed è stato isolato nel 1890 da un italiano che aveva osservato nelle cellule delle persone affette da vaiolo la presenza di corpi inclusi nel citoplasma che riteneva fossero batteri che si coloravano come il dna nucleare.

Il virus del vaiolo è il più grosso conosciuto, con dna lineare a doppia elica che contiene circa 200000 - 270000 paia di basi, una replicazione esclusivamente citoplasmatica, ed avvolto da un envelope.

Ha una forma definita brick shape, a mattonella.

Non esiste una riserva animale del virus.

La superficie presenta delle protusioni digitiformi che rappresentano i recettori del virus.

Il vaiolo attualmente è stato debellato, l'ultimo caso di infezione naturale è stato osservato in Somalia nel 1977.

Il core del virus è ad otto, di forma allungata, e presenta dei corpi laterali (come potete vedere QUI e QUI) che contengono enzimi capaci di funzionare a diversi pH.

Le lesioni provocate dal virus lasciano cicatrici permanenti.

Il periodo di incubazione del virus è di circa 10-15 giorni, seguito da una fase pre-eruttiva che dura circa 3 giorni, accompagnata da febbre elevata, sete intensa, dolore lombare e rigidità nucale.

Dopo questa fase la febbre cala (contrariamente alla varicella).

Segue la fase eruttiva, in cui compare l'esantema, che dura circa 5 giorni, con la comparsa di papule, vescicole e pustole, le cui forme evolvono simultaneamente su tutto il corpo.

L'immunizzazione derivante dall'infezione è totale e duratura.

Il virus replica nel citoplasma, dunque ha tutti gli enzimi necessari alla replicazione, senza bisogno della dna polimerasi del nucleo (ne ha una propria).

Esistono due varietà di pox virus, il virus del vaiolo e il virus del mollusco contagioso.

Il virus del vaiolo è resistente alle temperature si conserva ad una temperatura di 4-5 gradi, e questo ha permesso il trasporto del vaccino in tutte della terra.

È una patologia facilmente trasmissibile e caratterizzata da una notevole morbilità (capacità di dare patologia) e mortalità (intorno al 20-30%).

Esiste un vaccino, notevolmente efficace, costituito da virus vaccino, mentre non esiste una terapia farmacologica adeguata.

Nel 1980, l'organizzazione mondiale della sanità ha dichiarato il vaiolo scomparso.



Illustrazione 68: Vesciche causate da smallpox (vaiolo)

Ciclo replicativo del virus:

Il virus ha già pronti tutti gli enzimi necessari alla replicazione, e dunque il ciclo replicativo ha luogo interamente nel citoplasma. Le proteine vengono codificate e assemblate, formando i virus intracellulari che poi si avvolgeranno nelle envelope. Sono state identificate delle proteine essenziali perché venga prodotto del virus infettante, in quanto servono per la maturazione del virus.

Il vaiolo delle scimmie è un modello adattabile al vaiolo umano in quanto causa la patologia anche da scimmia a uomini, direttamente o attraverso roditori. A questo scopo è stata verificata l'efficacia di vaccini per controllare il vaiolo; vaccini basati sul virus vaccinico. Geni specifici come quelli dei ceppi attenuanti, sono in grado di proteggere dal vaiolo; non danno effetti collaterali, non possono presentarsi quando viene fatta la vaccinazione su persona immunodepressa o affetta da cancro.

Proteggono attraverso l'induzione di anticorpi specifici che neutralizzano il virus. Quindi non solo ceppi derivanti dal virus vaccinico, ma anche attenuanti, pur derivanti da quel ceppo originario. Si tratta pur sempre di ceppi di virus vaccinico che potrebbero revertire al genotipo selvatico.

Pertanto un passo avanti è stato fatto attraverso l'identificazione di quei geni che sono responsabili della protezione, cioè di tutte le proteine che il virus vaccinico esprime (200), il v. vaccinico prima di vaccinare contro il vaiolo è un virus vivo. Ma quali sono quelle importanti per la protezione?

Si è verificato attraverso la risposta immunocompetente quali potessero essere:

A33R

B5R

L1R

A27 (successivamente)

Sono geni che codificano per le proteine tardive corrispondono ad alcune tappe finali dell'assemblaggio del virus. Sono i geni più importanti per la protezione. Eliminiamo tutti gli altri geni e utilizziamo come vaccino solo questi geni.

A33R: proteina della membrana esterna del virus envelope extracellulare. E' un bersaglio per gli anticorpi evocati dal v. vaccinico che bloccano la diffusione del virus da cellula a cellula.

B5R: anche questo codifica per le proteine dell'envelope del virione extracellulare, e anche questo è bersaglio x anticorpi.

L1R: proteina della membrana esterna ma del v. maturo intracellulare, quindi la proteina è sintetizzata prima delle altre due. E' uno dei bersagli principali di anticorpi evocati dal vaccinia.

Come si esprimono queste proteine indipendentemente dal vaccinia!?! Cioè in un modo più sicuro? Ci vuole un vettore di espressione. Ci sono vari vettori: il DNA plasmidico, opportunamente modificato mediante l'inserimento di promotore. Ma difficilmente all'interno del DNA plasmidico questi 3 geni vengono espressi in modo coordinato, e ognuno di questi 3 geni ha bisogno del proprio promotore, cioè di quella sequenza che lo faccia trascrivere. E più promotori uguali configgono tra loro.

Il DNA plasmidico può essere inoculato attraverso la cute, ma presenta dei problemi di costruzione del vettore.

C'è un'alta possibilità, vicina a quella del v. vaccinico, e cioè l'utilizzazione di poxvirus non della specie umana ma di uccello. Esistono poxvirus che infettano vari animali; quello degli uccelli, per esempio il poxvirus che causa il vaiolo dei polli, non infettano l'uomo.

Tutti i polli che mangiamo vengono vaccinati almeno 10 volte contro numerose malattie, tra cui il vaiolo. Questo virus si chiama fow pox. Anche gli uomini x almeno 2 secoli sono stati vaccinati contro il vaiolo, così i polli.

Ciò che è stato preso come vettore è il vaccino contro il virus del vaiolo dei polli.

Il virus, così attenuato, assomiglia molto al v. del vaiolo umano, come forma e dimensioni, ha un num di nucleotidi leggermente superiore, e ha 2 caratteristiche importanti:

- non da patologia negli altri animali (uomo compreso)
- penetra comunque nelle cellule, anche in quelle non di uccelli, ma ha un ciclo di replicazione abortivo: comincia la sintesi di alcune proteine e poi si ferma.

Quindi se inoculo il vaccino x il vaiolo dei polli, il virus penetra nelle mie cellule, comincia a moltiplicarsi, e poi si ferma.

Ciò è stato verificato perché in coloro che lavorano in azienda agricole, le persone che sono a contatto giornalmente con polli vaccinati, hanno livelli anticorpali molto elevati contro il v. dei polli. Quindi evoca risp immune.

Poi si sono introdotti i 3 geni in 3 punti diversi del v. vaccinico per vaccinare i polli (viene scaldato). Quindi è stato creato un virus ricombinante, un nuovo vaccino ricombinante!!!

Questa metodologia era già stata utilizzata per inserire alcuni geni del v. della rabbia in questo v. dei polli; bocconi contenenti questo v. ingenerizzato con proteine della rabbia, erano stati gettati nei boschi. Le volpi mangiavano questi bocconi e il v. penetrava nell'animale. Le volpi erano così protette dal v. della rabbia; esaminando il loro sangue, si trovavano gli anticorpi. (le volpi sono il veicolo maggiore del v. della rabbia).

Il problema è: ma c'è omologia tra fare il v. del vaiolo, e questi geni che sono derivanti dal v. vaccinico?

Si sono messe a confronto le sequenze geniche di quei 3 geni, x vedere le differenze tra il v. del vaiolo (quello che causa il vaiolo nell'uomo) e il corrispettivo gene che protegge dal vaiolo (il virus vaccinico). Le differenze tra le 2 sequenze amminoacidiche sono 14 mutazioni. C'è un'entità del 94% per A33R, del 93% per B5R, e del 99% per L1R.

Quindi v. vaccinico e v. del vaiolo hanno questi 3 geni praticamente uguali, pertanto quel gene può evocare un anticorpo in grado di bloccare il v. del vaiolo.

E' possibile utilizzare poxvirus come vaccino per controllare il vaiolo senza usare il virus vaccinico.

- Vaccino anti vaiolo non necessità di una catena del freddo; presenta molti vantaggi tra cui quello di essere particolarmente termostabile.

C'è la necessità x alcuni tipi di microrganismi di essere mantenuti, x rimanere vivi, a T estremamente basse (-80° _ghiaccio secco_ -180° _azoto liquido_).

Se venissero tenuti a T più alte perderebbero la loro attività. Per il virus vaccinico da utilizzare contro il vaiolo la catena del freddo non è necessaria. Basta tenerlo in frigorifero.

- Sulle scimmie era stata fatta una sperimentazione x verificare l'efficacia di vaccini antivaiolosi. Su alcune è stato inoculato il classico virus vaccinico, e su altre è stato inoculato il ceppo attenuato. Quando questi animali sono stati inoculati con il vaccinico e poi sono stati infettati col virus del vaiolo delle scimmie, questi animali risultavano protetti, sia che venissero vaccinati col vaccinico, che con il ceppo attenuato.

Cosa succede se diamo lo stesso tipo di vaccinazione ad animali immunodepressi, esempio macachi con l'AIDS? Questi macachi sono stati vaccinati col vaccinico o con il ceppo attenuato. Quando venivano vaccinati col ceppo originale non erano protetti, si ammalavano della patologia; quando invece venivano vaccinati con quello attenuato erano protetti.

Quindi quelli attenuati possono venire somministrati, proprio xchè attenuati anche a soggetti parzialmente immunodepressi (cioè con num di linfociti basso, c'è comunque una certa risposta immune). Questo è il vantaggio del virus vaccinico attenuato!!!

Non si potrà comunque usare su persone leucemiche o sotto trattamento con farmaci immuno depressori, cioè persone immunodepresse totalmente



Illustrazione 69: Bambino affetto da parotite

Parotite epidemica

Più correttamente definita epidemica, perchè si può avere parotite anche per la presenza di piccoli calcoli che si formano nella parotide.

“parotite” in se indica infiammazione della parotidi.

Invece la parotite epidemica è del tipo infettivo. E' molto contagiosa, di solito ad andamento benigno, e colpisce solo l'uomo.

Il virus responsabile è un paramixovirus, cioè un virus parainfluenzale, ed è molto simile al v. del morbillo. La gravità dell'infezione parotidica sta nelle sue complicazioni; poco frequenti quando la malattia colpisce i bambini, e molto frequenti se adulti. Le complicazioni sono di solito a carico degli organi riproduttivi.

Paramixovirus

- unica catena di RNA ss (elica singola), genoma continuo non segmentato
- 2 glicoproteine sulla superficie: **F** proteina della fusione, **H** emoagglutinina (così esiste solo nel v. del morbillo, **HN** emoagglutinina/neuraminidasi proteina di fusione nel paramixovirus (nel v. influenzale H ed N sono separate)
- replicazione citoplasmatica, con formazione di sinciziosi causati dalla F; cioè agglomerati cellulari che mettono insieme la membrane ma mantengono separati i vari nuclei
- virus envelope: membrana esterna fosfolipidica, nucleoproteine all'interno associate all'RNA. E' quindi etere sensibile, cioè, se trattato con etere perde la capacità infettiva, xchè l'etere estrae la componente lipidica.
- dimensioni: 150/200 nm, detto polimorfo
- contiene anche emolisina, non presente nel virus, ma codificata dal genoma del virus; viene prodotta e poi rilasciata nello spazio extracellulare. Quindi non è una proteina strutturale del virus.
- unico tipo serologico: c'è un unico vaccino estremamente efficace, usato in tutto il mondo

Andamento clinico

Ha un periodo di incubazione molto lungo, 10/15 giorni, a volte 20, e dopo questo periodo in cui non c'è sintomatologia, improvvisamente sale la febbre (anche alta) e si ha tumefazione delle gh. parotidi, non suppurativa (non c'è pus), ma semplicemente si ingrossano. L'ingrossamento può essere mono o bilaterale (quasi sempre bi).

Il virus penetra attraverso l'orofaringe dalla bocca attraverso il dotto di Stensen, risale, si moltiplica nelle cellule epiteliali del dotto e poi infetta le parotidi. Da qui, visto che sono riccamente vascolarizzate, passa nel sangue e da lì a viremia generalizzata. Dopo circa 10 giorni si ha scomparsa graduale della febbre e si guarisce.

La fase di ingrossamento è una fase dolorosa, qualsiasi movimento stimola il dolore.

La patologia in sé non è grave e in genere la contraggono i bambini.

Complicazioni

orchite: atrofia testicolare e sterilità

ovarite: atrofia delle ovaie e sterilità

mieliti, neuriti, encefaliti

Perché il virus dia questo genere di complicazioni non è ancora chiaro.

Parotite epidemica: conseguenze dell'infezione

- Immunità: duratura; superata la malattia non ci si riammala più, anche se più del 40% delle parotiti decorre in modo silente si ha ingrossamento ma non come l'immagine del bambino che ha fatto vedere.
- Origine: è solitamente quindi l'origine è solo da soggetti ammalati o convalescenti
- Trasmissione: x via orale o contagio diretto (bacio)
- Eliminazione: con la saliva o con le urine soprattutto se c'è risentimento a livello genitale
- Epidemiologia (cioè come si presenta): con più soggetti che presentano i sintomi a distanza di tempo l'uno dall'altro. Sono epidemie limitate, più frequenti nelle campagne, e in inverno o primavera. Il passaggio del virus è lento, essendo lungo il periodo di incubazione.
- Profilassi:

-denuncia obbligatoria; ci sono 30000 casi all'anno nonostante esista il vaccino

-isolamento; x 20 giorni dopo la scomparsa perché il virus rimane nell'orofaringe x circa 2 settimane

-diagnosi; il virus può essere isolato, dalla saliva (dove ce n'è di più) e dal sangue e poi coltivato su culture cellulari. E' facile effettuarla perché il v. possiede la proteina F

-identificazione; visto che anche altri v. possiedono i sincizi. Si usano anticorpi specifici che riconoscono il v. parotidico selettivamente e si possono utilizzare x verificare la capacità di inibire l'emoagglutinazione. Si prende il v. e lo si mette nel sangue, dopo aver aggiunto o meno un anticorpo specifico; se il v. è parotidico, nel sangue ci dovrebbero essere anticorpi che inibiscono l'emoagglutinazione. C'è anche la tecnica della fissazione del complemento, messo a punto x la sifilide.

-vaccinoprofilassi; con **v.vivo e attenuato**, basta una dose sotto cute per conferire immunità di 5/7 anni. L'immunità si prolunga x tutta la vita, perché il contatto col v. se si è stati vaccinati non fa altri che evocare risposta immune. Il vaccino viene spesso inoculato come vaccino associato con quello antirosolia e antimorbillo; anche se in alcune nazioni non c'è questo vaccino trivalente, devi farti 3 iniezioni.

Influenza

L'influenza si chiama così anche in inglese (o semplicemente flu) in quanto deriva dall'italiano "essere influenzati dalle stelle".

L'agente eziologico è un ortomixovirus. Ne esistono 3 ceppi: **A** e **B** colpiscono l'uomo, **C** gli animali. L'influenza è una patologia anche di altri mammiferi.

Ortomixovirus

- genoma: RNA ad elica singola (ss) a polarità negativa, cioè non funziona da messaggero; deve trasformarsi in positivo se vuole codificare le proteine. E' frammentato (segregato), composto da 13000 nucleotidi (HIV ne ha 10000, il vaccinico 280000). Non ha genoma unico. Nel tipo C ci sono 7 frammenti, in A e B 8.
- dimensioni: 80/20 nm
- simmetria elicoidale e dotato di envelope
- struttura: sulla superficie ci sono importanti recettori glicoproteici x il virus:

-emoagglutinina (HA): antigenica, media l'adesione del v. alla superficie della cellula.

-neuraminidasi (NA): enzima su acido sialico, rilascio di virioni dalla cellula, cioè è in grado dall'interno di uscire fuori dalla cellula, antigenica (induce risposta anticorpale protettiva)

Quindi entrambe essendo esposte evocano anticorpi, che si legano e il virus non riconosce più il recettore. I vaccini antinfluenzali non sono più costituiti come una volta da virus influenzale ucciso, sono costituiti dalla componente HA e NA isolata dal v. influenzale ucciso.

L'HA è più lunga dell'NA e protrude di più. Le 2 proteine sono infisse entro l'envelope del virus, e più internamente ci sono 2 proteine: m1 e m2 (m=membrana perché sono infisse nella membrana). Poi ci sono altre proteine interne che risultano associate ai frammenti del genoma (pb1, pb2,....).

Emoagglutinina: capace di agglutinare i globuli rossi. Quindi se ho il v. influenzale e lo metto con globuli rossi, dopo pochi minuti a T anche di 28-30° meglio 37°, vedo che i globuli rossi agglutinano; l'HA fa da ponte che li tiene uniti. Se invece aspetto 30 minuti il complesso non è più agglutinato. Il legame tra HA e il recettore (acido sialico) porta a modificazione conformazionale dell'HA, che si appiattisce e permette che al globulo rosso aderisca la NA. La NA è un enzima che taglia alla base l'acido sialico.... risultato: i globuli rossi si staccano. Quindi l'agglutinazione è mediata dall'HA, e la perdita dell'agglutinazione dalla NA.

Se prendo globuli rossi e virus influenzale e li metto insieme, aspetto che agglutinino, aspetto poi che disagglutinino x effetto della NA, dopo di che centrifugo, prendo il virus, che essendo più leggero rimane su, e aggiungo altri globuli rossi. Cosa succede? Riagglutinano o no? Sapendo che la NA taglia alla base l'acido sialico, il recettore del virus.

Risposta: quando al globulo rosso viene tagliato l'ac. sialico, l'attività dell'ac. sialico viene perduta, il taglio prevede la rimozione di quella porzione di NA che si è incaricata di effettuare questo taglio del virus. Però è un problema di dimensioni; se si prende un pallone aerostatico e gli si mettono vicino tante palline da tennis, il pallone può essere circondato da tutte le palline da tennis, ma ogni pallina interagisce col pallone solo per una piccola parte della superficie, tante palline ricoprono interamente il pallone.

Il virus, che è piccolissimo, ricopre interamente il globulo rosso ed elimina completamente da esso l'ac. sialico. In parte però anche lui perde l'ac. sialico perché l'attività del recettore è stata impegnata, ma non completamente. Solo dove ha toccato il globulo si è inattivato, ma dove non ha toccato è ancora efficiente. La pallina tocca il pallone solo per una piccola parte, quindi il pallone potrà essere ricoperto da tante palline.

Ci sarà emoagglutinazione ma l'efficacia sarà notevolmente ridotta!

Sono 2 proteine diverse; una è formata da 4 componenti (HA), l'altra è un trimero (NA). Sono proteine integrali di membrana, e il loro processo di glicosilazione avviene nel Golgi, dove vengono sintetizzate per poi essere trasportate separatamente a livello di membrana, e da lì il virus prolifererà successivamente.

Variabilità genetica

Abbiamo detto che il vaccino antiparotidico e antimorbillo è universale. Non è lo stesso per l'influenza; il vaccino antinfluenzale viene rinnovato ogni anno, perché esiste una variabilità genetica nella popolazione del virus influenzale. Questa variabilità è di 2 tipi:

- antigenic drift
- antigenic shift

La variabilità è dovuta al fatto che il genoma del virus è segregato; la segmentazione fa sì che, non soltanto i virus influenzali mutino loro stessi modificando la loro sequenza genetica attraverso mutazioni nella loro sequenza dei singoli segmenti (una mutazione in uno dei segmenti cambia le caratteristiche del virus), ma esiste anche la possibilità che 2 virus influenzali diversi tra loro, che infettano lo stesso ospite, rimescolino il loro genoma. Cioè il virus A con i suoi 8 segmenti, e il virus B con i suoi 8, replicando nella stessa cellula possano scambiarsi alcuni di questi segmenti (riassortimento genico).

L'antigenic drift interessa v. influenzale di tipo A e B (quindi umani); consiste nell'accumulo progressivo di piccole mutazioni genetiche, in molti casi silenti, perché riguardano x esempio soltanto una delle 3 basi di un codone. Se una mutazione interessa una di queste 3 basi ma l'amminoacido è lo stesso, la mutazione avverrà ma il risultato biologico, fisiologico non cambia, perché la proteina sarà la stessa.

Ci possono essere invece delle mutazioni nella sequenza nucleotidica che conducono ad un AA diverso. Se l'AA è diverso anche la proteina sarà diversa, e pertanto anche la risposta immune e la biologicità del virus. Quindi l'antigenic drift è il risultato di mutazioni naturali del v. influenzale; mutazioni che avvengono ogni anno e che giustificano il fatto che i virus influenzali sono sempre diversi ogni anno, e sono anche diversi da regione a regione e da nazione a nazione, e ciò avviene alla fine del periodo in cui il v. influenzale circola.

I virus in Italia arrivano da oriente e vanno verso occidente. I v. che sono stati isolati in oriente, a Mosca a Singapore ad Hong Kong dove ci sono stazioni di isolamento dei virus (verso agosto), quando arrivano da noi sono ancora praticamente uguali, con qualche piccola mutazione, ma quando arriva la fine dell'inverno sono già mutati.

Conseguenze: produce delle mutazioni parziali del genoma del virus, tanto che il v. ha la stessa capacità di infezione, e non da dei..... influenzali virali.

L'antigenic shift interessa solo il tipo di virus A, e consiste in un riassorbimento genico; cioè 2 virus possono presentare uno shift antigenico quando replicano nello stesso ospite e nella stessa cellula! Solo nella stessa cellula possono rimescolare il loro genoma. Non è mai stato isolato un v. influenzale con 2 volte lo stesso segmento; il seg. numero 1 del

v.A può cambiarsi col seg. numero 1 del v.B. Ma il seg.1 del v.A non può mettersi accanto all'1 del B. Quindi solo scambio di questi segmenti.

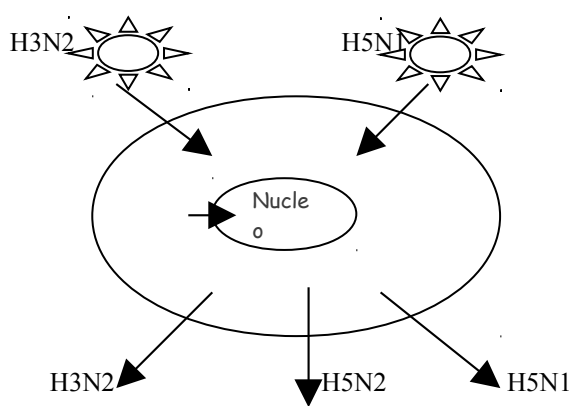
Conseguenze: conduce alla comparsa di nuovi ceppi che possono avere una gravità molto più elevata.

Il fenomeno dell'antigenic drift avviene annualmente, e questo giustifica il fatto che dobbiamo preparare un ceppo vaccinale nuovo per adeguarci a queste piccole mutazioni; mentre l'antigenic shift avviene di solito ad intervalli di 2 o 3 decenni. Il primo di cui conosciamo bene molte cose, anche il tipo di virus, è avvenuto nel 1918, la Spagnola, che ha portato a circa 20 milioni di morti (da 20 a 50), sicuramente 20 milioni da virus influenzale, probabilmente 50 milioni da patologie che si sono sovrapposte all'infezione dal v. influenzale. (nel 1918 è finita la prima guerra mondiale e le condizioni igieniche e di salute nutrizionale erano decadute).

Riassortimento genico

La comparsa di nuovi ceppi è data dall'riassortimento genico mentre piccole mutazioni puntiformi, in alcuni degli 8 segmenti dei ceppi A e B, giustificano le piccole differenze che si presentano ogni anno dando luogo a nuovi ceppi influenzali. Le piccole modificazioni puntiformi non danno luogo a pandemie al contrario del riassortimento genico; la pandemia è lo scambio di alcuni di segmenti quando due virus diversi infettano la stessa cellula/ospite.

Esempio di genetic drift



I due ceppi, H3N2 e H5N1, che infettano la stessa cellula, scambiando alcuni segmenti, daranno luogo, accanto ai due virus parentali (H3N2 e H5N1), al ceppo dovuto al riassortimento genico (H5N2) ovvero geneticamente modificato.

Il riassortimento genico è alla base delle pandemie cioè di quelle manifestazioni gravi che si verificano ciclicamente ogni 25-30 anni da quando è stato isolato il primo ceppo del virus dell'influenza cioè la cosiddetta spagnola del 1918.

I virus che infettano l'uomo sono tutti di origine animale e più precisamente l'origine dell'origine è rappresentata dal virus degli uccelli come anatre, oche,..... che possono infettare o direttamente l'uomo, con una frequenza relativamente bassa, o infettare un ospite intermedio, più frequentemente, come il maiale.

Il maiale viene considerato l'ospite intermedio per una ragione di tipo locale; i nuovi virus che infettano l'uomo derivano dall'est e dal sud-est asiatico in quanto gli animali sono spesso allevati insieme come le oche, le galline, anatre ed il maiale e pertanto lo scambio di virus è relativamente facile e naturalmente anche con l'uomo che li accudisce.

Un esempio di genetic shift è l'anatra con il ceppo H1N1 e l'uomo con H3N2, dove ciascun virus è formato da 8 segmenti quali

Anatra: D1,D2,D3,D4,D5,D6,D7,D8

Uomo: H1,H2,H3,H4,H5,H6,H7,H8

Questi due virus possono infettare contemporaneamente il maiale, in quanto suscettibile ad entrambi, e si avrà come risultato un nuovo virus ricombinante che in seguito infetterà l'uomo.

Come avviene l'infezione?

L'infezione avviene in modo relativamente semplice attraverso un processo di endocitosi, dove, le molecole di superficie interagiscono con i recettori, che si trovano sulla cellula, e poi l'interazione tra questo ed il ligando stimola un processo intracellulare che porta all'invaginazione della membrana, dove questa farà capovolgere il virus formando un endosoma (vacuolo endocitotico) che permetterà l'entrata del virus. Il virus influenzale non penetra per fusione ma per endocitosi. Il processo di fusione avviene però nella fase di svestimento nel citoplasma, dove il virus penetra avvolto dalla membrana cellulare sotto forma di endosoma e va a localizzarsi a livello del sistema lisosomiale dove l'imoglutulina interagisce con la membrana del vacuolo endocitotico e successivamente del sistema lisosomiale. A questo punto si ha una modificazione conformazionale che porta al processo di fusione tra l'endovirale?? della cellula

e la membrana del vacuolo endocitotico. Si ha così la liberazione del citoplasma nel contenuto genetico virale che poi migrerà nel nucleo.

Quali sono le pandemie causate dal riarrangiamento genetico?

1918 compare il virus H1N1 (primo ceppo isolato)

1957 compare il virus H2N2

1968 compare il virus H3N2

1977 compare il virus H1N1

Attualmente circolano soprattutto H1N1 e H3N2

Queste date corrispondono alle pandemie più importanti: la spagnola, l'asiatica...

Le incidenze e le diagnosi

Per poter preparare dei modelli immunologici di protezione, i vaccini, bisogna eseguire una sorveglianza ed una verifica delle incidenze dei vari ceppi: numero di casi diagnosticati ogni 100 assistiti per settimana, questo per verificare l'efficacia della vaccinazione e questi dati si riferiscono sempre a nuovi casi insorti durante la settimana di riferimento.

La profilassi

La patologia può essere prevenuta mediante il **vaccino**.

I vaccini devono essere annualmente aggiornati ed è ormai chiaro che ogni infezione influenzale si porta sempre delle code, ovvero accanto ai nuovi virus che compaiono all'inizio dell'inverno ci sono sempre quelli delle annate precedenti anche se meno importanti dal punto di vista patologico, in quanto la maggior parte della persone ha già sviluppato degli anticorpi verso i virus dell'annata precedente.

Il vaccino somministrato non è costituito solo da un unico ceppo, quello che causerà l'influenza in quell'anno, ma è associato ad altri due ceppi ovvero uno dell'anno precedente ed uno dell'anno prima ancora ed in alcuni casi si usano i ceppi che si ritengono più pericolosi e che possono riemergere.

Il vaccino è raccomandato ogni anno soprattutto a persone che hanno problemi particolari come problemi respiratori, cardiaci, a persone con più di 65 anni e per i bambini piccoli che soffrono di bronchiti... per queste categorie è gratuito

Il **vaccino classico** è costituito dal virus intero inattivato (formalina) ma questo vaccino ha sempre dato degli effetti collaterali come febbre, malessere ed anche dolori muscolari. Gli effetti collaterali sono dovuti all'uso del virus vivo intero pur sapendo che la componente che dà effetti indesiderati sono le proteine esterne che definiscono il virus ovvero H e N. Queste proteine si possono estrarre trattando il virus ottenuto con dei detergenti particolari non ionici che spulciano il virus e con opportuni trattamenti si possono separare H ed N, avendo come risultato la scomparsa degli effetti collaterali. Questo tipo di vaccino viene chiamato **vaccino a subunità** dove appunto HA ed NA sono state purificate. Attraverso studi è stato prodotto anche un **vaccino split** ottenuto trattando il virus con etere e detergenti.

Il vaccino è lo stesso in tutte le nazioni e viene allestito in laboratori specializzati in isolamento e identificazione dei nuovi virus influenzali dove le variabili virali A e B vengono individuate individualmente attraverso studi epidemiologici a Tokyo e Mosca.

Il vaccino potrebbe essere prodotto in colture cellulari ma dato che costa molto e la quantità di virus prodotto è comunque limitata viene utilizzato un metodo più economico che è quello di far crescere il virus su uova embrionate derivate da galline definite esseri F, ovvero totalmente prive di agenti patogeni. Ci sono 2 tipi di uova una è SPARTAS e l'altra è UOMAN, queste uova sono tutte fecondate dove il virus si replica nel liquido amniotico dove dopo alcuni giorni dall'inoculo viene aspirato meccanicamente ed il virus viene ucciso e successivamente purificato se il vaccino è a subunità. Si ottiene così un vaccino altamente specifico.

Da un uovo si ottengono 3 dosi vaccinali, ed una dose contiene 10^{10} virioni/0.5ml che rappresenta il corrispettivo proteico ed il tipo di risposta quando si inocula un virus intero è di tipo umorale. Il problema è rappresentato dalla modalità con cui si prepara questo vaccino, ovvero, le uova contengono l'albumina di uovo che rappresenta una componente altamente immunogenica quando entrano in una specie diversa da quella di origine e quindi purtroppo è sempre presente nei vaccini ma è maggiore nei vaccini costituiti da virus intatto rispetto a quello contenente subunità. Questa componente può dare effetti collaterali anche molto gravi in poco tempo dopo il vaccino, 5-10min, in quanto in alcune persone sensibilizzate si può avere l'anafilassi, risposta improvvisa come blocco della respirazione ed anche morte.

La **produzione del virus dell'influenza di tipo A attenuato a scopo vaccinale**, si sfrutta il riarrangiamento genico tra un virone altamente patogeno contro cui si vuole vaccinare ed un virone a virulenza attenuata.

Questo genere di procedimento, per preparare un vaccino contro un virus emergente altamente patogeno, è stato utilizzato per il ceppo H5N1. Questo ceppo da una mortalità del 58% ed il vaccino lo si è cercato di preparare ancor prima che cominciasse diffondersi per evitare un eventuale pandemia. Il fatto che non si sia ancora diffuso ulteriormente è dato dal fatto che il virus è passato direttamente dall'uccello all'uomo ma non è mai avvenuto il passaggio da uomo a uomo. La paura di un eventuale diffusione mondiale del virus non è ancora scartata in quanto i virus fanno molto in fretta ad adattarsi.

Influenza

Spesso il termine influenza viene impropriamente utilizzato nell'80% circa dei casi, in quanto nella maggior parte delle volte si tratta di virus parainfluenzali ovvero virus che assomigliano a quello dell'influenza ma molto più blandi, per poter parlare d'influenza bisogna avere oltre all'innalzamento della febbre anche altri sintomi. Per verificare se si è affetti da influenza bisogna eseguire degli esami biologici per controllare che vi siano anticorpi per uno dei tre tipi di solito A e B.

Nuova emergenza di Reemerging Viruses

Nel campo influenzale vi è un'emergenza di nuovi microrganismi di forma virale:

H5N1 e sottotipi

Saars

Crimean-Congo Virus

Smallpox e ceppi simili a quelli del vaiolo

Per le malattie batteriche si hanno gli antibiotici e si sanno controllare mentre per le malattie virali non si sa ancora cosa fare ma solo isolare gli infettati e chiudere le fonti di contagio. La saars fatta è scomparsa dopo 8 mesi in quanto sono stati isolati i casi e le persone venute a contatto con questi, bloccando il rischio di pandemia.

Meningite da meningococco

La meningite da meningococco è causata da dei cocci **gram negativi** a forma di chicco di caffè pleiomorfi dal diametro di 1µm, le **Neisseria meningitidis**.

Esistono 12 diversi serotipi in base a differenze nella capsula, ma i più frequenti sono A, B e C. La diagnosi richiede l'individuazione del patogeno nel **liquor** cefalorachidiano (che diventa **torbido**). La trasmissione è aerogena, non ci sono serbatoi animali. La letalità nei casi non trattati raggiunge 85% mentre con adeguato trattamento antibiotico scende all'1%.

Per la terapia sono indicati le penicilline ed i sulfamidici, in caso di resistenza o reazione allergica si impiegano cefalosporine. Il vaccino esiste per i serotipi A e C, non per quello B, l'immunizzazione è fatta con un polisaccaride derivato dalla capsula ma l'immunizzazione è di breve durata: non più di 2 anni, la profilassi pertanto è consigliata solo a chi si trova a stretto contatto con individui malati, come i familiari.

Pertosse

L'agente eziologico della pertosse, una patologia solo umana, è la **Bordetella Pertussis**. Il batterio, trasmesso tramite droplets, è capace di dare necrosi delle cellule epiteliali e subepiteliali delle vie aeree inferiori, ma generalmente solo alle cellule dell'**epitelio cigliato**.

La *B. Pertussis* è un batterio piccolo, coccoide, **Gram negativo** e **non motile**. I fattori di patogenicità di questo batterio contemplano:

- **fattori di adesione**, i più importanti sono emoagglutinina filamentosa e tossina pertussica.
- **esotossine**, tossina pertussica una AB esotossina i cui meccanismo d'azione prevede l'intervento di Gproteins e provoca aumento dell'AMP ciclico intracellulare.
- **endotossina**, oltre all'LPS degli Gram negativi che stimola le citochine c'è la citotossina tracheale, formata da un frammento murico che causa necrosi delle cellule epiteliali cigliate

Decorso clinico

Il decorso clinico è caratterizzato da diverse fasi, che seguono un periodo di incubazione variabile da 10 a 14 giorni:

- fase **catarrale**, 1,2 settimane
- fase **parossistica**, 2-3 settimane con tosse
- fase **convalescente**, anche diverse settimane

Sono relativamente comuni complicanze in polmonite per il sopraggiungere di una infezione secondaria. La letalità è significativa (1-2%) solo per bambini nel primo anno di vita, l'infezione conferisce **immunità permanente**, mentre la vaccinazione non è altrettanto efficace.

L'accertamento diagnostico avviene con l'isolamento del batterio durante la fase catarrale. La terapia antibiotica ha ragion d'essere solo nella fase catarrale e nella prima parte della fase parossistica, una volta che le tossine si sono legate ai loro recettori, invece, diventa inutile. Per la prevenzione si impiegava un vaccino 'intero' mentre ora si è passati a vaccini acellulari.

Malattie a trasmissione sessuale

Sifilide

La sifilide è una malattia sessuale a contagio diretto.

E' una patologia ad andamento evolutivo, cronico, causata dal microrganismo *Treponema pallidum*, agente eziologico della malattia, chiamato così perché è difficilmente colorabile. E' una spirocheta che si muove in modo strano.

È un batterio **Gram-** visibile in campo oscuro o dopo colorazione con AgNO₃ nero. Il microrganismo ha le dimensioni di **5 micron**, caratterizzato dalla presenza di 6/12 spire, per cui il batterio si può classificare in base al numero di spire presenti; è privo di appendici motorie, quindi di flagelli, ma ciò nonostante è dotato di capacità motorie, in quanto è dotato di una struttura fibrillare sottoparietale, chiamata **endoflagelli**, localizzati nel periplasma, che è lo spazio tra la parete cellulare e la membrana cellulare. Gli endoflagelli permettono il movimento rotatorio soprattutto: la contrazione di queste microfibrille rende possibile l'allungamento o l'accorciamento del corpo dell'organismo.

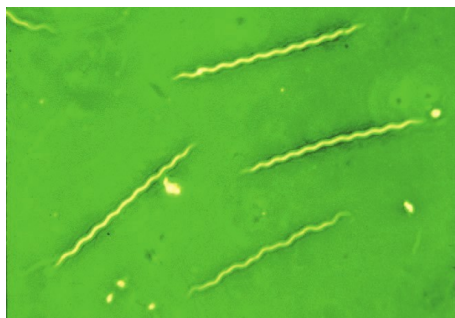


Illustrazione 71: *T. Pallidum*, si notano le spire

Del *treponema* abbiamo poche informazioni dal punto di vista immunologico. Ciò è dovuto al fatto che **non è coltivabile** su terreni sintetici, ma solo in vivo: cresce infatti solo se inoculato in altri animali, come per esempio nei testicoli dei conigli. E' estremamente **labile**, infatti ha la caratteristica di sopravvivere soltanto qualche giorno ad una temperatura

di 25°C e in terreni di coltura, sopravvive un po' di più in ambiente favorevole come il sangue; mentre è conservabile per anni a -70°C



Illustrazione 70: Lesioni palmari da fase secondaria

Patogenicità

La patologia si presenta inizialmente come una lesione a livello mucosale (in quanto il batterio non è in grado di passare le cute): si parla di sifiloma quando avviene l'adesione alla mucosa da parte del batterio a livello delle mucose oro-genitali o anali.

L'uomo è l'animale più suscettibile alla malattia, nel coniglio, come nella scimmia si osserva un andamento cronico, con analogia alla malattia che si sviluppa nell'uomo e perciò rappresenta l'unico animale in cui si può coltivare il batterio; il topo è invece poco suscettibile.

Conosciamo poco la risposta immune di questo organismo, sia a causa della difficoltà di isolarlo sia a causa della scarsa antigenicità, in quanto presenta una scarsa quantità di proteine presenti nella parete.

Dal punto di vista patologico la sifilide può essere catalogata in due forme:

- congenita**: si presenta fin dalla nascita, causata da un'infezione placentare
- acquisita**: si contrae attraverso un rapporto sessuale infetto

Decorso clinico della forma acquisita

Il decorso clinico della patologia può essere esemplificato individuando 4 stadi: bisogna tener presente che la sifilide è una malattia in cui non si individua un esatto quadro clinico, ma tende a cronicizzarsi a partire dal secondo stadio della patologia.

1° STADIO: è il periodo subito dopo l'**incubazione**, che avviene in 1 o al massimo 2 giorni; questa prima fase ha una durata di 1/2 settimana in cui si verifica un'ulcera, detta **ulcera dura**, il cui fondo è giallognolo, dovuta al **sifiloma** iniziale, accompagnata da un'infiltrazione di cellule del sistema immunocompetente, soprattutto macrofagi, e, a volte, da linfadenite, cioè ingrossamento dei linfonodi inguinali se l'infezione avviene a livello genitale. La linfadenite è dovuta al fatto che i macrofagi migrano verso i linfonodi per stimolare la maturazione e il rilascio di cellule linfonodiche: la linfadenite è perciò una risposta dei linfonodi all'agente estraneo. Queste ulcere passano spesso inosservate e nel 50% dei casi guariscono spontaneamente; se non viene fatto alcun trattamento si passa al

2° STADIO: ha una durata di 2/3 mesi ed è dovuta al passaggio del microrganismo dall'ulcera al torrente ematico e una volta passato nel sangue si moltiplica. Si parla di **fase ematica o batterioemia**. La quantità del batterio è comunque

bassa, ma è sufficiente a scatenare una risposta immune che si osserva con la **comparsa di roseole e papule** soprattutto sul tronco e poi successivamente sugli arti e sulle mucose. Altre sintomatologie sono l'ingrossamento epatico, febbre e nefrite. Del 50% di persone che procedono nella malattia, il 25% guariscono spontaneamente al secondo stadio.

3°STADIO: è lo stadio della *cronicizzazione* che può durare dai sei mesi ad anni. È caratterizzato dalla comparsa di **fenomeni degenerativi** soprattutto a livello del sistema cardiovascolare, nervoso, polmonare, articolare, ma anche a livello dello scheletro osseo, dove si formano delle strutture sottocutanee che modificano la conformazione dello scheletro, portando a paralisi degli arti e poi a morte.

Decorso clinico della forma congenita o transplacentale

È causata dal passaggio del microrganismo dalla madre al feto; il 50% dei feti muore a livello intra-uterino, per cui la donna partorisce il feto morto. Nel restante 50% il feto riesce a sopravvivere ma presenta già la patologia con segni clinici caratteristici del secondo stadio e in breve tempo passa al terzo stadio. Si osserva perciò una sifilide generalizzata, caratterizzata da lesioni scheletriche, cheratiti.

La forma congenita porta a morte quasi nel 70% dei casi.

TERAPIA

La malattia ha una veloce capacità di adattarsi ai farmaci:

- sulfamidici (il batterio è resistente dal 1940)
- pennicillina (tutti i ceppi diventano resistenti a partire dal 1976)
- pennicillina associata alla prebenecina
- rifampicina, più efficace è il farmaco tutt'ora utilizzato: i casi di sifilide sono anche diminuiti.

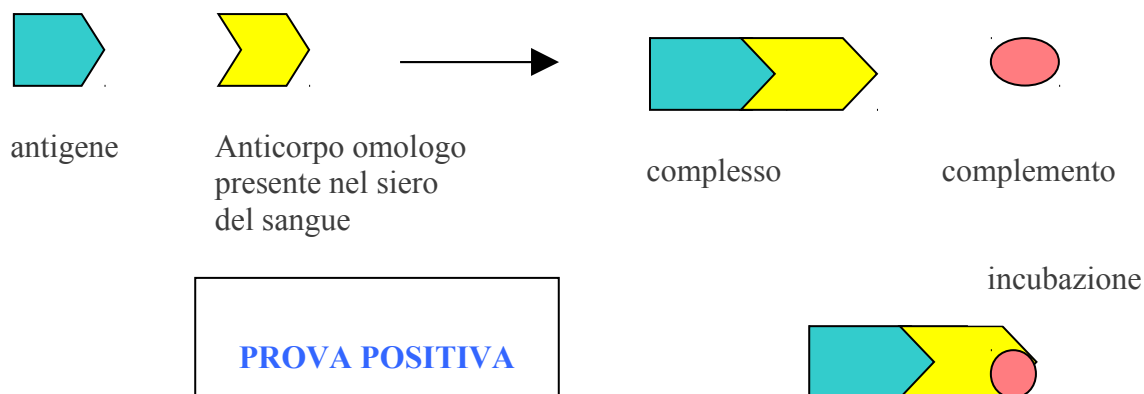
Reazione di Wasserman

È una reazione immunologica realizzata da Wasserman negli anni '20, definita anche "Fissazione o Deviazione del complemento": è un test utilizzato per verificare se il paziente è più o meno affetto da sifilide. Non è un test specifico solo per la sifilide, ma è stata utilizzata anche per altre malattie, come il morbillo.

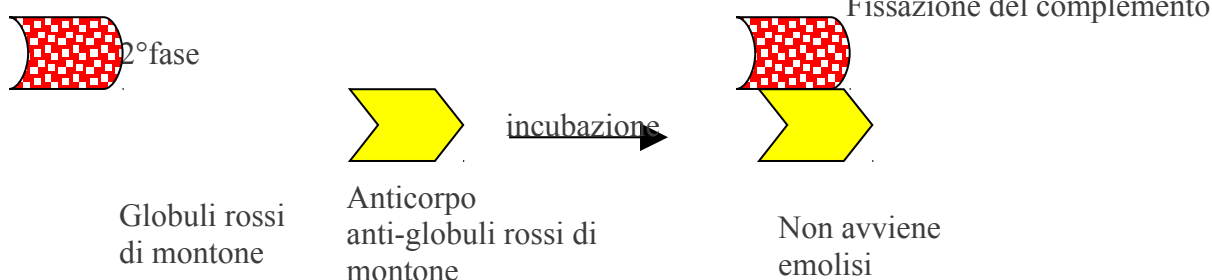
È una reazione che si fa sul siero per verificare se l'organismo ha anticorpi per il *treponema pallidum* e quindi se è venuto a contatto con l'agente eziologico della sifilide.

È una reazione caratterizzata da due fasi

1°fase



2°fase



In una provetta si mette del siero della persona sottoposta ad analisi che potrebbe contenere anticorpi della sifilide, che si dovrebbero legare all'antigene. L'antigene dovrebbe essere rappresentato dalle proteine del treponema, ma in realtà si inserisce la cardiolipina, che si ricava dal cuore del bue, questo perché il *T. Pallidum* è difficilmente isolabile.

Se nel siero sono presenti anticorpi del batterio, la cardiolipina si lega ad essi e si forma il complesso anticorpo-antigene. Successivamente si aggiunge una sostanza estranea, chiamata **complemento**, che è una frazione di siero di tipo eterologo appartenente alla cavia.

La seconda fase è necessaria perché il complesso anticorpo- cardiolipina è un complesso invisibile: questa fase è, perciò, una reazione rivelatrice che mi permette di vedere se la prima reazione è avvenuta o meno. Consiste nell'utilizzare globuli rossi di montone e siero o anticorpi anti-globuli rossi di montone: questi si legheranno sicuramente ai globuli rossi di montone per la reazione antigene-anticorpo. Questa reazione tra antigene e anticorpo comporta la lisi del globulo rosso, con rilascio dell'emoglobina che per il suo basso peso molecolare si va a localizzare sulla parte alta della soluzione. Affinché la reazione avvenga e quindi la seconda fase abbia effetto è necessario il complemento: se il complemento è stato utilizzato dalla prima reazione, allora non potrà essere utilizzato dalla reazione rivelatrice che perciò non si realizza. Questo significa che la prima reazione è avvenuta, cioè si è formato il complesso tra l'antigene e l'anticorpo: la persona ha la sifilide o meglio ha gli anticorpi per la sifilide e quindi i globuli rossi di montone non vengono utilizzati, si depositano sul fondo, perché non è avvenuta la emolisi e quindi non c'è rilascio dell'emoglobina. Ho così una soluzione limpida.

Il complemento viene fissato -dal complesso anticorpo-antigene se ci sono gli anticorpi della sifilide quindi non avviene emolisi dei globuli rossi (si verifica solo la prima reazione): ho una soluzione limpida;

-dal complesso anticorpo-globuli rossi montone se non ci sono gli anticorpi per la sifilide nel siero del paziente e quindi avviene emolisi dei globuli rossi (si verifica solo la seconda reazione): ho una soluzione rossa.

La quantità adeguata di complemento che bisogna aggiungere al siero per titolare è la **quantità minima** per far avvenire l'emolisi dei globuli rossi e questa quantità è determinata da quanto complesso antigene-anticorpo ho nella provetta. Per titolare il complemento prendo i globuli rossi di montone e anti-globuli rossi in stesse quantità, poi aggiungo il siero di cavia (quindi il complemento) ed osservo la lisi dei globuli rossi: diluendo il siero di cavia ottenendo la quantità adeguata del complemento da utilizzare. Il siero della persona infettata deve però essere complementato, cioè si deve annullare la componente complementare contenuta al suo interno: scaldo a 56°C il siero, in modo che il complemento viene inattivato, mentre gli anticorpi non vengono eliminati.

Gonorrrea o blenorragia

Deve il suo nome al greco (gono, seme e rhein, scorrere)

È una patologia a trasmissione sessuale, molto più grave della sifilide. È causata dalla *neisseria gonorrhoeae*, suo agente eziologico: è una patologia infettiva a **sede uro-genitale** (viene coinvolto il sistema escretore), ma talora anche extragenitale, come a livello degli occhi o anche setticemica, nei casi gravi, dando disfunzione del microrganismo del torrente circolatorio. È un batterio **diplococco GRAN-** negativo, caratterizzato dall'essere localizzato nei linfociti e leucociti, spesso intracellulare. È un batterio **aerobio, immobile**, dalla forma di chicco di caffè, dotato da una **capsula** formata da acido ialuronico.

È una malattia a trasmissione sessuale, ma il quadro clinico non interessa gli organi genitali, ma interessa l'uretra: infatti si parla di **uretrite gonococcica**. L'uretrite è l'infiammazione dell'uretra, la parte terminale del sistema escretore che porta all'esterno l'urina. Il batterio si localizza sulle pareti dell'epitelio uretrale, ma dato che l'uretra è costantemente sottoposto a flussi di urina, il batterio deve ben aderire all'epitelio e questo è possibile grazie ai **pili comuni o pili di adesione**

Vengo coltivati in terreni di coltura all'agar di cioccolato, caratterizzata dalla presenza di sangue (l'emoglobina esce dai globuli rossi, cuoce e dà al terreno una colorazione caratteristica) a temperatura di 35°C (temperatura che deve essere inferiore ai 37°C, che è quella corporea): crescono velocemente in un tempo stimato tra 24/48 ore. Inoltre devo avere una atmosfera acida, cioè con CO₂ al 10%.

È un batterio in grado di **fermentare gli zuccheri**: il glucosio, il saccarosio, il lattosio, ma non il maltosio: su questa sua proprietà si può effettuare un test. Prendo la provetta, metto lo zucchero e poi inoculo il battere, si mette una carta velina di vetro: se c'è il battere, in presenza di glucosio, avviene la fermentazione, con produzione di acido, si solleva la carta velina e il terreno diventa da rosso (ph neutro) a giallo (ph acido).

Non è patogeno per gli animali da laboratorio.

Patogenicità

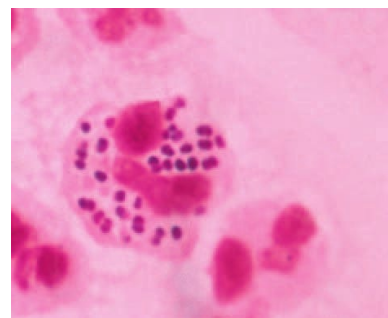


Illustrazione 73: In piccolo, più scuri, diplococchi di *Neisseria gonorrhoeae* (X 500)

La patogenicità è causata da un'endotossina che viene rilasciata dal microrganismo solo quando questo aggredisce. Il tempo di incubazione è breve: si aggira tra 2/3 giorni, massimo una settimana.

Il quadro clinico si definisce come uretrite anteriore acuta e si osserva dai 3 ai 7 giorni dopo il rapporto sessuale infetto. L'uretrite è accompagnata da secrezione uretrale purulenta giallo-verdastro, bruciore e dolori alla minzione uretrale. Il dolore si osserva quando l'urina passa attraverso l'uretra, ed è causato dal bruciore alle pareti del canale; invece nella cistite il dolore si verifica al termine della minzione, perché al termine della minzione le pareti della vescica si toccano.

Complicanze

Le complicanze sono la possibile sterilità dovuta

- nell'uomo a causa di complicanze che portano a prostatite, vescicolite, epididimite, fibrosi con stenosi uretrale (chiusura del canale uretrale) o possono essere colpiti i testicoli con morte degli spermatozoi;
- nella donna complicanze che colpiscono la vagina o la cervice causando vaginite, uretrite, salpingite o varite.

Epidemiologia

Patologia infettiva endemica a diffusione mondiale con episodi epidemici in collettività per cateteri o termometri infetti. È una malattia soltanto dell'uomo e la causa è il soggetto infetto. La propagazione avviene solo attraverso il contatto sessuale in quanto il gonococco è presente nel luogo in cui si instaura l'uretrite, cioè nel secreto prostatico e vaginale. Rimedi: uso di preservativi meccanici e nei neonati, che nascono da madri con questa patologia, si usano soluzioni contenenti penicillina.

Accertamento diagnostico

Si esegue un esame al microscopio dei secreti, in quanto contengono numerosi diplococchi che vengono riconosciuti dopo colorazione di Gram.

Il materiale può anche essere coltivato e in seguito al contatto con il dimetil-para-fenilen diammina (test dell'ossidasi) si osserva una colorazione rosso porpora delle colonie, inizialmente bianche.

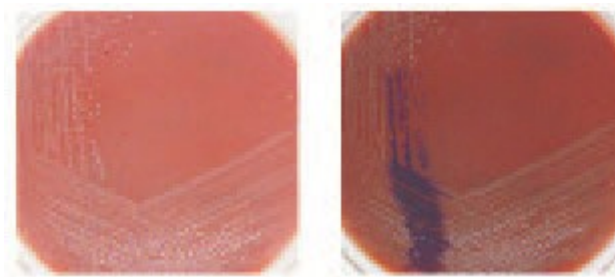


Illustrazione 74: Test dell'ossidasi in agar-cioccolato su N. gonorrhoeae. (sx prima dell'aggiunta di ossidasi).

Terapia

Molto simile a quella utilizzata per la sifilide:

- Sulfamidici (resistente dal 1940)
- Penicillina (resistente a partire dal 1976)
- penicillina accompagnata da prebenecina
- spectinomycin: 2 grammi intramuscolo: usata solo per la terapia anti-gonorrea
- cefalosporine, usati per i batteri che risultano essere resistenti alla spectinomycin

Papillomatosi

Esistono oltre 70 tipi di papilloma virus (HPV – human papilloma virus) alcuni provocano verruche, altri tumori benigni ed alcuni provocano il cancro della cervice uterina. A causa del loro tropismo questi batteri non possono essere cresciuti in coltura, fatto questo che ne ha complicato lo studio: solo da qualche anno, infatti, è disponibile un vaccino per i papillomavirus che causano il tumore dell'utero (tipi 6 e 11 in particolare).

I papillomavirus sono grandi 55nm, contengono 8mila bp in un genoma a DNA ds. Gli HPV infettano le cellule degli epiteli e delle mucose, e possono dare esito tumorale in seguito all'integrazione del proprio genoma con quello della cellula ospite. La trasmissione avviene per contatto diretto (le verruche sono piene di virus) anche nella stessa persona da un punto all'altro.



*Illustrazione 75:
Linfonodo ingrossato
in soggetto con
linfogranuloma
venereo*

Linfogranuloma venereo

Il linfogranuloma venereo è una malattia a trasmissione sessuale causata dalla *Chlamydia trachomatis* diffusa in tutto il mondo ma in particolare nelle regioni tropicali. Il decorso clinico prevede tre fasi:

- Ulcera sui genitali da pochi giorni a qualche settimana dopo l'infezione
- Infezione dei linfonodi e loro ingrossamento. Compaiono sintomi sistemici
- Se non trattata si trasforma in fibrosi

L'accertamento diagnostico avviene colorando le clamidi incluse nelle cellule infettate con soluzioni a base di iodio.

Epatite virale

L'epatite virale è causata, come dice il nome, da un virus della famiglia degli *Hepadnaviridae* (hepatitis dna virus). Come dice il nome hanno un genoma a DNA,

AIDS

È stata riconosciuta come patologia solo a partire dal 1981.

La patologia consiste in un'immunodeficienza: è causata dal virus **HIV**: *human immunodeficiency virus*. È un virus prettamente umano, anche se si osservano virus analoghi negli animali, soprattutto nei primati, bovini e gatti. Quello più simile all'uomo è il virus che si è sviluppato nei primati (scimpanzé): in verità esistono diversi tipi di questo virus a seconda della specie di primate. La particolarità è che il virus che infetta una determinata specie è totalmente incapace di infettare un'altra e differente specie. In realtà questa limitazione è abbastanza superabile: infatti il virus dell'aids nell'uomo è arrivato dalle scimmie, perciò questo è un virus proveniente dagli animali e che si è adattato a moltiplicarsi nell'uomo.

Ammonta quasi a 40 milioni le persone affette dall'aids: una percentuale rilevante è rappresentata dai bambini, inoltre il maggior numero di infezioni si verificano nei paesi sottosviluppati e in paesi musulmani.

Diffusione della patologia

La patologia ha colpito più di 50.000.000 di persone in Africa e continua a mantenere un livello di infezione estremamente elevato in particolare nei paesi poveri o sottosviluppati, cioè l'Africa sub-sahariana, il sud-est asiatico, l'India e la Cina sono le zone in cui questa patologia si sta diffondendo mentre in Europa e Nord America il numero di persone colpite rimane praticamente costante in quanto la terapia, che consiste in un cocktail di farmaci contro il virus, è in grado di cronicizzare la malattia senza portare più a morte come avveniva prima.

Storia

L'AIDS è una patologia che è stata riconosciuta nel 1980-1981, il virus è stato isolato due anni dopo, un anno dopo Luc Montagnier in Francia e Robert Gallo in USA hanno messo a punto un sistema per il rivelamento del virus. Questo dato è molto importante in quanto con la possibilità di verificare la presenza del virus è stato possibile verificarne la presenza nelle sacche di trasfusione in tutto il mondo. E così, per la prima volta si è potuto controllare se il sangue che veniva somministrato con la trasfusione poteva o meno essere vettore dell'HIV. Infatti anche se la patologia è stata introdotta nell'ambito delle patologie trasmesse sessualmente, questa patologia può anche essere trasmessa mediante il sangue o i suoi derivati.

Nel 1986 ci fu un accordo tra Francia e USA per stipulare una convenzione allo scopo di dividersi il brevetto e le royalty (ricavi economici) di questi test che sono stati diffusi in tutto il mondo.

In quel periodo si scoprì un altro dato importante cioè che non esisteva un unico virus che causava l'AIDS bensì due e precisamente il virus chiamato HIV1 e l'altro chiamato HIV2. Questi due virus non sono equamente distribuiti ma la grande prevalenza è soprattutto del ceppo1 mentre il ceppo2 è presente in individui già infettati dal ceppo1. Rari sono gli individui infettati solo dal ceppo2. Il ceppo2 è interessante perché differisce dal ceppo1 in quanto è più vicino geneticamente al virus dell'AIDS delle scimmie e rappresenta quasi sicuramente, dal punto di vista di omologia genetica, il punto di passaggio dal virus HIV della scimmia (SHIV) al virus dell'uomo. Tanto è vero che il virus HIV1 infetta l'uomo e causa patologia nell'uomo, mentre non causa patologia nella scimmia, invece il virus HIV2 causa patologia sia nell'uomo che nella scimmia e quindi l'HIV2 rappresenta il virus di passaggio dalla scimmia nell'uomo. In ultima analisi si può considerare questa patologia come una nuova patologia di origine animale attraverso la mutazione di un virus degli animali che sia passato all'uomo, questo è sicuramente avvenuto in Africa attraverso la trasmissione di sangue animale infetto.

Il virus HIV1 in origine non si chiamava così ma si chiamava HTLV1, questo vale anche per HIV2.

Erano stati chiamati così da R.Gallo, ma dopo l'accordo con la Francia si mantenne il termine HTLV1 e HTLV2 per i virus che causano leucemia e invece per il virus dell'AIDS si coniò la sigla HIV.

Per cui ci sono quattro virus della famiglia retroviridae: HTLV1 e HTLV2, che causano leucemia e linfomi, HIV1 e HIV2, che causano l'AIDS. Per le loro caratteristiche HTLV1 e HTLV2 sono stati ulteriormente denominati $\square$ retrovirus, HIV1 e HIV2 lentivirus perché danno una patologia ad evoluzione estremamente lenta, la sintomatologia è latente e compare anche dopo 5 o 10 anni dall'infezione, per cui, in questo periodo, le persone infettate possono diffondere il virus.

Genoma

Il genoma è ad RNA a polarità positiva, a elica singola. Le dimensioni sono di 100 nm di diametro, il virione è dotato di envelope (membrana derivata dalla cellula) che gli permette di stare nello spazio extracellulare. Il virus sta solo nello spazio tra le cellule, non esiste traccia di esso all'interno delle cellule perché si assembla a livello della membrana, infatti viene prodotto tramite gemmazione dalla cellula. Dopodiché il virus fuoriesce nello spazio extracellulare. Il core è di forma troncoconica.

L'HIV è l'unico virus che ha un genoma diploide cioè a due coppie del genoma: due catene identiche di RNA a catena singola. Ogni singola catena è composta da 9700 nucleotidi, quindi 10k bp.

Il genoma è costituito da tre porzioni geniche importanti:

- Porzioni geniche che codificano per le proteine che andranno a far parte della struttura finale del virus.
- Geni che codificano per proteine che avranno funzioni regolatorie (che regolano la produzione del virus stesso ovvero che regolano la cellula a produrre il virus)
- Geni regolatori non essenziali che hanno la funzione di modulare la produzione. Questa modulazione è importante in quanto permette, attraverso la regolazione della produzione del virus, di protrarre a lungo la produzione del virus da parte della cellula, in molti casi anche per tutta la vita della cellula.

I geni strutturali sono tre: ***gag, pol e env***.

Gag sintetizza le proteine per la produzione del core. *Gag* sta per group antigene o gruppo antigene specifico perché codifica per proteine che sono identiche per HIV1 e HIV2 e differenti da altri retrovirus.

Pol sta per polimerasi ed è il gene che codifica per tre funzioni ben distinte: polimerasi RT (cioè retroscrittasi), integrasi IN, proteasi PR. Quindi il gene *pol* codifica per un'attività retrotrascrittasi, un'attività integrasica e un'attività proteasica.

L'attività polimerasica ha la funzione di trasformare il genoma del virus che è ad RNA in una copia di DNA. Questo virus ha dato il nome alla categoria di virus, infatti si chiamano retrovirus perché hanno la retrotrascrittasi. L'integrasi è un enzima che taglia il DNA cellulare e poi cuce il genoma virale nel genoma della cellula. Lo integra in modo permanente per cui la cellula infetta lo rimarrà per tutta la vita.

Perciò diventa una patologia genetica solo che non è ereditaria ma acquisita.

La proteasi è un enzima che taglia le proteine virali codificate dal virus e è importante perché è specifica del virus, è un enzima in grado di aumentare il numero delle proteine partendo da un precursore comune molto grosso. In pratica il virus produce una grossa proteina e attraverso la proteasi la spezzetta in più proteine.

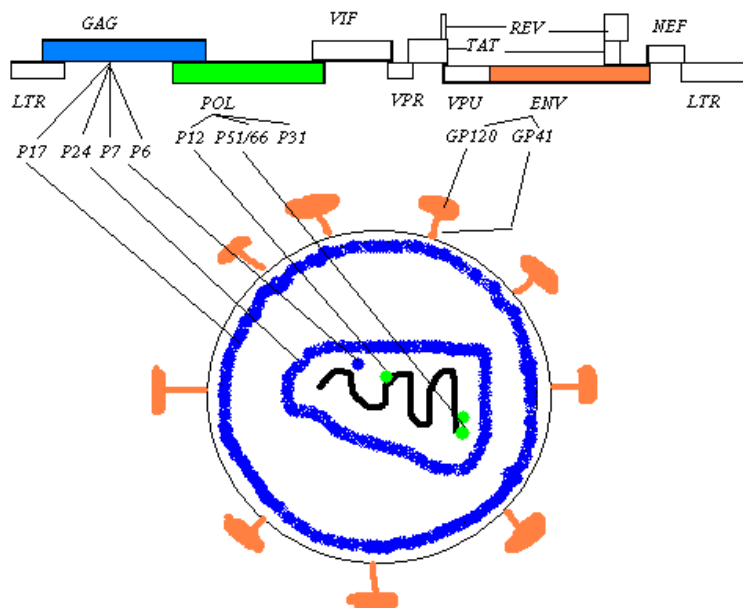
Env sta per envelope ed è il gene che codifica per le due proteine virali specifiche dell'envelope: la proteina gp41 e gp120. Queste due proteine vengono prodotte come un'unica grossa proteina poi tagliata nelle due proteine.

I geni regolatori essenziali sono due e si chiamano *tat* e *rev*. Questi due geni codificano per piccole proteine che hanno una funzione a livello trascrizionale. Per esempio, il *tat* regola la trascrizione di geni virali integrati nella cellula. Il *tat* agisce sulla LTR in posizione 5' (LTR è una breve sequenza a monte del genoma del virus che permette il legame con l'*env* e che pertanto viene trascritto).

Il *rev* è un gene che codifica per una proteina che permette il trasporto dei messaggeri dal nucleo alla citoplasma perché se il genoma del virus si integra nel genoma cellulare è chiaro che i messaggeri devono uscire dal nucleo e andare nel citoplasma per produrre proteine. Questo processo di traslocazione del messaggero non potrebbe avvenire perché questi sono messaggeri virali un po' particolari e hanno bisogno delle proteine *rev* che associa ai messaggeri virali una sequenza analoga che si chiama *rre* (rev response element) che lega la proteina e la trasloca nel citoplasma.

In ultimo i geni della regolazione non essenziale: *nef, vif, vpr, vpr*, che modulano la produzione del virus in vari modi.

Lasciamo perdere le regioni non codificanti e prendiamo in considerazione le caratteristiche peculiari del genoma del virus.



Se le sequenze codificanti sono sovrapposte come si fa a codificare i geni?

Attraverso un meccanismo chiamato frame shifting: lo spostamento della cornice o quadro di lettura.

Si può codificare per proteine diverse usando la stessa sequenza procedendo in due modi diversi. Uno è quello di utilizzare la stessa sequenza ma di leggerla cablata cioè avendo la sequenza di DNA che viene trasformata in RNA messaggero ogni tre basi di RNA messaggero formano una tripletta che codifica per un amminoacido. Ma il virus riesce a leggere le stesse sequenze non solo dal primo nucleotide ma anche partendo dal secondo, il risultato è completamente diverso perché ad una diversità della sequenza corrisponde un diverso amminoacido. Questo è il frame shifting, uno scorrimento del quadro di lettura. E questo fenomeno può avvenire partendo dal secondo nucleotide della sequenza come dal terzo per cui con la stessa sequenza il virus può codificare per tre proteine. La seconda possibilità è che alcune triplette possano funzionare dicendo quanto amminoacido bisogna produrre oppure alcune triplette possano funzionare come terminatore, come stop.

Sulla base di queste possibilità è chiaro che il virus può codificare sulla stessa sequenza cominciando un nucleotide prima o dopo producendo proteine completamente diverse.

Vediamo che alle due estremità del genoma abbiamo LTR (lunghe sequenze ripetute). Queste sequenze sono ripetute perché, quando il genoma del virus integra nel gene della cellula, LTR 5' sarà quella che legherà la RNA polimerasi e farà trascrivere i geni a valle. La LTR in posizione 3' non serve a nulla al virus infatti al virus serve solo LTR5', ma LTR 3' esiste perché, quando il genoma deve trasformarsi in DNA a doppia elica, raddoppia LTR. Questo è un problema enorme perché giustifica la capacità oncogena del virus, infatti come la polimerasi si lega all'LTR 5' si legherà all'LTR 3' trascrivendo i geni cellulari successivi a questo. Il risultato è la possibilità che questo virus dia tumori poiché l'integrazione è casuale e quindi il genoma virale si può integrare a monte di geni collegati con la proliferazione della cellula, automaticamente la sequenza LTR attiverà questo gene e la cellula comincerà a moltiplicarsi. LTR sono promotori definiti costitutivi cioè che funzionano sempre perché la cellula deve continuamente produrre virus. Questo vale anche per LTR 3' quindi la cellula continuerà anche a trascrivere geni a valle di questo, con conseguenze collegate alla funzione che quei geni esprimono.

Ciclo Replicativo

Come tutti i virus HIV entra nella cellula solo se questa ha una molecola complementare ad una sua molecola. Le proteine che interagiscono con il recettore della cellula sono gp41 e gp120. L'interazione iniziale avviene con gp120 che è una proteina glicosilata localizzata sulla parete esterna del virione. La gp41 è una proteina transmembrana legata alla gp120. Il virus riconosce la cellula attraverso l'interazione tra gp120 e una molecola sulla cellula. Il recettore del virus dell'AIDS è il CD4. E' una molecola che bisogna ricordare perché ci sono delle cellule chiamate CD4+ che sono linfociti T helper. Il virus dell'AIDS riconosce le molecole CD4 presenti in tutti i linfociti T helper, ma non solo, infatti è presente anche nei macrofagi. Di conseguenza questi sono i bersagli. Inoltre compaiono CD4 in quantità basse nelle cellule dendritiche e della glia, però rappresenta il recettore per il virus solo quando è espressa dai linfociti o dai macrofagi. Questo è dato dal fatto che il virus utilizza più molecole per entrare: un recettore principale (CD4), che deve

essere per forza presente e poi dei corecettori, delle molecole che sono presenti nelle cellule T o nei macrofagi e sono rispettivamente il recettore CXCR4 e CCRC5.

E si è anche scoperto che esiste una doppia popolazione di virus HIV1: una popolazione chiamata variante T topica che infetta le cellule T e una popolazione chiamata M topica che infetta i macrofagi. Il virus che utilizza l'R4 non può utilizzare l'R5 e viceversa. Per la verità esiste una popolazione che riesce a utilizzare tutti e due.

Il virus, dunque, si lega al recettore e al corecettore, ma non penetra. Cosa ci vuole per penetrare? Al microscopio elettronico si vede che il virus fonde con la membrana cellulare. E il processo di fusione è ovviamente successivo al riconoscimento. La fusione con la membrana cellulare è innescata dalla molecola gp41 del virus. Quando la gp120 interagisce col recettore e il corecettore, si muove e scopre la gp41 che a questo punto innesca la fusione. Poi core che viene inoculato con tutto il suo contenuto. Nel citoplasma il core si apre e incomincia il processo di retrotrascrizione: la trasformazione dell'RNA virale in DNA complementare. Questo DNA va nel nucleo e si integra in modo totalmente casuale diventando a tutti gli effetti una serie di geni preceduti da un promotore che li farà trascrivere continuamente e la cellula comincerà a produrre il virus. La moltiplicazione del virus procede tramite la proteasi virale che taglia la poliproteina centrale del virus e permette la strutturazione del core del virus infatti taglia il precursore gag in p17, p24, p7, p6 e così per le altre proteine.

Vi sono dei virus ad RNA, come il virus dell'AIDS, che non integrano e replicano, altri virus ad RNA vanno nel nucleo e replicano, ma non integrano, altri ancora non vanno nel nucleo e rimangono nel citoplasma, questi non integrano, ma replicano. Allora perché il virus HIV deve integrare?

La risposta è dovuta al fatto che il virus HIV è un virus ad RNA che non possiede un'RNA-polimerasi cioè non è in grado di fare una copia di RNA utilizzando RNA polimerasi, dovrebbe quindi cercarla nella cellula, ma l'RNA polimerasi della cellula per il virus è inutilizzabile perché è una RNA polimerasi DNA dipendente. Il virus, allora, possiede una DNA polimerasi RNA dipendente che trasforma l'RNA del virus in DNA che va nel nucleo. Però la RNA polimerasi si lega solo al DNA genomico perciò il virus fa integrare il suo genoma in quello della cellula così la RNA polimerasi non riconosce che quella sequenza non è cellulare, la trascrive e a questo punto viene prodotto dell'RNA. Chiaramente vengono fatti diversi tipi di RNA, viene chiamato policistronico, viene fatto dell'RNA che serve per la produzione di proteine (pol, env, gag...) e poi viene fatto un lungo RNA cosiddetto genomico, anch'esso esce dal nucleo e rappresenta il nuovo genoma. Il virus quindi ha preso la via più lunga, ma anche la via più efficiente.

La retrotrascrittasi è la pietra filosofale alla base della microbiologia perché trasforma qualunque RNA in un DNA genico, quindi io posso costruire geni a partire dal relativo RNA messaggero per inserirli in genomi in cui questi geni non sono presenti. Ma il gene che io costruisco utilizzando la retrotrascrittasi non è uguale al gene della cellula, è molto più corto perché non sono presenti sequenze non codificanti (gli introni).

Gli stadi della patologia

Il CDC americano ha stabilito quattro stadi della malattia:

- Infezione acuta
- Stadio asintomatico, che può durare mesi o anni e non sappiamo da cosa dipenda la durata di questo stadio.
- Inizio della patologia, AIDS conclamato. Reattività che consiste in linfadenopatia persistente e generalizzata (in pratica avviene il rigonfiamento dei linfonodi inguinali)
- Comparsa di patologie opportunistiche (malattie funzionali, sistemiche, biologiche e tumori)

Dall'appartenenza al gruppo primo al gruppo quarto possono passare anche 10-12-13 anni, in altri casi la progressione è molto più veloce, questo avviene quando l'infezione è multipla. La patologia infatti è comparsa per prima in gruppi di omosessuali maschi che praticavano sesso multiplo cioè con più partner in una settimana.

Rapporto tra linfociti CD4+ e malattia

Le infezioni opportunistiche da cui è caratterizzata la patologia sono causate dalla caduta della percentuale di cellule CD4+. Il virus fa diminuire per morte queste cellule, avendo su di esse attività citocida, e quindi il loro livello diminuisce progressivamente. Da un livello intorno a 1200 cellule per microlitro si arriva a 300-400 cellule per microlitro.

Le cellule CD4+, in una persona normale, sono in rapporto 2:1 con le cellule CD8. Diminuendo il numero delle cellule CD4, il rapporto diventa 1:1 o inferiore. Le CD4, quando sono troppo poche (400 unità per microlitro), non possono più bloccare i microrganismi che entrano nel nostro corpo e perciò comincia la patologia conclamata. Ad una diminuzione delle cellule CD4 corrisponde un aumento della sintomatologia.

Trasmissione della patologia

La trasmissione può avvenire attraverso il sangue, con i rapporti sessuali attraverso le secrezioni vaginali o lo sperma oppure con i derivati del sangue, per esempio, fattori di coagulazione.

Il virus può passare dalla mamma al feto o al figlio, cioè durante la gravidanza o dopo la gravidanza. Infatti il figlio può contrarre l'AIDS durante l'allattamento dalla madre ammalata perché il virus non è soltanto nel sangue, ma anche in molti liquidi corporei per esempio nello sperma (in grande quantità), nelle secrezioni vaginali (in quantità inferiore ma comunque elevata), nel sudore (in quantità bassa), nel latte (in quantità media).

Patologie Opportunistiche

Le patologie opportunistiche sono le patologie riscontrate in malati di AIDS.

Si riscontrano herpes orali, anali, genitali. C'è possibilità di tumori, soprattutto sarcoma di Kaposi. La tubercolosi, la polmonite da pneumocistis carinii, la toxoplasmosi, meningite criptococcica, le candidosi genitali o cutanee sono altre malattie possibili.

Le patologie collegate sono molte e estremamente varie.

Diagnosi

La diagnosi si può effettuare con il test Elisa.

Il più usato, però, è il test Western Blot (WB). Consiste in una strisciolina bianca di microcellulosa sulla quale vengono attaccate varie proteine del virus separate. Questo test permette di ricercare gli anticorpi cioè dice se la persona è sieropositiva o no, dice anche quanto la persona è sieropositiva e quali anticorpi ci sono.

Terapia

Non esiste il vaccino per l'AIDS. Esistono però moltissimi farmaci anti-virus HIV.

Questi farmaci colpiscono attività specifiche del virus. Esistono farmaci inibitori della retrotrascrittasi che siano nucleotidici (che assomigliano ai nucleotidi) o non nucleotidici. Esistono farmaci contro l'attività proteasica, quelli contro l'integrasi sono in sperimentazione. Altri farmaci inibiscono l'infezione contrastando la fusione del virus con la cellula.

La terapia di solito in uso prevede un cocktail di due inibitori della retrotrascrittasi e un inibitore della proteasi ed in grado di cronicizzare la malattia e permettere la sopravvivenza.

Attualmente la terapia viene iniziata quando il numero delle CD4+ arriva a 400 anche se non sono presenti ancora sintomi della malattia.

25/01/2007 (B)

Malattie a trasmissione oro-fecale

Tifo Addominale (salmonellosi)

Sono patologie correlate con la mancanza di norme igieniche e con l'eliminazione di rifiuti.

Il tifo addominale (salmonellosi), che si presenta in diversi tipi causati da diversi microrganismi, è una patologia infettiva che può essere umana o animale ed è dovuta all'ingestione di alimenti contenenti questi microrganismi.

I quattro agenti principali sono:

1. Salmonella Tifhi
2. Salmonella Paratiphi A, B, C
3. Salmonella Enteritis
4. Salmonella Gallinarum

La salmonella tifhi è quella più frequente e responsabile del tifo umano. La salmonella paratiphi è invece una variante più blanda del tifo che spesso si risolve da sola senza terapia.

La salmonella enteritis è una varietà più rara, localizzata nel sud est asiatico.

La salmonella gallinarum è un microrganismo che alberga nell'intestino di alcuni volatili, soprattutto le galline.

Tutti questi microrganismi sono presenti di solito in un organismo clinicamente sano, creando così un serbatoio umano della malattia.

Caratteristiche

È un microrganismo gram negativo, chiamato anche bacillo di Ebert, è dotato di capacità motoria (possiede numerosi flagelli), aerobio, non forma spore ma possiede una capsula che gioca un ruolo importante nella patogenicità.

È inoltre in grado di fermentare il glucosio con produzione di gas.

È molto resistente all'essiccamento, il che lo rende capace di resistere a lungo nell'ambiente esterno (in condizioni normali può resistere anche 4 o 5 giorni all'esterno dell'organismo), mentre si dimostra sensibile al calore ed ai disinfettanti.

Questi batteri sono caratterizzati dal possedere tre categorie di antigeni:

1. antigeni capsulari
2. antigeni flagellari
3. antigeni somatici

Questi tre tipi di antigeni sono quelli che si trovano nel siero delle persone infette da salmonellosi.

Gli antigeni somatici sono rappresentati dall'endotossina (o tossina complessa) è correlata con la struttura parietale, ha un peso molecolare variabile da 100 a 900 kilodaltons, ed è una proteina complessa termostabile. Conferisce patogenicità al microrganismo

L'antigene flagellare è rappresentato dai monomeri di flagellina che costituiscono il flagello. È una proteina pura, e pertanto è altamente tremolabile.

Non è correlato con la patogenicità, ma rimane comunque un antigene altamente immunogenico, e viene utilizzato in ingegneria genetica per associarlo a proteine che si desiderava evocassero una risposta immune.

L'antigene capsulare, viene anche indicato come antigene di virulenza. Il microorganismo possiede una capsula priva di lipidi, dunque altamente tremolabile, che permette alla salmonella di sfuggire alla fagocitosi dei macrofagi.

Quando è presente l'antigene capsulare, l'antigenicità è talmente forte che maschera gli altri due antigeni.

Decorso Clinico:

Il microorganismo penetra attraverso l'orofaringe attraverso l'ingestione di alimenti contaminati e raggiunge lo stomaco. La minima dose infettante è compresa tra $10^6 - 10^8$ batteri vivi, a seconda del ceppo di salmonella, e dipende anche dalla tipologia di alimento contaminato (l'infezione è facilitata se l'alimento è liquido, in quanto meno tempo il batterio passa nello stomaco più possibilità ha di non venire inattivato dall'acidità dello stomaco).

Una volta raggiunto l'intestino, il microorganismo passa attraverso la barriera intestinale ed entra nel sistema linfatico, dal quale raggiunge il dotto toracico ed infine il sangue.

Dal sangue ritorna dunque nell'intestino dopo aver infettato fegato, milza, reni e midollo osseo.

Il ritorno nell'intestino avviene dall'interno dell'organismo all'esterno (il lume intestinale), e questo passaggio provoca delle lesioni emorragiche (enteroragie).

Se si supera la patologia queste lesioni cicatrizzano, ed il tessuto non riacquista più la sua capacità di assorbimento.

Il tessuto cicatrizzato viene chiamato escare.

Diffusione:

Prima dell'uso del cloranfenicolo la letalità variava dal 10 al 20%, aggravata anche dalle condizioni igieniche che di solito danno origine a questa malattia, mentre ora è stata ridotta al 2-5%, ed interessa soprattutto i bambini piccoli colpiti da questa malattia, in quanto sono molto più sensibili alle notevoli perdite di liquidi di cui è responsabile questa patologia.

La fonte dell'infezione è rappresentata dagli ammalati o dai portatori sani.

I portatori sani possono essere di tre tipi:

1. Portatori precoci: persone infette che non hanno ancora sviluppato i sintomi della patologia;
2. Portatori convalescenti: persone che hanno superato la malattia e non presentano più il quadro clinico, ma continuano ad eliminare il microorganismo mediante le feci;
3. Portatori cronici: persone che hanno superato la malattia, ma che per tutta la vita continueranno a mantenere il microorganismo nella cistifellea e che lo riversano ad intervalli più o meno regolari nel tubo gastroenterico.

I veicoli che più frequentemente ospitano le salmonelle sono i liquidi a base di latte, le uova, le carni, l'acqua, la verdura e i molluschi (i molluschi filtrano grandi quantità di acqua, intrappolando al loro interno il microorganismo).

Le uova sono il veicolo principale della salmonella gallinarum, che è causa di una patologia molto più blanda della salmonella typhi o paratyphi, ma che risulta essere più frequente.

La persona ammalata elimina il microorganismo esclusivamente per via orofecale.

Quadro clinico:

L'incubazione è breve ed è legata alla carica microbica ingerita, solitamente dopo circa 6-10 ore si ha la comparsa dei primi sintomi.

Il quadro clinico viene diviso in quattro settenari:

1. Il primo settenario è chiamato ascendente e si riferisce alla comparsa della febbre: si ha un malessere diffuso, diminuzione dei battiti cardiaci e febbre in rapida ascesa. In questa fase il microorganismo è passato nel sangue, e l'innalzamento febbrile è dovuto alla presenza in circolo dell'endotossina O (a.k.a. endotossina pirogena);
2. Il secondo settenario è chiamato statico: la febbre si mantiene elevata, accompagnata da stato stuporoso, caduta del sensorio (il soggetto risponde poco agli stimoli sensoriali), ingrossamento del fegato e della milza e comparsa di roseole iperemiche a livello dell'addome.

3. Il terzo settenario è detto anfibolico: la temperatura comincia ad oscillare velocemente nel giro di poche ore. Questo è dovuto al ritorno del batterio nell'intestino con conseguente disepitelizzazione di notevoli porzioni di tubo digerente, enteroragie e spesso perforazione intestinale. Solitamente a questa fase segue la morte
4. Il quarto settenario è noto come defervescente: la febbre cala, il sensorio ritorna ma le escare rimangono.

La patologia dura solitamente un mese, anche se l'uso di farmaci la può ridurre a tre settimane.

Dal punto di vista epidemiologico, la salmonella è una malattia diffusa in tutto il mondo, ma in alcune regioni è endemica, come nell'India, a causa delle situazioni igieniche.

In Italia i casi che si verificano compaiono quasi al 90% in comunità turistiche, dove spesso le norme igieniche vengono trascurate.

Dopo aver contratto il tifo si sviluppa una resistenza di breve durata che non è correlata con la comparsa di una risposta immune, ed è dovuta ad una maggiore presenza di cellule immunocompetenti aspecifiche.

Profilassi:

La denuncia è obbligatoria, l'accertamento diagnostico avviene attraverso coprocultura oppure bilicoltura.

Terapia:

La terapia farmacologica è molto efficace, il farmaco d'elezione è il cloranfenicolo che va somministrato per almeno 14 giorni dopo la fine della sintomatologia, per evitare la cronicizzazione della malattia.

Il farmaco di seconda scelta è l'ampicillina, da utilizzare soltanto se il cloranfenicolo non è stato efficace.

L'uso di questi due farmaci dev'essere accompagnato alla somministrazione di farmaci anti diarroici, liquidi ed elettroliti per via endovenosa.

Prevenzione:

Esistono vari tipi di vaccini:

- Vaccino polivalente ucciso costituito da salmonella tifi e paratifi A e B, inattivati con formolo allo 0.4% per 15 giorni a 37 gradi (3 dosi).
- Vaccino polivalente ucciso costituito da salmonella tifi e paratifi A e B, inattivati con acetone al 50% per 15 giorni e poi liofilizzati. Da una protezione per 2 mesi e mezzo circa.
- Vaccino orale vivo attenuato TY21A, somministrato in 3 dosi ed ha un'efficacia variabile dal 60 al 90%. Se somministrato mediante iniezione ha un'efficacia ancora maggiore.

Tipizzazione fagica:

La tipizzazione fagica consiste nella identificazione del ceppo di salmonella (o dei ceppi) che stanno causando la malattia per decidere la terapia farmacologica da impiegare, mediante test divisi di ceppi aventi l'antigene V in fase s e che dunque possono essere sensibili ai batteriofagi.

Sono stati scoperti dei batteriofagi selettivi per alcuni ceppi di salmonella, che permettono quindi di identificare il ceppo di salmonella che causa la malattia nella persona.

Colera

Il colera è una patologia che si diffonde in condizioni di scarsa igiene.

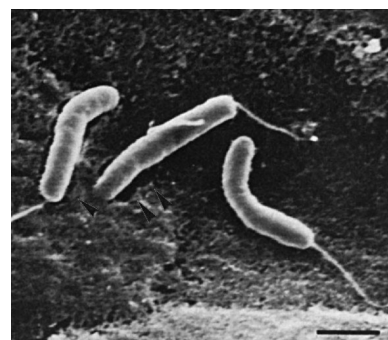
È una patologia infettiva solo umana, quindi priva di un serbatoio animale, dovuta all'ingestione di alimenti contaminati con le feci di persone che hanno il colera.

L'agente eziologico è il vibriocolera (o vibriocomma), identificato da Kock nel 1887, del quale si riconoscono 6 sierotipi diversi e 13 sottotipi differenziabili sulla base delle diverse capacità antigeniche dell'antigene O (l'antigene parietale).

Il secondo agente eziologico, identificato pochi anni fa, è il vibrio el tor, caratterizzato dalla capacità di emolisare gli eritrociti di montone e di agglutinare gli eritrociti di pollo.

Sono entrambi bacilli gram negativi, aerobi obbligati, e sono dotati di un unico flagello in posizione terminale. Non formano spore e fermentano il glucosio senza produrre gas.

È sensibile al calore ed ai disinfettanti, resistente all'essiccamento (nel suolo e negli alimenti resiste fino a 5 giorni) ed è presente nelle acque dolci e salate dove viene scaricato con le fogne.



*Illustrazione 76: Vibrio Cholerae
adeso all'epitelio intestinale*

Si può coltivare su terreni comuni, ma ha una preferenza per i terreni basici dove produce fino a tre enterotossine ed una sostanza neuroaminidasica (che taglia l'acido sialico).

Attività tossica:

L'enterotossina è una esotossina tremolabile, formata da due componenti A e B, causa ipersecrezione e diarrea dovuta dell'attivazione dell'adenilato ciclasi e aumento di AMPc.

Struttura antigenica:

1. antigeni capsulari
2. antigeni flagellari
3. antigene somatico (esotossina)

Infezione nell'uomo:

E' un processo infettivo non invasivo, non esce mai dal tubo gastroenterico, dove arriva attraverso l'ingestione di alimenti contaminati. La dose minima infettante è di 10^{11} batteri vivi, ma scende di molto nei casi di ipocloridria (poca acidità nello stomaco).

Andamento clinico:

L'incubazione dura dalle 6 alle 48 ore, a seconda della carica batterica, nel quale il virus passa attraverso lo stomaco per arrivare nell'intestino dove si moltiplica.

La moltiplicazione causa il rilascio delle tossine, le quali causano crampi, diarrea, vomito, sete, ipotermia e tossicosi. Le feci sono biancastre e risiformi, inodori, senza sali.

Si ha una disidratazione che da luogo ad un'acidosi sistemica, la quale provoca ipotensione e collasso cardiocircolatorio. Queste condizioni portano in breve tempo alla morte.

Altre Malattie

Poliomielite

Asd

Peste

Intro

La peste (dal lat. *plaga*, peste) è una patologia diffusa tra i roditori e che si è manifestata in diverse occasioni con andamento epidemico nel corso del Medio Evo (peste nera, per le macchie di colore sulla pelle, e peste bubbonica), mentre attualmente si osserva solo sporadicamente su persone che abbiano avuto rapporti stretti con roditori malati. L'agente eziologico, *Yersinia Pestis*, penetra nel corpo attraverso lesioni cutanee o ingerito con alimenti, raggiunge e prolifera nei **linfonodi**, causando i caratteristici bubboni. Nello stadio successivo si ha batteremia e si sviluppano infezioni generalizzate agli organi. Può essere **trattata** efficacemente con **antibiotici**, la diagnosi di laboratorio prevede l'isolamento e l'identificazione dell'agente eziologico da pus sangue o altri materiali del paziente. La segnalazione all'Autorità sanitaria è obbligatoria.

Agente eziologico

La *Y. Pestis* è un coccobacillo non flagellato (quindi immobile), corto, capsulato, Gram negativo, aerobio facoltativo. La sua struttura antigenica prevede la presenza di:

- Antigene somatico O
- Endotossina LPS
- Complesso polisaccaride-lipoproteico
- Esotossina 74k Da che inibisce respirazione mitocondriale

Decorso Clinico

Peste **bubbonica**: febbre elevata, vomito, delirio, dopo 3-5gg comparsa del bubbone per linfonodo ingrossato che si rompe o riassorbe.

Peste **settica**: primitiva o secondaria alla bubbonica, febbre non elevata, emorragie, collasso e morte

Peste **polmonare**: primitiva o secondaria alla bubbonica, provoca broncopolmonite

Letalità:

- Peste bubbonica – 70%
- Peste setticemica – 90%
- Peste polmonare – 100%

La **profilassi immunitaria** con siero risulta poco efficace, con vaccino è di breve durata così come la chemioprophilassi con sulfamidici.

La **terapia** prevede il trattamento con antibiotici (streptomicina e tetracicline) mentre l'incisione dei bubboni è controindicata.



Illustrazione 77: Virione della rabbia, in giallo, bullet shaped e coperto da glicoproteine per il legame ai recettori cellulari

Rabbia

La rabbia (dal lat. Rabere, pazzia) è una malattia causata da virus della famiglia dei Rhabdovirus. Storicamente a lungo carica di paura e fascinazione, mentre attualmente è pressoché debellata dai Paesi sviluppati, mentre è ancora diffusa nei paesi in via di sviluppo a causa dei morsi dei cani infetti.

L'agente eziologico è un Rhabdovirus di cui esistono diversi genotipi diversi

Il virione possiede un genoma a RNA- single strand, si trasmette con i morsi di animali infetti, nei quali è presente nella saliva, per aerosol o in ferite aperte. In seguito all'inoculazione una regione delle glicoproteine dell'envoltura aderisce alla cellula muscolare scheletrica, nella quale penetra e si moltiplica. Successivamente entra nel SNP tramite le terminazioni nervose sensitive e motori, che risale alla velocità di 8-20mm/day fino alla colonna spinale. Qui si riproduce (nei gangli dorsali e successivamente diffonde nell'SNC sviluppando encefaliti. Si accumula poi nei neuroni dell'ippocampo, ove si riproduce e produce i caratteristici **corpi del Negri** virus o subunità virali ammassate visibili al microscopio ottico. Fuoriesce dalla cellula per gemmazione senza lisi (è, infatti, un v. enveloped). Gli effetti sul SN sono dovuti al legame tra la glicoproteina G ed i recettori nicotinici per l'acetilcolina.

Decorso clinico

A causa del lungo processo infettivo appena visto i sintomi si sviluppano dopo un

1. periodo di **incubazione** variabile dalle **2 alle 16 settimane**;
2. segue un periodo **prodromico** di circa **2gg** con dolore al petto, depressione, insonnia e vomito;
3. periodo **convulsivo** della durata di **3gg** con spasmi faringei, rifiuto alimenti (anche acqua, per questo la rabbia era anche detta idrofilia), crampi e spasmi muscolari
4. infine un periodo **paralitico** di circa **un giorno** porta alla morte per asfissia.

La patologia, infatti, non trattata è sempre mortale nel giro di 4-5 gg dal periodo paralitico.

Nota che a causa del lungo periodo di incubazione questa è l'unica malattia che può essere curata con un vaccino, mentre di solito i vaccini sono sfruttati per indurre immunità. Per essere efficace, tuttavia, il vaccino deve essere somministrato subito dopo l'infezione.

Profilassi

La profilassi è eseguita soprattutto con vaccinazione di cani, con vaccinazioni post-esposizione per gli umani e vaccinazioni pre-esposizione per soggetti ad alto rischio (es. che si trovino per più di un mese in Paesi dove la rabbia è diffusa negli animali).

Il primo vaccino per la rabbia fu creato da Pasteur, successivamente venne messo a punto con virus inattivati da Flurry.

Chikungunya

La chikungunya ("malattia dell'uomo piegato") è una patologia causata da un arbovirus, e trasmessa dalle zanzare che ne costituiscono il serbatoio animale. I sintomi sono febbre, mal di testa, dolori ossei ed articolari, la terapia antipiretica ed antidolorifica. Recentemente se ne sono verificati 130 casi tra Cesena e Forlì.

Malaria

La malaria (stesso nome in inglese, chiamata così in Italia nel 17th secolo per la presunta correlazione con i malsani vapori delle paludi intorno a Roma) è la più grave patologia causata da un plasmodio, in particolare gli agenti eziologici sono i *Plasmodium malariae*, *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*. Solo in Africa ogni anno muoiono di malaria un milione di persone, mentre i casi riportati annualmente negli USA sono circa un migliaio. La particolarità di questo plasmodio è che il suo ciclo vitale presenta una fase chiave nella zanzara anofele che ne è vettore. In particolare la parte sessuata del ciclo di riproduzione del plasmodio avviene nella zanzara mentre la porzione asessuata avviene nell'uomo.

L'OMS varò un programma di eradicazione mondiale della malaria nel 1955 che fallì definitivamente nel 1976 in seguito allo sviluppo di resistenza al DDT da parte delle zanzare e la resistenza alle cloroquine del plasmodio.

Negli anni '60 è stato scoperto come la resistenza da parte dei pazienti talassemici sia dovuto alla presenza di Emoglobina-S (Hb-S) negli eritrociti in luogo della normale Hb- α . Il Plasmodio, infatti, necessita del ferro dell'emoglobina per riprodursi.

I plasmodi sono protozoi, microorganismi mobili unicellulari, eucarioti, lunghi circa 12-15 μ m.

Nota che la malaria può essere un cofattore per le infezioni da virus di Epstein-Barr (mononucleosi).

La chemiopprofilassi per i viaggiatori che si recano in Paesi dove è diffusa la malaria deve iniziare una settimana prima e terminare un mese dopo il viaggio. Viene effettuata con chinino, cloroquina, proguanil etc.

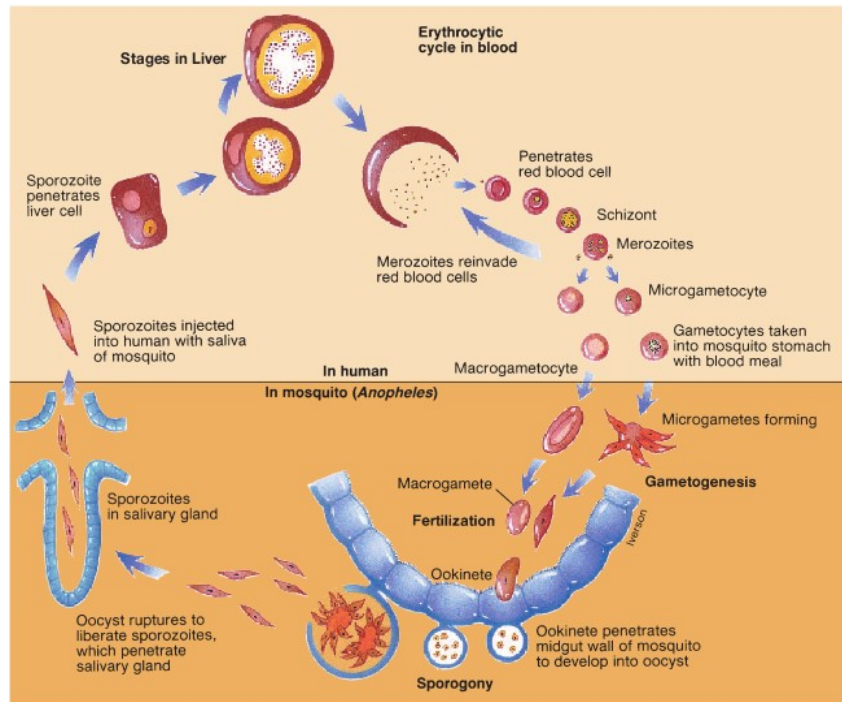


Illustrazione 78: Ciclo vitale del plasmodio

Tetano

Il tetano è una patologia causata dal *Clostridium Tetani*, un batterio anaerobio obbligato sporigeno, con endospore in posizione terminale quindi plettridio. Le sue spore, contenenti la tossina tetanica, causa dalla malattia, possono sopravvivere per anni, sopravvivono all'intestino degli erbivori e possono diffondersi inquinando il terreno.

Il *C. Tetani* è un batterio Gram positivo con una potente, esotossina: la **tetanospasmina**. È mobile, peritrico e causa della sua anaerobiosi stretta la forma vegetativa è labile mentre quella sporale è altamente resistente.

La trasmissione all'uomo avviene tramite ferite aperte ma le spore possono germinare solo in assenza di ossigeno ovvero con la cicatrizzazione della ferita. Se il batterio germina la sua forma vegetativa sintetizza tetanospasmina, una tossina che è rilasciata con la morte e lisi della cellula batterica. In particolare la tetanospasmina è un'endopeptidasi che cliva selettivamente la sinaptovina, una proteina di membrana delle vescicole sinaptiche necessaria per il docking della vescicola alla membrana cellulare e quindi per il rilascio del neurotrasmettitore nella sinapsi. Poiché la t. tetanica colpisce le sinapsi inibitorie (a GABA e glicina) la loro inibizione causa tetano (da cui il nome) ovvero contrazioni incontrollate dei muscoli scheletrici.

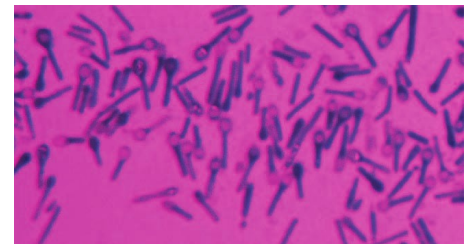


Illustrazione 79: Forma vegetativa del *C. Tetani*, evidente la forma a plettro

Decorso Clinico

Nelle prime fasi il decorso clinico prevede crampi e tensione muscolare nella regione adiacente alla ferita nella quale è avvenuta l'infezione, segue l'incapacità ad aprire la cavità boccale come conseguenza della contrazione de massetere ed infine la morte sopraggiunge a causa della contrazione del diaframma, dei muscoli intercostali e degli altri muscoli coinvolti nella respirazione. Una seconda tossina, la tetanolisina, aiuta la lisi tissutale

Carbonchio



Illustrazione 80: Una pustola maligna causata dal *B. Antracis*

asd

Difterite

asd

Tubercolosi

La tubercolosi è una patologia infettiva di natura batterica ad andamento acuto-cronico causata dal “bacillo di Koch” (o *Mycobacterium tuberculosis*); l'uomo è l'unico serbatoio del germa e la trasmissione avviene per contagio aerogeno interumano cioè attraverso tosse, sputo, starnuto da parte di una persona che contenga al suo interno il

microrganismo, ma nel bambino può avvenire anche attraverso il latte di vacche affette da tubercolosi bovina (*Mycobacterium bovis*, TBC intestinale e non polmonare).

AGENTI EZIOLOGICI:

- *Mycobacterium tuberculosis* (Koch, 1882)
- *Mycobacterium bovis* (via orale)
- *Mycobacterium avium* complex (MAC): è presente negli uccelli migratori e piccioni; presenta la stessa patologia del *M. tuberculosis*, ma solo in persone immunocompromesse come quelle affette da AIDS

I micobatteri patogeni, e non, sono presenti: nel suolo, nelle acque e negli animali a sangue freddo e caldo.

FORMA: bacilli o coccobacilli che possono crescere sottoforma filamentosa in colonie, mentre all'interno di un liquido si presentano a V, cioè paralleli l'uno all'altro.

CARATTERISTICHE DEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

- Bacillo alcool-acido resistente quindi per essere colorato deve subire trattamento di mordenzatura e poi trattamento con alcool e acido (colorazione di Ziehl-Neelsen);
- Resistente all'essiccamento e ai disinfettanti;
-
- Moltiplicazione lenta nei macrofagi (duplicazione ogni 12-24 ore su terreni selettivi);
- Isolamento difficile perché si trova in ambienti dove ci sono anche molti altri microrganismi, come nell'orofaringe o a livello bronchiopolmonare, che invece si moltiplicano velocemente;
- Colonie visibili solo dopo 7-10 giorni: la lentezza nella moltiplicazione sta nel fatto che gli anaboliti presenti nel terreno di coltura penetrano con molta difficoltà attraverso la parete cellulare;
- Coltura su terreno di Petagnani (selettivo per micobatteri tubercolari);
- Disposizione a palizzata o a V;
- Aerobio stretto (in qualche caso anche aerobio facoltativo);
- Immobile: non è dotato di flagelli;
- Gram (+) ma con parete particolare;
- Asporigeno.

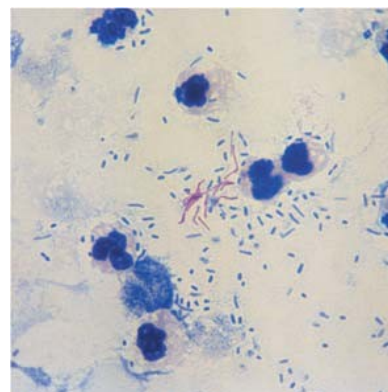


Illustrazione 81: In rosso, *M. tuberculosis* evidenziati dalla colorazione di Ziehl-Neelsen

STRUTTURA DELLE PARETE DI UN MICOBATTERIO

Hanno parete complessa formata da ac. glicolici e amminogalattasi e altri componenti in una struttura compatta. Una componente di tipo proteica polipeptidica definita PPD è importante perché

viene utilizzata per il test della tubercolina. Nei micobatteri lo strato di peptidoglicano è lo strato più interno della parete.

TERRENO DI PETRAGNANI (per isolamento selettivo dei micobatteri)

Gli ingredienti specifici del terreno di Petraghani sono:

- asparagina
- fecola di patate
- glicerolo
- uovo (ovoalbumina)
- caseina
- latte scremato
- verde malachite (inibizione della flora batterica)

Il tuorlo d'uovo è essenziale nella costruzione di particolari cere della parete.

STRUTTURA ANTIGENICA

La struttura antigenica è fondamentale per capire come si presenta il quadro tipico della tubercolosi: infatti, la tubercolosi, viene contratta dal 70-80% della popolazione, ma fortunatamente la maggior parte non si ammala o presenta una sintomatologia banale.

Gli antigeni possono essere di tre tipi:

ANTIGENI PROTEICI

Sono numerosi, inseriti in modo criptico nella parete e pertanto sono difficilmente purificabili; questi componenti proteici vengono definiti PPD (derivati poliproteici) e sono agglomerati di proteine estratte dalla parete difficilmente separabili e purificabili tra di loro. Sono poco immunogenici se non sono associati e potenziati dalle cere della parete; sono i responsabili dell'antigenicità cellulare ritardata (DTH) rivelata dal test della tubercolina: test che rivela la presenza di antigeni proteici associati con la parete dei micobatteri; è un test di immunità cellulare ritardata perché compare lentamente nel giro di due giorni ed è dovuta non al braccio umorale, cioè agli anticorpi, ma dovuta ad una risposta di immunità cellulo-mediata.

ANTIGENI POLISACCARIDICI

- costituiti da arabinogalattano
- sono apteni (non immunogenici se non inoculati insieme alla cellula batterica)

ANTIGENI LIPIDICI

- grassi (ac. palmitico, oleico, linoleico, ecc..)
- cere (esteri di ac. grassi superiori: ac. micolici)

Grassi e cere si complessano con strutture proteiche e polisaccaridiche per conferire antigenicità. Le cere sono la causa della difficoltà nell'effettuare la colorazione di Gram.

ANDAMENTO CLINICO

- trasmissione per via aerogena;
- infezione delle vie respiratorie inferiori (alla base dei polmoni);
- moltiplicazione all'interno dei macrofagi alveolari;
- infezione benigna, progressiva e letale;
- incubazione di circa una settimana.

La tubercolosi è una patologia inizialmente di tipo respiratorio, ma quando si evolve colpisce tutti gli organi della persona ammalata. I micobatteri infettano i macrofagi penetrando al loro interno, ma non li uccidono, in questo modo sfuggono alla risposta immunocompetente che avviene soltanto quando il macrofago va incontro a lisi ed espone le componenti antigeniche.

In generale l'infezione è benigna: nella maggior parte delle persone tra i 6 e i 12 anni si riscontra l'infezione, ma la patologia passa senza quasi essere osservata; in altri casi può esserci una progressione o una acutizzarsi dell'infezione.

L'infezione è rilevabile anche a distanza di anni attraverso schermografia ai raggi x in cui si vedono noduli di natura granulomatosa di 2-3 mm alla base dei polmoni detti tubercoli dovuti alla tubercolosi primaria.

La moltiplicazione causa uno stato infiammatorio locale attirando i macrofagi; questi avvolgono il tubercolo e impediscono la diffusione del microrganismo. Nel giro di un mese il tubercolo va incontro a necrosi e calcificazione che permette l'osservazione ai raggi x.

Questo tipo di nodulo è chiamato tubercolosi primaria granulomatosa o anche miliare perché hanno la dimensione di due o tre mm; in pratica si tratta di un nodulo solido con numerose cellule Langhans giganti che non sono altro che i macrofagi che bloccano la diffusione del micobatterio.

Bisogna distinguere l'infezione primaria, cioè quella che dà uno stato di premunizione da quella secondaria. Si può suddividere in quattro stadi:

1° STADIO: durata 3-8 settimane; formazione del complesso polmonare primario (TBC polmonare), dà luogo ad una lesione granulomatosa (tubercolo) del parenchima polmonare. Al 99% le persone che sono al primo stadio guariscono, mentre le persone immunodepresse o con altri problemi possono passare al secondo stadio.

2° STADIO: durata 3 mesi; caratterizzato dalla disseminazione del micobatterio causata da necrosi del centro del tubercolo, cioè il centro del tubercolo va in lisi e il contenuto costituito dal micobatterio si disperde riversando dei batteri nel ramo bronchiale, dando quindi un'alta capacità infettante (per tosse, starnuti...) ma spesso risulta essere la risoluzione della patologia perché nei bronchi i batteri possono essere espulsi. Situazione più grave quando il tubercolo si apre e riversa il contenuto nei vasi sanguigni perché in quel caso i micobatteri vanno in circolo e raggiungono diversi organi della persona infettata (batteriemia).

3° STADIO: durata 3-4 mesi; TBC miliare (pleuro-polmonite tubercolare) che presenta tubercoli inizialmente piccoli che poi si espandono e diffondono il micobatterio tubercolare; questo è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e dare una TBC meningea (meningite a liquor liquido causata da virus o micobatteri, mentre meningite a liquor torbido è causata da meningococco).

4° STADIO: durata 3 anni dopo il primo stadio; cronicizzazione delle TBC miliari. Il microrganismo non è più in un solo organo ma è diffuso in tutto il corpo: TBC ossea, enterica, articolare o urogenitale.

DIAGNOSI

- coltura dell'espettorato su terreno di Petraghiani;
- test cutaneo: test della tubercolina. E' un test per verificare la reattività immunologia cellulo-mediata che si esegue inoculando sottocute attraverso un punzono a quattro punte quattro dosi scalari di PPD (derivato proteico purificato della parete di M. tuberculosis); la reazione al test dipende dall'età in cui viene effettuato: se si è in età scolare (7-8 anni) la maggioranza avrà reazione positiva, mentre se lo si effettua a due o tre anni la maggior parte avrà una reazione negativa perché non è stata ancora infettata. se test è positivo (reazione cutanea) significa che si è in uno stato di premunizione, cioè ha una resistenza parziale alla patologia; se si verifica un'iper-reazione significa che il soggetto o, ha appena terminato un'infezione primaria, oppure ha tubercolosi in atto; in questo caso si ricorre ad una schermografia per verificare che non ci sia tubercolosi e dopo 10 giorni si riefettua il test: nella maggioranza dei casi il secondo test dà risultati normali. Se invece, il test è negativo non si ha nessuna premunizione. Ciò significa che l'individuo non è mai venuto a contatto con il micobatterio tubercolare; in questi casi si riefettua il test della tubercolina a distanza di 4 o 5 mesi: di solito in quel lasso di tempo la persona si infetta e risulta positiva. Se risulta ancora negativa si esegue la vaccinazione con BCG (bacillo di Calmette e Guérin), cioè bacillo tubercolare di bovino attenuato. Questo è uno dei pochi casi di vaccino antibatterico.

EPIIDEMIOLOGIA

Patologia a diffusione mondiale: un terzo della popolazione è stato infettato. Nel mondo:

- 20-30 milioni di persone ammalate;
- 8 milioni di nuovi casi anno;
- 3 milioni di morti all'anno.

PROFILASSI

Vaccino nuovo attenuato: BCG. BCG è un ceppo di M. Bovis attenuato mediante ripetute colture (più di 250) su terreno alla fecola di patata biliata. Poiché il genoma di M. Bovis è molto grande attualmente non si sa ancora quali siano le mutazioni che avvengono.

Essendo un vaccino attenuato non può essere somministrato ad individui immunodepressi come per esempio i malati di AIDS.

TERAPIA

Procedure terapeutiche complesse a regimi terapeutici diversificati.

Terapie prolungate che durano fino a 2-3 mesi dopo la fine della malattia e talvolta possono durare anche anni. Le terapie si effettuano con farmaci di:

- *prima scelta* (terapia singola): dapsona, clofazimina, isoniazide, etambutolo, rifampicina (prima molto efficace, ora tutti i ceppi sono resistenti ad essa), streptomina, acido para-amino-salicilico;
- *seconda scelta* (terapia combinata): etionammide e cicloserina, isoniazide e streptomina.

La scelta del farmaco dipende dal ceppo di batterio del quale si è infettati.

La frequenza di comparsa di mutanti farmaco resistenti è:

- isoniazide 1 su 10^5 ;
- streptomina 1 su 10^6 ;
- associazione isoniazide-streptomina 1 su 10^{11} .

Ci sono numerosi altri micobatteri oltre a quello tubercolare, ma l'unico patogeno per l'uomo è il *Micobacterium lepre* che provoca la lebbra. Ci sono due tipi di lebbra: la lebbra tubercolare e la lebbra lepromatosa che forma tubercoli solo a livello cutaneo.

La patologia si rivela dopo anni dall'infezione, che solitamente non si avverte perché l'infezione porta alla desensibilizzazione della cute.

La lebbra non coinvolge gli organi interni, ma cute e articolazioni e porta a mutilazioni. Per contrarre la patologia bisogna stare a stretto contatto con persone ammalate, e prima che essa si manifesti possono trascorrere 6-7 anni o più.

Questa patologia richiede un trattamento farmacologico simile a quello della tubercolosi, ma per un tempo molto più prolungato: a volte per tutta la vita.

SARS

(SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME) (SINDROME RESPIRATORIA SEMIACUTA)

AGENTE EZIOLOGICO: SARS-CoV; è un **coronavirus** come quello del raffreddore, ma con effetti molto più drammatici..

Esplosa nel sud-est asiatico improvvisamente.

BREVE CRONISTORIA DELL'EPIDEMIA DI SARS DEL 2002

Novembre 2002: primi casi di polmonite atipica nel Guangdong in Cina;

Febbraio 2003: la Cina comunica all'OMS (org. mondiale sanità) tali casi;

20 febbraio: Hong Kong compare virus H5N1(virus influenzale che non aveva correlazione con la SARS): due infetti con un decesso;

26 febbraio: ad Hanoi in Vietnam si presenta il caso indice: ricoverato un residente a Shanghai proveniente da Hong Kong con sindrome respiratoria;

Successivamente un medico italiano dell'OMS, Carlo Urbani, per primo ha descritto questa patologia ne è rimasto infettato a fine marzo è morto;

9 Marzo 2003: vengono prese misure straordinarie di sicurezza, ma purtroppo da marzo a luglio la malattia si è diffusa non solo nel sud-est asiatico ma in tutto il mondo;

Luglio 2003: l'OMS dichiara la diffusione della patologia controllata; quindi in pochissimo tempo una nuova patologia attraverso misure di controllo epidemiologico e di diffusione, ma senza l'aiuto di farmaci è stata controllata.

L'OMS ha riportato ufficialmente 8089 casi con 774 morti (9,6%). La maggior parte in Cina (62%), poi Hong Kong (21%), Cina Taiwan, Canada, Vietnam, USA ecc... (in Italia un caso).

La rapidità con cui la SARS si è diffusa in tutto il mondo è dovuta al fatto che era presente in un albergo di Hong Kong nel quale soggiornavano persone provenienti da diversi paesi mondiali e la diffusione è avvenuta attraverso i viaggi aerei.

CORONAVIRUS (famiglia Coronaviridae)

GENOMA: RNA ss positivo.

DIMENSIONE: 60-220 nm.

SIMMETRIA: elicoidale.

RIVESTIMENTO: envelope.

Due sierotipi infettano l'uomo a livello delle vie respiratorie superiori causando raffreddore; questi due sierotipi sono: HCoV-229E e HCoV-OC43.

Nel 2003 è stato isolato e completamente sequenziato un terzo coronavirus umano: quello responsabile della SARS. Si tratta del SARS CoV e questo differisce per circa il 70% dagli altri due.

STRUTTURA E REPLICAZIONE

- virioni polimorfi;
- glicoproteine di superficie claviformi che danno caratteristico aspetto a corona al virione;
- replicazione e assemblaggio del capsido nel citoplasma;
- formazione dell'envelope (gemmazione) dal reticolo endoplasmatico rugoso;
- è il più lungo dei virus ad RNA (27-30 Kb).

SINTOMI DELLA MALATTIA

- febbre sopra i 38°C;

- tosse secca;
- insufficienza respiratoria;
- brividi;
- dolori muscolari;
- cefalea;
- diarrea.

La persona muore per edema polmonare

DIFFUSIONE DELLA SARS

- medico del Guangdong soggiorna nell'Hotel Metropol;
- infetta 12 ospiti dell'albergo al nono piano;
- muore 10 giorni dopo;
- in un complesso di 8 torri il 14 marzo un individuo con la SARS soggiorna al piano 16 della torre 7 e dopo tre giorni 320 persone sono infettate. Di queste persone la maggior parte erano stranieri e tornando nei loro paesi di origine hanno diffuso la malattia.

La letalità della SARS aumenta in funzione dell'età, infatti:

età (anni)	letalità (%)
0-24	1
25-44	6
> 65	50

In Italia si è verificato un solo caso ufficiale a Milano. Il ceppo isolato a Milano è stato definito H5R1 dall'ospedale San Raffaele: cellule Vero (rene di scimmia) sono state inoculate con il campione dopo 24h presentavano un marcato effetto citopatico.

Il nuovo coronavirus, SARS CoV, è stato confermato come agente eziologico della SARS nel marzo 2003 in laboratori della Germania, Hong Kong e USA e tutti e quattro i postulati di Koch erano soddisfatti.

SARS CoV è il primo coronavirus capace di causare una malattia estremamente grave all'uomo

E' costituito da 5 geni molto lunghi detti ORFs che codificano per la replicasi e le proteine S, M, N.

Il SARS CoV proveniva da due animali:

- Palm Civet (simile ad un gattone);
- Raccoon Dog (simile ad un orsetto lavatore).

Entrambi questi animali non si ammalano, ma sono solo portatori del virus. Questi animali però vengono mangiati dai cinesi e venduti ad alti prezzi nei mercati; si è riscontrato che coloro che vendevano questi animali avevano numerosi anticorpi contro il SARS CoV. Quindi si è capito che il virus si era trasmesso dal sangue dell'animale macellato all'uomo che quindi diventava portatore del virus e ha potuto infettare altri individui (è una zoonosi).

Il recettore del SARS CoV, definito ACE2, è una peptidasi di membrana il cui sito attivo è situato verso l'esterno della cellula ed è particolarmente numeroso nelle cellule dell'apparato respiratorio. Questo taglia l'angiotensina 2 (vasocostrittore) e la trasforma in angiotensina 1-7 (vasodilatatore).

Nei campioni biologici il virus è presente in concentrazioni maggiori nella saliva, nel sudore e nelle feci che quindi sono i principali mezzi di contagio, mentre è presente in basse quantità nelle urine e ancor meno nel sangue.

I recettori ACE2 sono concentrati per la maggior parte nel cuore (dove ha un turn-over elevatissimo: in pratica rimane pochissimo sulle cellule del cuore, lega il virus, ma immediatamente si stacca e non riesce a penetrare nel muscolo cardiaco), nei polmoni, e nell'intestino (dove invece la conc. Di ACE2 rimane costante ed ha un basso turn-over).

Misure di biosicurezza sono di tipo 3: aria filtrata, doppia compartimentazione delle porte e operatori completamente coperti.

Copyright



Questi appunti sono in aggiornamento continuo; puoi trovare l'ultima versione su <http://ctf4u.netsons.org>.

Tutti i file sono resi pubblici secondo i termini della licenza [CC Attribution Non-Commercial Share Alike](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/deed.it)⁸.

Puoi:

- riprodurre, distribuire, comunicare al pubblico, esporre in pubblico, rappresentare, eseguire e recitare quest'opera
- modificare quest'opera

Alle seguenti condizioni:

- **Attribuzione** — Devi attribuire la paternità dell'opera nei modi indicati dall'autore o da chi ti ha dato l'opera in licenza e in modo tale da non suggerire che essi avallino te o il modo in cui tu usi l'opera.
- **Non commerciale** — Non puoi usare quest'opera per fini commerciali.
- **Condividi allo stesso modo** — Se alteri o trasformi quest'opera, o se la usi per crearne un'altra, puoi distribuire l'opera risultante solo con una licenza identica o equivalente a questa.

⁸ <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/deed.it>