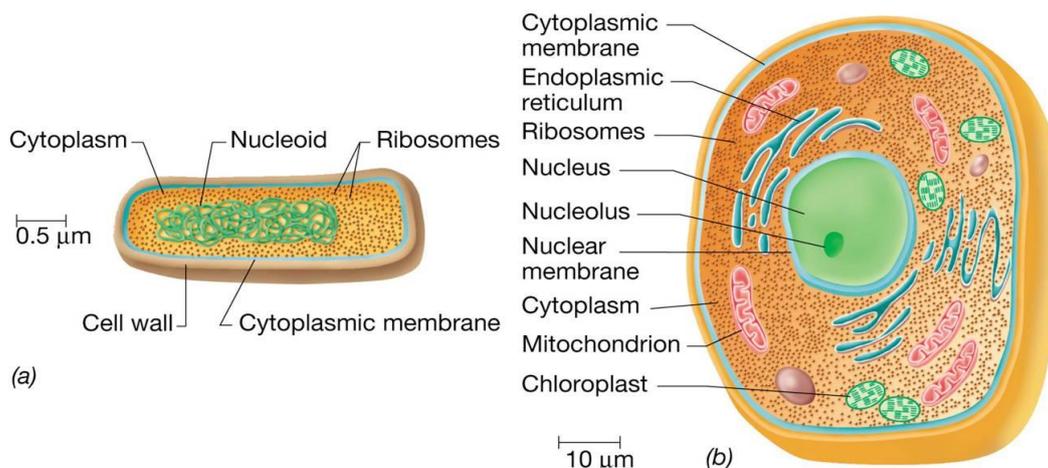


MICROBIOLOGIA MEDICA: scienza che si occupa dello studio dei microorganismi patogeni e dei microorganismi simbiotici della flora microbica normale, che svolgono un ruolo importantissimo nel mantenimento dell'omeostasi. I microorganismi della flora microbica normale possono anche proteggerci dall'invasione di microorganismi patogeni.

MICROBIOLOGIA: branca della biologia che studia organismi unicellulari. Hanno dimensioni assai piccole e sono visibili solo al microscopio. Talora possono formare aggregati pluricellulari nei quali però tutte le cellule sono equivalenti. Gli organismi unicellulari sono i batteri, i protozoi e i miceti microscopici. La microbiologia comprende anche la virologia, che studia i virus, che sono microorganismi endocellulari obbligati, cioè necessitano del metabolismo di una cellula ospite.

EUCARIOTI: sono alghe, protozoi e miceti microscopici e cellule animali, caratterizzati da una struttura cellulare con un nucleo evidente ed organizzato e una architettura cellulare identica a quella delle cellule degli organismi pluricellulari. Hanno dimensioni maggiori di 5micrometri; i cromosomi sono costituiti da filamenti diDNA e il genoma è diploide. Per quanto riguarda le strutture citoplasmatiche questi presentano sempre mitocondri, corpi del Golgi, reticolo endoplasmatico, ribosomi 80s (60s+40s) e la membrana citoplasmatica è caratterizzata dalla presenza di steroli. In genere non presentano parete cellulare, e se è presente è formata da chitina. La riproduzione avviene in via sessuata o asessuata a seconda della specie cellulare; il movimento avviene grazie alla presenza di un flagello complesso (qualora esso sia presente) e il loro metabolismo si basa sulla respirazione cellulare, che avviene nei mitocondri.

PROCARIOTI: comprendono i batteri, che possono essere di dimensioni comprese tra i 0.5 e i 3 micron. Presentano un nucleo non definito, costituito da un unico cromosoma circolare, disperso nel citoplasma della cellula e caratterizzata da un'estrema essenzialità di strutture citoplasmatiche, ma presentano ribosomi 70s (50s+30s). Presentano una membrana plasmatica che non contiene steroli; la parete è sempre presente e costituita da una struttura complessa; si riproducono per scissione binaria asessuata; sono in grado di muoversi solo in presenza del flagello, che è in generale di tipo semplice e la respirazione avviene a livello della membrana plasmatica.



I batteri, sono estremamente semplici, ma anche estremamente efficienti e in grado di vita autonoma. Questa efficienza deriva dalla loro organizzazione strutturale. non hanno gli organelli citoplasmatici

come le cellule eucariote (quindi non hanno mitocondri, non presentano reticolo endoplasmatico, non c'è evidenza di membrana nucleare, ecc...).

Un batterio ha dimensioni minori di una cellula animale (quindi < 5-10 micron), perchè hanno dimensioni al di sotto del micron. I batteri sono parte anche della flora batterica normale, sono agenti di infezione e hanno un ruolo molto importante nelle biotecnologie.

I batteri visti come agenti patogeni, cioè che non esistono come flora microbica normale sono stati individuati tramite i postulati di Koch, che sono riassunti in 4 punti essenziali necessari per stabilire che un microorganismo che veniva isolato nel contesto della malattia era effettivamente coinvolto nella malattia. Questi sono:

- un microorganismo deve essere presente sempre in ogni caso di malattia;
- l'organismo deve poter essere isolato e fatto crescere in una coltura cellulare;
- la stessa malattia deve poter essere ottenuta inoculando il microorganismo isolato in un animale da laboratorio sensibile alla malattia;
- l'organismo deve poter essere nuovamente isolato dall'animale infettato sperimentalmente.

Questi postulati di Koch si sono evoluti nel tempo, e attualmente sappiamo che esistono microorganismi in grado di riprodursi non rispettando i postulati di Koch.

Un'infezione può essere:

-ESOGENA: infezione data da microbi che non fanno mai parte della flora microbica normale. Questi batteri rispettano i 4 postulati di Koch. Per ottenere questo tipo di infezione mi devo "infettare".

-Utilizzando farmaci, posso alterare la capacità del sistema immunitario e alterare l'equilibrio esistente tra di esso e la flora microbica normale; in queste condizioni di disfunzione del sistema immunitario posso avere infezioni, anche gravi, causate dalla flora microbica normale. Questo tipo di infezione è detta ENDOGENA e non rispetta i 4 postulati di Koch. Queste infezioni sono in genere più mortali e più emergenti delle precedenti. In particolare sono più emergenti per lo smodato utilizzo di antibiotici. In queste infezioni il malato non si è infettato, ma il problema è l'alterata funzionalità del sistema immunitario.

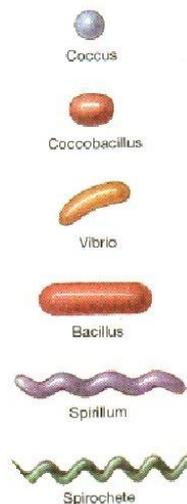
STUDIO DELLA MORFOLOGIA BATTERICA

Le dimensioni dei batteri possono essere utili per identificare il batterio, come anche la sua forma e la sua citoarchitettura. La loro identificazione è necessaria per proiettare il batterio su un tipo di infezione, dove "proiettare" significa associare il batterio ad una malattia infettiva diagnosticata e riconosciuta. Dal punto di vista clinico ciò non è così semplice, e si procede a più passaggi:

- bisogna innanzitutto capire che si tratta di una malattia infettiva;
- bisogna orientarsi su che tipo di infezione sia, per fare il prelievo giusto e richiedere la diagnostica giusta e per iniziare se necessario la terapia giusta.

La forma, le aggregazioni e le dimensioni del batterio sono particolarmente utili quando faccio un campionamento da siti sterili, cioè siti in cui non sono normalmente presenti dei batteri.

COCCHI: sono batteri dalla forma tondeggiante che possono essere raggruppati in 3 ultrastrutture diverse: se organizzati in catenelle si dicono **STREPTOCocchi**; se organizzati in grappoli invece si dicono **STAFILOCocchi**. In alcuni casi i cocci sono accoppiati a 2 a 2 e si dicono **DIPLOCocchi**. I cocci più comuni in medicina stafilococchi e streptococchi, che possono fare parte sia della flora microbica normale che dei patogeni. I cocci sono in genere gram+. Negli streptococchi, i singoli cocci si dividono sempre lungo lo stesso asse, e per questo assumono una struttura a catenella, mentre negli stafilococchi, i singoli cocci si dividono su più assi e formano un grappolo.



BACILLI o bastoncelli: batteri dalla forma più allungata, bastoncellare, i quali possono essere presenti sottoforma di aggregati a catenelle che prendono il nome di **STREPTOBacilli**. Possono essere presenti batteri detti **COCCOBACILLI**, che sono cocci dalla forma allungata, di difficile identificazione

SPIROCHETE: batteri spiraliformi, allungati e molto fini

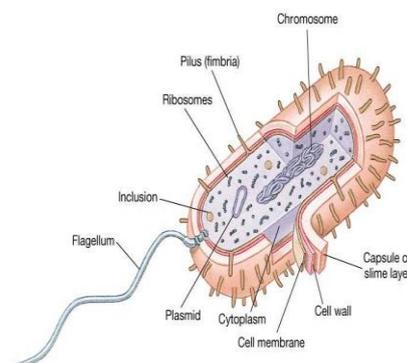
VIBRIONI: batteri dalla forma ricurva

SPIRILLI

FILAMENTOSI

La struttura del batterio comprende molti componenti di cui alcuni sono obbligatori, mentre alcuni sono accessori.

I componenti accessori possono essere geneticamente determinati, oppure cambiare al cambiare dell'ambiente circostante (come nel caso di un'infezione, in cui il batterio cambia perché deve mettere in atto una serie di protezioni contro il sistema immunitario). Per compiere quest'adattamento i batteri hanno messo in atto strategie, che vengono applicate solo quando necessario. Ciò significa che il batterio isolato dalla flora microbica normale e il batterio in sede di infezione saranno diversi strutturalmente. Nel contesto di un'infezione, la modificazione più importante avviene a livello dello strato più esterno del corpo batterico, e si tratta della cosiddetta capsula. La capsula è uno strato mucoso prodotto dal batterio che avvolge la parete batterica, ed è generalmente associata a una condizione di infezione. Sulla parete batterica, che è la parte più esterna del corpo batterico, sono localizzate le molecole antigeniche riconoscibili dal sistema immunitario. La parete batterica però è essenziale per il batterio in quanto costituisce una struttura di protezione rigida e impermeabile. Coprendo la parete con la capsula, i batteri si rendono meno



riconoscibili dal sistema immunitario e si difendono meglio. La capsula è una classica struttura accessoria opzionale. Le strutture di rivestimento batterico sono:

- capsula (opzionale);
- parete batterica;
- membrana plasmatica;

L'integrità dei batteri è data dalla parete batterica e dalla membrana plasmatica. La membrana plasmatica racchiude il citoplasma batterico, che contiene i ribosomi per la sintesi proteica e il materiale genetico. Il materiale genetico è costituito da un solo cromosoma e da materiale extracromosomiale, contenuto nella struttura circolare del plasmide, libero nel citosol. I plasmidi sono più piccoli del cromosoma; il DNA plasmidico si replica autonomamente e può passare da un batterio all'altro, o con la liberazione del materiale genetico alla morte del batterio ma anche senza la morte dei batteri, tramite meccanismi di scambio di materiale nucleare (uno di questi meccanismi avviene proprio tramite scambio del plasmide). Questi plasmidi codificano per un determinato numero di proteine, che cambiano la biologia del batterio. Questo processo è essenziale per la variabilità genetica, in quanto essa non sarebbe possibile perché i batteri si riproducono in via asessuata.

Altre strutture sono in genere estroflessioni della membrana plasmatica e abbiamo:

-PILI o FIMBRIE: strutture prevalentemente proteiche che hanno diverse funzioni, quali l'adesione al sito di replicazione, funzione molto importante, perché solo pochi batteri entrano nelle cellule, quindi devono aderire al tessuto su cui proliferare. Questo scopo adesivo è molto importante per le infezioni delle vie urinarie, che essendo sempre sottoposte a flusso idraulico, non permetterebbero la persistenza dei batteri in situ e verrebbero continuamente espulsi;

-FLAGELLI: strutture molto più lunghe rispetto a pili e fimbrie, sempre di natura proteica e posso presenti in singola copia o in più copie. La funzione di questi flagelli è prevalentemente la motilità, che viene ottenuta attraverso un movimento rotatorio del flagello. L'espressione del flagello può essere geneticamente determinata.

I batteri a seconda della specie hanno caratteristiche diverse

Classifichiamo quindi le strutture cellulari in:

Strutture essenziali: parete cellulare, membrana citoplasmatica, nucleoide, ribosomi

strutture accessorie: capsula, appendici (pili, fimbrie, cilia, flagelli), granuli, plasmidi

I batteri, nel contesto del loro corpo batterico, hanno una distribuzione di macromolecole ben definita.

La membrana plasmatica dei batteri è fondamentalmente uguale alla membrana plasmatica degli eucarioti. Essa è costituita da un bilayer fosfolipidico in cui sono localizzate delle proteine e sono presenti invaginazioni dette mesosomi. Nella membrana plasmatica dei batteri non abbiamo steroli

(esclusi i micoplasmi, che invece presentano steroli in membrana). Questa membrana è molto attiva dal punto di vista enzimatico, in quanto a livello di essa sono localizzati tutti gli enzimi per la produzione di energia, tramite la respirazione cellulare.

La stragrande maggioranza dei batteri si colora con la colorazione di gram, per via delle comuni strutture di membrana, ma abbiamo delle eccezioni.

In questa membrana sono intercalate una serie di proteine e di glicoproteine, che possono avere una funzione anche di trasportatori, in modo che molecole e sostanze possono passare tra interno ed esterno del bilayer, sia per trasporto attivo (in cui c'è riconoscimento e consumo di energia) o per trasporto passivo (in cui le sostanze passano liberamente attraverso la proteina, senza consumo di energia). Questi sistemi permeabilizzano la membrana, ma permettono di mantenere comunque un certo grado di selettività. Le sostanze possono muoversi anche grazie alla forza protonmotrice che si genera a livello della membrana plasmatica.

LA PARETE BATTERICA (introduzione alla lezione successiva)

La parete batterica è la struttura dei batteri più sfruttata in assoluto, perchè è una struttura presente solo nei batteri con proteine esclusive. Questo è ciò che la rende così speciale e riconoscibile dal nostro sistema immunitario. Noi siamo in grado di colpire batteri e virus perchè abbiamo individuato processi metabolici (come processi coinvolti nella sintesi della parete batterica, in cui sono coinvolti enzimi esclusivi dei batteri) o strutture (come la parete batterica stessa) che possono essere colpiti da farmaci. Contro i virus abbiamo meno farmaci, perchè vivono all'interno delle nostre cellule e sfruttano le nostre vie metaboliche. Per questo la parete batterica è molto utilizzata sia dal punto di vista diagnostico, che dal punto di vista farmacologico.

LA PARETE BATTERICA

La parete batterica è tra i componenti essenziali dei batteri e costituisce la struttura più esterna e quindi la struttura che caratterizza meglio i batteri alla risposta ai coloranti utilizzate nelle tecniche di colorazione (utilizzate anche a scopo diagnostico), in quanto queste sostanze reagiscono con componenti della parete batterica e dipende quindi dalla composizione biochimica della parete. La composizione biochimica della parete ci permette quindi di classificare i batteri che infettano l'uomo. Ci sono vari tipi di parete, ma in questo corso andremo ad analizzare le seguenti:

-la tipologia maggiormente rappresentata è la parete caratterizzante i batteri gram+ e i gram-. Con questa colorazione raggruppiamo la stragrande parte dei batteri importanti per l'uomo. Con la dizione "gram positivo" e "gram negativo" raggruppiamo la gran parte dei batteri più importanti nell'uomo;

-quella che caratterizza la classe dei micobatteri, che non rientrano nella classificazione di gram, perchè hanno una parete con caratteristiche diverse. Questi batteri sono colorati con una colorazione specifica detta di Ziehl-Neelsen;

-quella che caratterizza altri batteri, atipici, che hanno una parete ancora diversa rispetto a quella degli altri 2 gruppi, che però non viene riconosciuta con particolari colorazioni, e a questa categoria appartengono i micoplasmi, le clamidie e altri classi batteriche.

Le pareti batteriche conferiscono rigidità al corpo batterico ed è quindi sempre importante per mantenere l'integrità del corpo batterico.

La distinzione dei vari tipi di parete non è utile solo ai fini delle tecniche di colorazione, ma è indispensabile anche per capire la biologia della cellula, in quanto anche la parete partecipa ai vari processi biologici della cellula.

LA PARETE DEI BATTERI GRAM+ E GRAM-

I gram+ e i gram- sono differenziabili tramite la microscopia elettronica:

-la parete dei gram+ è composta da un unico strato omogeneo, localizzato al di fuori della membrana plasmatica, composto da un'unica proteina detta peptidoglicano, che è un polimero di 2 molecole, che si ripetono più volte (ed è presente anche nella parete dei gram- e dei micobatteri, ma in percentuale minore). La membrana plasmatica dei gram+ coincide con lo spesso strato di peptidoglicano. I batteri caratterizzati da questo tipo di membrana, presentano come struttura accessoria i flagelli, la capsula, altre componenti accessorie, ma non i pili.

-la parete dei gram- presenta una struttura molto più complessa, in quanto è composta da una membrana interna e una esterna, in cui è frapposto uno strato sottile di peptidoglicano. L'esterno della parete dei gram- è quindi diverso da quello dei gram+. La membrana interna della parete dei gram- corrisponde in realtà alla membrana plasmatica. A livello microscopico, il rivestimento di questi batteri viene visto come un tristrato, in cui nella parte più esterna c'è la parete batterica, più internamente lo strato di peptidoglicano e infine la membrana interna. Questa classe di batteri presenta tra le strutture accessorie annovera quasi tutte le strutture possibili, compresi i pili, assenti nella parete dei gram+.

La diversità della parete dà differenze nella reattività colorimetrica, nella permeabilità a nutrienti e anche a farmaci. Quindi, farmaci efficaci su batteri gram+ possono non esserlo su batteri gram-, appunto per via di queste differenze nella struttura della parete.

COLORAZIONE DI GRAM

La colorazione di gram è una colorazione differenziale che si basa su una diversa capacità della parete batterica di reagire con i coloranti e che ci permette di distinguere i batteri dei 2 generi.

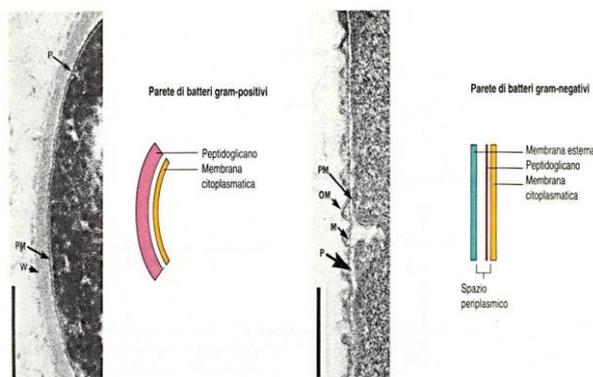
la procedura è la seguente:

-coloro la coltura batterica con un primo colorante, detto cristalvioletto, chiaramente di colore violetto;

-fisso il colorante alla parete batterica con una soluzione iodoiodurata detta "lugol";

-eseguo una breve decolorazione (rispettando il tempo di decolorazione) utilizzando dell'alcool;

-i batteri gram+, che fissano il colorante bene non si decolorano (se supero il tempo di decolorazione però si decolorano anche questi), mentre i gram- si decolorano;



-i gram+ saranno quindi colorati in violetto, mentre i gram- saranno decolorati e saranno incolore; -eseguo una controcolorazione con un colorante diverso e dal diverso colore, che in questo caso è la fucsina, dal colore rosa, che colora solo i gram-.

Essendo differentemente colorati, posso iniziare a riconoscere i batteri in base a questo parametro, anche se ciò non mi permetterà di distinguerli tutti. Per distinguere i batteri allora potrò utilizzare anche i parametri forma e dimensione.

Questa colorazione non ha alcun senso se analizzo un campione di flora batterica normale (campione orofaringeo, campione fecale,...), perchè osserverò un mix di batteri di diversi colori, ma può essere utile a scopo diagnostico sull'analisi di un campione prelevato da un sito sterile (tipo il liquor cefalorachidiano). Infatti in un paziente con meningite, questo campione non è più sterile, e posso visualizzare ciò con una colorazione di gram, che peraltro è molto rapida da eseguire. Questa colorazione distingue i batteri anche in base alla costituzione della parete.

Una componente della parete sempre presente nei batteri è il peptidoglicano. Questo peptidoglicano è presente solo nei batteri, quindi i batteri presentano un macchinario biosintetico con enzimi esclusivi dei batteri. Uno dei meccanismi su cui si basano farmaci antibiotici si basa infatti sull'inibire gli enzimi per la sintesi del peptidoglicano, impedendo quindi la corretta sintesi della parete batterica, rendendo più deboli i batteri o uccidendoli direttamente.

STRUTTURA DEL PEPTIDOGLICANO

Il peptidoglicano è costituito essenzialmente da una struttura polimerica, costituita a sua volta da un dimero ripetuto che formerà strutture a catena, che poi si intersecano tra di loro. Il peptidoglicano è una struttura compatta, per proteggere il batterio dalla lisi, anche quando l'ambiente esterno non è isotonico: in questo modo in ambiente ipotonico, anche se la cellula si gonfia, questa non può scoppiare perchè il volume è limitato dalla rigidità della parete.

Queste due componenti del dimero sono 2 monosaccaridi azotati che si chiamano N-acetilglucosamina e acido N-acetilmuramico (in breve NAG e NAM), e sono tenute legate da legami trasversali, che rinforzano la struttura. Questi legami sono di natura peptidica, che si formano tra strutture amminoacidiche e che partono dall'estremità carbossiterminale del NAM e tramite l'interposizione di una catena amminoacidica fatta da 4/5 amminoacidi, prendono attacco all'estremità amminoterminale del NAG di una catena parallela.

NAM e NAG sono invece concatenati tramite legami B-1,4-glicosidici. Le catene tetrapeptidiche si legano direttamente tra loro nei gram-, mentre si legano tramite una pentaglicina, che fa da ponte nei gram+. Gli enzimi che determinano la formazione dei legami trasversali si chiamano transpeptidasi, e sono inibiti dagli antibiotici della famiglia delle penicilline.

La parete batterica identifica il batterio anche dal punto vista antigenico, quindi è chiaro che sulla parete dei gram+ di peptidoglicano e sulla membrana esterna dei gram- ci sono dei determinanti antigenici. Esistono dei determinanti antigenici interspecie, che caratterizzano i batteri appartenenti a specie diverse; esistono anche varianti antigeniche intraspecie, perchè un batterio è comunque diverso dall'altro e sono unici, altrimenti non possono più dare infezione.

Il peptidoglicano dei gram+ quindi è complessato con strutture antigenicamente diverse, intercalate nello strato di peptidoglicano, e sono acidi teicoici e lipoteicoici, e sono diversi da specie a specie. La variabilità antigenica dei batteri gram+ è garantita da queste strutture intercalate, che sono polimeri di polialcoli, legati a una porzione lipidica. Inoltre la parete può essere accessoriata

della capsula. Le strutture antigeniche che fanno la diversità nei gram+, non sono le stesse nella membrana esterna dei gram-. Possiamo poi definire la parete cellulare dei batteri gram+ come una struttura altamente polare e impermeabile a molecole idrofobiche.

Nei gram- la parete è più complessa, in quanto fatta da 3 strati:

- Membrana interna (o plasmatica);
- strato di peptidoglicano, ridotto di spessore
- membrana esterna molto spessa, che costituisce il componente maggiore della parete ed è la componente con l'impatto più grande sulla fisiologia della cellula.

La membrana esterna è un bilayer fosfolipidico asimmetrico, più spesso e diverso da quello interno. Il foglietto esterno della membrana esterna dei batteri gram- è costituita dal lipopolisaccaride (LPS o endotossina) che è il principale componente tossico della dei batteri gram- e ne fa la patogenicità. Oltre a questa molecola troviamo:

- fosfolipidi, siti nel foglietto interno;
- proteine, inserite a varie altezze;
- lipoproteine che ancorano la membrana esterna allo strato sottostante di peptidoglicano.

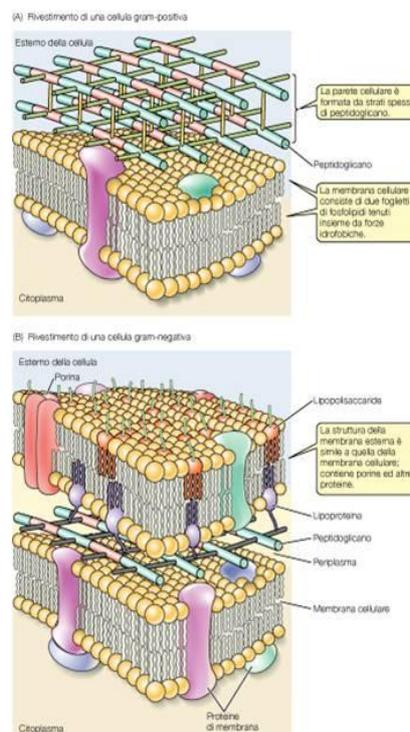
Osserviamo poi la presenza dello spazio periplasmico, localizzato tra membrana interna e membrana esterna, che non è uno spazio virtuale ma uno spazio reale, in cui sono presenti componenti proteiche ad attività enzimatica importante (quali attività detossificanti). Questo gel di proteine protegge l'ambiente interno da sostanze provenienti dall'ambiente esterno. Il peptidoglicano è ancorato alla membrana esterna ma non a quella interna, per questo si forma lo spazio periplasmico.

STRUTTURA DEL LIPOPOLISACCARIDE (LPS)

L'LPS è un lipopolisaccaride, ed è un costituente unico dei batteri gram-. Questa molecola è divisa in 3 zone:

- una parte lipidica, che è il lipide A, sita all'interno della membrana;
- 2 componenti polisaccaridiche, una corta e una lunga.

Quella corta è quella centrale e detta "core", mentre quella lunga è la catena laterale detta anche catena/antigene O. Queste 2 parti polisaccaridiche vengono distinte perchè la composizione è diversa tra i diversi batteri gram-. Infatti, se tutti i batteri avessero lo stesso LPS ogni batterio gram- sarebbe uguale all'altro dal punto di vista antigenico. Il core non dà l'identità antigenica all'LPS della specie batterica, ma questa è data dalla catena laterale, in quanto questa struttura è variabile nelle varie specie. Ciò è dovuto al fatto che il core è molto più corto della catena



laterale (quindi sito centralmente nella membrana e meno esposto) ed è molto più conservato nelle varie specie di gram-. LPS ha capacità tossica, in quanto innesca nel nostro organismo una risposta infiammatoria.

I batteri innescano infiammazione anche tramite l'LPS, che va a interagire con il recettore TLR4 della famiglia toll. I batteri gram- provocano morte nell'infettato per shock settico data dall'LPS. L'LPS dei batteri è quindi simile ma non uguale, per via della differenza della catena laterale (detta antigene O o "antigene somatico", per distinguerlo dall'antigene "flagellare" tipico dei flagelli), garantendo specificità di tossicità. L'LPS dei batteri gram- della flora batterica normale però non dà reazione infiammatoria, perché finché esso sta nel lume intestinale non determina infiammazione in quanto le cellule sono LPS-tolleranti, ma se passa nei tessuti circostanti, determina infiammazione (in questo caso peritonite, che può essere mortale). L'LPS è sempre tossico, ma la sua tossicità dipende anche dalla quantità presente nella zona infetta. Siccome le infezioni progrediscono molto velocemente, in quanto i batteri proliferano in modo esponenziale nella prima parte dell'infezione se l'ambiente è quello giusto, si avrà una rapida attivazione dei processi infiammatori. Quindi tossicità e quantità sono 2 parametri linearmente correlati. Analizzando la struttura dell'LPS osserviamo che:

- il lipide A è un glicosfingolipide formato da un dimero di NAG-fosforilato legato ad acidi grassi a catena lunga; rappresenta la porzione idrofobica che ancora LPS alla membrana ed è il principio tossico dell'intera molecola. Questa parte è altamente conservata in tutti i batteri gram-;
- il core è un oligosaccaride a struttura costante e contiene uno zucchero a 8 atomi di C e uno a 7;
- la catena laterale è un polisaccaride costituito dalla ripetizione di subunità a 3/4 o 5 zuccheri, responsabili delle proprietà antigeniche delle diverse specie batteriche e utilizzato per la classificazione sierologica dei batteri gram-

PARETE CELLULARE DEI GRAM-

La parete esterna dei gram- è estremamente impermeabile, sia alle molecole idrofobiche che a quelle idrofiliche, quindi si sono sviluppati meccanismi di trasporto (ponti proteici) che intercalano il bilayer fosfolipidico della membrana esterna e sono rappresentati dalle porine, cioè proteine canale che consentono la diffusione passiva di molecole idrofile di peso compreso tra i 600 e i 700 dalton. La parete cellulare dei gram- non contiene acidi teicoici.

I batteri agiscono tramite componenti tossici quali l'endotossina (che è un componente strutturale solo dei gram-) e le esotossine, che sono proteine prodotte dai batteri (sia gram+ che gram-) che questi secernono nell'ambiente esterno. Osserviamo quindi che i batteri gram- hanno più strumenti che gli consentono di arrecare danno ai tessuti, e inoltre inducono infiammazione con la loro sola presenza.

La penicillina impedisce la formazione dei legami trasversali inibendo le transpeptidasi nella parete di peptidoglicano, e sarà molto più efficace sui gram+, per i quali è più importante il peptidoglicano, mentre sarà meno efficace sui gram-, nei quali la mancata produzione dello strato di peptidoglicano colpisce una frazione più piccola della parete cellulare.

I MICOPLASMI

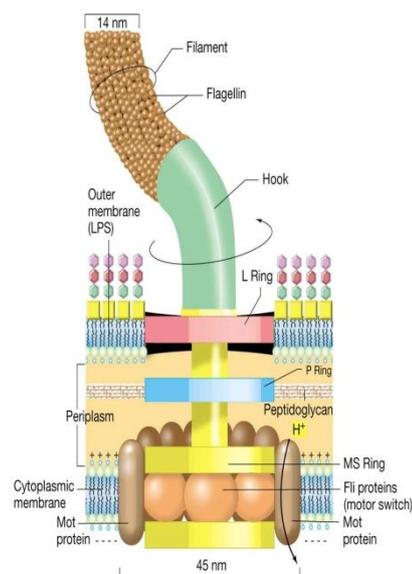
Sono batteri atipici, privi di parete batterica classica, ma che presentano una membrana plasmatica

ricca in steroli, che la rende molto resistente. Non li coloriamo con la colorazione di gram e sono batteri resistenti alle penicilline, perchè non devono sintetizzare peptidoglicano.

MICOBATTERI

Sono una classe di batteri molto numerosa, nel senso che ci sono molte specie di micobatteri di cui fa parte il batterio della tubercolosi. Questi batteri hanno patogenicità diversa e possono essere trovati in diversi distretti del nostro organismo, in alcuni dei quali non danno luogo a nessuna risposta infiammatoria. La lesione dei micobatteri è diversa da quella degli altri batteri, in quanto non dà una lesione suppurativa, ma danno un'infiammazione localizzata detta granuloma, che diventa cronico, si espande, distrugge il tessuto e fa perdere la funzionalità. fanno tutto ciò anche perchè hanno una parete molto particolare, che risponde alla colorazione di Ziehl-Neelsen; questa colorazione è molto importante in diagnostica perchè è selettiva solo per i micobatteri e mi permette di identificarli in modo semplice e rapido.

La parete presenta un rivestimento costituito dalla membrana plasmatica all'interno e un sottile strato di peptidoglicano. Il grosso della parete dei micobatteri è lipidica e la parte esterna è costituita da arabino-mannani e arabino galattani complessati con acidi micolici, ma anche da glicolipidi fenolici. Essa è molto impermeabile e spessa, quindi questi batteri sono colpiti solo da farmaci specifici in grado di entrare all'interno del corpo batterico.

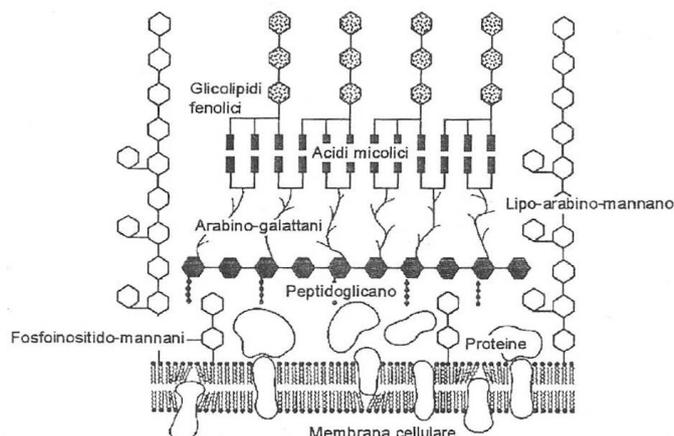


COLORAZIONE DI ZIEHL-NEELEN

La colorazione di Ziehl-Neelsen evidenzia l'acido-resistenza dei micobatteri e di altri microorganismi acido-resistenti. Anche se uccisi, questi batteri non sono colorabili con i normali coloranti istologici, se non mediante trattamento a caldo; una volta colorati sono difficilmente decolorabili. La procedura è la seguente:

- stemperare la sospensione batterica al centro del vetrino per sciogliere leggermente la parete esterna;
- fissare i batteri;
- colorare con colorante primario a caldo con fucsina basica;
- decolorare con acido solforico al 20%;
- lavaggio;
- controcolorare con blu di metilene;
- asciugatura;
- osservazione;

I micobatteri fissano bene la fucsina basica e non si decolorano, perchè sono acido-resistenti e risaltano con colore rosa.



Le altre cellule saranno colorate con blu di metilene. I micobatteri sono identificabili anche per la forma, in quanto sono bastoncelli lunghi e stretti.

I micobatteri sono patogeni perchè sono in grado di resistere all'interno delle cellule (soprattutto nei macrofagi, da dove fanno partire l'infiammazione). Non sono dotati di LPS e non producono esotossine, quindi il loro meccanismo patogenetico è totalmente particolare.

STRUTTURE ACCESSORIE DELLA PARETE BATTERICA E LORO FUNZIONE

CAPSULA

La capsula è detta anche "strato mucoso" (termine non molto utilizzato però) che alcuni batteri secernono per proteggersi, cioè si rivestono di questo strato di natura polisaccaridica, che aumenta la loro capacità invasiva, occultandoli al riconoscimento del sistema immunitario e permettendo di mantenersi durante l'infiammazione, occultando le molecole antigeniche e impedendo la fagocitosi. La capsula favorisce anche l'adesione, previene l'azione del complemento e anche la fagocitosi.

La capsula di alcuni batteri può essere usata anche a scopo vaccinale, come nel caso della neisseria meningitidis, in quanto rappresenta la componente più esterna, e quindi la componente da riconoscere da parte delle cellule del sistema immunitario. La neisseria meningitidis per andare a infettare l'SNC deve passare attraverso il sangue, e per fare ciò deve quindi essere capsulata. La capsula è uno strato amorfo, priva di struttura definita e rigida e infatti non fa la forma batterica. La capsula può essere vista in contrasto su alcune tipi di colorazioni scure come un areola che circonda i batteri. La capsula può essere più o meno spessa e alcune cellule possono non averla; inoltre alcune cellule possono avercela più grossa mentre altre più piccole.

FLAGELLI

I flagelli fanno parte della struttura dei batteri, sono strutture accessorie, sono tipici dei bacilli e hanno diverse funzioni:

- sono utili a scopo diagnostico, in quanto dotati di capacità antigenica;
- danno motilità ai batteri in quanto organelli locomotori;
- mediano reazioni chimiche, agendo da sensori dell'ambiente;
- possono essere in singola o multipla copia (monotrichi, lofotrichi o peritrichi)
- permette la chemiotassi.

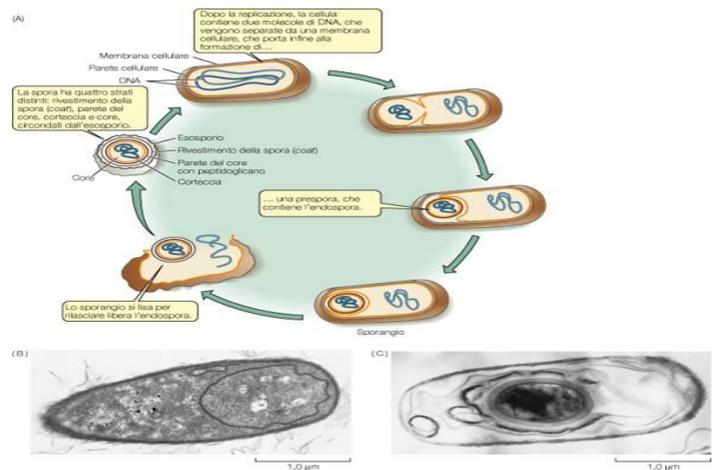
Il flagello è una struttura estremamente complessa, che ruota su se stessa e che dà un movimento propulsivo del batterio, con consumo di ATP. Il consumo di ATP fa ruotare la base del flagello e lo fa muovere, spingendo il batterio. La proteina dei flagelli è detta flagellina, ed è una proteina a carattere antigenico.

PILI O FIMBRIE

Tipici dei batteri gram- sono i pili e le fimbrie. Sono strutture che protrudono dalla parete, sono di natura proteica e hanno una generale funzione di adesione.

Ci sono però anche i pili sessuali (o pilo F o pilo di coniugazione), che sono pili specializzati per il processo di coniugazione batterica. Il batterio dotato di pili non li presenta mai in singola copia, ma

ne presenta una moltitudine, mentre i pili sessuali (quando presenti) sono sempre in numero minore rispetto ai pili generici. I pili sessuali permettono la formazione di un "ponte" che unisce temporaneamente 2 batteri e che permette di scambiarsi materiale genetico: questo è l'unico caso di unione "sessuale" che conosciamo nei batteri, perchè sono per definizione a riproduzione asessuata. La coniugazione batterica dimostra che i batteri possono essere uniti temporaneamente attraverso il pilo sessuale, che però è presente solo sui batteri che presentano il plasmide sessuale, che stimola la produzione di questo pilo.



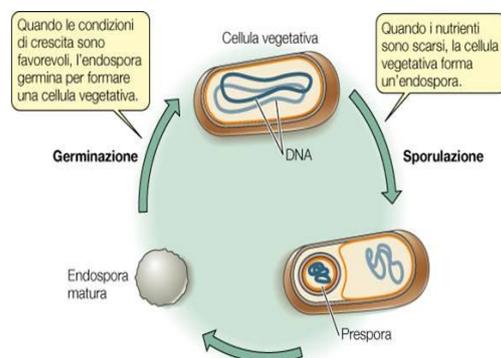
SPORE BATTERICHE O ENDOSPORA

La spora è un'altra struttura accessoria. Le spore sono tipiche dei batteri sporigeni, e vengono sviluppate dai batteri per resistere a condizioni sfavorevoli. Infatti la spora è una cellula quiescente, prodotta dalla stessa cellula vegetativa (che poi va incontro a morte) dotata di estrema resistenza. La spora sopravvive per tempi indefiniti per via del fatto che hanno un metabolismo bassissimo, è resistente ad alte temperature e a trattamenti con solventi organici. I batteri che producono spore sono quelli del genere bacillus e del genere clostridium, gli unici sporigeni, mentre tutti gli altri sono non sporigeni.

La spora è una forma alternativa di vita, ed è unicamente costituita da involucri resistenti, contenenti il genoma e il minimo macchinario indispensabile per permettere la germinazione; ha quindi il solo scopo di mantenere la specie in un periodo di condizioni avverse in attesa di condizioni favorevoli, che permettano il processo di germinazione, cioè il processo di trasformazione della spora nella forma vegetativa.

La spora ha un basso contenuto di acqua, è resistente alla disidratazione, ma anche ai raggi UV e a molti altri agenti lesivi. In qualsiasi caso, le spore possono infettare, e in particolare possiamo essere infettati da spore provenienti dall'ambiente esterno, e non per forza per contatto diretto con un soggetto infetto.

Le spore si formano attraverso il processo di sporulazione, che avviene perchè, quando si moltiplica il cromosoma batterico, uno dei 2 cromosomi viene rivestito dall'involucro della spora detto "esosporio", costituito da membrana plasmatica, parete batterica, ed è ricco in sostanze tipo dipicolinato di calcio, che rendono resistente la cellula ad agenti chimici e fisici. L'endospora può essere visualizzata al microscopio ottico tramite colorazioni particolari e può anche provocare cambiamenti morfologici della cellula. Il clostridium tetani, l'agente eziologico del tetano, è un batterio sporigeno.



METABOLISMO BATTERICO

Il metabolismo della cellula batterica è quello della cellula eucariotica presentano diverse differenze, soprattutto per quanto riguarda il loro rapporto con l'ossigeno: mentre per le cellule eucariote è necessaria la presenza dell'ossigeno, per i batteri ciò può essere facoltativo.

I batteri si dividono per scissione binaria. Questo processo, estremamente complesso, implica innanzitutto la moltiplicazione del cromosoma, l'allungamento della cellula e la formazione di un setto che divide la cellula madre in 2 cellule figlie perfettamente identiche alla cellula madre, portando alla formazione del cosiddetto clone, in quanto un batterio dà origine a una popolazione batterica uguale a se stesso. Per fare questo le cellule impiegano un tempo estremamente variabile (dipendente dalla specie batterica) detto "tempo di dimezzamento". Per esempio, E.Coli ha tempo di dimezzamento di circa 20 minuti, mentre i micobatteri, per via della loro parete più complessa, impiegano tempi decisamente più lunghi.

Quando i batteri si trovano in un ambiente ottimale per la crescita danno origine alla così detta "crescita esponenziale", perchè se in un unità di tempo pari al tempo di dimezzamento la cellula madre dà origine a 2 cellule figlie a ogni generazione il numero di cellule si raddoppia. Questo rappresenta il calcolo matematico che rappresenta la crescita batterica in un ambiente ottimale. Un ambiente ottimale può essere ottenuto in vitro, con la costituzione di un terreno di coltura artificiale, in cui l'atmosfera, la pressione di ossigeno, la presenza di nutrienti, l'idratazione, la temperatura e altri parametri importanti per la crescita cellulare possono essere impostati. Inoculando dei batteri su un terreno di coltura questo segue delle fasi di crescita, potremo quindi studiare la crescita batterica e costruire una curva di crescita batterica, rappresentabile su un grafico dove in ordinata abbiamo la conta logaritmica della popolazione dei batteri, mentre sull'ascissa il tempo. Siccome queste conte vengono generalmente fatte in un terreno liquido, la quantità di batteri viene in genere espressa come numero di batteri/unità di volume. Costruire una curva può essere utile durante un infezione, dove osserviamo diverse fasi:

-se il batterio arriva infettando l'organismo e trova delle condizioni ottimali e una scarsa competizione con altri organismi, questo si instaura nel nostro organismo;

-all'inizio c'è una fase di "lag", in cui non si ha crescita e la cellula si adatta alle condizioni ambientali;

-dopo una prima fase di adattamento i batteri cominciano a dividersi, e questa fase è detta "fase esponenziale", in cui i batteri aumentano di numero in modo molto importante della massa batterica in un lasso di tempo molto breve.

Questa fase spiega l'infezione acuta, in quanto i batteri a tempo di dimezzamento rapido, possono dare luogo a popolazioni ingenti in brevi lassi di tempo e dare luogo a infezioni più gravi. La fase esponenziale è importante per determinare la carica batterica degli alimenti: su di essi i batteri possono trovare un terreno fertile per proliferare e dopo poche ore può essere tale per rendere l'alimento non più commestibile; la conservazione in ambiente freddo è sicuramente necessaria, ma non sufficiente per il mantenimento a lungo termine, in quanto il freddo rallenta solo la crescita batterica e non la arresta; inoltre i batteri si possono adattare a queste condizioni. Per eseguire la conta dei batteri lo posso fare in 2 modi: se lavoro in un mezzo di coltura liquidi posso valutare la torbidità del mezzo di coltura. Posso quindi valutare la densità ottica con uno spettrofotometro ed è correlata alla densità di popolazione tramite delle leggi matematiche. Questo tipo di conta si dice

"non vitale", perchè conta sia i batteri vivi che quelli morti.

-Segue una fase stazionaria, in cui la massa batterica, che si è espansa troppo, vò incontro a scarsità di nutrienti e ad accumulo di sostanze tossiche, quindi la crescita si arresta e le cellule pian piano muoiono. Quindi, morendo osservo che in un campione liquido, eseguendo la conta non vitale, la torbidità diminuisce di meno, perchè sia batteri morti che vivi danno torbidità. Si esegue allora la conta vitale, che è un secondo metodo di misurazione della quantità di batteri, e non è altro che la conta delle unità formanti colonie, per unità di volume, cioè delle cellule vive, che nella fase di declino diminuiscono. In questa conta si prende il liquido che contiene i batteri, lo si mette su una piastra contenente il terreno di coltura e viene poi incubata alla temperatura corretta (37° per i batteri che infettano l'uomo). Al termine dell'incubazione osserverò la comparsa di una serie di colonie macroscopiche, in cui ciascuna colonia rappresenta un unità formante colonia (UFC), cioè un batterio. Il numero di unità formanti colonie vò poi moltiplicato per il fattore di diluizione con cui è stato diluito il campione iniziale per ottenere delle colonie ben separate e visibili (se non eseguo la diluizione ottengo un film di batteri, inutile dal punto di vista della conta).

FATTORI AMBIENTALI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA MICROBICA

I batteri sono sensibili a diversi fattori ambientali, quali temperatura, pH, disponibilità di acqua e disponibilità di ossigeno. I parametri ottimali possono variare a seconda della specie batterica.

TEMPERATURA, pH E CONCENTRAZIONE DI IONI SODIO

I batteri che infettano l'uomo, vivono alla stessa temperatura del nostro corpo, cioè 37° . Per quanto riguarda il pH, i patogeni hanno pH ottimale intorno a valori neutri. I batteri inoltre sono influenzati in base alla concentrazione di ioni sodio, e i batteri patogeni sono dotati di halotolleranza, cioè sono in grado di sopportare alte concentrazioni di sodio. Batteri halotolleranti sono gli stafilococchi, che fanno parte della flora microbica normale. Per isolare questi batteri si utilizza un terreno "agar salt", che costituisce un terreno selettivo, importante dal punto di vista diagnostico, che seleziona la crescita di un batterio impedendo la crescita di altri, in base alla selezione di un criterio ambientale.

RAPPORTO CON L'OSSIGENO

I batteri hanno un rapporto con l'ossigeno diverso, per il quale non tutti i batteri hanno tolleranza alla pressione di ossigeno dell'atmosfera. In base a questa tolleranza si distinguono:

- aerobi, crescono alla normale pressione di ossigeno presente nell'atmosfera;
- aerobi facoltativi;
- anaerobi;
- microaerofili;
- anaerobi aerotolleranti (vedi esperimento delle provette su slide)

Si può cercare di capire questa distinzione dei batteri in base al loro rapporto con l'ossigeno con un esperimento, in cui prendiamo una serie di provette con mezzo di coltura liquido riducente (detto "tirpicolato"). Siccome la provetta è piena solo a metà, e nella metà superiore è a contatto con l'atmosfera, nella parte superiore del brodo di coltura avremo una pressione di ossigeno simile a

quella atmosferica, mentre andando verso il fondo la pressione di ossigeno tende ad essere nulla. Osserviamo che:

-i microorganismi aerobi obbligati cresceranno solo nella parte alta della provetta, perchè se la pressione di ossigeno si abbassa questi non sopravvivono;

-gli anaerobi obbligati cresceranno invece verso il fondo della provetta, dove la pressione di ossigeno è pressochè nulla, e quindi non causa danno a questi organismi, che non sopportano l'ossigeno. Questi organismi esistono anche in patologia umana.

-gli aerobi facoltativi crescono dappertutto nella provetta, in quanto possono avere sia un metabolismo aerobio che anaerobio, anche se utilizzano preferenzialmente il loro metabolismo aerobio. Inoltre questi microorganismi non sono danneggiati dall'ossigeno;

-gli anaerobi aerotolleranti crescono dappertutto nella provetta, in quanto hanno metabolismo anaerobio, ma l'ossigeno non arreca a loro danno;

-gli organismi microaerofili crescono a una pressione di ossigeno inferiore a quella atmosferica, infatti crescono appena al di sotto della superficie della coltura, dove la pressione di ossigeno è un pò più bassa di quella atmosferica

La condizione di anaerobiosi e la condizione di microaerofilia le devo rispettare in tutte le fasi per la coltivazione in vitro di questi batteri (quindi devo rimanere in queste condizioni dal prelievo fino all'incubazione e all'osservazione), altrimenti questi batteri non si moltiplicano e non mi danno colonie.

Le colture per batteri anaerobi stretti vengono effettuate tramite prelievo in condizioni riducenti e coltivazione in gaspak e giare per anaerobiosi, in cui l'atmosfera è controllata e protetta.

Gli anaerobi stretti non tollerano l'ossigeno perchè sono sensibili ai ROS (perossido di idrogeno, radicale ossidrilico, ione superossido...), in quanto mancano degli enzimi per eliminarli. Tra questi enzimi i più importanti sono l'ossidasi, la catalasi e la superossidodismutasi.

CORRELAZIONE METABOLISMO-USO DI OSSIGENO

In base alla relazione che i batteri hanno con l'ossigeno, possiamo avere un tipo di metabolismo diverso. I tipi di metabolismo che osserviamo all'interno di un batterio, possono essere utilizzati dal punto di vista diagnostico e sono utili nella loro classificazione, che viene in genere determinata dal punto di vista biochimico, valutando il corredo enzimatico.

La fermentazione, cioè quel processo metabolico che vede come accettore ultimo di elettroni un composto diverso dall'ossigeno, è tipica dei batteri anaerobi e viene utilizzata a scopo diagnostico, in quanto a seconda del tipo di sostanza organica utilizzata come accettore ultimo degli elettroni, avrà prodotti diversi, rilevabili a livello biochimico. Per esempio, i batteri in grado di eseguire la fermentazione lattica, degradano il glucosio nella via glicolitica producendo piruvato, che viene utilizzato come accettore di elettroni per produrre lattato, rilevabile a livello biochimico (posso evidenziare anche le fermentazioni propionica, butirrica, etanolica, ecc...). Tutte queste sostanze possono essere utilizzate come marcatori fenotipici per identificare il batterio. La fermentazione determina la produzione di ATP, ma in quantità minore rispetto alla produzione di ATP che si ottiene con il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa, che utilizzano come accettore ultimo degli elettroni l'ossigeno e avvengono nei batteri aerobi.

Nel metabolismo del glucosio, osserviamo che nei batteri aerobi, l'accettore ultimo degli elettroni è l'ossigeno, mentre negli anaerobi, gli accettori ultimi sono altre molecole come i nitrati che

diventano nitriti, utilizzabili a scopo di identificazione.

Non essendoci nei batteri i mitocondri, la produzione di ATP avverrà a livello della membrana plasmatica, su cui ci sono tutti gli elementi (catena dei citocromi) per eseguire la fosforilazione ossidativa, a livello della quale si crea anche la forza motrice protonica, che costituisce il gradiente protonico che permette il passaggio degli ioni H^+ attraverso il complesso dell'ATP sintasi. Anche a livello della catena della fosforilazione ossidativa osserveremo che, nei batteri aerobi l'accettore ultimo degli elettroni sarà l'ossigeno, mentre nei batteri anaerobi l'accettore ultimo saranno altre molecole.

Nei batteri ci sono vie batteriche esclusive, che ci permettono di combattere questi microorganismi bersagliando con dei farmaci specifici enzimi appartenenti a vie metaboliche esclusive, che non ci sono nelle nostre cellule: una di queste è la complessa via di sintesi del peptidoglicano.

Questa via parte nel citosol, ha uno stand nella membrana plasmatica e presenta una fase di accrescimento della parete batterica (in cui ci sono la gran parte degli enzimi bersaglio degli antibiotici), cioè quella fase in cui i monomeri costituiti dal dimero NAM-NAG, ispessiscono lo strato di peptidoglicano. In questa fase c'è il processo fondamentale di formazione dei legami trasversali, ed è fondamentale perché se non si formano i legami trasversali il peptidoglicano si presenta lasso. Questa reazione è chiamata di transpeptidazione ed è catalizzata dalle transpeptidasi e sono bersaglio delle penicilline, inibendole.

Somministrando un antibiotico però rischiamo di alterare anche la flora microbica normale, quindi i farmaci antibiotici vanno prescritti con criterio.

GENETICA BATTERICA

I batteri hanno un enorme variabilità genetica, il che costituisce un grande problema per la medicina. Infatti, l'utilizzo degli antibiotici ha creato una pressione selettiva che ha creato specie batteriche farmaco-resistenti. Inoltre le resistenze si accumulano, creando la resistenza a un farmaco, poi a un altro, fino a creare specie batteriche multi-resistenti, cioè resistenti a più farmaci antibiotici. La farmaco resistenza ha base genomica, appunto per via della loro enorme variabilità, che crea ceppi resistenti alla gran parte degli antibiotici, modificando continuamente gli enzimi su cui agiscono i farmaci.

IL GENOMA

Il genoma batterico è costituito da un unico cromosoma circolare, quindi si è in una continua situazione di aploidia, quindi una qualsiasi modificazione viene immediatamente osservata a livello fenotipico. Nel cromosoma batterico non ci sono introni, non ci sono sequenze di DNA ridondanti, le sequenze trascrizionali sono multicistroniche (cioè avremo la produzione di più mRNA finalizzati alla produzione di proteine deputate ad un unico scopo, come nell'operone lac) e infine si ha la presenza di catene codificanti su ambedue i filamenti.

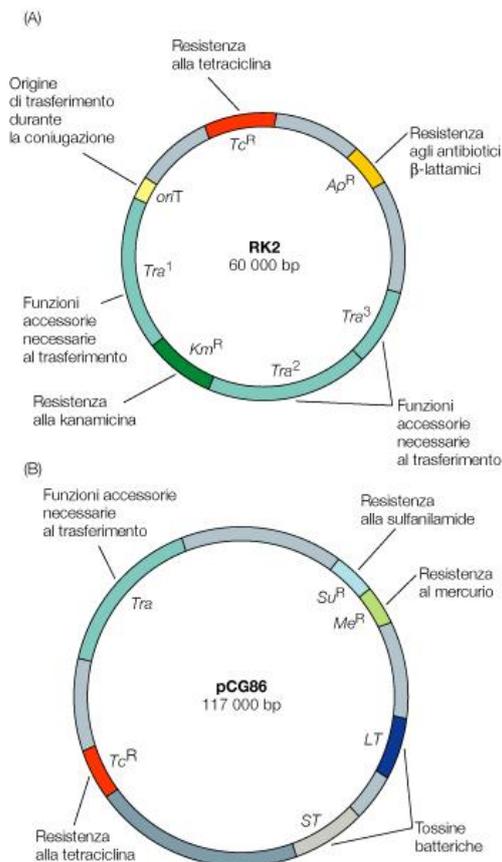
PLASMIDI

Sono unità genetiche accessorie extracromosomiali, dette anche episomi, hanno struttura a doppia elica, sono circolari e di dimensioni estremamente variabili. Una caratteristica importante dei plasmidi è che sono dotati di autonomia replicativa, ovvero che contengono tutta una serie di geni che codificano per le proteine necessarie e sufficienti alla loro duplicazione e ripartizione nelle

cellule figlie, che avviene in maniera autonoma dal cromosoma principale. Questi plasmidi possono portare informazioni genetiche per tutto, ma a livello patogenetico, i plasmidi in particolare possono portare le informazioni per le tossine, per le adesine e per enzimi che permettono la resistenza ad alcuni farmaci. Ogni batterio può possedere più plasmidi, sono in genere piccoli e molto sfruttati nelle biotecnologie per modificare geneticamente i batteri, e fargli produrre grandi quantità di proteine.

La variabilità del patrimonio genetico batterico, e in particolare del patrimonio plasmidico, è dovuto a 2 fattori:

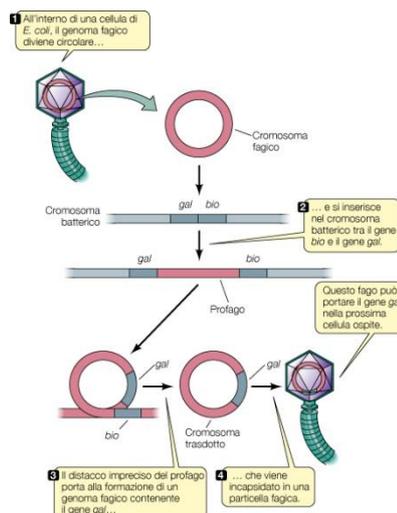
- mutazioni, cioè variazioni ereditabili nella sequenza del DNA e possono essere spontanee o indotte da agenti mutageni;
- Passaggio di materiale genetico da una cellula all'altra, attraverso i processi di trasformazione, trasduzione, coniugazione e trasposizione. Se il segmento genetico non è un plasmide, questo oltre che penetrare nel batterio questo si deve integrare nel cromosoma batterico.



LA TRASDUZIONE

La trasduzione implica sempre il passaggio di materiale genetico da un batterio donatore a un batterio ricevente, ma in questo caso non si tratta di un passaggio libero: in questo caso il materiale genetico è contenuto in capsule, che non sono altro che virus che infettano i batteri, detti batteriofagi, o fagi. I batteriofagi si attaccano alla parete batterica durante l'infezione, inoculano il loro genoma e a volte catturano frammenti di genoma batterico (detti lossDNA). In questa nuova condizione, i batteriofagi possono andare a infettare un'altra cellula e quindi agiscono inoculando i loro frammenti di materiale genetico più quelli precedentemente inoculati, cambiando il genoma di questo secondo batterio e favorendo la variabilità genetica. I batteriofagi sono parassiti endocellulari obbligati dei batteri. Il loro genoma verrà replicato ed espresso grazie al metabolismo cellulare batterico. Il ciclo litico (o trasduzione generalizzata) è quel ciclo in cui il virus infetta il batterio e si replica al suo interno grazie al suo metabolismo. La replicazione di molte copie del fago farà lisare il batterio e le nuove copie di fago sono libere di andare a infettare altre cellule. Parlando sempre dei batteriofagi, questi presentano anche un ciclo lisogenico (o trasduzione specializzata), dove per lisogenia fagica implica il fatto che il fago si integra nel cromosoma batterico, e può essere anche un ciclo silente. La lisogenia è una condizione che non uccide i batteri, ma li modifica; i batteriofagi infatti sono in grado di integrarsi nel cromosoma batterico e rimanere silenti dal punto di vista replicativo (e quindi non produrre nuovi virioni), ma non dal punto di vista trascrizionale, che vuol dire che il batterio lisogeno per un determinato fago, porta l'informazione genetica portata dal fago nel cromosoma, il quale farà fare delle determinate proteine che possono svolgere determinate funzioni, come produrre delle tossine o altre attività nocive (un esempio è lo

streptococco piogenes, che può essere lisogeno per un fago che gli fa produrre la tossina della scarlattina). Il ciclo lisogenico (immagine qui sopra) non è irreversibile, ma si può tornare al ciclo litico e quindi interrompere il silenzio replicativo: quando ciò accade il genoma fagico deve essere ricostituito nella sua forma circolare indipendente per andare a riformare il nuovo fago. Ciò può avvenire in modo corretto e quindi includere solo il genoma fagico, oppure può avvenire erroneamente e includere parti di genoma batterico.



LA TRASFORMAZIONE

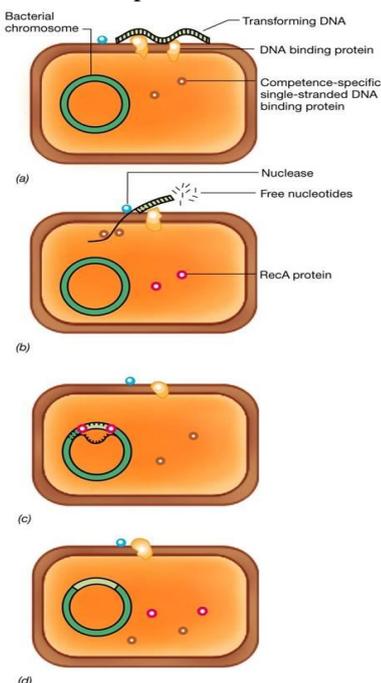
La trasformazione implica l'assunzione di materiale genetico da parte di un batterio ricevente. Il materiale genetico può essere freeDNA, cioè pezzi di genoma derivati da un altro batterio che è morto, che costituisce il batterio donatore, oppure possono essere plasmidi appartenenti a cellule morte, che vengono recuperati dal batterio accettore attraverso il processo di uptake.

Il meccanismo della trasformazione è stato scoperto nel 1928 da Griffith, attraverso esperimenti in cui ha inoculato diversi ceppi di streptococcus pneumonie nel topo. Griffith osservò che:

- inoculando ceppi di streptococcus pneumonie capsulati nel topo, il topo moriva, in quanto la capsula è ciò che dà virulenza al ceppo;
- inoculando ceppi di streptococcus pneumonie non capsulato nel topo, il topo rimaneva sano, data la non virulenza del ceppo;
- inoculando nel topo ceppi di streptococcus pneumonie capsulati uccisi col calore, il topo rimaneva sano;
- inoculando nel topo un ceppo di streptococcus pneumonie non capsulato insieme a una quota di streptococchi in grado di produrre la capsula ma uccisi con il calore, il topo sviluppava la malattia e moriva. Quando andò a isolare i batteri dal topo, osservò che ora erano capsulati.

Quest'ultimo caso dimostra l'esistenza del meccanismo di trasformazione, tramite il quale il ceppo di batteri non capsulato, acquisisce parti del genoma del batterio virulento capsulato morto tramite il processo di uptake, e diventa in grado di produrre la capsula. La trasformazione batterica si verifica sempre sia in natura che in laboratorio.

La competenza all'uptake necessita la presenza di proteine sulla parete batterica in grado di legare il DNA. Il meccanismo di entrata è molto complesso e porta a successo solo se il frammento di freeDNA si va a integrare nel cromosoma batterico, altrimenti il segmento viene perso. Come il batterio acquisisce il DNA esso può anche espellerlo o degradarlo, però una volta che questo si è integrato, questo segmento rimane compreso nel cromosoma. L'acquisizione di DNA dall'ambiente esterno



avviene solo durante la fase esponenziale di crescita del ceppo.

CONIUGAZIONE

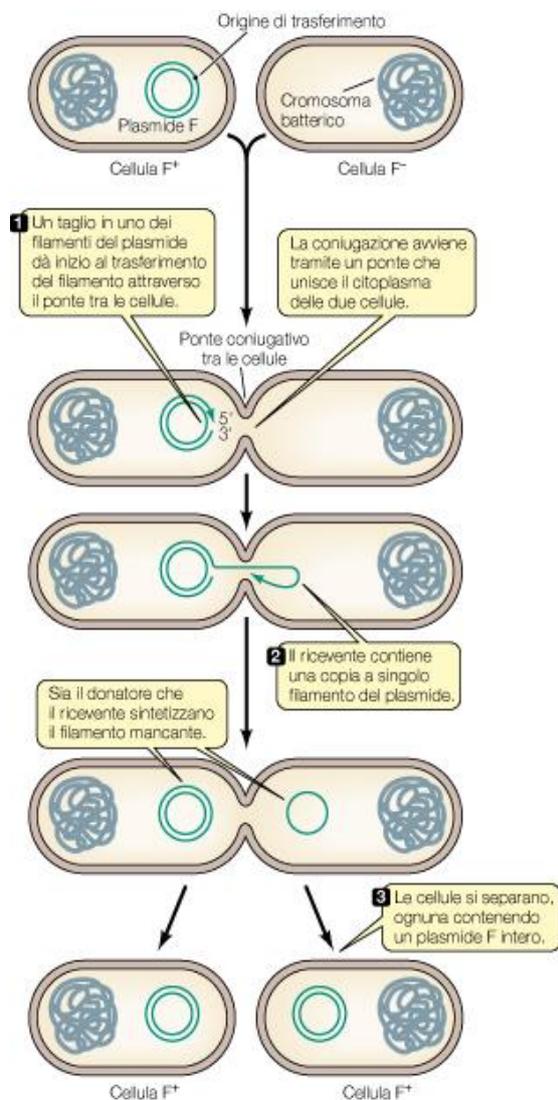
La coniugazione prevede il contatto tra 2 batteri e permette unicamente il passaggio del plasmide, da un batterio donatore a un batterio accettore, attraverso un ponte proteico temporaneo che si viene a creare grazie all'interazione dei pili sessuali delle 2 cellule batteriche e che costituisce un'unione di tipo sessuale delle 2 cellule.

I batteri che esprimono il pilo coniugativo significa che hanno il plasmide F, che codifica per la produzione del pilo sessuale.

Il plasmide passa da un batterio all'altro tramite un meccanismo in cui un'elica della doppia elica del plasmide passa al batterio ricevente. Nel batterio ricevente questa elica viene processata dalla DNA polimerasi, che produce l'elica complementare, producendo il plasmide completo. In questo caso è stato effettuato un trasferimento completo, ma può avvenire anche solo un trasferimento parziale. Si

possono avere altri eventi ricombinativi quando il plasmide F si integra nel cromosoma batterico.

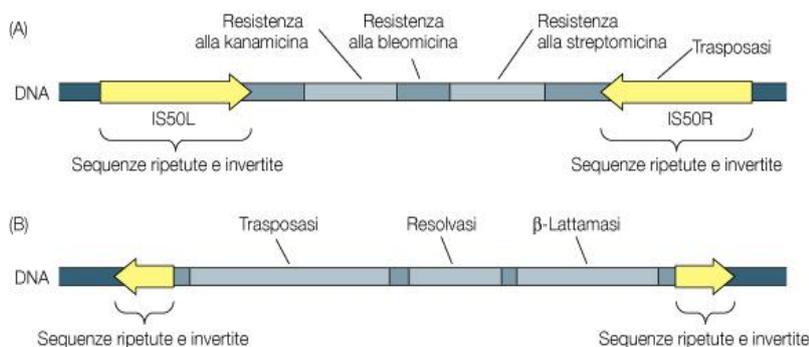
In questo caso le informazioni codificate dal batterio sono sempre le stesse (per la rottura e il passaggio della doppia elica), ma la quantità di materiale genetico che passa è molto maggiore: potenzialmente ciò non avviene mai perché il cromosoma è troppo grosso e il tempo di durata dell'interazione è troppo breve. Possono però passare sequenze adiacenti a quella del plasmide F integrato. Ciò significa che con questo processo oltre che il plasmide, possa far passare anche parte del genoma, costituendo un grado di ricombinazione più alta.



TRASPOSIZIONE

La trasposizione è legata ad elementi mobili del genoma batterico, detti trasposoni e sono sequenze genetiche che si possono spostare. Noi sappiamo che il genoma batterico è fatto dalla grande unità dei cromosomi e da unità indipendenti più piccole come i plasmidi: i trasposoni sono in grado di muoversi sia all'interno del cromosoma, che dal cromosoma al plasmide.

Una volta nel plasmide il trasposone può quindi passare ad altri batteri per coniugazione o per trasformazione. I trasposoni hanno una struttura abbastanza conservata in cui all'estremità sono presenti sequenze che portano l'informazione per l'inserzione di questi segmenti genomici. Nella porzione trasposonica possono esserci dei geni, dove quelli che interessano a noi sono solo quelli per la resistenza agli antibiotici.



CARATTERISTICHE PATOGENICHE DEI BATTERI

CARATTERISTICHE GENERALI

Non tutti i batteri sono patogeni, ma in realtà alcuni sono nostri simbiotici e sono essenziali per il mantenimento dell'omeostasi. Solo pochissimi sono sempre patogeni, altri invece possono essere solo potenzialmente patogeni, ma in condizioni normali non arrecano danno; infine abbiamo i batteri che non sono mai patogeni

In un'infezione sono coinvolti sempre 2 organismi:

- l'ospite;
- l'infettante;

L'alterazione dell'equilibrio che esiste in questa simbiosi determina l'insorgenza della patologia. Nel momento in cui vi sono delle condizioni predisponenti nell'organismo ospite, il microorganismo infettante può replicarsi e dare inizio a tutta una serie di eventi che caratterizzano la malattia. Le condizioni predisponenti possono essere:

- condizione del sistema immunitario (un soggetto immunodepresso è più soggetto a sviluppare le infezioni);
- le condizioni del microambiente; sappiamo riguardo a ciò che in ogni distretto dei vari apparati, viene mantenuto un flusso di materiale (liquido, solido, aereo o mucoso) all'interno di una serie di "canali" (vie aeree, urinarie, canale digerente, canali ghiandolari, ecc...) che deve essere mantenuto attraverso il mantenimento della pervietà dei canali, altrimenti si cade in una situazione di "stasi", cioè il flusso di materiale si arresta o rallenta. Infatti, il flusso di materiale permette l'eliminazione fisiologica dei microorganismi, e se questo flusso si arresta si favorisce l'adesione dei batteri e la loro replicazione. In questo caso la condizione di stasi, a prescindere della condizione del sistema immunitario, favorisce l'infezione;

-inoculazione di batteri in un sito generalmente sterile, generando infezione anche se il sistema immunitario è perfettamente funzionante.

Non tutti i batteri che vivono nel nostro organismo non sono patogeni, in quanto alcuni possono essere scarsamente patogeni o "patogeni opportunisti". Infatti, fintanto che i batteri rimangono confinati nel loro distretto e tutto funziona in maniera fisiologica non causano danno, ma non appena si ha un alterazione dell'equilibrio omeostatico, anche questi possono dar luogo a infezione. Abbiamo però anche batteri che sono "sempre patogeni", e danno infezione ogni volta che ci infettano.

I patogeni "sempre patogeni" sono definiti come i batteri in grado di dare sempre infezione in un animale.

La patogenicità indica la capacità di un microbo di causare malattia.

La virulenza ci permette di misurare quantitativamente la patogenicità (dandoci un grado di patogenicità) di uno specifico microorganismo.

Le caratteristiche determinanti la virulenza possono essere genetiche, biochimiche o strutturali che gli permettono di arrecare danno all'organismo ospite.

La cellula batterica è una cellula che è dotata di una serie di fattori di virulenza, in cui quelli di tipo strutturale sono:

- pili di adesione;
- capsula;
- proteine presenti sulla parete batterica, quali le adesine;
- endotossine come l'LPS dei gram-;
- flagelli;

Tra quelle biochimiche e metaboliche rientra la capacità di produrre esotossine, cioè molecole proteiche che vengono liberate nell'ambiente.

Queste caratteristiche determinano azione patogena principalmente attraverso 2 meccanismi, che possono essere copresenti o presenti singolarmente:

- l'abilità di invadere i tessuti, detta "invasività"
- l'abilità di produrre tossine detta "toxogenesi", rimanendo stabile nel punto di entrata e producendo esotossine

Invasività e toxogenesi servono ad attuare un flusso di eventi, applicabili sono alla classe di batteri "sempre patogeni", che avvengono a seguito dell'esposizione dell'individuo al agente patogeno:

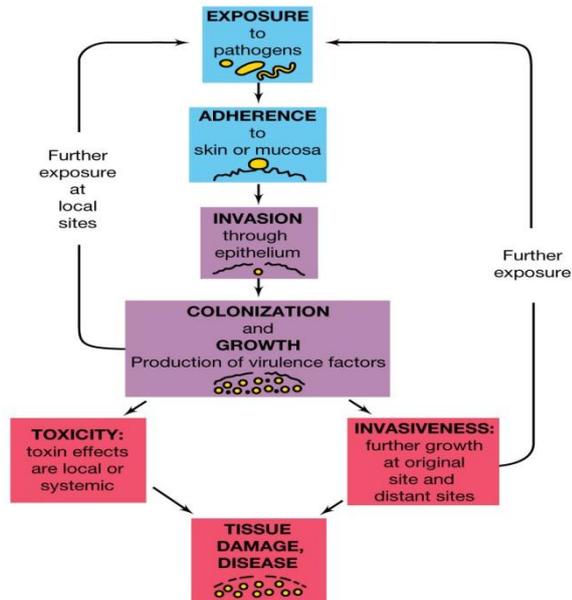
- Esposizione; non coincide con l'infezione, in quanto io possono essere esposto ad un agente patogeno ma non infettarmi, in quanto il patogeno viene eliminato dai sistemi di difesa;
- infezione, che è quell'evento in cui il batterio si stabilisce all'interno dell'ospite bypassando i sistemi di difesa;
- aderenza, in quanto i batteri devono aderire da qualche parte per poter persistere al flusso dei materiali nei diversi distretti e continuare l'infezione;
- invasione dei tessuti;

-colonizzazione;

-crescita della massa batterica: il danno è direttamente proporzionale alle dimensioni della massa batterica. Gli antibiotici, insieme al sistema immunitario eliminano l'infezione e riducono la massa batterica, determinando la riduzione dei sintomi.

Arrivati alla colonizzazione i batteri possono dare effetto patogeno tramite la produzione di tossine o l'espansione della massa batterica, con ulteriore crescita e ulteriore invasione. In qualsiasi caso daranno malattia e cioè danno tissutale.

La sorgente della malattia può essere di 2 tipi:



-le infezioni possono essere ENDOGENE, cioè arrivare dalla flora microbica normale oppure essere microrganismi opportunisti; in questo caso non ho ne esposizione ne infezione, ma ho semplicemente lo squilibrio ospite-flora microbica normale. I meccanismi possono essere 2 e uno è l'overgrowth (sovraccrescita) nel normale sito di residenza (esempio: candidosi. Non è un batterio ma un fungo; nella candidosi orale le candide, normalmente presenti nel cavo orale, prendono il sopravvento quando viene meno il sistema immunitario) mentre l'altro è l'invasione di un sito sterile (polmonite: le alte vie respiratorie contengono normalmente batteri, mentre le basse vie respiratorie sono assolutamente sterili; l'infezione è semplicemente dovuta all'invasione dei batteri della flora orale nelle basse vie aeree);

-le infezioni possono essere ESOGENE, in cui la causa della malattia arriva dall'esterno del corpo e non dalla flora microbica normale; necessita di essere trasmessa o dalla sorgente primaria (arrivano dall'acqua, suolo, ecc... e sono detti patogeni accidentali) o da un individuo portatore sano o da un malato, attraverso l'ambiente fino al corpo dell'ospite (nel periodo di incubazione, cioè quel periodo in cui il batterio è presente ma deve ancora sviluppare la malattia, il soggetto infetto può trasmettere l'infezione: ciò è più pericoloso dal punto di vista epidemiologico perchè l'individuo è privo di sintomi e non può essere evidenziato come persona infetta) o da un animale infetto (le infezioni che arrivano dagli animali sono dette "zoonosi") e dai loro derivati; possono essere patogeni naturali o accidentali. Il batterio non fa quindi parte della flora microbica normale, ed è quindi necessaria un'esposizione e un'infezione.

Le vie di eliminazione dei microrganismi patogeni sono diverse:

- le vie respiratorie, attraverso le gocce di saliva;
- il canale digerente, quindi sia tramite la saliva che tramite le feci;
- attraverso tutti gli essudati;
- il tratto uro-genitale, quindi con le urine;
- la via parenterale, che implica un contatto di sangue (aghi, insetti...)

Alcuni batteri sono poco resistenti nell'ambiente esterno, a meno che non siano sottoforma di spore. Esistono però delle eccezioni, infatti alcuni batteri come *Pseudomonas* sono anche resistenti all'ambiente esterno.

Le infezioni iniziano con l'arrivo dei batteri ad una mucosa. A questo punto i batteri possono rimanere attaccati alla mucosa mentre altri batteri possono invadere i tessuti, si espandono e iniziano a produrre tossine che entrano in circolo. Se i batteri invadono il tessuto, questi passano nella sottomucosa da dove daranno già un alto grado di infezione in quanto richiamano una moltitudine di elementi infiammatori. Normalmente il sangue è un tessuto sterile e infatti la presenza di batteri in esso è molto pericolosa: al di sotto di un certo valore soglia di batteriemia è una condizione asintomatica; al di sopra di un certo valore di batteriemia essa esita in setticemia e può provocare shock settico.

I batteri possono arrivare e resistere nel sangue, tramite l'inibizione del riconoscimento dal sistema immunitario tramite lo sviluppo di una capsula e l'elaborazione di strutture che inibiscono la fagocitosi. Le proteine inibenti la fagocitosi servono anche per la resistenza nella mucosa. Quest'ultimo meccanismo di resistenza fa resistere il batterio nel fagolisosoma, e quindi causa morte le macrofago ma resistenza del batterio, che può continuare a proliferare nel macrofago stesso.

L'invasione dei tessuti è caratterizzata anche dalla distruzione del tessuto e fanno ciò attraverso la secrezione una serie di proteine (tra cui alcuni enzimi): tossine ed invasine.

Le invasine permettono l'invasione e la distruzione dei tessuti. La distruzione dei tessuti favorisce la crescita e lo spreading (distribuzione nei tessuti).

Le invasine sono degli enzimi. I batteri che danno infezione purulenta sono caratterizzati dalla produzione di particolari proteine "invasine" che fanno la liquefazione dei tessuti (ialuronidasi, collagenasi, neuroaminidasi, streptochinasi e stafilocinasi).

TOSSINE BATTERICHE

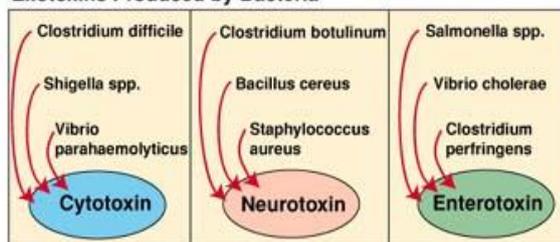
Sono costituite da:

-esotossine. Sono sostanze secrete all'esterno dal batterio e sono in genere proteine, e quindi sensibili al calore. Hanno elevato potere antigenico, infatti basta una piccola quantità di esotossine per dare danno tissutale e sono utilizzate per la produzione di vaccini e antidoti (il vaccino

contro il tetano è prodotto per sensibilizzazione di un individuo alla tossina tetanica). Le esotossine sono molto specifiche nel causare danno, infatti per molti batteri ci saranno tossine specifiche che daranno diversi effetti. Le esotossine possono essere molecole con attività enzimatica ma in genere non hanno effetto pirogenico;

-endotossine. Tipica è l'endotossina LPS presente sulla membrana esterna della parete batterica dei gram-, resistente al calore. LPS inoculato nel nostro organismo ha scarso potere antigenico. LPS

Exotoxins Produced by Bacteria



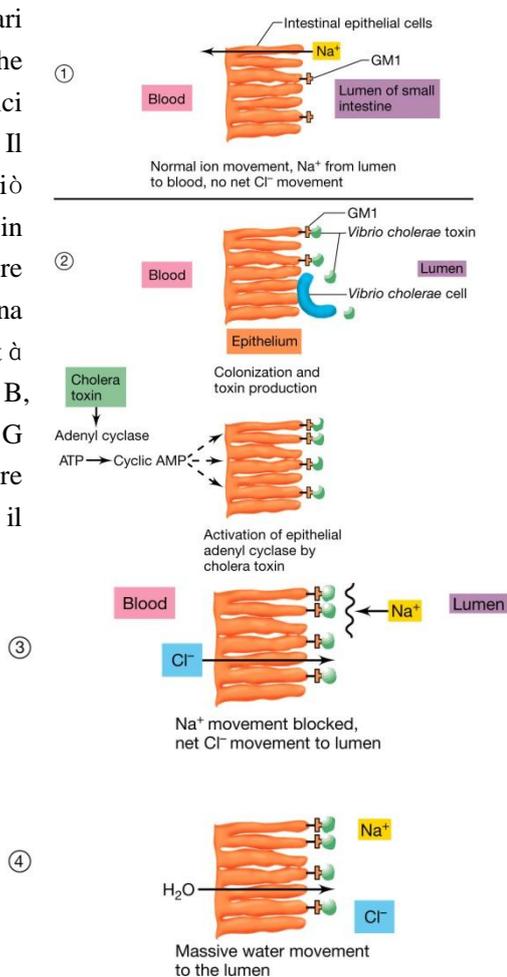
presenta bassa specificità e infatti produce gli stessi effetti, qualunque sia il batterio che lo produce. LPS ha tipicamente una spiccata attività pirogenica.

L'informazione genica per queste sostanze può trovarsi sia sul cromosoma che sul plasmide, ed è per questo che rispetto a queste sostanze possiamo avere una notevole variabilità, per le numerose variazioni a cui vanno incontro queste strutture. Da ciò deriva l'immensa variabilità dei batteri.

Posso avere diverse classificazioni di tossine, e per citarne una, possiamo osservare questo primo tipo di classificazione funzionale, in cui le tossine sono divise in base al bersaglio (le neurotossine agiscono sulle cellule del sistema nervoso, le enterotossine sugli enterociti, ecc...)

Le esotossine possono danneggiare le nostre cellule essenzialmente in 3 modi:

- agisce a livello della membrana cellulare, compromettendone l'integrità;
- inibiscono la sintesi proteica;
- esotossine che alterano vie biochimiche che portano alla formazione di secondi messaggeri, causando problemi nelle vie di trasduzione del segnale. I batteri sono in grado di modificare messaggeri come il cGMP.;
- esotossine che interagiscono con recettori cellulari specifici, presenti sulla membrana plasmatica, che innescano o impediscono di innescare pathway biochimici (esempio: tossina del vibriocolerae o "enterotossina". Il vibriocolerae non ha grande capacità invasiva e perciò rimane sulla mucosa e produce la tossina, che non va in circolo ma agisce sull'enterocita agendo su un recettore strutturalmente complesso. Questo recettore ha una porzione B di legame e una porzione A ad attività enzimatica. Una volta che la tossina si lega alla subunità B, la subunità A entra nella cellula e stimola una proteina G che attiva la adenilato ciclasi e determina una maggiore produzione di cAMP, mantenendo aperto il canale per il cloro e favorendo così la disidratazione).



LE ESOTOSSINE

LA TOSSINA COLERICA (già in lezione precedente)

la tossina colerica è una tossina multimerica con una subunità di binding (subunità B) e una subunità con attività enzimatica (subunità A). Essa penetra nella cellula attraverso un recettore a cui si lega la subunità di binding. La tossina colerica è un tipo di tossina identificativo della specie batterica (perchè è tipica del *Vibrio cholerae*) e ne mette in evidenza il quadro patogenetico, dato esclusivamente dalla produzione della tossina colerica. Essa modifica l'azione dei secondi messaggeri a livello dell'enterocita, aumentando la quantità di cAMP nella cellula, tramite il legame con la proteina G che regola l'attività dell'adenilato ciclasi, che rimane costitutivamente attivata in presenza di questa tossina. Questo determina l'accumulo di Na⁺ nel lume intestinale, con conseguente richiamo di acqua e altri elettroliti, e comparsa di diarrea acquosa che causa importante perdita di liquidi incompatibile con la vita.

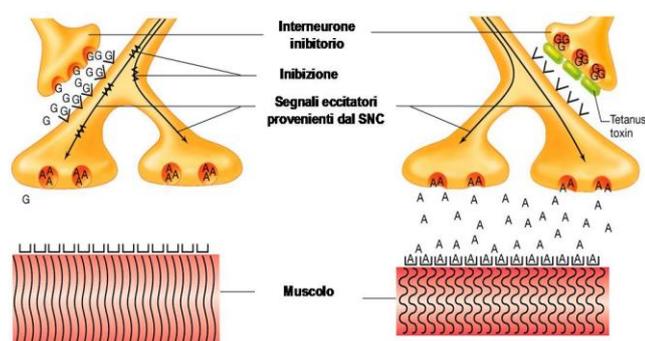
LA TOSSINA PERTOSSICA

Un'altra tossina è la tossina pertossica che, come la tossina colerica, identifica la specie batterica che la produce (*Bordetella pertussis*) anche dal punto di vista patogenetico. Anche questa tossina agisce variando la quantità di secondo messaggero nella cellula bersaglio, in particolare agisce sulla subunità inibitoria della adenilato ciclasi, inibendola, determinando l'aumento di cAMP intracellulare.

LE NEUROTOSSINE (TOSSINA BOTULINICA E TETANICA)

LA TOSSINA TETANICA

Altre tossine che identificano la specie batterica dal punto di vista patogenetico sono la tossina tetanica (*Clostridium tetani*) e la tossina botulinica (*Clostridium botulinum*), che sono tossine dette neurotossiche, perchè agiscono esclusivamente a livello del sistema nervoso e hanno azione



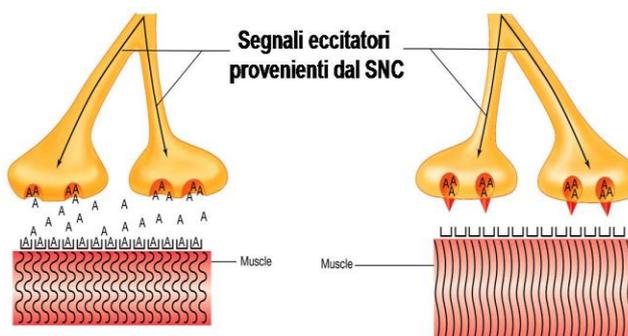
assolutamente letale. Essendo sia il *Clostridium tetani* che il *Clostridium botulinum* batteri appartenenti al genere *Clostridium*, sappiamo che questi 2 batteri sono batteri sporigeni.

Il *Clostridium tetani* è anche un anaerobio stretto, perchè non ha gli enzimi detossificanti l'ossigeno e quindi per esistere nella sua forma vegetativa (che è quella in grado di produrre la tossina) deve trovarsi in un ambiente privo di ossigeno. Essendo il *Clostridium tetani* sporigeno, la spora germina solo in ambiente privo di ossigeno. Essendo il *Clostridium tetani* un batterio privo di capacità invasiva, la tossina viene prodotta nel punto in cui la spora germina. La spora entra tramite ferite traumatiche o chirurgiche, si crea una nicchia anaerobiotica per via della bassa vascolarizzazione, e la spora può germinare, producendo la forma vegetativa. La tossina (costituita da una catena peptidica leggera legata a una catena peptidica pesante tramite un ponte disolfuro) passa poi in circolo (non attraverso il circolo sanguigno, ma attraverso le vie nervose) arriva nel SNC dove causa una alterazione a livello sinaptico. Ha azione enzimatica di zincoendopeptidasi, non importante ai fini dell'esame. L'azione importante della tossina tetanica è quella che essa esplica sulla contrazione muscolare, in quanto inibisce la liberazione dei mediatori chimici responsabili del

rilassamento (sinapsi inibitorie) e quindi il muscolo rimane contratto (paralisi spastica o "tetano muscolare"). Essendo l'effetto sistemico, i muscoli di tutto l'organismo smettono di rilassarsi, e particolarmente importante è il mancato funzionamento dei muscoli respiratori. L'effetto della tossina tetanica si esplica impedendo il rilascio del neurotrasmettitore inibitorio glicina.

LA TOSSINA BOTULINICA

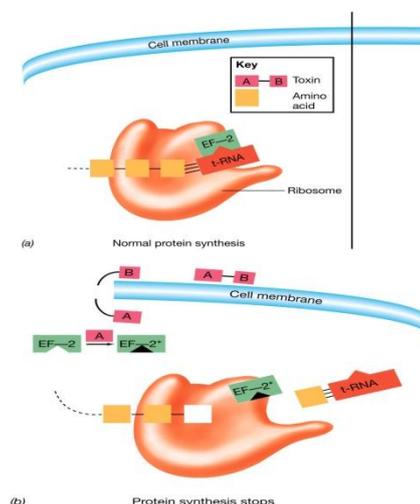
La tossina botulinica agisce a livello dell'SNP, ed in particolare a livello della placca neuromuscolare, dove il mediatore è l'acetilcolina (neurotrasmettitore eccitatorio) che serve a trasdurre il segnale dalla fibra nervosa alla fibra muscolare. La tossina botulinica impedisce il rilascio di acetilcolina, inibendo la



trasmissione neuromuscolare; il muscolo non si contrae e si ha paralisi flaccida: il risultato è perdita della funzionalità muscolare. La tossina botulinica arriva al SN dell'individuo per "tossinfezione", che è il processo infettivo per il quale c'è sempre la presenza di un agente batterico, ma la tossina (vero agente che causa la patologia) viene acquisita tramite l'alimentazione; infatti la spora del clostridium botulinum non germina nel nostro organismo ma infetta un alimento, in cui germina, produce la forma vegetativa che produce la tossina, che contamina in questo modo l'alimento. Il clostridium botulinum si sviluppa in ambienti anaerobiotici, come per esempio confezioni di alimenti chiuse per lunghi periodi di tempo, dove prolifera e produce tossine per poi produrre le spore quando si trova di nuovo in condizioni di presenza di ossigeno (la confezione viene aperta). Le spore del clostridium botulinum sono presenti anche nell'ambiente in bassa quantità, ma queste germinano in condizioni molto selezionate e sono dotate di bassa resistenza, quindi anche se raggiungessero il nostro intestino non reggerebbero la competizione con la nostra flora microbica normale: perciò l'effetto della tossina botulinica si esplica solo per tossinfezione. Le tossine botuliniche (sì, sono più di una sola) è un veleno molto potente e infatti bastano piccolissime quantità per avere condizioni mortali. Essendo più di un tipo le tossine prodotte dal clostridium botulinum viene difficile la produzione di un vaccino per tale agente patogeno, mentre invece abbiamo un vaccino per la tossina tetanica.

LA TOSSINA DIFTERICA

La tossina difterica è una tossina multimerica, prodotta dal corinebacterium diphterie, con una subunità A ad attività enzimatica e una subunità B a funzione strutturale, unite da un ponte disolfuro. La subunità A va ad agire sull'elongation factor 2 (EF2), enzima essenziale per la sintesi proteica, che viene quindi inibita e la cellula viene danneggiata. Questo batterio è responsabile della difterite, che è una patologia che ormai non esiste più in occidente, grazie alla strategia di vaccinazione che è stata messa in atto. L'infezione di questo batterio causa



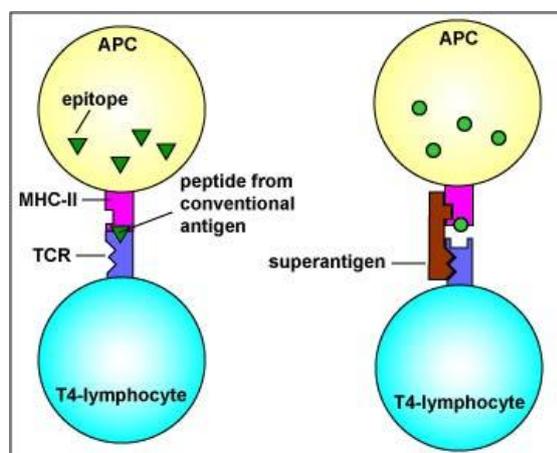
distruzione delle cellule epiteliali nella laringe e nella trachea, con conseguente rilascio di essudato infiammatorio.

LA TOSSINA DI SHIGELLA DYSENTERIAE

La tossina di shiga, prodotta dal batterio shigella dysenteriae, inibisce la sintesi proteica, agendo sulla aminoacil-tRNA, che è essenziale nei processi ribosomiali. Essa causa la distruzione delle cellule epiteliali nell'intestino tenue con conseguente perdita di acqua e sanguinamento. La tossina di shiga è costituita da una subunità A circondata da 5 altre subunità (da B1 a B5) ad azione di binding. Le subunità B legano gangliosidi (Gb3 e Gb4) presenti sulla membrana cellulare. l'azione della tossina di shiga è irreversibile.

TOSSINE CON CARATTERISTICHE SUPERANTIGENICHE

La superantigenicità è un'attività generale, che non si basa su un'attività enzimatica precisa, ma è un meccanismo immuno-mediato, in quanto questi superantigeni stimolano il sistema immunitario anche in maniera aspecifica; questo avviene perché i superantigeni sono in grado di legarsi a MHC di classe II, in maniera non specifica. I linfociti T riconoscono l'antigene con TCR, se presentato da una cellula APC su MHC di tipo II. La tossina con funzionalità di superantigene agisce facendo un ponte aspecifico tra MHC di classe II e TCR, attivando il linfocita T, anche se non specifico per quell'antigene. In questo modo vengono attivate il 20% delle cellule T, contro lo 0,01% che viene attivato nelle attivazioni specifiche. Questo innesca un meccanismo detto di shock, che quando causato da batteri è detto shock settico. Una classica tossina con attività superantigenica è quella prodotta dallo staphylococcus aureus ed è alla base di una condizione clinica molto grave detta "sindrome da shock tossico" o "TSST" (Toxic-Shock-Syndrome-Toxine). Questa tossina è prodotta solo da alcuni ceppi di S. Aereus. La proliferazione del batterio deve poter avvenire senza attivare risposta infiammatoria, e quindi senza produrre sintomi (o al massimo delle forme paucisintomatiche), permettendogli di iniziare a produrre la tossina che invece porterà alla comparsa dei sintomi, dando manifestazione della presenza batterica.



LE ENDOTOSSINE

L'endotossina per definizione è l'LPS (quindi anziché usare il termine "endotossina" utilizzeremo il termine "LPS"), che siccome è una molecola caratteristica della membrana esterna della parete cellulare dei gram- e dà un'attività tossica esclusivamente affiliata ai batteri gram-. LPS determina la gran parte delle patologie associate ai gram- negativi, perché tutti i gram- che si replicano aumentano la massa batterica, aumentando la quantità di LPS aumentandone il suo effetto. I batteri gram- sono peculiari, perché hanno la capacità di passare nel circolo sanguigno e quindi di aumentare la batteriemia, condizione molto grave in quanto significa un aumento della quantità di LPS nel sangue, quadro clinico identificato come "shock settico da LPS". L'LPS ha delle

caratteristiche peculiari che sono:

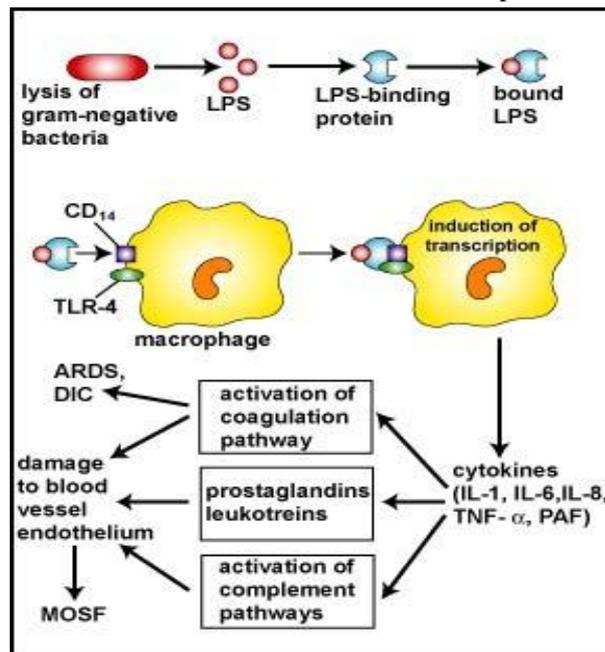
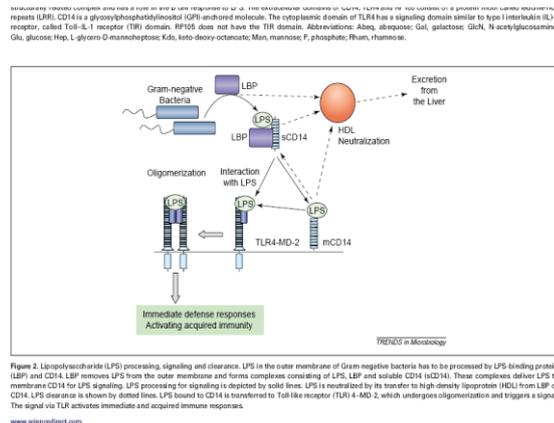
- resistenza al riscaldamento;
- profilo di azione tossica non differenziato. Ciò è dovuto al fatto che il lipide A, che è la struttura ad azione antigenica, è sempre uguale negli LPS dei vari batteri gram-,e quindi tutti gli LPS avranno gli stessi effetti tossici
- è meno potente delle altre esotossine (ma è comunque mortale! Si parla solo di rapporto dose/effetto);
- è privo di attività catalitica, ma agiscono sempre e solo attraverso un legame recettoriale;
- è sempre innocuo se ingerito.

AZIONE RECETTORIALE DELL'LPS (preso da review mostrata dalla prof. in classe)

LPS viene riconosciuto da vari recettori, tramite il quale innesca una risposta immunitaria "innata" (detta anche "intrinseca"). Ci ò significa che qualunque cellula del nostro organismo che viene a contatto con l'agente patogeno infettivo, di qualunque tipo cellulare, "sente" la presenza dei

microorganismi, e in particolare di alcune loro parti (come l'LPS per i gram-) e attuano una risposta che costituisce la risposta immunitaria innata. Il principale recettore attraverso il quale viene riconosciuto LPS è il TLR4 (ma anche altri recettori presenti nelle cellule). Altre volte, alcune di queste parti che segnalano la presenza del microorganismo invasore, sono parti di DNA o di RNA dell'invasore stesso, che attivano altri recettori. Tutti questi recettori che attivano l'immunità intrinseca sono raggruppati nel gruppo dei Pattern/Patogen Recognition Receptors (PRR). L'attivazione di una risposta immunitaria innata determina l'attivazione di una serie di ripsoste che

possono portare sia all'eliminazione del patogeno, che a danni tissutali. Finchè LPS sta complessato nella parete batterica questo ha capacità tossica contenuta, e non può andare ad attivare il suo recettore. L'LPS si vò a legare con il suo recettore quando questo viene prima a contatto con una proteina detta LBP (LPS Binding Protein), che nell'uomo è presente in circolo. LBP è una lipide-transferasi, in grado di trasferire LPS dalla parete batterica o alle HDL (causandone neutralizzazione e eliminazione attraverso il fegato, costituendo da processo protettivo contro LPS) oppure trasferendolo ad un recettore solubile (il

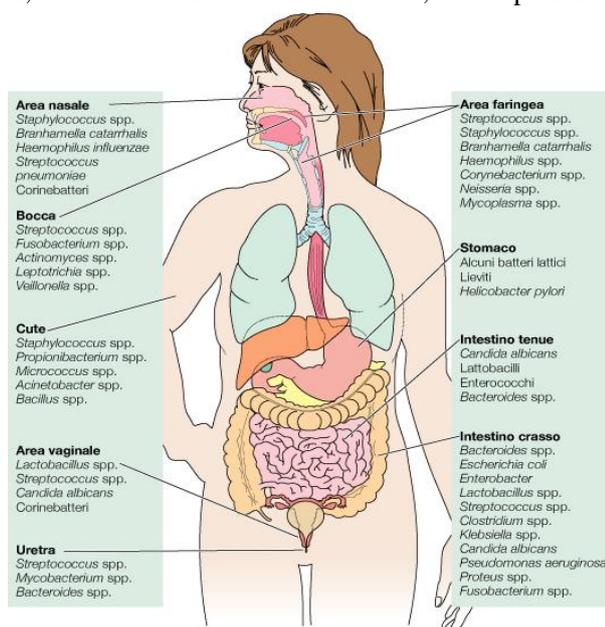


CD14), che si lega in un complesso che determina ancora neutralizzazione ed eliminazione tramite il fegato. Infine LPS può legarsi al CD14 in membrana, viene processato e legato a un'altra molecola di membrana detta MD2, che porta infine ad un complesso multirecettoriale che coinvolge anche TLR4. Questo tipo di interazioni sono necessarie per la formazione del complesso recettoriale attivo e trasduzione del segnale a valle del TLR4. I geni effettori di questa cascata trascrizionale sono fattori di trascrizione, tra cui NF- κ B e IRF3, che sono i fattori trascrizionali responsabili della produzione di citochine infiammatorie. L'attivazione recettoriale da parte di LPS porta a una serie di sintomi (riassunti nell'immagine) che rapidamente porta a uno stato di shock, rapidamente mortale. LPS tramite questi meccanismi può quindi essere responsabile di quadri clinici molto gravi come la coagulazione intravascolare disseminata. Una manifestazione caratteristica delle infezioni da gram-, quindi dovuta a LPS, è l'effetto pirogenico, cioè lo sviluppo di febbre. L'insieme di strutture caratteristiche di agenti patogeni che vengono riconosciute dai PRR vengono raggruppati in un gruppo di strutture attualmente chiamati PAMPs (Pathogen-Associated-Molecular-Pathways). I PAMPs legano sempre i PRR e danno sempre infiammazione. Ciò non si riferisce solo ai batteri, ma anche ai miceti, ai virus e ad altri microorganismi invasori, ognuno dei quali sarà dotato di specifici PAMPs, ognuno dei quali andrà ad interagire con degli specifici PRR.

LA FLORA MICROBICA NORMALE

La maggioranza dei microorganismi è solo scarsamente patogena e per questo non dobbiamo sempre vederli come patogeni (non sono non-patogeni, perché quando le condizioni dell'ospite sono troppo predisponenti, ogni microorganismo può diventare patogeno). Quindi dobbiamo ora considerare la flora microbica normale microorganismi che esistono in simbiosi con l'organismo umano. La flora microbica è quindi costituita da una miscela di microorganismi presenti in diversi siti anatomici, quali la cute. La flora microbica cutanea è importantissima e dobbiamo assolutamente mantenerla e preservarla cominciando dalla regola più semplice, cioè di evitare l'eccessiva detersione della cute (In piscina si prendono i funghi e le verruche non perché ti contaminano ma perché la presenza di cloro e altre sostanze tossiche alterano la flora microbica normale: la verruca è causata dal poliomavirus, che è un virus della flora normale, che ha preso il sopravvento). L'equilibrio tra flora microbica normale e il nostro organismo deve essere quindi sempre mantenuto.

La flora microbica normale è presente nelle alte vie respiratorie (e non deve estendersi alle basse vie respiratorie, perché queste ultime sono sterili, e si avrebbe infezione dell'albero respiratorio); è presente nella cavità orale; è presente sulla cute; la flora microbica normale abbonda anche nell'intestino; microorganismi caratteristici sono localizzati sui genitali esterni. (vedi immagine su distribuzione dei batteri). Abbiamo anche virus nella flora microbica normale, presenti



sottoforma di infezioni latenti che rimangono nella flora microbica senza dare patologia, accumulandosi. Le famiglie di virus presenti in queste condizioni sono il Papillomavirus e il Poliomavirus.

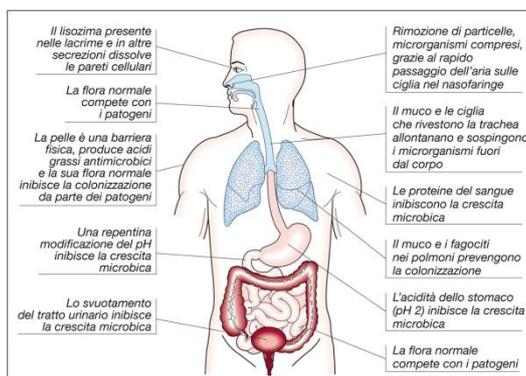
La flora microbica normale cambia nel corso della vita, e questi cambiamenti sono dovuti all'eterogeneità dei tipi di alimentazione, all'attività ormonale variabile, alla presenza di alcune patologie e più in generale a qualsiasi cambiamento della nostra omeostasi. Attraverso la flora microbica normale, attualmente, vengono spiegate molte patologie ad eziologia non nota. Questo viene fatto attraverso l'analisi del microbioma (cioè tutto ciò che c'è di non-self in un determinato distretto), ed è possibile grazie al recente sviluppo di tecniche di sequenziamento totale. Questo tipo di analisi è molto complicato per via dell'enorme quantità di dati sviluppata dai nuovi macchinari sviluppati. Queste tecniche hanno però permesso di individuare patologie in cui si ha un differente assetto del microbioma. Questo tipo di analisi attualmente è molto utile per spiegare alcuni tipi di malattie infiammatorie croniche che coinvolgono l'intestino: in questo distretto, per via della sensibilità alle variazioni di alimentazione, si osserva un enorme variabilità del microbioma. Il microbioma di un distretto è poi influenzato anche dall'utilizzo di farmaci quali antibiotici, immunomodulanti, cortisonici, chemioterapici, ecc... Nella flora microbica normale, oltre ai batteri troviamo i miceti (in particolare le candide) e anche alcuni protozoi: quindi quando faccio un'analisi batteriologica può essere molto difficile fare un'interpretazione corretta di tale analisi, perché la flora microbica normale è costituita da una vastità di elementi, ed è quindi difficile stabilire chi può fare parte di questa schiera di simbionti e chi no.

La flora microbica normale è un importante componente delle barriere di difesa del nostro organismo contro altri microorganismi patogeni, che dovranno vincere la competizione dei batteri della flora microbica normale per dare infezione. Ciò è comunque secondario all'azione di barriera meccanica della cute, che deve mantenersi continua;

lacerazioni della cute infatti sono suscettibili enormemente a infezioni per mancanza del sistema di barriera.

Il tipo di simbiosi esistente tra la flora microbica normale e il nostro organismo è detto mutualismo, ed è un rapporto in cui ambedue i partecipanti traggono vantaggio dalla condizione di simbiosi.

L'eccessiva crescita dei batteri determina la comparsa di una struttura detta "biofilm" che è la struttura responsabile della comparsa delle placche dentarie, e rappresenta la matrice su cui i batteri si sviluppano.



VIROLOGIA GENERALE

(premessa: praticamente tutta la prima parte della lezione è riassunta nelle tabelle col bordino rosso!)

I virus sono parassiti endocellulari obbligati; sono entità che non possono essere annoverate nel regno animale; non sono dotate di vita; sono costituite dal solo materiale genetico (sottoforma di DNA o RNA) e diverse proteine, perlopiù a funzione strutturale; non sono da sole in grado di svolgere alcun tipo di attività, ma necessitano di una cellula che le metta a disposizione il suo metabolismo per permettergli di compiere azioni come la replicazione; sono entità molto piccole, le cui dimensioni sono nell'ordine degli angstrom ($200-4000\text{\AA}$).

I virus sono le entità più presenti sulla terra, infatti tutti gli organismi viventi sono infettati da virus e addirittura nel nostro genoma vi sono sequenze che derivano in modo primordiale da genoma virale. I virus sono entità anche molto antiche in quanto sembra si siano sviluppati quando si è sviluppata la vita. I virus sono stati scoperti a metà dell'800 e si era scoperto che erano entità in grado di causare patologia.

Il primo vaccino è stato scoperto, nel '900, proprio su un virus che è il virus del vaiolo. Fu scoperto da Jenner, che inoculò materiale purulento di vaiolo proveniente da una mucca infetta in un soggetto umano, osservando che questo individuo non sviluppava più la malattia, perchè era immunizzato nei confronti del suo agente eziologico.

La presenza di un virus non può essere osservata facilmente, date le loro dimensioni, però possono essere osservati grazie alle caratteristiche che assume la cellula infettata da virus; i virus possono però essere osservati al microscopio elettronico (non utilizzato molto in diagnostica ma più per la ricerca perchè costoso, richiede personale molto specializzato e perchè richiede tempi lunghi di analisi dei risultati ottenuti). Le cellule infettate, grazie alle caratteristiche che esse assumono, ci permettono quindi di identificare il virus.

STRUTTURA DEL VIRUS

Al loro interno presentano il genoma, che può essere o a DNA o RNA e mai i 2 tipi di acido nucleico possono essere rappresentati insieme; le molecole di acido nucleico inoltre possono essere a doppio o a singolo filamento. Già grazie alle caratteristiche del suo genoma posso quindi dividere i virus in 7 diverse classi:

- virus con DNA a doppio filamento;
- virus con DNA a singolo filamento;
- virus con RNA a doppio filamento;
- virus con RNA a singolo filamento a polarità positiva;
- virus con RNA a singolo filamento a polarità negativa;
- virus con RNA a singolo filamento con intermedio a DNA;
- virus con DNA a doppio filamento con intermedio a RNA.

Il genoma è racchiuso nell'involucro proteico detto "capside"; con il termine nucleo-capside si intende il complesso costituito da capsid e materiale genetico (detto anche virus nudo); se oltre al nucleocapside il virus è dotato anche di un ulteriore rivestimento, costituito da un doppio foglietto fosfolipidico, il virus verrà detto "rivestito", e la struttura aggiuntiva è detta "pericapside" o "peplos"

o "envelope".

Sulla superficie del pericapside (che deriva dalle membrane della cellula ospite) vi sono delle proteine virali, che conferiscono la capacità del virus di riconoscere il suo bersaglio specifico. Il capside ha innanzitutto la funzione di protezione del genoma ed ha struttura regolare: esistono 2 tipi di simmetrie in questo senso:

-icosaedrica, in cui il capside risulta essere costituito da un poligono di 20 facce triangolari costituite da proteine strutturali;

-elicoidale, in cui le proteine strutturali che costituiscono il capside si distribuiscono lungo l'acido nucleico, formando una struttura tubulare (Es. virus del mosaico del tabacco TMV).

Considerando i virus non dotati di envelope osserviamo che questi vengono rilasciati dalla cellula ospite (a seguito della replicazione del virus che avviene all'interno) unicamente per lisi, determinando la morte cellulare.

Considerando invece i virus rivestiti, abbiamo visto che oltre al capside questi hanno il pericapside che deriva da membrane cellulari, in quanto i virus rivestiti fuoriescono dalle cellule infettate per gemmazione, assumendo parte della loro membrana plasmatica (a volte può essere acquisito come pericapside anche la membrana nucleare, anche se raro; in questo caso la cellula morirà per lisi), su cui sono localizzate le proteine virali precedentemente posizionate; in questo caso la cellula non muore.

Come si diceva precedentemente i virus possono essere o virus "nudi" o virus "rivestiti", ma esistono una serie di casi intermedi quali:

-i poxvirus, che sono virioni con capsidi a struttura complessa, in cui il capside è rivestito da una serie di membrane e presentano una conca all'interno. Le membrane servono a proteggere il capside;

-i batteriofagi, che sono virus che infettano i batteri e hanno un capside a simmetria combinata, in cui si osservano 2 parti: la testa, costituita da un capside con all'interno il genoma virale e poi la coda che permette l'attacco del virus al batterio.

Quindi i virus possono avere molteplici forme. (inserisci immagine a bordi rossi)

IL GENOMA VIRALE

Il genoma virale è molto piccolo (può andare da 3500 nucleotidi fino a 280kb) e per questo i virus hanno dovuto compattare le informazioni in sequenze più corte possibile; infatti il genoma virale può codificare tanti mRNA con sequenze di DNA molto corte, perché presenta diverse origini di trascrizione genica, quindi da una stessa sequenza possono essere trascritti moltissimi mRNA diversi; inoltre i virus hanno moltissimi meccanismi di splicing alternativo.

Il genoma, oltre che essere suddiviso in base al tipo di acido nucleico da cui è costituito e dal numero di filamenti, può essere classificato in base alla sua ultrastruttura, in quanto può essere lineare, circolare e frammentato e all'interno di un virus ci possono essere diversi frammenti di virus che codificano per mRNA (Es. l'ortomixovirus, il cui genoma ha 8 segmenti lineari di RNA a polarità negativa).

I criteri di classificazione di un virus sono:

- struttura del genoma, del capsido e del pericapsido;
- caratteristiche biochimiche (enzimi particolari, meccanismi di replicazione, ecc...);
- malattia;
- tipo di trasmissione (aerea, veicolato da insetti, ecc...);
- cellula ospite preferenziale e cellula bersaglio del virus;
- tropismo, che sta ad indicare in che tessuto si replica il virus;

La tassonomia dei virus li divide in:

- ordini, in cui al nome dell'ordine si associa sempre il suffisso "-virales";
- famiglie, in cui al nome della famiglia si associa sempre il suffisso "-viridae";
- sottofamiglie, in cui al nome della sottofamiglia si associa sempre il suffisso "-virinae";
- genere, in cui al nome del genere si associa sempre il suffisso "-virus";
- specie, che sono generalmente indicate utilizzando lettere e numeri.

CICLO REPLICATIVO

Le fasi di questo ciclo, che possono essere riportate a tutti i virus, sono:

- l'adsorbimento cioè il riconoscimento tra cellula e virus;
- attacco alla cellula ospite;
- penetrazione all'interno della cellula;
- decapsidizzazione, in cui il genoma viene rimosso dal suo involucro;
- sintesi macromolecolari (replicazione del genoma e trascrizione e traduzione del genoma batterico e in particolare traduzione delle proteine virali);
- maturazione, che avviene a livello citoplasmatico, dove si ha assemblaggio e uscita dei neo-virioni.

Il virus non infetta tutte le cellule, ma l'infezione avviene solo in cellule sensibili e permissive. Le cellule vengono definite **SENSIBILI** quando hanno recettori sulla superficie cellulare che riconoscono anti-recettori presenti sul virus, che quindi si riconoscono e il virus potrà penetrare all'interno della cellula; la cellula è definita **PERMISSIVA** quando ha determinate caratteristiche che permettono al virus di utilizzare il macchinario replicativo della cellula e che quindi gli permetta di replicarsi al suo interno.

Se la cellula è recettiva ma non permissiva, il virus può entrare in essa e inserire materiale genetico che però non viene espresso oppure può avvenire che il virus penetra nella cellula e rimane latente, cioè è il soggetto nonostante infettato, essendo immunocompetente, non permette al virus di replicarsi.

L'attacco del virus alla cellula ospite si basa su cariche elettrostatiche tra una proteina virale e un recettore cellulare, che portano alla formazione di un legame specifico. Una volta avvenuto il riconoscimento avviene la penetrazione, che è un processo che può avvenire con diversi meccanismi:

- nei virus con rivestimento può avvenire una fusione diretta del virione con la cellula da infettare, rilasciando al suo interno il materiale genetico, che potrà essere integrato nel nucleo oppure essere

degradato; questo meccanismo è pH-indipendente;

-la penetrazione può avvenire anche per endocitosi, in cui l'intero capsidone viene endocitato dalla cellula ospite. In questo caso si possono avere 2 tipologie di endocitosi: nell'endocitosi pH-dipendente si viene a creare nell'endosoma un pH molto acido che distrugge il rivestimento del virus in modo che il genoma venga rilasciato nel citoplasma; nel meccanismo pH-indipendente si ha una modificazione della membrana, che ne permette la fusione con la membrana del virione con quella dell'endosoma;

-un terzo meccanismo, tipico del virus dell'HIV, consiste nella presenza di glicoproteine presenti sul pericapsidone virale che permettono la fusione del rivestimento virale con la membrana endosomiale. Nell'HIV la glicoproteina gp160 viene clivata e successivamente esposta sull'envelope sotto forma di gp120 e gp41. La gp120 si lega al CD4 e al corecettore CCR5 della cellula da infettare, facendo attivare gp41 che avvicina la cellula al virus e fa avvenire la fusione delle membrane.

REPLICAZIONE DEI VIRUS

Esistono diversi metodi di replicazione per i diversi tipi di virus:

-I virus a DNA a doppio filamento si replicano nel nucleo. Partono da un DNA a doppio filamento, che viene trascritto dalle DNA polimerasi in mRNA che vengono poi tradotti dai ribosomi in proteine (che possono essere precoci, cioè quelle essenziali alla replicazione del genoma virale o tardive, che in genere sono quelle che compongono il capsidone), che regoleranno poi la traduzione vera e propria delle proteine virali; il DNA viene poi replicato da una DNA polimerasi cellulare nel citoplasma, che verrà poi assemblato con le proteine precedentemente prodotte per andare a formare i nuovi capsidi

-La seconda classe comprende i virus a DNA a singola elica a filamento positivo. Anche in questo caso la replicazione avviene nel nucleo e siccome il filamento di DNA è a filamento positivo, può essere utilizzato per produrre mRNA. Nel caso dei virus a DNA a singolo filamento negativo, prima che venga prodotto il trascritto, una DNA polimerasi sintetizza il filamento di DNA complementare a polarità positiva, che verrà utilizzato come stampo per produrre molte copie del filamento di DNA a polarità negativa, che verrà inserito nei nuovi virioni, ma anche come filamento per la traduzione di proteine.

-La classe di virus con RNA a doppia elica presentano come caratteristica fondamentale degli enzimi fondamentali all'interno dei virioni, perchè non esistono enzimi cellulari in grado di trascrivere l'RNA in RNA. In questi virus quindi osserviamo che il filamento a polarità positiva del genoma a doppio filamento può essere utilizzato direttamente per produrre proteine grazie all'attività ribosomiale; il filamento a polarità positiva poi viene utilizzato come stampo per la produzione del filamento complementare a polarità negativa, e avviene viceversa con il filamento a polarità negativa (questi verranno poi accoppiati per riprodurre il genoma virale che verrà accoppiato al capsidone). L'enzima che questi virus portano con sé è una RNA polimerasi RNA-dipendente, che non è mai presente nelle cellule, perchè non c'è nessuna funzionalità cellulare che richiede la presenza di questo enzima.

- Nella classe dei virus con RNA a singolo filamento a polarità positiva il genoma virale può essere direttamente usato per tradurre proteine e per fare lo stampo di RNA a polarità negativa, che produrrà nuovo RNA a polarità positiva da inserire nei nuovi virioni
- Nella classe dei virus con RNA a singola elica a polarità negativa si parte da questo stampo per ottenere filamenti a polarità positiva che potranno essere utilizzati sia come mRNA che come stampo per la produzione di genoma per nuovi virioni.

I virus devono infettare una cellula eucariotica per poter utilizzare i loro messaggeri per effettuare la sintesi proteica. Tutti i virus inoltre differiscono per il loro tipo di genoma, a seconda dell'organizzazione biochimica e strutturale. Qualunque sia la composizione del genoma, una volta entrati nelle cellule devono arrivare alla produzione di mRNA virali, che codificano per proteine virali; la trascrizione del genoma virale e delle proteine virali, avviene però grazie all'apparato enzimatico cellulare. A seconda del tipo di genoma vi sono pathways diversi per arrivare alla produzione finale di mRNA messaggero, (nel caso dei virus con genoma ad RNA a singolo filamento a polarità positiva, cioè virus in cui il genoma ha già la struttura di mRNA, una volta che questo viene inoculato nella cellula ospite, questo funziona direttamente per la traduzione di nuove proteine virali).

Il genoma virale codifica per diverse informazioni:

- informazioni per la sintesi di mRNA;
- informazioni per la replicazione del genoma virale (siti che vengono riconosciuti dalle polimerasi);
- informazioni per la regolazione dell'espressione;
- Informazioni per l'assemblaggio e il packaging dei nuovi genomi;
- informazioni per la velocità di regolazione e per la temporizzazione, cioè per l'alternanza di processi cronologicamente ben determinati;
- informazione per la sintesi di proteine in grado di modulare le difese dell'ospite (cellular intrinsic immunity=capacità di svolgere processi immunitari di cui sono dotate tutte le cellule e non solo quelle immunitarie);
- informazioni per l'uscita dalla cellula ospite e per la successiva infezione di altre cellule.

Il genoma non contiene le informazioni relative a:

- le proteine enzimatiche per la produzione delle strutture virali;
- le proteine necessarie per la produzione dell'energia e nella sintesi della membrana;
- non c'è la tipica strutturazione in cromosomi con telomeri e centromeri, quindi non ci saranno le informazioni per queste strutture;

Le informazioni vengono poi trasformate in un mRNA e tradotte dai ribosomi della cellula ospite, che iniziano a tradurre massivamente proteine virali, tanto che la cellula è talmente metabolicamente impegnata in questa attività che può morire per la mancanza di energia dovuta all'eccessiva espressione di processi virali.

TASSONOMIA VIRALE

Le nuove tecniche di sequenziamento ad alta efficienza stanno permettendo al mondo della ricerca di

scoprire continuamente nuovi virus, che per essere riconosciuti, dovranno essere classificati in gruppi in cui vi siano caratteristiche in comune. La classificazione più accettata attualmente è quella di Baltimore, che ha diviso i virus in 7 classi utilizzando come caratteristica differenziale l'organizzazione del genoma virale, che effettivamente è la caratteristica più importante dei virus, perchè tutta la loro attività replicativa dipende da come è organizzata questa struttura. Le classi di virus identificate da Baltimore sono 7 e sono (vedi diapositiva "all'americana"):

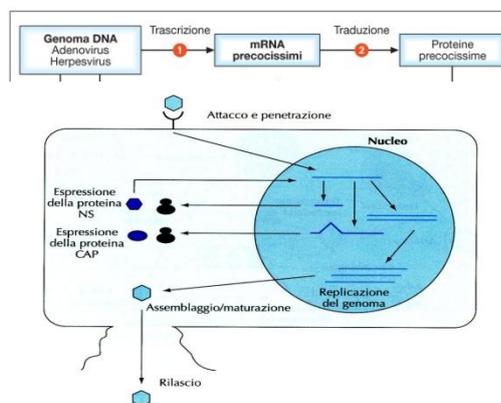
- virus con genoma a DNA a doppia elica;
- virus con genoma a DNA a singola elica;
- virus con genoma a RNA a doppia elica;
- virus con genoma a RNA a singola elica con polarità positiva;
- virus con genoma a RNA a singola elica con polarità negativa;
- virus con genoma a RNA a singola elica che replicano attraverso un intermedio a DNA (retrovirus);
- virus con genoma a DNA a doppia elica interrotto con intermedio a RNA.

MECCANISMI DI ESPRESSIONE DEI mRNA NELLE VARIE CLASSI VIRALI

CLASSE I

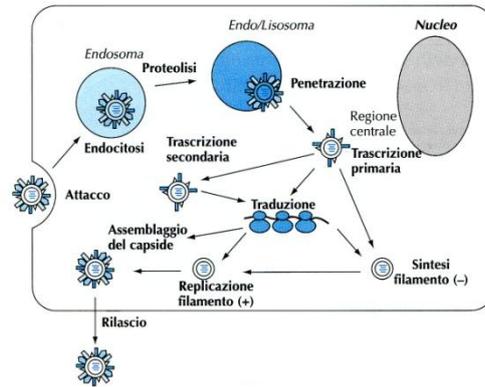
I virus di classe I replicano il loro genoma grazie all'attività della DNA polimerasi; già a questo livello troviamo una differenza, in quanto alcuni virus codificano per una propria DNA polimerasi virale, mentre altri utilizzano quella cellulare. In genere i virus che sfruttano la DNA polimerasi cellulare sono i virus con genoma piccolo (quali poliovirus e papillomavirus), mentre quelli con genoma molto grande (quali herpesvirus) presentano nel loro genoma una sequenza per una DNA polimerasi privata. Questa prima differenza determina differenze dal punto di vista terapeutico (si può osservare infatti come non esistano farmaci contro poliovirus e papillomavirus, mentre contro l'herpesvirus esistono farmaci che vanno ad agire proprio sulla sintesi della loro DNA polimerasi virale). La DNA polimerasi è, in questa classe di virus, una proteina precoce (preteine "early" o "E"), perchè il suo mRNA è uno dei primi ad essere sintetizzato in caso di infezione. Esistono poi mRNA "late" o "L" e "very early" o IE, cioè "tardivi" e "immediati precoci", che rispettivamente sono prodotti a seguito della replicazione del DNA virale, oppure nella fase iniziale dell'infezione; in genere alle sigle "IE" "E" "L" possono essere seguite da un numero che va ad identificarne altre caratteristiche. Le proteine E sono sempre funzionali, ovvero sono proteine con funzioni non strutturali; le proteine L invece saranno sempre proteine con funzione strutturale, cioè proteine che costituiscono il capsido, il pericapside e le proteine virali. Le proteine "late", essendo espresse sulla superficie esterna del virus, e quindi quelle con maggiore azione antigenica, sono quelle proteine che vengono utilizzate per la messa a punto di vaccini; le proteine early ci danno anche informazioni a riguardo dello stadio diagnostico).

Gli mRNA sono poi fatti sempre dalla RNA polimerasi cellulare.



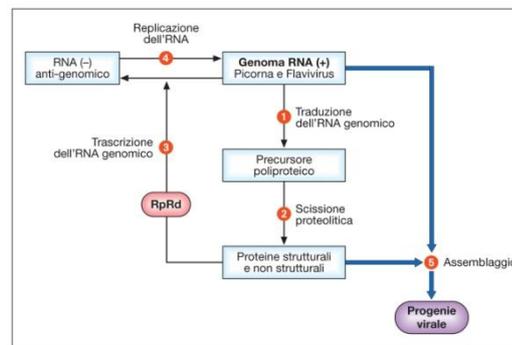
CLASSE II

Essendo il genoma a DNA a singola elica, per poter essere questo riconosciuto dalla RNA polimerasi è necessaria la sintesi della catena complementare ad opera di una DNA polimerasi. Dopodichè il percorso seguito dal flusso dell'informazione genica segue il percorso della classe precedente.



CLASSE III

sono virus con genoma a RNA a doppio filamento. Da questo genoma devono essere trascritti gli mRNA grazie all'attività delle polimerasi virali; infatti le nostre RNA polimerasi lavorano solo partendo da uno stampo a DNA, ma siccome in questo caso lo stampo è a RNA l'attività di trascrizione è resa possibile grazie alle RNA polimerasi presenti nel packaging virale: queste polimerasi dovranno poi essere resintetizzate e ri-incluse nel virione durante l'assemblaggio. Queste RNA polimerasi, oltre che per produrre l'mRNA servono per replicare il genoma virale.

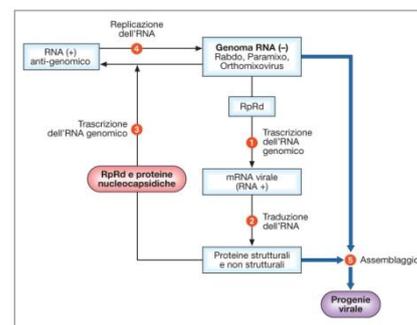


G. Antonelli e M. Clementi

Principi di Virologia Medica Copyright 2008 C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana

CLASSE IV

Sono virus con genoma a RNA a singola elica a polarità positiva, cioè RNA che può essere direttamente utilizzato come mRNA dai nostri ribosomi; questo messaggero virale sarà tradotto dai ribosomi cellulari ma sarà anche replicato dall'RNA polimerasi. Virus appartenenti a questa classe sono i Flavovirus, dove in questa famiglia c'è il virus dell'epatite C (HCV); l'infezione da virus dell'epatite C diventa cronica e grave e a lungo termine può diventare grave e mortale. Per essere replicato il filamento di RNA a polarità positiva deve essere complementato con un filamento a polarità negativa, che a sua volta sarà utilizzato da un RNA polimerasi per produrre molteplici copie di RNA a polarità positiva (che costituisce il genoma).



G. Antonelli e M. Clementi

Principi di Virologia Medica Copyright 2008 C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana

CLASSE V

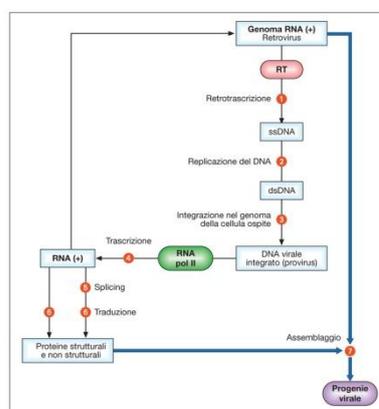
Sono virus con genoma a RNA a singola elica con polarità negativa., che ovviamente non può funzionare da messaggero. Osserviamo quindi che questo filamento dovrà poter essere moltiplicato per poter diventare il nuovo genoma dei nuovi virioni; dovrà inoltre essere prodotta la sequenza complementare a questo filamento che verrà successivamente utilizzato come mRNA per la sintesi di altre proteine virali. Questi virus, impacchettandosi nelle nostre cellule, possono impacchettare proteine cellulari nel virione; quindi quando il virus va ad infettare un'altra cellula libera sia proteine virali che proteine provenienti da altre cellule, innescando in questo modo meccanismi autoimmuni. Il genoma di alcuni virus viene cromatinizzato dalle nostre proteine istoniche; la presenza di proteine istoniche nei virus è spiegabile con il fatto che i virus convivono con le cellule umane da milioni di anni.

CLASSE VI E CLASSE VII

In questa classe sono compresi i retrovirus (classe VI) e gli Hepadnavirus (classe VII), che contengono il virus responsabile di epatite C (HCV). Queste 2 classi di particelle virali sono caratterizzate dall'attività di un particolare enzima che è la retrotrascrittasi o trascrittasi inversa, cioè una polimerasi che va contro il flusso normale dell'informazione genica, e permette di sintetizzare DNA a partire da uno stampo di RNA (sarà quindi una DNA polimerasi RNA-dipendente).

CLASSE VI

I retrovirus, grazie all'attività di questo enzima hanno un genoma che si integra sempre con quello della cellula ospite, dando sempre origine ad un'infezione cronica, non eliminabile. I retrovirus più importanti comprendono il virus HIV, ed altri virus che durante l'evoluzione si sono integrati con il genoma umano. La replicazione dei retrovirus parte da un genoma ad RNA a singola elica ma diploide, cioè ha 2 eliche uguali. Queste 2 eliche



G. Antonelli e M. Clementi

Principi di Virologia Medica Copyright 2008 C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana

sono eliche a polarità positiva che però non vengono utilizzate da messaggero, ma che subiscono nella cellula una trasformazione in DNA a doppia elica ad opera del complesso enzimatico della trascrittasi inversa. La scoperta della trascrittasi inversa ha portato anche alla scoperta dei cDNA partendo dagli mRNA messaggeri cellulari, che vengono sintetizzati in laboratorio a vari scopi. Queste sequenze di DNA vengono sintetizzate tramite un processo di Real-Time-RT-PCR (Real-Time retrotrascrittasi PCR) che si basa sull'attività della trascrittasi inversa. La Real-time PCR è una tecnica più avanzata della PCR "end-point", in quanto nella prima il DNA amplificato viene reso fosforescente e può essere letto in tempo reale dalla macchina. La normale PCR si basa sull'attività di una polimerasi che amplifica il DNA; se il genoma però è ad RNA devo fare una serie di passaggi per riportarlo a DNA, dove c'è un primo passaggio di retrotrascrittasi.

Il genoma dei retrovirus esiste in 2 stati fisici:

- come RNA libero nel virione fuori dalla cellula ospite;
- lo stato fisico del virus nelle cellule ospiti, sottoforma di DNA a doppia elica integrato nel genoma cellulare, detto "pro-virus";

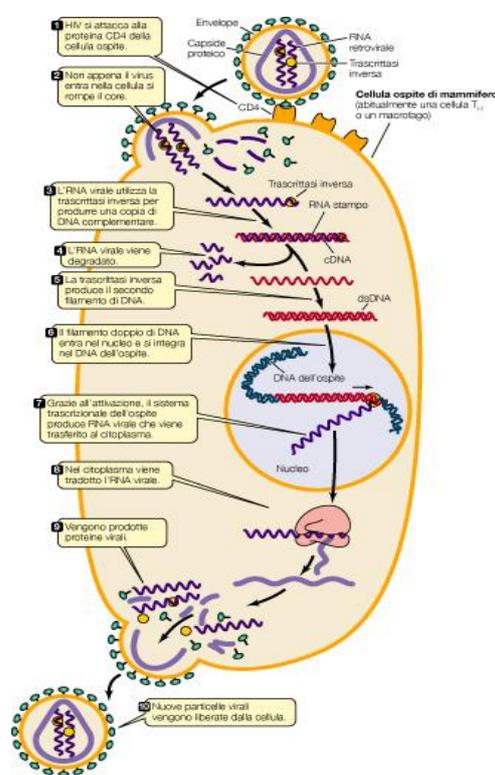
I retrovirus sono GLI UNICI virus a RNA che integrano il loro genoma in quello della cellula ospite per dare luogo alla malattia: anche altri virus (però a DNA) possono integrare il loro genoma in quello della cellula ospite, ma solo per i retrovirus questo evento è un obbligo per avere la manifestazione dei loro effetti. Quindi per completare il ciclo replicativo dei retrovirus deve avvenire la trasformazione dell'RNA a singola elica in DNA a doppia elica, che si deve poi integrare nel genoma grazie alla presenza di siti di integrazione agli estremi del genoma virale. In questa condizione ho genoma nei virioni a RNA (che può essere quantificato attraverso una Real-Time rt-PCR, cosa che per esempio si fa nella diagnostica per l'HIV) e del genoma integrato in quello della cellula (che può essere identificato attraverso una Real-time PCR). Il genoma virale si inserisce in modo casuale nel genoma cellulare, infatti non è importante dove si inserisca perché il

genoma virale contiene tutte le sequenze enhancers e promoter necessarie per regolare la sua espressione. I promotori virali hanno la capacità di attrarre l'apparato enzimatico in maniera massiccia, facendo sì che le polimerasi vadano tutte sui promotori virali, portando presto a morte cellulare anche per deregolazione dell'espressione genetica del genoma cellulare.

Una volta arrivato alla cellula il virus penetra all'interno di essa, dove avviene l'uncoating, cioè la liberazione del genoma virale perdendo tutti i suoi rivestimenti. Durante l'uncoating viene liberato il complesso RT, che viene attivato dai processi di uncoating e inizia a retrotrascrivere il genoma nella sua versione a DNA (vedi passaggi). L'RNA viene liberato insieme a tRNA che agiscono da primer per la DNA polimerasi RNA-dipendente (trascrittasi inversa):

- viene sintetizzato un ibrido RNA-DNA grazie all'attività della trascrittasi inversa;
- l'ibrido viene scisso da una RNAsi, liberando il filamento di DNA a singola elica;
- quest'ultimo filamento viene utilizzato come stampo per produrre il suo filamento complementare, con cui andrà a costituire la versione a DNA a doppia elica del genoma virale, grazie all'attività della DNA polimerasi DNA-dipendente.

Il genoma del retrovirus è fatto da una porzione centrale codificante e da porzioni laterali R (regolatrici), localizzate alle estremità 5' e 3' (saranno indicate come RU3' e RU5', dove U sta per uncoding). Queste regioni regolatrici vengono duplicate nel corso del processo della retrotrascrittasi,



portando alla formazione di un prodotto terminale, che si andrà a integrare nel genoma, costituito da:

- una porzione centrale codificante, che rimane inalterata;
- sequenze regolatrici duplicate alle estremità a formare un complesso (presente solo nel provirus) detto LTR (Long-Terminal-Repeats), che costituiscono il principale apparato regolatore dell'espressione della parte codificante.

Le sequenze LTR hanno in genere una funzione di upregolazione, che viene esplicata sia sui geni virali, che sui geni normali della cellula: questo meccanismo è coinvolto nei vari fenomeni di trasformazione cellulare, causati dall'infezione del retrovirus.

Tutto ciò accade solo quando il virus riesce a portare a completamento i processi che gli permettono di infettare la cellula; non sempre il virus riesce però a portare a termine tutta questa serie di processi, infatti potrà succedere che il genoma non si riuscirà ad integrare nel DNA, dando luogo ad un'infezione abortiva, oppure il provirus può essere totalmente o parzialmente silente:

- Nel primo caso il provirus non codifica per nessuna proteina virale, quindi esso continuerà a rimanere nel genoma virale in una fase di latenza permanente;
- nel secondo caso i virus in latenza possono esprimere alcuni messaggeri e fare solo alcune proteine; quindi in questo caso il virus non si replicherà ma la cellula è modificata dalla presenza del virus, in quanto le poche proteine prodotte possono essere in grado di modificare la fisiologia della cellula e si dice che il provirus in questo caso ha effetto citopatico.

Per completare il ciclo virale i passaggi che devono avvenire sono:

- trascrizione del provirus integrato ad opera di RNA-polimerasi;
- traduzione dell'mRNA prodotto nel passaggio precedente per la produzione di proteine funzionali o strutturali;
- la RNA polimerasi, oltre che produrre mRNA, trascrive completamente tutto il provirus per andare a produrre un RNA pre-genomico, che è quello che verrà poi inserito nei nuovi virioni;
- l'RNA pre-genomico viene inserito nel capsido che poi gemma e assume anche il pericapside;

Essendo i retrovirus dotati di pericapside, questo deve essere assemblato e le proteine che lo compongono devono andare incontro a maturazione. Il pericapside è una struttura mista sia cellulare (bilayer fosfolipidico) che virale (glicoproteine che vengono prodotte dal RE, inviate alla membrana tramite vescicole provenienti dall'apparato del Golgi, dove poi si integreranno). Il capsido assume il pericapside attraverso il processo di gemmazione o "budding": in questo modo il virus che esce dalla cellula è identico al virus che la ha infettata.

In genere i virus senza pericapside sono in genere più stabili, e si trasmettono per via orofecale e per contatto indiretto; la resistenza dei retrovirus nell'ambiente esterno dipende però dalla presenza del pericapside, in quanto su questa struttura sono localizzate proteine e glicoproteine che permettono al virus di identificare la cellula da infettare.

Osserviamo, per quanto riguarda la patogenicità di questi virus, che i virus ad RNA hanno una più elevata possibilità di andare incontro a mutazioni durante il loro ciclo replicativo, generando

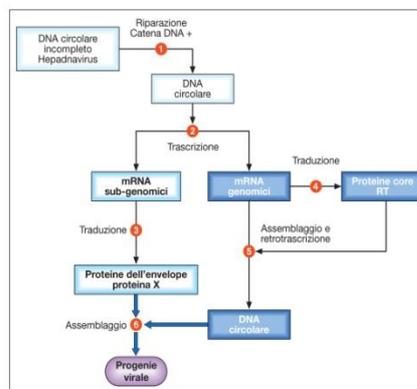
mutazioni che aumentano la probabilità che durante una terapia prolungata si generino ceppi resistenti.

CLASSE VII

è costituita dalla sola famiglia degli Hepadnaviridae, e sono virus con genoma a DNA a doppio filamento con intermedio a RNA. In questa famiglia virale, di rilevanza medica c'è solo il virus dell'epatite B (HBV), per il quale attualmente esiste un programma vaccinale che sta portando alla diminuzione della frequenza dell'infezione, anche se è ancora intensamente presente nella popolazione. Per andare da RNA a DNA avrò bisogno nuovamente della retrotrascrittasi. Quindi avremo questo enzima in comune alla classe VI ma il processo svolto sarà diverso. Gli stati fisici attraverso cui passa questo virus fanno la differenza sia dal punto di vista diagnostico che da quello del bersaglio terapeutico, perchè se voglio combattere questo virus devo agire in uno di questi stati, dove uno è quello del virus all'interno della cellula e l'altro è quello del virus all'esterno della cellula.

Il virus dell'epatite B (HBV) ha un genoma incompleto, condizione che viene detta "gap del double strand DNA", abbreviato con gapsDNA. Il virus porta con sé nel capsido una DNA polimerasi che, una volta avvenuto l'uncoating, si attiva e porta al completamento del gap. Una volta completato il gap il DNA può venire trascritto ad opera della RNA polimerasi DNA-dipendente, portando alla formazione degli mRNA virali che verranno tradotti dai ribosomi cellulari, portando alla formazione delle proteine funzionali e a quelle strutturali per la formazione del capsido. La peculiarità di questo virus è che oltre agli mRNA, il genoma viene trascritto anche ai fini della produzione di un RNA pre-genomico, che costituisce l'intermedio a RNA da cui prende il nome la classe. Questo RNA pre-genomico deve però maturare a genoma a DNA incompleto attraverso l'attività della trascrittasi inversa. Questo processo di maturazione però avviene nuovamente all'interno del virione.

Anche il genoma di HBV può integrarsi nel genoma come i retrovirus, ma ciò non è essenziale nel ciclo vitale del virus.



G. Antonelli e M. Clementi

Principi di Virologia Medica Copyright 2008 C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana

ASSEMBLAGGIO DEI VIRIONI E MECCANISMI DI ESOCITOSI

Consiste nell'assemblaggio del capsido e nella maturazione del pericapside (se presente) che avviene tramite il processo di gemmazione, in cui il virus spinge verso la membrana e esce assumendo la membrana. Il pericapside ha uno scheletro cellulare costituito dal bilayer fosfolipidico, ma ha altissima specificità virale che gli viene conferita da queste glicoproteine sulla membrana plasmatica. La cellula infettata esprime a livello di membrana quindi esprime delle glicoproteine virali che non sono self, e sono quindi riconosciute dal sistema immunitario che quindi le bersaglia. Oltre al fatto di rendere la cellula un bersaglio del sistema immunitario, queste glicoproteine hanno attività fusogena, che è un'attività che è stata sviluppata per far fondere la membrana del

pericapside con quella della cellula bersaglio; l'attività fusogena produrrà anche l'effetto di far fondere le cellule tra di loro, perchè l'attività di queste glicoproteine non distingue se la membrana con cui vanno a interagire è quella di una cellula o quella del pericapside di un altro virione: le fanno fondere e basta, e questo effetto rientra negli effetti citopatici dei virus con pericapside.

Se il virus è nudo esso non esce tramite gemmazione, ma esce con altre modalità che possono essere con o senza morte della cellula:

- la cellula può andare incontro a lisi, liberando le particelle virali;
- la cellula può liberare i virioni attraverso vescicole, senza andare quindi incontro a morte;
- la cellula può subire differenziazioni e venire quindi eliminata, liberando le particelle virali (ciò avviene nelle cellule infettate da papillomavirus, che sono infatti virus nudi).

In un contesto ideale in cui ho una cellula e un virus, ho un intervallo di tempo che decorre dall'ingresso del virus nella cellula, in cui non ci sono virioni, in quanto il virus che entra nella cellula entra sottoforma di genoma: questo periodo è detto periodo di latenza o di eclissi. Questo periodo di latenza ha una durata estremamente variabile, e il virus è identificabile solo se cerco il genoma del virus dentro la cellula.

LA COLTIVAZIONE DEI VIRUS

La replicazione dei virus avviene unicamente all'interno della cellula. La replicazione virale è anche riproducibile in vitro, ma non per tutti i virus, in quanto alcuni tipi si replicano in tessuti che non possiamo gestire in vitro. Fonti di cellule per la coltivazione virale sono diverse:

- cellule coltivate su piastra;
- animali da laboratorio;
- cellule embrionali animali (embrione di pollo). Questo mezzo di coltura in particolare è molto utilizzato perchè, oltre a costituire un ottimo terreno di coltura, può essere utilizzato per la coltivazione di virus umani (da cui posso produrre poi vaccini). Ciò è dovuto al fatto che, nonostante siano pochi, esistono virus che fanno il salto di specie, e quindi possono passare ad infettare cellule di una specie diversa da quella di partenza (virus dell'influenza aviaria);

COLTIVAZIONI VIRALI IN CELLULE COLTIVATE IN VITRO

Le coltivazioni cellulari in vitro necessitano di un terreno di coltura che abbia particolari condizioni di pH, temperatura, concentrazione salina, concentrazioni di gas (CO₂, O₂...). Le cellule vengono coltivate su contenitori di plastica (piastre di Petri), su cui le cellule (ad esempio umane) aderiscono, formando il cosiddetto monolayer. In genere le cellule più utilizzate sono i fibroblasti, oltre per via della semplicità di prelievo di queste cellule, anche per la loro facilità di coltivazione e per il fatto che molti virus sono in grado di infettarli. Tutte le cellule primarie hanno però una capacità replicativa limitata a pochi cicli replicativi, quindi devono essere continuamente rinnovate. Si possono allora utilizzare linee continue, cioè cellule immortalizzate (non tumorali) o trasformate, che possono andare incontro a infiniti cicli replicativi e non vanno incontro a senescenza. Oltre alle cellule epiteliali e ai fibroblasti (che si attaccano alla piastra formando il monolayer) possono dover essere utilizzate altre cellule quali i linfociti che non si attaccano al terreno di coltura e rimangono

quindi in sospensione.

Tutte queste cellule le posso infettare, rispettando però una serie di caratteristiche:

-una cellula per essere infettata da virus deve essere "susceptibile", cioè deve avere il recettore giusto per quel virus, ovvero deve essere sensibile. Questa condizione crea il "propismo cellulare" di un virus, cioè il fatto che il virus infetta un determinato tipo cellulare. una cellula non sensibile non ha il recettore;

-una cellula deve essere permissiva, cioè deve permettere al virus di completare il ciclo replicativo;

Se la cellula è sensibile ma non permissiva, avremo un ciclo replicativo virale abortivo. Nella cellula sia sensibile che permissiva avremo il processo di infezione, che può essere un processo "produttivo" quando avremo la produzione di nuove particelle virali, oppure "non-produttivo" quando il virus va in latenza, che è una condizione di silenziamento con possibilità di riattivazione. Quando un virus che va in latenza (come Herpes simplex) penetra infetta la cellula questo può dare i sintomi dell'infezione (come quelli dell'herpes labiale) oppure andare direttamente in latenza. Essendo l'Herpes Simplex un virus che va sempre in latenza, la seconda comparsa dei sintomi non costituisce una nuova infezione, ma si dice si ha una "riattivazione", che dal punto di vista virologico è molto diverso. La condizione di latenza può essere evidenziata per via del fatto che, anche verso il virus in latenza, può esserci stata la produzione di anticorpi contro quel virus.

I virus coltivati nelle cellule in vitro danno luogo ad una serie di alterazioni che rientrano in quello che viene definito "effetto citopatico".

L'effetto citopatico avviene sempre nel contesto dell'organismo ospite e può essere osservato in vitro. Gli effetti sono moltissimi e diversi a seconda del virus, dovuti a modificazioni di pathways cellulari diversi, dando alterazioni cellulari macroscopiche quali la morte cellulare (effetto citolitico). L'effetto citolitico è l'effetto citopatico per eccellenza e può essere evidenziato a livello microscopico. (vedi effetti citopatici in tabella).

La cellula sensibile e permissiva che sta replicando massivamente il virus, avrà dei siti di assemblaggio per questi virus che alterano l'istologia del tessuto, dando origine a degli "inclusion bodies", che possono stare nel nucleo o nel citoplasma (a seconda del sito di assemblaggio del virus), e che sono visibili al microscopio ottico. Questa deformazione istologica è un altro esempio di effetto citopatico da virus, che per esempio può essere utilizzato a scopo diagnostico in anatomia patologica.

Un altro effetto citopatico può essere quello della fusione delle cellule tra di loro, caratteristico dei virus con pericapside; in questo effetto si va alla formazione di grandi sincizi multinucleati, formate sia da cellule che erano infettate che da cellule non infettate. Un altro effetto citopatico può essere anche l'aumento di rischio per la trasformazione tumorale. Il punto (evidenziabile in coltura) in cui le cellule infettate perdono l'inibizione da contatto è detto "focus di trasformazione".

QUANTIFICAZIONE DELLA PRESENZA DI VIRUS IN UN CAMPIONE

Ci sono 2 possibilità di quantificare i virus in un campione biologico, che tengono in considerazione di 2 aspetti diversi dei virus:

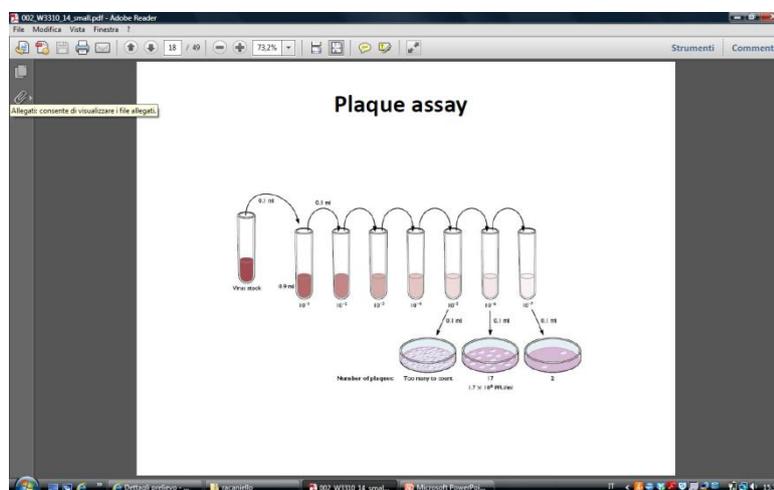
-il virus come agente infettante, cioè il concetto di infettività, che ci permette di quantificare i virus

vivi;

-il concetto di virus come entità inerte, incapace di riprodursi, cioè quando è allo stato fisico di virione.

La diagnostica dei virus non viene quasi mai fatta sull'infettività, ma viene fatta sullo stato fisico del virione

Il sistema delle placche è l'unico modo che abbiamo per quantificare l'infettività di un virus, in particolare modo dei virus citolitici. Il sistema delle placche è stato messo appunto dall'italiano Renato



Dulbecco nel 1930. Il sistema è nato con l'obiettivo di valutare la capacità di infettare dei batteriofagi quando sono litici con un sistema di conta delle placche di lisi. Ognuna placca corrisponde a un fago che ha infettato un batterio che ha infettato i batteri vicini. Queste placche di lisi permettono di contare il numero di fagi per unità di volume di partenza (UFP= unità formanti placca per unità di volume). Dulbecco poi capì che questo sistema delle placche poteva anche essere utilizzato per la conta dei virus che infettano le cellule animali, con un metodo esattamente identico, cioè avendo un tappeto di cellule animali che vengono messe a contatto con una soluzione contenente cellule virali.

Procedimento:

- coltivo cellule animali su terreno solido e attendo la formazione di un film
- utilizzo un campione liquido contenente una concentrazione nota di particelle virali;
- effettuo diluizioni scalari per rendere le placche contabili sulla piastra;
- verso la soluzione contenente le particelle sul film di particelle animali presenti nella coltura e attendo l'adsorbimento per 1-2 ore a 37° C;
- sostituisco il terreno liquido con terreno di coltura semisolido;
- incubo per un tempo variabile;
- conta delle placche, formatesi per via della lisi cellulare delle cellule contigue indotta dal virus, tramite colorazione con cristalvioletto

Il valore di infettività sarà dato da $(N^{\circ} \text{ UFP} \times \text{coefficiente di diluizione}) / \text{unità di volume}$, cioè la quantità di virus vivo che vedo replicante.

METODI DI QUANTIFICAZIONE DEL CONTENUTO VIRALE

Tutti gli altri virus potranno essere quantificati in modo fisico, cioè vado a valutare quantitativamente il numero di particelle che sono presenti e non solo quelle infettanti. I principali metodi utilizzati per la misurazione fisica sono anche i principali metodi diagnostici, e sono:

-EMOAGGLUTINAZIONE, che consiste nel valutare la capacità del virus di far fondere i globuli rossi, interagendo tramite proteine di superficie (quindi non è necessario che il virus entri nell'eritrocita), grazie a un test di sedimentazione;

-MICROSCOPIA ELETTRONICA, che non è un mezzo di diagnostica di routine per via dei costi. Grazie a questa strumentazione le particelle virali sono fisicamente visibili;

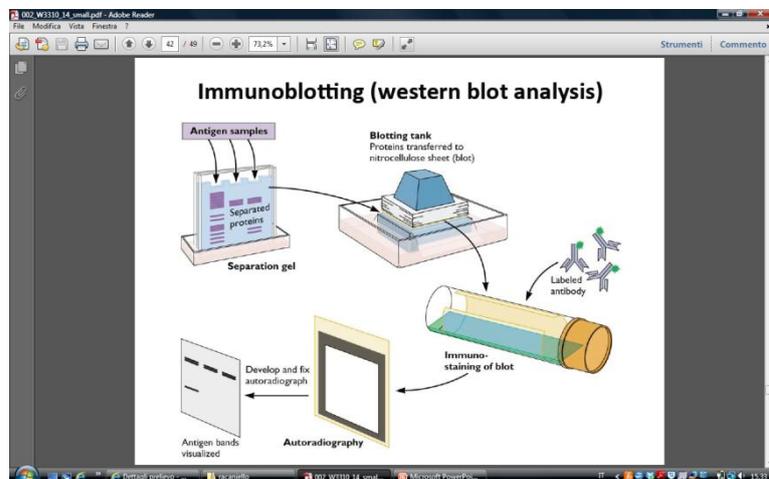
-valutazione dell'attività degli ENZIMI VIRALI, in genere la trascrittasi inversa, per poter valutare la presenza del virus: maggiore è l'attività enzimatica, maggiore è la quantità di virus;

-METODI SIEROLOGICI, cioè metodi che utilizzano reazioni antigene-anticorpo; questa reazione si sfrutta considerando il fatto che un virus quando infetta le cellule le fa produrre proteine specifiche; se io produco un anticorpo marcato fluorescentemente e, specifico per quella proteina, potrò vedere la cellula, in quanto l'anticorpo si lega ad essa. Questa reazione è detta di immunostaining e può avvenire in 2 modi: facendo legare direttamente un anticorpo marcato all'antigene presente sulla superficie della cellula infetta e sulla superficie del virus stesso; facendo reagire un primo anticorpo, specifico (anticorpo primario) per l'antigene virale, il quale verrà attaccato da un altro anticorpo specifico per il Fc del primo (anti-anticorpo o anticorpo secondario).; (vedi slide). Se l'indicatore è un marcatore fluorescente si parlerà di tecniche di immunofluorescenza; se l'indicatore è un enzima si parla di tecniche di immunistoichimica, e dovrò andare a misurare l'attività di questo enzima (fornendogli il substrato) che sarà attivo solo se l'anticorpo a cui è associato avrà marcato l'antigene virale: maggiore è la quantità di substrato che è stata trasformata in prodotto, maggiore è la quantità di virus; le analisi di questo tipo possono essere effettuate anche tramite western blotting e test ELISA. Il western blotting consiste

nel caricare un estratto proteico dove penso ci sia una proteina virale e vi aggiungo un anticorpo specifico contro il virus. Il western blotting può anche essere usato al contrario, cioè caricando le proteine virali e aggiungendo successivamente il siero di un paziente che si pensa sia stato infettato dal virus.

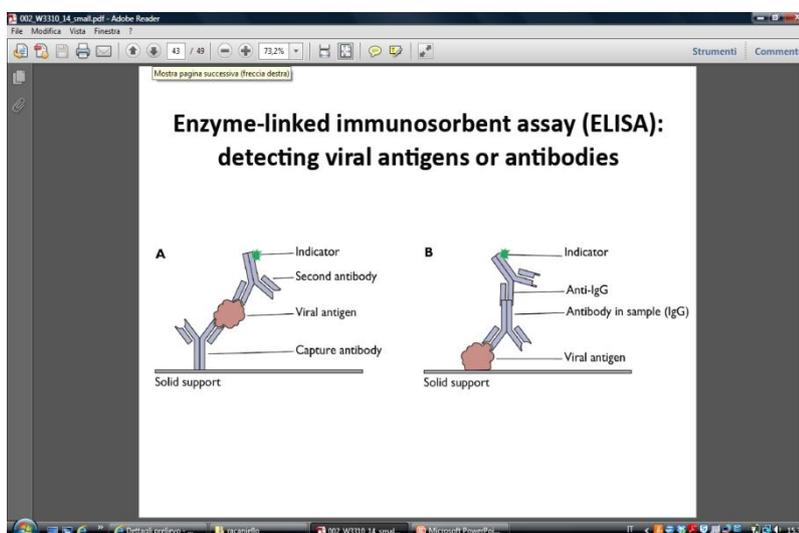
Il test ELISA si effettua con una piastra a 96 pozzetti. Sul fondo dei pozzetti possono essere adsorbiti o l'antigene virale oppure l'anticorpo per questo antigene. Se utilizziamo l'anticorpo (detto "capture"), questo lo troviamo adsorbito sul fondo del pozzetto, dopodiché eseguiremo i seguenti passaggi:

- carico il siero del paziente con sospetta infezione del virus; se il paziente è infettato gli antigeni virali si legheranno all'anticorpo sul fondo del pozzetto;
- lavaggio;
- carico l'anticorpo secondario marcato; l'indicatore è un enzima (attivo quando l'anticorpo si lega) che agendo sul suo substrato lo trasforma in una sostanza colorata.
- carico il substrato e osservo la formazione di colore;
- in presenza di colore vi è positività al test, quindi nel campione c'è l'antigene;



Come dicevamo, il test ELISA può essere utilizzato anche al contrario, cioè facendo adsorbire l'antigene sul fondo del pozzetto: questo meccanismo è il più utilizzato nella diagnosi per l'HIV.

Sempre per vedere le particelle virali possiamo sfruttare delle proteine delle "green fluorescent protein", prodotte dalle meduse. Il gene per queste proteine può essere inserito nel genoma del virus: il risultato è la formazione di un virus con proteine del capsido colorato, diventando più visibile al microscopio a fluorescenza.



La PCR è la tecnica più sfruttata dal punto di vista diagnostico e in particolare: la PCR end-point ci dà informazioni sulla presenza/assenza del virus, mentre per avere informazioni quantitative dovremo effettuare una Real-time PCR.

Negli ultimi anni sono nate nuove tecniche di sequenziamento dette "high-throughput", che ha sostituito in molte occasioni la tecnica introdotta da Sanger. Queste metodologie effettuano il deep-sequencing, che ci permette di analizzare tutte le sequenze presenti in un campione biologico e ci permette di osservare se queste sequenze sono già presenti in un database (e quindi appartengono a un virus noto) oppure sono sequenze di nuovi virus. Il deep sequencing non costituisce ancora un metodo diagnostico.

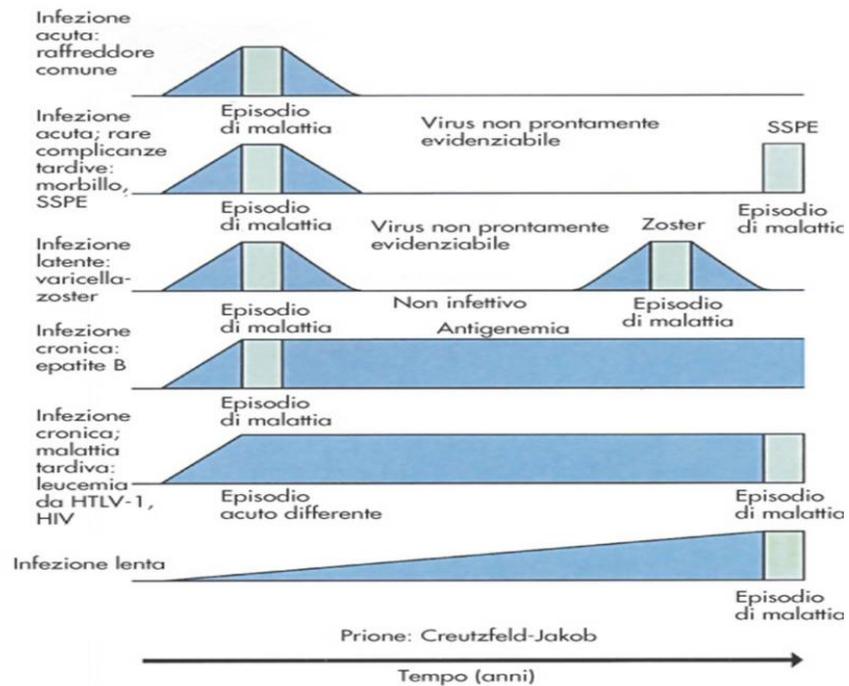
PATOGENESI VIRALE (questa lezione prendetela con beneficio di inventario perchè la Gariglio è impazzita)

Ogni particella virale ha un proprio meccanismo patogenetico e ciò è dovuto al fatto che ciò che il virus fa dipende dalla sua struttura, dal suo genoma e dalla cellula che infetta.

Come sappiamo, un virus deve trovare una cellula sensibile e permissiva per poter dare malattia, mentre per dare infezione è sufficiente che un virus entri in una cellula, ma non deve essere un'infezione necessariamente "produttiva". Il risultato dell'infezione virale può produrre:

- un'infezione acuta, in cui il virus, trovando una cellula sensibile e permissiva, si replica massivamente finchè la cellula lo consente. Segue una fase di declino. Gli esiti dell'infezione acuta possono essere differenti, perchè nella fase della massiccia replicazione, l'ospite può morire; se il soggetto non muore durante la fase di replicazione massiva si ha un'infezione acuta con risoluzione.
- un'infezione acuta può essere anche persistente, cioè la carica virale non si abbassa mai, come in un'infezione latente in cui la carica di virus rimane alta;
- nell'infezione latente la carica di virus si abbassa notevolmente dalla fase acuta ma non tocca mai lo zero e sono possibili nuovi picchi di riattivazione;

Un'infezione virale viene eliminata quando vengono attivati i meccanismi immunitari, che siano essi intrinseci (presenti in tutti i tipi di cellule) o specifici. L'attivazione della risposta immunitaria determina la clearance del virus:



-in un'infezione

acuta la clearance del virus sarà molto alta

-in un'infezione da retrovirus la clearance del virus è nulla, ma si ha il silenziamento dello stesso

Quando l'infezione virale è latente a livello della singola cellula significa che nella cellula c'è il genoma del virus e che non c'è replicazione; infezione latente nell'organismo ospite vuol dire invece che un individuo è stato infettato da un virus che è presente nelle sue cellule e che si può sempre replicare.

L'infezione virale acuta può evolvere in infezione cronica, perché il paziente non ha eliminato il virus dopo l'evento primario. L'andamento di una infezione cronica è estremamente variabile a seconda della specie e dalla cellula infettata.

L'infettività del soggetto con infezione cronica è anch'essa variabile, a seconda della quantità di virus che risiede nell'ospite: ci saranno momenti in cui la quantità di virus nell'ospite è molto alta e l'infettività è alta, mentre se la quantità di virus è bassa l'infettività sarà bassa.

Quindi, l'infezione acuta è l'evento primario che costituisce lo squilibrio dell'omeostasi a favore del patogeno; nelle infezioni latenti si ha il primo evento infettivo, in cui il virus può essere silenziato ma successivamente può riattivarsi, per via del fatto che ormai il genoma del virus è nella cellula; nelle infezioni croniche il virus non va in latenza, ma si ha una costanza della persistenza del virus nell'individuo ospite, dovuto all'instaurarsi di un equilibrio tra ospite e virus, il rischio maggiore delle infezioni croniche è che gli individui infetti sono potenzialmente infettanti.

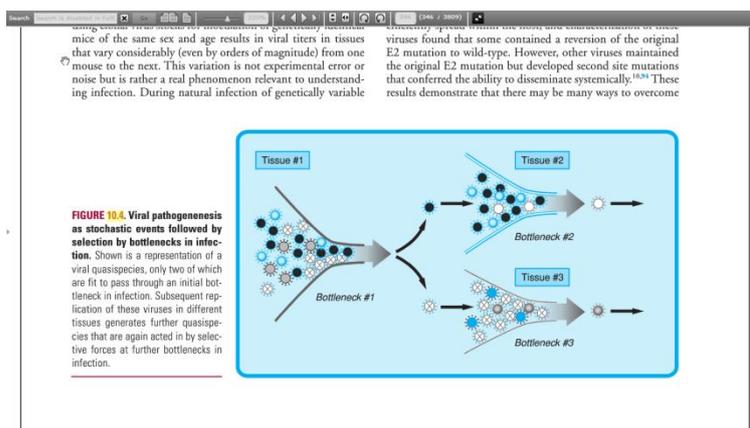
MALATTIA E INFEZIONE VIRALI

Nelle infezioni virali, la malattia è il danno che consegue alle infezioni: alcune infezioni virali non danno danno, e quindi non danno malattia. A dare malattia spesso non sono solo i virus in attività replicativa ma possono essere anche i virus latenti, perché inserendosi nel genoma questi possono far produrre proteine che possono avere attività patogenetica. La principale funzione della replicazione virale è quella di mantenere la presenza della particella, e il fatto che essa abbia anche

una funzione patogenetica è assolutamente secondario. Le cellule infettate da virus possono, per esempio, far produrre citochine infiammatorie che poi possono provocare anche danni sistemici. I determinanti della virulenza di un virus sono molti, ma questi sono i principali:

- la capacità replicativa, perchè più particelle virali ci sono più cellule potranno potenzialmente essere infettate; inoltre ciò fa sì che l'infezione possa espandersi nell'organismo;
- capacità infettante, che deve essere alta per determinare un'alta virulenza, o viceversa;
- capacità evasiva dalle difese del sistema immunitario;
- capacità di alterare i processi cellulari;

Inoltre la virulenza dipende anche dal distretto anatomico che il virus va a colpire (tropismo). Tutto ciò va studiato però considerando che il virus durante la sua permanenza nella cellula diventa vivo, e in quanto tale muta. Di conseguenza nell'organismo ospite possono contemporaneamente esserci presenti virus con mutazioni diverse, che hanno caratteristiche diverse di resistenza. Questa capacità di mutare all'interno dello stesso organismo ospite è un altro determinante della patogenicità, perchè mano a mano verranno selezionate dalle nostre difese immunitarie specie di virus sempre più resistenti.



GLI ANTIBIOTICI

Gli antibiotici sono dei farmaci che agiscono sui microorganismi, tipicamente i batteri. Non hanno effetto riguardo i virus, dato di fatto che i virus sono parassiti endocellulari obbligati, che sfruttano appieno il metabolismo della cellula ospite per svolgere le tappe del ciclo replicativo virale. Ecco che quindi si capisce già subito perchè molte terapie antivirali colpiscano anche molte funzioni dell'ospite (a meno che non si tratti di farmaci più squisitamente selettivi, come ad esempio quelli contro la retrotrascrittasi o trascrittasi inversa dei retrovirus).

Talvolta comunque anche in caso di patologia da virus può essere prescritto un antibiotico ad ampio spettro, per evitare sovrinfezioni batteriche.

Consideriamo il papà degli antibiotici il dottor Fleming, che nel 1929 (peraltro stesso anno dell'introduzione dell'elettroencefalogramma da parte del dottor Berger) scoprì la penicillina. Il grande studioso sbagliò a coltivare delle piastre con degli *Stafilococchi aurei*,

esse si contaminarono con muffe di *Penicillium notatum* che davano una zona di inibizione ove i batteri non crescevano; era chiaro che quelle muffe avevano prodotto una sostanza inibente la crescita batterica, che altro non era che la penicillina.

La penicillina fu iniziata all'uso clinico, per la cura di un grande numero di infezioni batteriche, tra le quali spiccava la gonorrea (agente eziologico *Neisseria gonorrhoeae*).

Tipicamente un antibiotico dovrebbe essere per definizione una molecola naturale prodotta da microbi (come i miceti microscopici) che inibisce la crescita di altri microbi. Tuttavia oggi consideriamo inclusi nel termine antibiotico sostanze di uso antibatterico anche di origine artificiale (chemioterapici), basti pensare al Salvarsan o Arsfenamida, che cura la sifilide (*Treponema pallidum*) o al Proctosil (antimicotico artificiale); squisitamente naturali invece sono antibiotici come la già citata Penicillina ma anche la Streptomina (prodotta da batteri *Streptomyces*).

Le penicilline sono state continuamente modificate industrialmente, dato che i batteri acquisiscono resistenza.

Abbiamo poi le Batteriocine che sono molecole batteriche inibenti batteri dello stesso genere.

SPETTRO DI ATTIVITA' DELL'ANTIBIOTICO: è il numero di specie batteriche colpite dall'antibiotico. Un antibiotico ad ampio o largo spettro colpisce molte specie batteriche, specialmente gram- e gram+, danneggiando pure la flora microbica normale. Un antibiotico a spettro mirato colpisce una specie, un antibiotico a spettro ristretto qualche specie e un antibiotico selettivo agisce su molti batteri appartenenti però allo stesso lato dello spettro (es. gram-).

E' chiaro che se la diagnosi è solo presunta e sto attendendo con ansia le analisi di laboratorio, conviene, in certi casi, somministrare lo stesso un antibiotico ad ampio spettro al paziente, per evitare che si aggravi e nei casi peggiori vada a morte.

Un antibiotico poi può essere:

-batteriostatico: arresta la moltiplicazione dei batteri senza ucciderli se è usato ad adeguate concentrazioni; generalmente se il sistema immune del paziente è ben funzionante questi antibiotici funzionano

-battericida: uccide i microbi; se li uccide per lisi è un antibiotico batteriolico

Vi sono poi organismi quali le Clamidie e le Rickettsie che sono parassiti obbligati e sono combattuti solo da pochissimi antibiotici, come alcune penicilline e la Tetraciclina (antibiotico potente).

Adesso definiamo ancora qualche caratteristica riguardo gli utilizzi terapeutici:

MIC: concentrazione minima inibitoria. E' la minima dose per inibire la crescita batterica.

MBC: concentrazione minima battericida. E' la minima concentrazione per uccidere i batteri, oltre a bloccarne la crescita.

Solitamente si usa una concentrazione MIC o poco più, poi è anche vero che ognuno antibiotico ha una sua più specifica posologia.

Come calcolo MIC ed MBC? Faccio un esperimento, che ora mi accingo ad esplicitare.

Dopo avere isolato il microbo, faccio una coltura pura di esso. Poi lo semino in tante provette con in ognuna la stessa quantità di microbo, mentre aggiungo concentrazioni di farmaco antibiotico via via a crescere nelle varie provette.

Incubo per una notte a 37 gradi e osservo: alcune provette saranno più torbide e altre meno, finché una sarà non torbida. Questa coincide con la concentrazione MIC di farmaco, visto che la crescita è stata inibita.

Se voglio verificare che solo la crescita non c'è stata ma i batteri non sono stati uccisi basta mettere il contenuto in agar-terreno di coltura per una giornata, osserverò delle colonie. Per sapere la MBC prendo provette a concentrazione di farmaco maggiore: una di queste, anche se messa in agar-terreno di coltura per un giorno, non mi darà colonie. Coincide con MBC.

TEST DI SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI

Questo test è detto test di KIRBY- BAUER, è utile specialmente quando i batteri diventano resistenti a certi antibiotici.

Si parte da una coltura pura del battere, lo si mette in gran quantità in piastra e le colonie crescono a confluenza creando un film batterico su tutta la piastra.

Piazzo poi sopra dei dischettini imbevuti con vari antibiotici e lascio lì una notte a 37 gradi. Il mattino dopo vedrò che attorno ad alcuni distretti vi sono degli aloni di inibizione ad indicare che quell'antibiotico ha funzionato. Si vede anche quale antibiotico ha funzionato meglio, cioè quale è l'antibiotico a cui il battere è più sensibile.

BERSAGLI DEGLI ANTIBIOTICI

Schematicamente sono divisi in:

- sintesi di parete batterica
- sintesi proteica
- membrana plasmica
- vie metaboliche, tipicamente la via dell'acido folico
- sintesi di DNA/RNA

SINTESE DI PARETE

Sono divisi in tre gruppi i bersagli: sintesi di precursori nel citosol, trasporto di essi mediante la membrana plasmica, inserimento dei precursori in parete (bersaglio più importante).

Nelle fasi precoci agiscono antibiotici come CICLOSERINA e FOSFOMICINA (non frequentemente usati, a meno che non siano micobatteri, in questo caso li si usano in cocktail con altri farmaci).

La D-cicloserina somiglia alla D-alanina, uno degli aminoacidi del ponte che collega i vari dimeri NAG-NAM nel peptidoglicano, mima la alanina e gli enzimi attaccati alla cicloserina non vanno avanti con le tappe di sintesi.

Alcuni batteri resistenti a essa cambiano alcuni loro enzimi, riconoscenti lo stesso la alanina. La fosfomicina invece assomiglia all'acido fosfoenolpiruvico e determina una non produzione del NAM (acido N acetilmuramico).

BACITRICINA: inibisce il passaggio di precursori attraverso la membrana, bloccando il bactoprenolo, che non viene fosforilato.

VANCOMICINA: inibisce l'unione del dimero NAG-NAM mediante ponti (transpeptidazione), dato che copre le proteine target. La parete così diventa lassa.

BETA LATTAMICI: essi inibiscono le transpeptidasi; sono le PENICILLINE, LE CEFALOSPORINE, LE CEFAMICINE, I CARBAPENEMI, I MONOBATTAMI E L'ACIDO CLAVULANICO (CHE E' UNA BETA LATTAMASI).

Hanno un anello beta lattamico con 4 atomi (tre carboni e un azoto) che sembra una specie di legame aminoacidico disposto ad anello. Oltre a questo anello c'è un secondo anello che differenzia i vari antibiotici beta lattamici e anche vari gruppi R che se cambiati dagli studiosi teorizzanti nuove molecole possono migliorare o peggiorare il farmaco.

Le penicilline in sostanza inibiscono la transpeptidasi in membrana, che sono delle PBP (penicilline binding proteins). L'anello beta lattamico mima il dimero alanina-alanina che è substrato delle transpeptidasi. Sono battericide e batteriolitiche, dato che la parete resa debole non segue l'accrescimento della cellula che tende alla lisi.

Le cefalosporine hanno lo stesso ruolo ed esistono cefalosporine di varie generazioni, di cui la terza e la quarta sono le migliori e più recenti.

L'acido clavulanico invece inibisce le beta lattamasi. Queste ultime rompono l'anello beta lattamico e sono evolute da batteri resistenti a penicilline-cefalosporine. Il clavulanico fa da substrato per le beta lattamasi e così i beta lattamici non sono più distrutti.

L'acido clavulanico va somministrato in combinazione con un antibiotico beta lattamico, tipica è la combinazione AUGMENTIN (amoxicillina+acido clavulanico).

INIBITORI DI SINTESI PROTEICA

Questi funzionano dato che le subunità dei ribosomi batterici sono diverse dalle nostre, i batteri hanno ribosomi 30s e 50s e con proteine un po' diverse.

Ricordiamo che la sub unità 30s lega l'mRNA, mentre la sub unità 50s copre il tutto e lega tRNA.

Gli AMINOGLICOSIDI tra cui STREPTOMICINA sono antibiotici battericidici e legano la sub unità 30s inducendo vari errori di lettura del messaggero.

Le TETRACICLINE inibiscono il legame tra tRNA e rRNA.

Il CLORAMFENICOLE inibisce il legame dell'amminoacil-tRNA e il polipeptide.

I MACROLIDI tra cui ERITROMICINA e AZITROMICINA bloccano lo scorrimento del messaggero.

Queste tre classi sono antibiotici batteriostatici.

Sono farmaci che vanno dosati con molta attenzione, specialmente nel oggetto pediatrico, visto che hanno attività tossica, come per esempio le tetraciline anno effetto lesivo sul canale uditivo.

Alcuni batteri sono capaci di fare effluire alcuni antibiotici, come le tetraciline dalla membrana plasmica verso l'esterno; ancora abbiamo altre classi batteriche dotate di enzimi inattivanti l'antibiotico.

Ad esempio i macrolidi, analoghi alle penicilline, sono somministrati in caso di resistenza alle penicilline stesse, per altro sono anche un po' tossici.

Gli aminoglicosidi come la streptomina non funzionano contro i batteri anaerobici visto che serve, per il loro meccanismo, una fosforilazione ossigeno dipendente. Quindi sono inutili contro molti Streptococchi.

ANTIBIOTICI CONTRO LA MEMBRANA PLASMATICA

Gli antibiotici contro la membrana plasmatica si utilizzano specialmente per via topica e causano alterazioni della membrana esterna dei Gram-.

Sono antibiotici derivanti dai Bacillus.

Queste sono le POLIMIXINE, tra cui l'ANFOTERICINA B, attiva specialmente su infezioni funginee.

INIBITORI DEL DNA/RNA

Tra questi abbiamo la famiglia dei CHINOLONI tra cui il Ciprofloxacina e l'Acido Nalidixico, sono dei chemioterapici e inibiscono le subunità alfa delle DNA girasi; la DNA girasi è un complesso enzimatico che prende il DNA batterico e mediante processi di taglia-cuci e avvolgimento impacchetta il materiale genetico. Difatti i batteri non hanno gli istoni.

Il chinolone, che inibisce questo complesso enzimatico, fa sì che il materiale genetico del batterio sia spezzettato e poi distrutto.

La NOVOBIOCINA ha anch'essa un meccanismo di azione battericida agendo sinergicamente con i chinoloni.

Di chinoloni ne abbiamo di prima e seconda generazione, vengono utilizzati per il trattamento di infezioni urinarie ed infezioni causate da Bacillus anthracis, ma comunque lo spettro di azione risulta ampio (Gram+ e Gram-).

Alcuni batteri resistono ai chinoloni e alla novobiocina perché modificano, grazie a mutazioni, le DNA girasi.

Il Clostridium difficile di solito è in bassa quantità nell'intestino ma, in soggetti anziani, immunodepressi e sottoposti a terapia antibiotica, si può avere un disequilibrio con una iperproliferazione del batterio e con l'insorgenza di coliti pseudomembranose e sanguinanti, fino alla morte.

Altri antibiotici che bloccano la sintesi e la funzione degli acidi nucleici sono: i NITROFURANI e i NITROIMIDAZOLI; ancora la RIFAMICINA inibisce la sintesi dell'RNA agendo sull'RNA polimerasi. È utilizzata nell'infezioni da micobatteri.

ANTIMETABOLITI

Sono gli inibitori della sintesi dell'acido folico, utile della sintesi di purine, timidina, metionina e tRNA.

Nell'uomo il folato viene assunto con la dieta, nei batteri viene formato ex novo: il PABA è substrato di una sintetasi che dà origine all'acido diidropteroico e da questo grazie a una reduttasi si produce l'acido tetraidrofolico.

I SUFAMIDICI inibiscono la sintetasi, mentre il TRIMETHOPRIM agisce sulla reduttasi, venendo riconosciuto molto meglio dalla reduttasi batterica rispetto all'isoforma umana.

In sostanza sulfamidici e trimethoprim sono inibitori indiretti degli acidi nucleici.

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

La resistenza agli antibiotici si verifica quando la MIC del farmaco verso un particolare battere è superiore a quella tollerata in vivo.

L'inappropriato uso di antibiotici, associato al largo impiego di antibiotici a largo spettro, favoriscono la resistenza agli antibiotici.

Infatti batteri selezionano e trasmettono mutazioni spontanee, ancora si scambiano parti di genoma con i meccanismi di coniugazione, trasduzione, traslocazione e ricombinazione, assumendo varie caratteristiche.

Alcuni meccanismi acquisiti riguardano l'interferenza nel trasporto del farmaco, l'attivazione di pompe di efflusso, la modificazione del target del farmaco, la distruzione o l'inattivazione del farmaco, la iperproduzione di siti bersaglio che competono con il substrato.

Enterococchi vancomicina resistenti (VRE);

Stafilococcus aureus e Stafilococcus epidermidis vancomicina resistenti;

Micobacterium tuberculosis multi resistente;

Stafilococchi meticillino resistenti (MRSA): ceppi di stafilococco aureo meticillino resistenti producono una PBP per beta lattamici meno affine, resistono pertanto a questa penicillina modificata e determinano infezioni spesso ospedaliere. Vanno identificati nei preparati clinici con molta attenzione, preparati di cute, urine, naso e sangue. Il rischio maggiore di acquisire infezioni ospedaliere da MRSA è correlato alle procedure invasive, come cateterismi, ove si altera la barriera cutanea.

DIAGNOSTICA BATTERIOLOGICA DI LABORATORIO DELLE MALATTIE INFETTIVE

Per diagnostica batterica si intende l'atto di scoprire qual'è il batterio o l'agente patogeno che determina la malattia nel paziente e scoprirne le varie caratteristiche (resistenza ai farmaci, ecc...) per organizzare al meglio la terapia per il paziente. Il prelievo del campione può essere effettuato in diverse zone, che possono essere:

- normalmente sterili (sangue, liquor cefalorachidiano, midollo, liquido articolare e cavità pleurica, tessuti profondi, vie respiratorie inferiori);
- zone dove si ha normalmente una formulazione batterica residente (bocca, congiuntiva, tratto gastrointestinale, tratto genitale femminile, uretra).

Le tecniche di prelievo includono:

- tampone sterile (cutaneo, orale, genitale, ecc.);
- agoaspirazione (prelievo del sangue);
- biopsia;
- intubazione (solo a paziente ospedalizzato);
- catetere (solo a paziente ospedalizzato);

Queste tecniche vengono usate a discrezione della zona infettata o del tipo di infezione per fare il prelievo del materiale biologico adatto. Esistono diverse manovre procedurali per gestire il prelievo e il campione:

- il prelievo deve essere raccolto dal presunto sito infetto, in quantità sufficienti e durante la fase acuta della malattia, possibilmente prima della somministrazione di farmaci e antibiotici;
- evitare la contaminazione da parte di microorganismi esterni eseguendo il prelievo con le norme prescritte e con i tempi prescritti, per esempio, nel prelievo delle urine bisogna

considerare che il tratto uretrale non è sterile, perciò si va ad effettuare il prelievo del minto intermedio, perchè il minto primario porta via con sé parte della popolazione batterica;

- utilizzando i campioni opportuni e gli adeguati sistemi di trasporto;
- etichettare adeguatamente il campione e fare una diagnosi presunta, per stabilire il presunto agente patogeno, per discriminare i batteri e poter effettuare esami specifici;

La diagnosi microbiologica si divide in:

- diretta, cioè quando si va a vedere la presenza del patogeno nel materiale biologico prelevato dal paziente;
- indiretta, cioè quando si va a rilevare la risposta immunitaria che il paziente ha messo in atto contro il patogeno, quindi si vanno a ricercare gli anticorpi contro il patogeno.

Quando si sospetta un'infezione si raccoglie un campione e si possono percorrere la via della diagnosi diretta o della diagnosi indiretta.

DIAGNOSI DIRETTA

Seguendo questa via, viene effettuato innanzitutto un'indagine macroscopica attraverso valutazione di caratteri macroscopici (torbidità del liquor, fattori che fanno presumere infezione batterica, ecc... sono però valutazioni senza alcun valore diagnostico) per poi passare all'esame microscopico analizzando il materiale ad un microscopio: se il materiale deve essere sterile questa fase basta per confermare l'infezione; se il campione non è normalmente sterile si può osservare la morfologia batterica oppure esaminare il campione tramite colorazione per discriminare i tipi di batteri. Per avere delle informazioni aggiuntive sulle caratteristiche dei batteri che danno infezione si possono fare colorazioni per determinare il batterio che dà infezione, come:

- colorazione di gram;
- colorazione di Ziehl-Neelsen, che permette di osservare la presenza dei micobatteri, caratterizzati dall'acido resistenza;

Nel caso in cui il materiale di partenza non sia sufficiente per fare una diagnosi, i batteri si possono coltivare su terreni di coltura che possono essere:

- terreni liquidi (detti anche "brodo");
- terreno solido, che non è altro che un terreno liquido solidificato con agar, che è un polisaccaride gellificante che rende il terreno gelatinoso.

Nei terreni di coltura ci sono macronutrienti, cioè i nutrienti di cui i batteri hanno più bisogno e che quindi sono presenti in maggior concentrazione (i CHONPS) e micronutrienti, che sono i nutrienti che devono essere presenti in tracce (es. ferro).

I terreni di coltura possono essere:

- non selettivi, che non selezionano le varie specie batteriche e sono costituiti da un liquido o

- un solido di base, con molti fattori nutritivi;
- selettivi, che contengono sostanze (come antibiotici e coloranti) che inibiscono la crescita di alcune specie e invece non impediscono quella di altri, scegliendo la popolazione batterica che vogliamo andare a valutare;
- differenziali, cioè che contengono delle sostanze che permettono di identificare le varie specie microbiche; ad esempio ci può essere uno zucchero che può essere fermentato da alcuni batteri ma non da altri, distinguendoli;
- selettivi-differenziali, cioè terreni che uniscono le caratteristiche dei 2 terreni, per osservare in un materiale prelevato la presenza del microorganismo che si pensa sia la causa dell'infezione.

TERRENI SELETTIVI

Sono in genere alla base di tutti gli altri terreni, e sono in genere fatti di composti che non hanno delle precise composizioni (come il peptone, che è un derivato della digestione parziale di proteine animali; estratto di carne allo 0,3%; NaCl per renderla isotonica, 0,5% di CO₂ ecc...) ma in cui i batteri possono trovare tutte le sostanze necessarie per la loro crescita. Prendiamo ad esempio un terreno Chocolate agar (che non contiene cioccolato, ma è detto così per il colore), che è un terreno non selettivo, che al suo interno contiene del sangue emolizzato, cioè sangue che viene riscaldato facendo rilasciare alle emazie il loro contenuto, come NAD⁺, fattori di crescita, ecc... permettendo la crescita di batteri.

TERRENI SELETTIVI

Il Thyer-Martin è terreno Chocolate Agar addizionato con antibiotici ed è quindi un terreno selettivo. L'antibiotico al suo interno impedisce la crescita dei batteri della flora normale e può essere utilizzato per vedere la crescita di Neisserie, che viene quindi selezionato per uno studio separato

TERRENI DIFFERENZIALI

Nei terreni differenziali sono presenti degli indicatori presenti al loro interno permettono di differenziare varie specie. Un terreno molto usato è il terreno Agar-Sangue (detto terreno "Columbia"), che contiene il 5% di sangue di montone non emolizzato. A seconda del tipo di emolisi che si osservano si possono differenziare diversi batteri:

- con alfa-emolisi, che è un emolisi parziale si ha la formazione di alone verde attorno alla colonia batterica dovuto alla degradazione dell'emoglobina a biliverdina, che si accumula attorno alla colonia;
- con beta-emolisi si ha un emolisi totale e si ha la formazione di un alone trasparente attorno alla colonia;
- con gamma-emolisi invece non si forma alcun alone attorno alle colonie perchè non si ha alcun tipo di emolisi.

Con questo terreno possono essere differenziati diversi tipi di streptococchi diversi.

TERRENI SELETTIVO-DIFFERENZIALI

Il terreno mcConkey-agar è un terreno sia selettivo che differenziale, che presenta nella sua composizione un fattore selettivo, che è il colorante cristalvioletto, il quale inibisce la crescita dei batteri gram+ e facendo crescere solo i gram-, fornendo al terreno caratteristiche di tipo selettivo; come fattore differenziale questo terreno contiene il lattosio, che è uno zucchero che viene fermentato da alcuni enterobatteri (E.Coli) che danno origine a colonie rosa (per via di un cambiamento del pH dovuto alla fermentazione), mentre non viene fermentato da altri batteri (come quelli del genere Salmonella), che daranno origine a colonie bianche (perchè il batterio non fermenta). Quindi, se effettuo un prelievo di un campione intestinale posso discriminare se in questo sono presenti solo batteri della flora microbica normale oppure sono presenti batteri patogeni. La capacità differenziativa dipende quindi dalle caratteristiche biochimiche dei batteri.

Un altro terreno selettivo-differenziale è il Mannitol-Salt agar (detto anche "terreno di chapman"). Questo terreno è selettivo per l'alta concentrazione salina, permettendo solo la crescita di batteri alofili (stafilococchi); è differenziale perché a seconda delle loro caratteristiche biochimiche, gli stafilococchi, danno una fermentazione diversa (per esempio, il mannitolo presente in questo terreno non viene fermentato da *S. Epidermidis*, mentre viene fermentato da *S. Aereus*, provocando acidificazione del terreno e colorazione gialla delle colonie che gli conferisce il nome).

TRATTAMENTO IN BASE AL TERRENO DI COLTURA SCELTO

Nel caso si utilizzi un terreno liquido, il prelievo viene disciolto in beute che contengono il terreno di coltura, che vengono mantenute in agitazione da dei macchinari per mantenere l'ossigenazione della soluzione. Queste beute (con l'agitatore) vengono messe in incubatori, settati a 37° con pCO₂ al 5%.

Se si utilizza un terreno solido, le piastre solidificate con agar vengono strisciate con un'ansa da batteriologia con su il campione e poi vengono messe in incubatore per una notte o più, per permettere la crescita di colonie batteriche. Se si vogliono fare test aggiuntivi (quali test biochimici) si vanno a fare prelievi da colonie singole, perchè sono sicuramente originate da un unico batterio.

TEST BIOCHIMICI

I test biochimici che si possono effettuare (per esempio con enterotube, che permette di prelevare il campione da una sola colonia e metterlo in diverse camerette di cui è dotato in cui, in base alle reazioni che avvengono, si può identificare il batterio) sono:

- test della catalasi, per valutare la presenza di questo enzima;
- indolo;
- coagulasi;
- bile;
- citocromo-ossidasi

Una volta che si è ottenuta la colonia del batterio infettante si può andare a valutarne la resistenza con il test di Kirby-Bauer.

I test di diagnosi rapida, che possono essere fatti direttamente se il materiale biologico è sufficiente, oppure indirettamente dopo arricchimento tramite coltivazione, se il materiale biologico all'interno del campione non è sufficiente. Questi test servono per identificare l'antigene batterico.

DIAGNOSI INDIRETTA

Nella diagnosi indiretta, come dicevamo prima, si v'è a ricercare la presenza nel siero del paziente gli anticorpi prodotti in risposta alla presenza dell'agente infettante:

- immunofluorescenza indiretta, in cui si ha come campione da saggiare delle proteine del batterio di interesse diagnostico, che verranno incubate con il siero del paziente: se il paziente è infetto, avverrà il legame tra antigene e anticorpo, che verrà rilevato da un anticorpo secondario, che emettendo fluorescenza ci permetterà di rilevare la presenza del patogeno;
- Test ELISA: nel fondo del pozzetto metteremo l'antigene dopodichè viene aggiunto il siero del paziente: se avviene il legame antigene-anticorpo potremo rilevare l'avvenuto legame attraverso l'aggiunta dell'anticorpo secondario, marcato con un enzima che quando viene aggiunto il suo substrato, determina la comparsa di una colorazione.

BATTERIOLOGIA SPECIALE

COCCHI GRAM POSITIVI

Sono un gruppo eterogeno di batteri, accomunati dalle seguenti caratteristiche:

- la forma sferica;
- gram positività;
- mancanza della capacità di produrre spore;

Si suddividono inizialmente con un test della catalasi: gli stafilococchi sono catalasi positivi, mentre gli strepto sono catalasi negativi.

Gli stafilococchi sono molto piccoli (diametro tra 0.5-1 micron), sono gram positivi e si distribuiscono sempre a grappolo; non sono mobili quindi non sono dotati di strutture per tale funzione; sono alofili in quanto sopravvivono a concentrazione di NaCl al 10%; crescono a temperature di 10-45° , con temperatura ottimale di 30-37° ; il range di pH a cui crescono è compreso tra 4 e 9, con un valore di pH ottimale a 7-7,5.

Le famiglie di stafilococco che infettano l'uomo sono moltissime (più di 40, di cui 16 sono patogene) e quelle più riscontrate sono lo *Staphylococcus Aureus* ed *S. Epidermidis* (ma anche *S. Saprophyticus*, ecc...).

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus Aureus è la specie patogena per eccellenza nell'uomo, infatti il 15% degli adulti sono portatori sani nel nasofaringe di questo batterio.

Gli antigeni più importanti dello *S. Aureus* sono:

- la proteina A, che è una proteina che si trova sulla parete del batterio e ha la caratteristica di legare l'Fc delle Immunoglobuline, non venendo in questo modo fagocitato perchè non riconosciuto dai frammenti variabili, e può quindi evadere le difese immunitarie;
- *S.Aureus* è dotato di capsula, che gli conferisce ulteriore resistenza alla fagocitosi;
- altri polisaccaridi di superficie, che fanno parte della parete e si legano alle cellule dell'ospite, fungendo da adesine.

L'azione patogena degli stafilococchi dipende principalmente dalla produzione sia di esoenzimi che di esotossine:

esoenzimi: sono prodotti da tutti gli stafilococchi per facilitare la sua replicazione e duplicazione. Sono moltissimi, quali la coagulasi che provoca la trasformazione del fibrinogeno in fibrina, che si dispone attorno al batterio proteggendolo dalla fagocitosi; Stafilonidasi; ialuronidasi che serve per distruggere l'acido ialuronico per facilitare la diffusione dell'infezione; le lipasi che permettono al batterio di sopravvivere nelle zone sebacee creandosi uno spazio per moltiplicarsi e la catalasi che gli permette di eliminare il perossido di idrogeno;

- esotossine, che variano al variare del ceppo di S. Aureus e possono essere:
- emolisine, che sono tossine ad azione generalizzata, che possono dare necrosi, distruggere le membrane cellulare, lisare gli eritrociti, ecc...;
- leucocidine, che lisano i leucociti ed hanno anche azione tossica generalizzata;
- enterotossine, sono ad azione tossica mirata, sono più di 8 tipi e sono classificate con le lettere dell'alfabeto; sono responsabili delle tossinfezioni alimentari;
- tossina da shock tossico, è ad azione tossica mirata, è detta enterotossina F e dà i tipici sintomi dello shock tossico quali innalzamento della temperatura corporea (febbre), ipotensione, eruzione cutanea e normalmente questo avviene quando S.Aureus si replica in una ferita, mettendo in circolo la tossina;
- tossina della sindrome della cute ustionata o tossina epidermiolitica, è ad azione tossica mirata e non è altro che una proteasi delle serine e causa la rottura dei ponti cellulari nello strato granuloso dell'epidermide, quindi scolla l'epidermide dal derma. Inizialmente si ha un eritema a cui segue la comparsa di delle bolle.

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

Staphylococcus epidermidis si trova sulla cute e sulle mucose dell'uomo; è dotato di capsula e può produrre vari esoenzimi. Questo batterio causa spesso problemi in sede post-operatoria, perchè può dare aderenza alle valvole cardiache, alle protesi ortopediche, ai cateteri vascolari e vescicali creando un biofilm su queste strutture difficile da eliminare. Essendo così presente su cute e mucose dell'uomo è molto difficile, in particolar modo durante un intervento, tenere sotto controllo la sterilità nei confronti di questo batterio. Nei pazienti immunocompetenti non dà in genere infezione.

STAPHYLOCOCCUS HOMINIS

Staphylococcus hominis può dare setticemie in pazienti immunocompromessi.

STAPHYLOCOCCUS SAPROPHYTICUS

S.saprophyticus può dare infezione a livello urinario, che con normale terapia antibiotica possono essere eliminate.

STAPHYLOCOCCUS LUGDUNENSIS

S.lugdunensis sembra essere responsabile di alcune forme di artrite perchè sembra dar luogo a immunocomplessi con gli anticorpi prodotti contro questo patogeno, che si accumulano a livello

articolare e possono dar luogo a questo tipo di problema.

METODI DIAGNOSTICI PER GLI STAFILOCOCCI

Nell'esecuzione della diagnosi per questo batterio possono essere utilizzati terreni particolari per farlo crescere (come il terreno di Chapman). Il terreno di Chapman presenta come zucchero il mannitolo e ha un'alta concentrazione di sale, quindi fa crescere solo gli alofili (stafilococchi crescono bene su questo terreno). Grazie alla presenza del mannitolo posso anche distinguere bene *S. Aureus* da *S. Epidermidis* per via della diversa colorazione delle colonie di questi batteri. Posso poi utilizzare il terreno agar-sangue, perchè gli stafilococchi danno un'emolisi di tipo beta, circondandosi di un alone trasparente. La terapia contro gli stafilococchi è una terapia di tipo antibiotica, in genere con vancomicina, nonostante stiano comparendo batteri resistenti alla vancomicina.

FARMACI ANTIVIRALI

I virus possono essere colpiti solo nel loro ciclo replicativo, perchè fuori dalla cellula possono essere considerati come non-viventi. Tutti i bersagli farmacologici contro i virus sono enzimi, che appartengono a varie fasi del ciclo replicativo del virus stesso. Non esiste una gamma di farmaci che ci permette di agire contro tutte le infezioni virali, quindi alcune infezioni virali non possono essere clinicamente trattate.

Gli step a cui sono associati alcuni farmaci sono specifici

di alcuni tipi di virus: per esempio gli inibitori della retrotrascrittasi agiscono solo sui retrovirus; altri farmaci sono specifici per altri tipi di virus perchè vanno ad agire sui loro meccanismi specifici di ingresso nella cellula; altri agiscono sulle integrasi (dove gli unici virus che utilizzano questi enzimi sono i retrovirus, perchè "integrano" il loro genoma all'interno del genoma della cellula); alcuni farmaci agiscono sulle proteasi (enzimi virali che hanno il compito di far maturare le proteine con reazioni idrolitiche: saranno proteine fondamentali per la ricostruzione dei nuovi virioni); altri farmaci, come gli inibitori della neuroaminidasi, agiscono sugli ultimi passaggi che riguardano il ciclo replicativo virale, cioè l'uscita dei virioni. Qualunque sia il punto su cui vado ad agire, l'obiettivo è sempre quello di inibire la replicazione del virus. Il farmaco aiuta quindi a ridurre la replicazione, ma per l'eliminazione del virus deve sempre intervenire il sistema immunitario.

Quindi, non potrò mai pensare di eliminare un virus tramite un farmaco, soprattutto quando si parla di virus che integrano il loro genoma nel genoma cellulare (retrovirus) oppure di quelli che vanno in

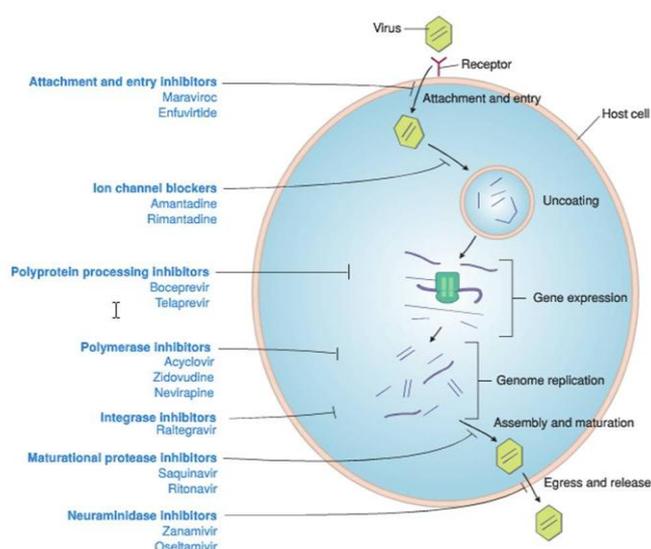


FIGURE 13.1. Antiviral drugs block various stages of viral replication. A generic replication cycle of viruses in cells is cartooned, showing the stages of infection, which different drug classes block. These include attachment and entry, uncoating, gene expression, genome replication, assembly and maturation, and egress and release. Examples of specific drug classes are provided. For some viruses (e.g., human immunodeficiency virus [HIV]), the order of the stages differs from that in this cartoon (see Fig. 13.2). Some viruses lack stages shown here (e.g., release), whereas other viruses have additional stages. (Modified from Yeh RW, Coen DM. Pharmacology of viral infections. In: Golan DE, Tashjian AH, Jr., Armstrong EJ, et al., eds. *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. Third edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012:649–673.)

latenza (herpes virus), perchè i meccanismi dell'immunità non possono andare ad agire a questi livelli. Possiamo però pensare di eliminare facilmente virus che danno infezione acuta come quello dell'influenza.

Tanto più i virus sono in grado di capacità metaboliche proprie, tanto più questi sono sensibili a farmaci antivirali, perchè dotati di enzimi propri (Herpesvirus e citomegalovirus sono dotati della propria DNA polimerasi, che è diventata bersaglio di farmaci antivirali). Altri virus che dipendono del tutto dal metabolismo cellulare, si prestano meno ad essere bersagliati da farmaci, o comunque di poter essere eliminati senza arrecare danno all'ospite.

FARMACI ANTIVIRALI ANALOGHI NUCLEOSIDICI

Gli analoghi nucleosidici sono delle molecole analoghe delle basi azotate ma che mancano dello zucchero contenuto nella base (ribosio o desossiribosio) (Esempio: aciclovir, primo farmaco antivirale, è costituito da un analogo della guanosina che presenta una catena laterale aciclica al posto del desossiribosio, utilizzato come anti-herpetico perchè agisce sulla DNA polimerasi di questa specie virale). Prendiamo per esempio l'aciclovir: questa struttura deve essere modificata nella cellula, e in particolare trifosforilata, per essere trasformata in guanosina trifosfato per essere inserita nella catena nucleotidica nascente; ciò avviene inizialmente ad opera di una timidina-chinasi virale, che fosforila l'aciclovir, che viene poi ulteriormente fosforilato da altre chinasi cellulari trasformandola in guanosina trifosfato, che viene inserita nella catena in allungamento: essendo l'aciclovir solo un analogo della guanosina la catena non può essere continuata perchè il nucleoside dopo non si può più attaccare. Avendone capito il funzionamento, possiamo elencare le proprietà dei farmaci analoghi nucleosidici:

- costituiscono la maggior parte dei farmaci antivirali;
- hanno come bersaglio le DNA polimerasi virali e le trascrittasi inverse;
- hanno una modificazione della base, dello zucchero ad essa associato, o di entrambe;
- devono essere fosforilate nella forma trifosfata da chinasi virali e/o cellulari
- le polimerasi virali sono inibite selettivamente perchè legano il nucleotide modificato con maggiore affinità rispetto agli enzimi cellulari;
- non passano il messaggio che essendo specifici per enzimi virali questi farmaci non sono tossici per l'uomo, perchè in realtà lo possono essere

Contro il citomegalovirus (CMV) si usa una molecola simile all'aciclovir, che è il ganciclovir, da cui differisce per la catena laterale aciclica; anche questo deve essere fosforilato da chinasi cellulari; viene utilizzato negli episodi acuti e come chemioprolifassi ed ha un intervallo terapeutico molto ristretto.

INIBITORI DELLA DNA POLIMERASI VIRALI NON NUCLEOTIDICI

Oltre agli analoghi nucleosidici ci sono molecole in grado di legare direttamente la DNA polimerasi virale e inibirla, di tipo non nucleosidico, come il foscarnet. In tutti questi casi i farmaci devono avere maggiore specificità per la polimerasi virale piuttosto che di quella cellulare: in qualsiasi caso ci può essere un effetto collaterale dovuto al fatto che, nonostante l'affinità per la polimerasi cellulare sia ridotta, il farmaco può legarsi ad essa lo stesso, generando danno cellulare.

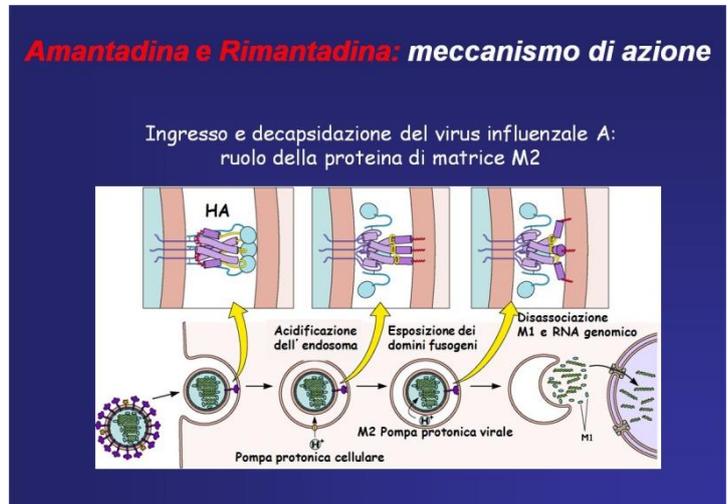
FARMACI ANTI-INFLUENZALI

I farmaci antiinfluenzali più utilizzati sono amantadina e rimantadina. Queste molecole sono amine tricicliche, che inibiscono la liberazione dell'RNA virale dopo la decapsidazione bloccando la proteina M2 della matrice virale. Quindi queste permettono di inibire le prime fasi di ingresso del virus nella cellula ospite, inibendo la liberazione dell'RNA virale nel citoplasma cellulare.

I virus influenzali, pur essendo virioni rivestiti, entrano nella cellula tramite la formazione di una vescicola endosomica in cui il virus è intrappolato.

La liberazione del genoma avviene grazie all'attività della pompa protonica virale M2, che permette l'acidificazione dell'interno dell'endosoma, che porta alla decapsidazione.

Amantidina e Rimantidina agiscono proprio sulla pompa M2, bloccando l'acidificazione e di conseguenza l'uncoating (se il genoma non viene liberato, la replicazione viene bloccata). Seguiranno meccanismi di eliminazione, quali la digestione nei lisosomi.



FARMACI ANTI-INFLUENZALI: INIBITORI DELLA NEUROAMINIDASI

Altri farmaci antiinfluenzali sono gli inibitori della neuroaminidasi, che:

- è una glicoproteina transmembrana tetramericata localizzata sul pericapside;
- taglia il legame alfa-chetosidico tra l'acido sialico (acido neuraminico) e la catena oligosaccaridica, avendo una funzione nel rilascio dei nuovi virioni;
- facilita la penetrazione del virus inglobato nelle mucine ricche di acido neuraminico;
- distrugge i recettori riconosciuti dall'HA.

Questi farmaci impediscono la fuoriuscita dei virioni che rimangono quindi intrappolati nella cellula, all'interno della quale danno luogo a grossi aggregati non infettivi. Farmaci antiinfluenzali appartenenti a questa categoria sono Zanamivir o Oseltamivir:

- sono analoghi dell'acido sialico;
- esplicano la loro azione antivirale inibendo rispettivamente la neuroaminidasi influenzale di tipo A e di tipo B
- hanno portato a sviluppo di resistenza da parte delle particelle virali, in seguito a mutazioni della neuroaminidasi virale

ALTRI FARMACI.

I virus contro i quali abbiamo più farmaci sono i retrovirus e i virus dell'epatite, e in particolare dell'epatite C. Questo è chiaramente dovuto a questioni di mercato, perché queste infezioni sono quelle più diffuse, il che spinge le aziende farmaceutiche allo sviluppo di più farmaci da mettere in

commercio.

FARMACI ANTIRETROVIRALI

Questi farmaci sono divisi in diverse categorie:

- analoghi nucleosidici inibitori della trascrittasi inversa (Combivir, Retrovir, Trizivir, Zerit, Ziagen, ecc...)
- inibitori della trascrittasi inversa non-nucleosidici (Rescriptor, Sustiva, Viramune)
- Inibitori delle proteasi (Agenerasi, Crixivan, Fortovase, Norvir, Viracept, Kaletra, ecc...)
- Hydrea (agente antitumorale, non approvato dall'FDA)

INIBITORI DELLE PROTEASI

Questi farmaci sono dei peptidomimetici e agiscono come inibitori competitivi dell'enzima; hanno come spettro sia il virus HIV-1 che HIV-2 e possono portare a formazioni di resistenze più frequenti nelle monoterapie (terapie con un farmaco solo).

Questa classe di farmaci utilizzata nella terapia contro l'infezione da HIV permette di agire su varie fasi del ciclo replicativo di questo agente. (metti immagine)

La prima fase su cui agisce questa classe di farmaci è quella di attacco. I recettori del virus dell'HIV sono in genere recettori per le chemochine che appartengono alla superfamiglia dei recettori a 7 eliche accoppiati alle G proteins.

Il recettore dell'HIV in genere è il CD4 (dove l'interazione CD4 gp120 fa esporre i siti di legame della gp120 per il corecettore), ma si è osservato che può essere anche il CXCR4 (corecettore per i ceppi T-tropici di HIV) o il CCR5 (corecettore per i ceppi macrofago-tropici di HIV), che sono stati usati come bersaglio farmacologico.

La 2° fase su cui vanno ad agire questi farmaci è quella della fusione e dell'entrata, su cui agiscono farmaci come gli inibitori della fusione (interagiscono con la forma intermedia di gp41).

La fase 3 è quella della trascrizione inversa, su cui agiscono sia gli analoghi nucleosidici che gli inibitori della trascrittasi inversa non nucleosidici, inibendo la trascrittasi inversa.

La fase 4 è l'integrazione del DNA nel genoma cellulare, tramite tramite l'azione dell'integrasi, anch'essa bersaglio farmacologico. La fase 5 è quella di maturazione degli mRNA, che è un'altra fase molto importante, come del resto la maturazione delle proteine virali che costituisce il 6° passaggio del ciclo replicativo del virus e reso possibile grazie ad una proteasi, sempre bersaglio farmacologico. Infine abbiamo la fase di assemblaggio del virione (fase 7) e la fase di uscita del virione dalla cellula ospite, e abbiamo visto che su quest'ultimo passaggio agiscono gli inibitori delle proteasi. Le terapie contro

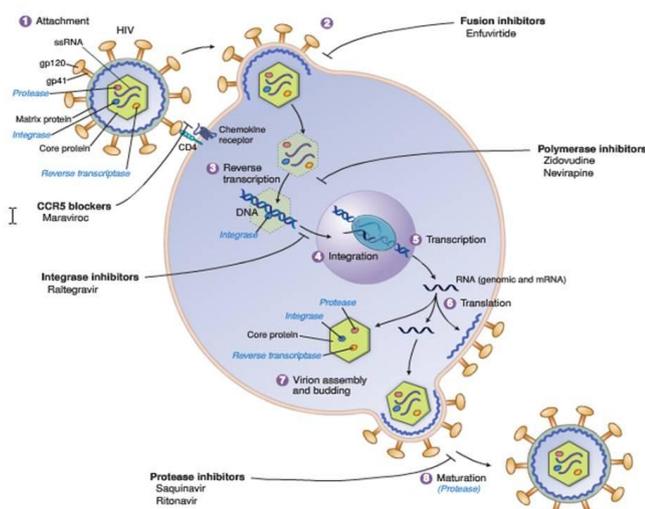


FIGURE 13.2. Stages of HIV infection blocked by different classes of antiviral drugs. The lifecycle of HIV is cartooned, showing the following: **1:** Virus attachment is dependent on binding interactions between viral gp120 (composed of gp41 and gp120 proteins) and host cell CD4 and certain chemokine receptors. **2:** Fusion of the viral membrane (envelope) with the host cell plasma membrane allows the human immunodeficiency [HIV] genome complexed with certain virion proteins to enter the host cell. **3:** Uncoating permits the single-stranded RNA (ssRNA) HIV genome to be copied by reverse transcriptase into double-stranded DNA. **4:** The HIV DNA is integrated into the host cell genome, in a reaction that depends on HIV-encoded integrase. **5:** Gene transcription and posttranscriptional processing by host cell enzymes produce genomic HIV RNA and viral messenger RNA (mRNA). **6:** The viral mRNA is translated into proteins on host cell ribosomes. **7:** The proteins and genomic RNA assemble into immature virions that bud from the host cell membrane. **8:** The virions undergo proteolytic cleavage, maturing into fully infective virions. The steps at which classes of anti-HIV drugs act (attachment, fusion, reverse transcription, integration, and maturation) are indicated, with examples from specific drug classes provided. (Modified from Yeh RW, Coen DM. Pharmacology of viral infections. In: Golan DE, Tashjian AH, Jr., Armstrong EJ, et al., eds. *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. Third edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012:649-673.)

L'HIV sono sempre costituite da cocktail di almeno 3 farmaci.

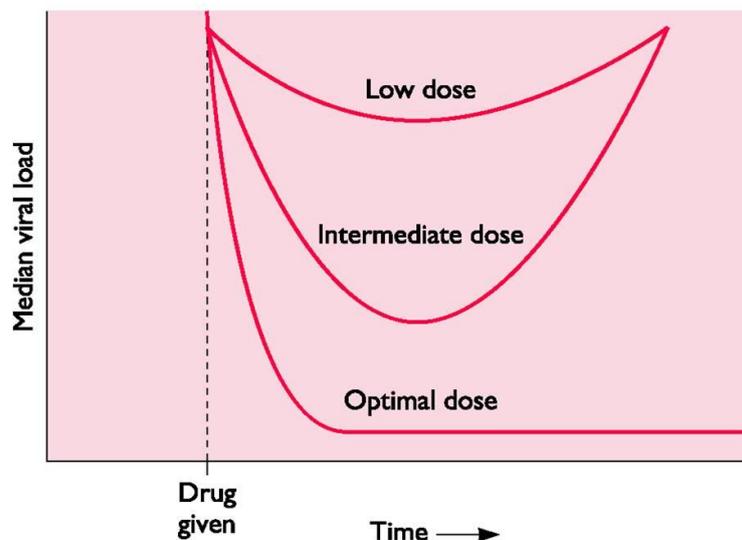
MONITORAGGIO DELL'EFFICACIA FARMACOLOGICA

Per valutare l'efficacia farmacologica si utilizzano 2 indicatori di malattia:

- il numero dei linfociti th CD4+, dove un valore normale sarà di 500 unità/microlitro, mentre un valore patologico sarà minore di 200 unità/microlitro;
- il numero di copie di RNA del virus dell'HIV presenti nell'ospite (50 copie/mL di plasma viene detto limite di detectabilità)

Chiaramente, in una terapia efficace il numero di linfociti th aumenta e il numero di copie di RNA del virus presenti in circolo diminuisce.

La terapia HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) è attualmente la terapia più utilizzata nei confronti dell'infezione da HIV e prevede l'utilizzo associato sia di inibitori della retrotrascrittasi e della proteasi. Permette di ottenere una maggiore potenza



antiretrovirale riducendo l'insorgenza di ceppi resistenti (ciò è dovuto al fatto dell'utilizzo di più farmaci insieme: infatti se la resistenza avviene una volta ogni 10^3 virioni e quella ad un altro farmaco avviene ogni 10^4 virioni, la probabilità che insorga un genoma che permetta al virione di resistere a tutti e 2 i farmaci è data dal prodotto delle 2 probabilità, cioè 10^7 virioni).

SISTEMA INTERFERON

L'interferon è una molecola naturale utilizzata come farmaco antivirale, perché è una citochina il nostro organismo produce in risposta a una serie di stimoli, tra cui l'infezione virale. Quindi l'interferon può essere somministrato per via esogena quando la quantità endogena prodotta è scarsa, aumentandone la potenza e favorendo l'eliminazione della particella virale. Non tutti i virus sono sensibili all'interferon e non esiste un solo tipo di interferon; tutti gli interferon hanno però delle caratteristiche in comune:

- sono proteine cellulari inducibili in primo luogo dalle infezioni virali ma anche da altri stimoli;
- non possiedono capacità antivirale diretta ma sono capaci di indurre, nelle cellule con cui vengono a contatto, uno stato di resistenza antivirale associato alla produzione di altre proteine, dette effettrici o interferon-inducibili;
- la loro azione non è specifica per il virus inducente;

- sono dotate di specificità di specie, essendo capaci di agire, in linea di massima, solo su cellule della stessa specie animale, o di specie tassonomicamente molto vicine a quella che ne ha indotto la produzione;
- la loro persistenza nei vari distretti dell'organismo è limitata ma lo stato antivirale e gli effetti biologici da esse indotto permangono per le 24-48 ore successive alla loro eliminazione

Gli interferoni appartengono alla classe II delle citochine e presentano prevalentemente 3 funzioni:

- azione antivirale;
- sono in grado di regolare la differenziazione e la crescita cellulare;
- sono in grado di regolare l'attività di alcune cellule del sistema immunitario quindi hanno anche azione immunomodulante;

Gli interferoni sono divisi in 3 famiglie:

- tipo 1, o interferon alfa o alfabetta, prodotto da quasi tutte le cellule del sistema immunitario;
- tipo 2, o interferon gamma, prodotto dalle cellule NK;
- tipo 3, o interferon lambda, chiamato anche IL-28/29.

Lo scopo del sistema interferon è quello di indurre lo stato antivirale, perché è in grado di rendere una cellula non infettata resistente all'infezione; interferon infatti non solo inibisce la replicazione del virus all'interno della cellula infettata, ma la sua azione principale è quella di preparare le cellule che stanno vicino alla cellula infettata a un possibile attacco di una particella virale: viene impedita l'ulteriore diffusione del virus.

Tipo	Sottotipo	Recettore	Localizzazione cromosomica	Numero di aminoacidi	Peso molecolare (kilodalton)	Distretto di espressione
I	IFN- α	IFNR-1/IFNR2	9p21	165-166	15-23	Espresso in maniera ubiquitaria
	IFN- β	IFNR-1/IFNR2	9p21	166	15-23	Espresso in maniera ubiquitaria
	IFN- ϵ	IFNR-1/IFNR2	9p21	208	24.4	Utero, ovaie
	IFN- κ	IFNR-1/IFNR2	9p21	180	24.5	Cheratinociti dell'epidermide
	IFN- ω	IFNR-1/IFNR2	9p21	172	20-23	Leucociti
II	IFN- γ	IFNGR-1/IFNGR2	12q24.1	146	34	Linfociti T, cellule NK
III	IFN- λ 1	IL-28R α /IL-10R β	19q13.13	200	20-33	Espresso in maniera ubiquitaria
	IFN- λ 2	IL-28R α /IL-10R β	19q13.13	200	22	Espresso in maniera ubiquitaria
	IFN- λ 3	IL-28R α /IL-10R2	19q13.13	196	22	Espresso in maniera ubiquitaria

Questa tabella ci fa osservare che ci sono degli interferoni ubiquitari (alfa, beta e il lambda) e di conseguenza verranno prodotti quasi sempre in occasione di un'infezione virale in un qualsiasi distretto anatomico; ci sono però degli interferoni che vengono prodotti da tipi cellulari specifici e che quindi verranno prodotti quando saranno infettati i tessuti in cui sono localizzati questi tipi cellulari. L'effetto delle diverse famiglie di interferon dipende però dalla presenza/assenza del loro

recettore su quel tessuto: gli effetti biologici di una classe di interferon saranno osservabili solo nei tessuti dove il recettore è espresso.

L'interferongamma è prodotto solo da linfociti T e cellule NK e ha bassa attività anti-virale, caratteristica che gli dà prevalentemente una funzione immunomodulante (sia per le cellule che lo producono che per la distribuzione del suo recettore)

L'interferon è parte integrante della risposta immunitaria innata o intrinseca, che sappiamo che è costituita da 3 componenti:

- barriere anatomiche;
- componenti cellulari;
- componente chimica e solubile. In questa componente è compreso il sistema interferon.

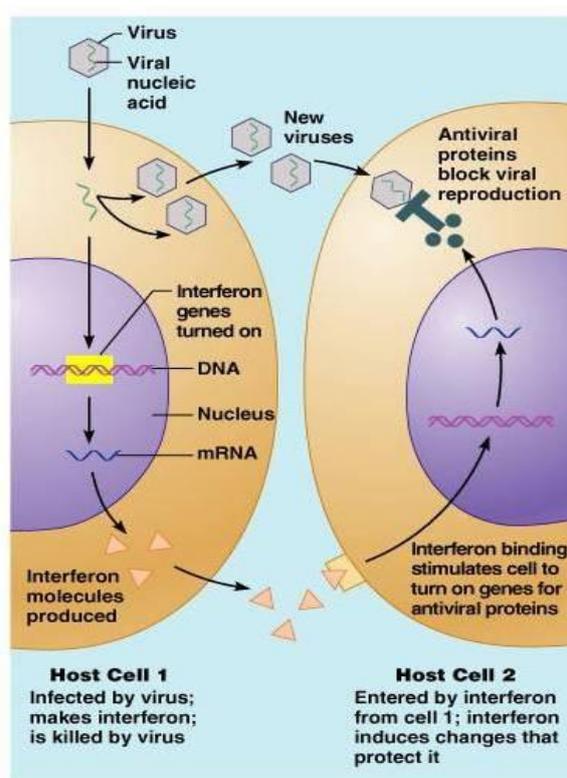
FUNZIONE DELL'INTERFERON

la funzione principale dell'interferon è principalmente quella di indurre lo stato antivirale, attraverso una serie di meccanismi:

- interferire con la replicazione virale nella cellula infettata;
- attivare le cellule del sistema immunitario, incrementandone l'abilità di combattere le infezioni;
- incrementare l'espressione di proteine MHC di classe I, in modo che le cellule infettate da virus possano essere più facilmente riconosciute dai linfociti T citotossici CD8+

La cellula infettata da un virus, ma anche solo l'interazione della particella virale con il suo recettore (annoverato tra i PRR), scatena la produzione di interferon. Una volta che i PRR sono attivati, questi innescano una via di trasduzione del segnale che giunge al nucleo, dove vengono attivati i geni che codificano per la produzione di molecole di interferon, aumentandone la produzione. L'interferon viene liberato all'esterno della cellula e a questo punto può avere funzione sia paracrina che autocrina: in qualsiasi caso deve poter interagire con un recettore localizzato sulla superficie cellulare per indurre lo stato antivirale. L'azione dell'interferon cambia molto a seconda del tipo cellulare.

La resistenza alle infezioni avviene a seguito dell'induzione dello stato anti-virale.



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

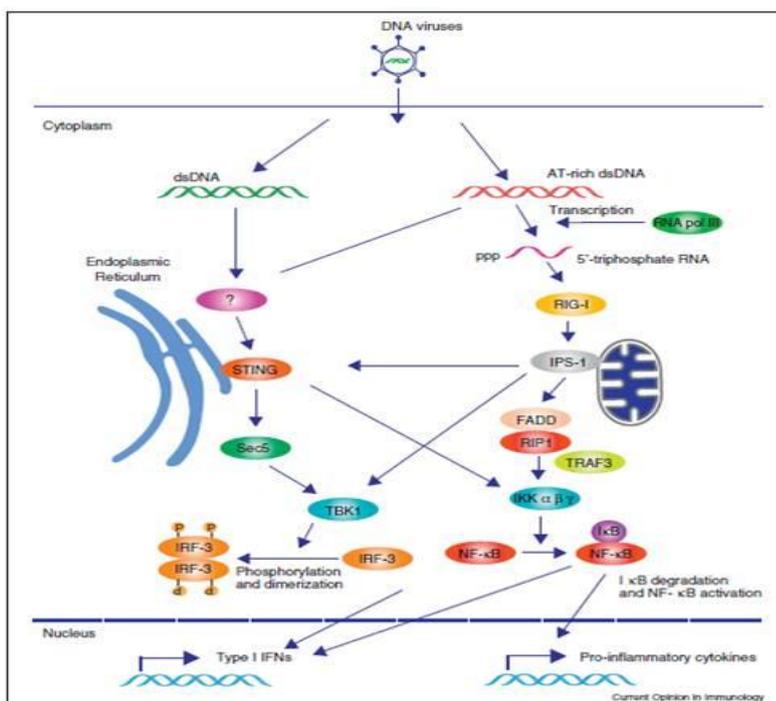
MECCANISMI DI INDUZIONE DELLA PRODUZIONE DI INTERFERON

L'interferon viene prodotto a seguito della stimolazione dei PRR (per alcuni patogeni sono stati

identificati gli specifici PRR che li riconoscono). La porzione della particella virale che persiste nella cellula in genere è il genoma, infatti i PRR in genere riconoscono gli acidi nucleici. Attivandosi i PRR fanno partire un signaling, che si dirige al nucleo dove viene stimolata l'espressione di fattori trascrizionali che essenzialmente sono:

- NF- κ B;
- IRF-3;
- AP-1 (seppur in misura minore degli altri);
- IRF-7;

Questi sono i fattori trascrizionali che sono presenti nel citoplasma in forma inattiva e devono essere attivati attraverso fosforilazione; a seguito della fosforilazione questi possono migrare nel nucleo dove legano le loro sequenze specifiche, presenti su più geni, tra cui quelli dell'interferon; la cellula infettata quindi produce interferon che, attraverso il legame con il suo recettore, potrà agire in maniera paracrina o autocrina, facendo partire l'induzione dello stato antivirale.



Esempio:

Il TLR9 è in grado di riconoscere il DNA virale, facendo partire un signaling che attiva alcune chinasi che vanno a fosforilare IRF-3, IRF-7 e NF- κ B, che vanno ad attivare i geni per l'interferon, ma anche altri altri geni pro-infiammatori come le linfochine. In questo modo, se da una parte proteggo le cellule circostanti dall'infezione virale, dall'altra danneggio i tessuti attivando una risposta di tipo infiammatorio. Quindi una terapia con interferon presenta un sacco di effetti collaterali, tra cui la febbre.

Esistono dei recettori citoplasmatici di DNA virale (RID o STING).

Qualunque sia il virus e qualunque sia il PRR che ha riconosciuto l'antigene si arriva spesso alle stesse conclusioni, quali produzione di interferon (via IRF-3, IRF-7 e NF- κ B) e attivazione dell'inflammosoma. L'inflammosoma consta dell'attivazione della caspasi 1, che agisce su IL-1 attivandola. IL-1 porta poi a risposta infiammatoria.

Di ogni classe di interferon ne viene indotta la produzione grazie all'attivazione di un recettore PRR specifico. Il recettore dell'interferon è un recettore simile a quello delle linfochine, che attiva una

via di segnalazione che porta all'attivazione di diversi fattori di trascrizione, che sono:

- ISGF-3 per la via di segnalazione attivata dagli interferon di classe 1
- GAF, o omodimero STAT1 per la via di segnalazione attivata da interferon-gamma.

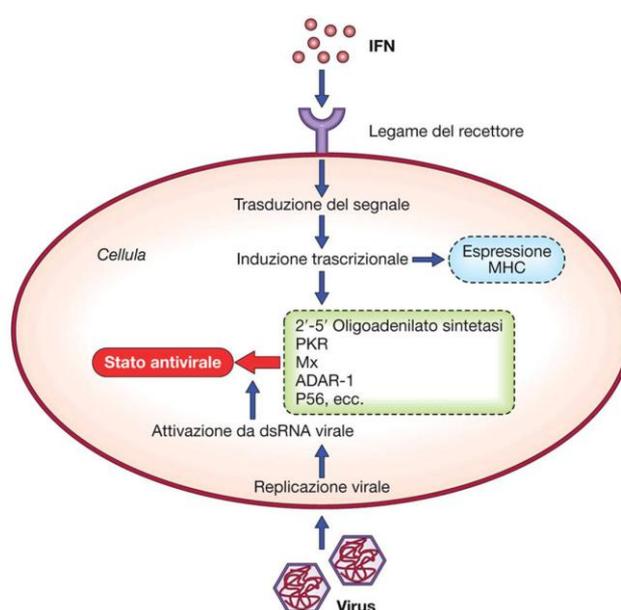
Questi legano sequenze diverse e in particolare ISGF-3 lega la sequenza ISRE, mentre GAF lega la sequenza GAS.

Le molecole STAT sono molecole proteiche presenti nel citoplasma delle cellule in forma inattiva, che vengono attivate per fosforilazione; una volta fosforilate queste danno origine a dimeri o eterotrimeri, che passano nel nucleo e attivano la trascrizione. Nonostante la specificità di legame delle molecole STAT l'azione espressa è molto generale, perchè i geni controllati dagli enhancers delle sequenze ISGF-3 e GAF sono moltissimi.

Quando stimolo la molecola con l'interferono genero una grandissima variazione dell'attivazione dell'attività trascrizionale: alcuni geni saranno upregolati mentre altri saranno downregolati, dove quelli che danno l'induzione dello stato antivirale codificano per la produzione delle seguenti molecole:

- un enzima detto 1',5'-oligoadenilato sintetasi;
- PKR;
- MX;

Questi sono gli enzimi che mediano lo stato antivirale. La 1'-5' oligoadenilato sintetasi è un enzima che viene upregolato dall'interferone, che per funzionare necessita la presenza di RNA a doppio filamento, cioè RNA virale. Questo enzima produce quindi oligoadenilati che attivano a loro volta un altro enzima, che è l'RNasi L, che degrada gli mRNA messaggeri virali, bloccando la sintesi proteica dei virus. Abbiamo poi le proteine della famiglia MX, che sono proteine con la capacità di bloccare la polimerasi virale. Infine PKR è una chinasi, in grado di fosforilare tutta una serie di substrati tra cui Initiation Factor-2 (IF-2), bloccando la sintesi proteica, sia virale che cellulare: quindi oltre ad avere un effetto antivirale avrà anche un effetto citotossico che può diventare importante.



RESISTENZA ALL'INTERFERON

Con il tempo i virus hanno assunto mutazioni che gli hanno permesso di resistere alle difese cellulari, attraverso lo sviluppo di antagonisti virali dell'interferone (Viral Interferon Antagonist VIA). Questi

antagonisti sono in grado di colpire la via di signaling dell'interferon in uno dei punti di trasduzione del segnale, come sull'attivazione della produzione dell'interferon (sequestrando NF-kB, IRF-3, ecc...) o sull'azione dell'interferon.

Uno di questi antagonismi fa sì che il virus segua una "strada" replicativa, che non venga riconosciuta dal PRR.

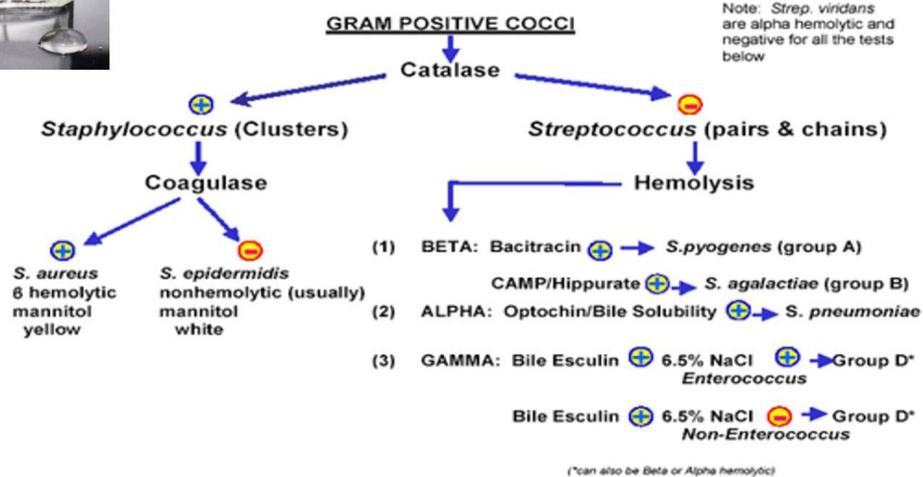
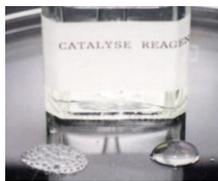
MECCANISMI DI EVASIONE DAL SISTEMA IFN	VIRUS
Arresto della sintesi di IFN	Influenza di tipo A e B; Ebola virus; herpes simplex virus; adenovirus; virus dell'epatite C; SARS-coronavirus; reovirus; papillomavirus di tipo 16; herpesvirus 8; poxvirus
Arresto della trasmissione del segnale dei <i>toll like receptors</i>	Virus dell'epatite C, poxvirus
Blocco del segnale delle proteine RIG-1 e MDA-5	Virus dell'epatite C, paramixovirus
Sintesi di analoghi del recettore dell'IFN	Poxvirus
Blocco del segnale di trasduzione indotto dall'IFN	Adenovirus, Ebola virus, Epstein-Barr virus; virus dell'epatite C; citomegalovirus; parainfluenza di tipo 1 e 2; papillomavirus di tipo 16; influenza di tipo A e B, virus Dengue
Blocco dell'attività delle proteine IFN-indotte:	
PKR	Virus dell'epatite C; virus dell'influenza di tipo A; reovirus; rotavirus; herpes simplex virus; herpesvirus 8; HIV; adenovirus; Epstein-Barr virus; poliovirus; virus vaccinico; papillomavirus
2'-5'oligoadenilato sintetasi/RNasi L	Reovirus; rotavirus; HIV; herpes simplex virus; virus vaccinico; virus dell'influenza di tipo A
Mx	Virus dell'epatite B

Batteriologia speciale (borgogna)

STREPTOCOCCI

Gli streptococchi hanno le seguenti caratteristiche generali:

- sono cocchi delle dimensioni di 1-1,5 micron;
- sono Gram+ con disposizione a catenelle;
- possono essere sia aerobi che anaerobi facoltativi;
- sono immobili e asporigeni;
- possono essere sia con che senza capsula (anche se la maggior parte sono capsulati);
- Si distinguono dagli stafilococchi per la loro negatività al test della catalasi;



I cocci sono normalmente presenti sulla cute dell'uomo, ma soprattutto nel cavo orale e nella faringe; li troviamo poi anche in vagina e intestino.

Gli streptococchi si distinguono in base alle loro caratteristiche di coltura. Sono in genere coltivati su terreno agar sangue e possono essere distinti in base alla composizione antigenica di membrana (in base a quest'ultimo parametro la classificazione viene detta di Lancefield).

In base all'attività emolitica, che viene testata su terreno agar sangue gli streptococchi si dividono in 3 gruppi:

- quelli che danno alfa emolisi, che creeranno un alone verdastro intorno, perchè non hanno gli enzimi per distruggere completamente l'emoglobina;
- quelli che danno beta -emolisi, cioè lisi totale degli eritrociti, formano un alone trasparente, in quanto hanno degli enzimi in grado di degradare completamente l'emoglobina;
- quelli che danno gamma-emolisi, dovuta all'assenza degli enzimi necessari, non formano nessun alone intorno alla colonia.

Nella classificazione di Lancefield si usa come discriminante la presenza del polisaccaride C sulla parete dei batteri. Questa classificazione suddivide i batteri in base alle caratteristiche di questo polisaccaride in classi che vanno da A alla G.

Classificazione di streptococchi comuni patogeni		
CLASSIFICAZIONE BIOCHIMICA	CLASSIFICAZIONE SIEROLOGICA	CARATTERISTICHE EMOLITICHE
<i>S. pyogenes</i>	A	Beta
Gruppo <i>S. anginosus</i>	A, C, F, G non raggruppabili	Beta, occasionalmente alfa o non emolitico
<i>S. agalactiae</i>	B	Beta, occasionalmente non emolitico
<i>A. dysgalactiae</i>	C, G	Beta
<i>S. bovis</i>	D	Alfa, non emolitico; occasionalmente beta
Gruppo dei viridanti	Non riportabile ad un gruppo	Alfa o non emolitico
<i>S. pneumoniae</i>	Non riportabile ad un gruppo	Alfa

Come la maggior parte dei cocci gli streptococchi sono capsulati e producono una serie di esoenzimi ed esotossine. A seconda dello stipite avremo degli enzimi e delle tossine diverse. Le specie più patogene per l'uomo sono Streptococcus Piogenes, S. Pneumonie e S. Agalactie.

STREPTOCOCCUS PIOGENES

Questo streptococcus è classificato come un beta emolitico di gruppo A secondo la classificazione di Lancefield e può dare diverse manifestazioni:

- infezioni a livello respiratorio (infezioni primarie, dovute alla presenza del batterio in sito). Lo si trova infatti spesso nel nasofaringe delle persone normali che possono esserne portatori. La manifestazione patologica più frequente è quella dell'angina streptococcica,

- che non è altro che una faringo-tonsillite;
- infezioni cutanee e sottocutanee (infezioni primarie), come la fascite necrotizzante ma anche la piodermite (infezione eritemato-vescicolare della cute, che diviene pustolosa e successivamente crostosa), l'erisipela (infezione infiammatoria della cute che si estende al derma, generalmente localizzata alla faccia e al capo), infezioni di ferite e la scarlattina (eruzione esantematica provocata dall'azione dell'esotossina pirogenica, che viene elaborata da alcuni ceppi di questo batterio. L'agente eziologico si impianta nel faringe dove determina faringo-tonsillite acuta e dove elabora la tossina che passa in circolo;
 - sequele post-streptococciche, cioè manifestazioni di tipo immunitario, dovute al fatto che le immunoglobuline prodotte dal sistema immunitario contro questo antigene formano degli immunocomplessi che bloccano i reni o dare origine ad autoanticorpi che riconoscono il self. A questa categoria di patologia appartengono la febbre reumatica, che porta alterazioni a livello delle valvole cardiache, perchè durante le infezioni vengono prodotti degli anticorpi che reagiscono anche con tessuti normali, quali quello delle valvole cardiache (che sono di un tessuto antigene-simile), instaurandosi una risposta autoimmune; un'altra manifestazione è quella della glomerulonefrite acuta, che non è altro che una infiammazione a livello dei glomeruli renal perchè si formano dei complessi antigene anticorpo, che si fermano a livello dei filtri, che richiamano macrofagi e altre cellule immunitarie, instaurando un'infiammazione a questo livello;
 - infezioni post-parto.

S. Piogenes è capsulato (caratteristica che ha azione anti-fagocitaria) e da questa struttura si dipartono delle fibrille composte dalla proteina M, che è altamente immunogena e contro la quale il nostro sistema immunitario dirige la risposta immunitaria. Di proteine M ne esistono 60 tipi differenti, ed essendo questa la sua molecola antigenica per ora non è possibile avere un vaccino, perchè sono troppe le varianti contro le quali si dovrebbe sensibilizzare la popolazione. La proteina M è un importante fattore di virulenza, perchè funge da adesina (favorendo l'adesione alle cellule e ai tessuti da infettare) ma può anche funzionare da super antigene, stimolando in maniera smisurata la risposta immunitaria.

Un'altra importante adesina è la proteina F che è anch'essa presente sulla superficie del batterio.

FATTORI DI VIRULENZA

Gli streptococchi producono degli esoenzimi come:

- streptochinasi, che distrugge il fibrinogeno;
- la ialuronidasi che distrugge l'acido ialuronico, che essendo il principale componente dei tessuti connettivi, fa sì che il batterio si possa creare una nicchia in cui riprodursi all'interno del tessuto;
- la neuroaminidasi, che depolimerizza le secrezioni mucose, permettendo al batterio di raggiungere le cellule epiteliali;
- NADasi, che danneggia i fagociti che hanno fagocitato il batterio;
- la C5a proteasi, che cliva il fattore C5 attivato del complemento, eliminando l'attività chemiotattica.

Le esotossine prodotte dagli streptococchi sono:

- streptolisina O, che è una citolisina, cioè uccide le cellule producendo dei pori nelle cellule infettate, ma è inattivata all'esposizione all'ossigeno. Questa tossina è importante dal punto di vista diagnostico perchè è antigenica, quindi il nostro sistema immunitario produce anticorpi contro questa tossina, che possono essere dosati per valutare l'andamento della malattia;
- Streptolisina S, che non è immunogenica ed è stabile all'esposizione all'ossigeno; è responsabile del 95% dei casi dell'attività emolitica degli streptococchi evidenziabile su agar sangue. Anch'essa sembra essere una citolisina e che agisca a seguito dell'azione della streptolisina O, ma la sua funzione non è ad ora ben nota;
- esotossine pirogeniche, che causano febbre e sono citotossiche. Sono dette Spe (exotossin pyrogenic streptococcus) e si dividono in A, B, C ed F e di solito agiscono come superantigeni; esotossina F permette il rilascio di grosse quantità di citochine che mediano diversi effetti biologici, tra cui lo shock tossico, l'insufficienza d'organo e il collasso; le esotossine A (e alcune volte le C) sono responsabili dell'eritema della scarlattina e agiscono solo a livello cutaneo; le esotossine B sono cisteino proteasi in grado di attaccare varie proteine dell'ospite ma soprattutto attiva la risposta immunitaria attivando la IL-1B (è responsabile di gravi patologie quali la fascite necrotizzante). Quando dei batteri in grado di produrre questa esotossina B, raggiungono lo strato sottocutaneo e le fasce muscolari creano un biofilm che distrugge il tessuto e danno una sintomatologia simile a quella della gangrena (per questo questi batteri sono detti "batteri carnivori).

Attualmente la terapia contro lo streptococcus pneumonie si basa sulla penicillina, per la quale non sembra si siano sviluppate particolari resistenze; solo in caso di allergie a questo antibiotico viene somministrata eritromicina. Le tetracicline non vengono più utilizzate per la terapia contro questo batterio perchè si è osservata la formazione di più specie resistenti. Attualmente non è disponibile perchè la molecola antigenica (la proteina M) è troppo polimorfica e quindi determina un'enorme variazione della superficie antigenica.

STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

Secondo la classificazione di Lancefield appartiene agli streptococchi di gruppo B e può essere classificato sia come gamma che beta emolitico. Questo agente è stato scoperto perchè è l'agente eziologico delle mastiti nei bovini mentre nell'uomo può normalmente essere un commensale (e lo si trova in intestino, tratto urogenitale femminile, uretra maschile), ma può dare patologie nel parto. Esso si trasmette generalmente per contatto sessuale. Di questo batterio ne esistono 5 sierotipi diversi di cui il 3 è il sierotipo più patogeno.

S. Agalactie è il responsabile della meningite neonatale, di cui ne esistono 2 forme:

- forma precoce, che si manifesta a 48h dal parto, con sindrome polmonare acuta, sepsi generalizzata e meningite acuta che porta a una mortalità del 50%;
- forma tardiva, che si manifesta entro 2 mesi dal parto, con manifestazione di meningite purulenta, che ha una mortalità del 20/30% ma può causare gravi conseguenze neurologiche.

Per *S. Agalactiae* per ora non esiste un vaccino, ma il suo sviluppo non è di particolare rilevanza perchè si preferisce effettuare uno screen delle gestanti per osservare la loro positività a questo agente; in caso di screen positivo si interviene direttamente sulla gestante. Circa un terzo delle gestanti risulta positiva allo screen per lo streptococcus agalactie.

STREPTOCOCCUS PNEUMONIE

Questo agente si dispone in genere in diplococchi o in catenelle molto corte; è normalmente presente nelle vie aeree superiori dei soggetti sani; la trasmissione di questo agente è interumana. *S. Pneumonie* è l'agente eziologico della polmonite e può dare luogo a tale patologie quando riesce a passare nelle basse vie aeree, che può avvenire in soggetti immunodepressi, in soggetti con altre infezioni in corso o quando viene aspirato: nei pazienti con polmonite si possono avere numerose complicanze quando il batterio passa in circolo (raggiungendo endocardio, pericardio, sepsi generalizzata...). *S. Pneumonie* può dare luogo anche a meningite perchè può passare dal rinofaringe ai seni dell'orecchio medio e raggiungere le meningi.

I suoi fattori di virulenza sono:

- tossina emolitica o pneumolisina, che è la tossina tipica di questo agente, che è in grado di dare dei pori a livello delle membrane cellulari, che rilasciano il loro contenuto all'interno del polmone, causando tosse liquida e conferendo la possibilità al batterio di passare da un alveolo all'altro; impedisce anche l'attivazione del complemento. Questa tossina è sensibile all'esposizione all'ossigeno e dà alfa-emolisi in aerobiosi.
- neuraminidasi, che distrugge le secrezioni mucose, permettendo al batterio di raggiungere le cellule epiteliali; questo avviene grazie alla capacità di questo enzima di attaccare le glicoproteine e i glicolipidi di membrana;
- ialuronidasi;
- proteina C non classificabile secondo Lancefield, non permettendo così di classificare in questa classificazione questo batterio.

La terapia in genere si basa sulla penicillina e per quanto riguarda il vaccino esso è disponibile, ma non copre tutti i 90 sierotipi di *S. Pneumonie*.

STREPTOCOCCI ORALI

Sono batteri che fanno parte della flora microbica normale del cavo orale, e che sono responsabili delle formazioni di placche e carie, attraverso la formazione di peptidi che si attaccano alle superfici lisce. Tra questi batteri abbiamo *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*. *S. mutans* in particolare è in grado di dare luogo a un polisaccaride derivato dal saccarosio, che promuove la genesi della carie dentale. Se *S. mutans* entra in circolo dà setticemia e endocardite sub-acute.

ENTEROCOCCHI

Sono streptococchi di rilevante importanza, che risiedono normalmente nel tratto enterico, quali *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*; sono in genere commensali e solo in alcuni casi possono dare origine a infezioni del tratto urinario. *S. suis*, normalmente facente parte della flora microbica degli animali, sembra essere responsabile di una zoonosi che ha un'incidenza particolare nei soggetti che lavorano con i suini. I soggetti si possono infettare tramite un taglio o una ferita, dando origine a un'infezione localizzata; se il batterio passa in circolo però l'infezione diventa sistemica causando meningiti.

GENERE NEISSERIE

CARATTERISTICHE GENERALI

Il genere Neisserie comprende molte specie al suo interno, ma noi andiamo a considerare solo le specie patogene, che sono N.Meningitidis e N.Gonorrhoeae; le altre specie (N. sicca, N.subflava, N. flavescens, N. mucosa) sono solo scarsamente patogene e possono dare infezioni solo in caso di organismi immunocompromessi.

Siccome queste 2 specie patogene sono presenti a livello del cavo orale, ma non fanno parte della flora normale, la diagnosi differenziale è molto importante perchè significa che esistono specie non patogene e per differenziarle è necessaria la tipizzazione biochimica, cioè prendere i batteri e metterli a contatto con una serie di substrati, con degli indicatori della reazione biochimica e che permetteranno di evidenziare la positività o la negatività a questa reazione biochimica (ovvero se questi batteri sono in grado di fare questa reazione o no). La tipizzazione biochimica quindi mi permette di distinguere, in una coltivazione, le varie colonie delle varie specie del genere Neisserie. Le caratteristiche generali delle Neisserie sono:

- Gram negatività;
- disposizione a diplococco (detta anche "a chicco di caffè");
- metabolismo aerobio;
- non sono mobili;
- spesso sono capsulati (come il meningococco);
- sono asporigeni;
- sono positivi sia per il test all'ossidasi che alla catalasi;
- producono acidi per ossidazione di carboidrati e non per la via fermentativa (caratteristica essenziale per differenziazione biochimica);
- La coltivazione di questi si fa su agar cioccolato con 5-10% di CO₂ e a 35-37° C, su cui crescono sia le specie patogene che quelle scarsamente patogene, quindi per distinguerle dovrò fare la diagnosi differenziale.

N. meningitidis è unicamente responsabile dell'infezione della meningite, mentre N. gonorrhoeae infetta principalmente le vie genitali dell'uomo (a livello dell'uretra) dove produce un'infiammazione che viene chiamata "uretrite gonococcica" (ma anche gonococco o gonorrea). Se non curata quest'ultima può diventare sistemica e andare a infettare molti altri distretti.

NEISSERIE MENINGITIDIS

CARATTERISTICHE GENERALI

Questo batterio è largamente presente nella popolazione in individui portatori sani (dove i focolai batterici sono localizzati nell'orofaringe e nelle vie aeree superiori in modo asintomatico), ma produce sintomi solo quando infetta l'SNC, infatti la meningite si verifica in un numero ristretto di pazienti. Il portatore sano potrà trasmettere il batterio per aerosolizzazione, ma l'individuo portatore potrà sviluppare lui stesso la malattia per passaggio nel sangue del batterio e raggiungimento delle zone di infezione tipiche.

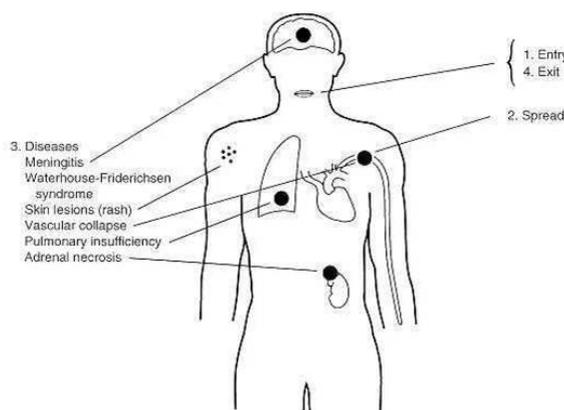
La meningite da Neisseria è spesso un evento di comunità perchè viene trasmesso a più persone per via della sua facile capacità di trasmissione e per via del fatto che a trasmetterla non è solo l'individuo malato (che contiene solo una maggior carica microbica) ma anche il portatore sano,

dove i focolai batterici sono nel cavo orale e quindi possono essere facilmente aerosolizzati; per questo motivo in comunità in cui si sviluppa questo batterio si devono mettere in quarantena i soggetti che sono diagnosticati come portatori sani, che dovranno essere curati.

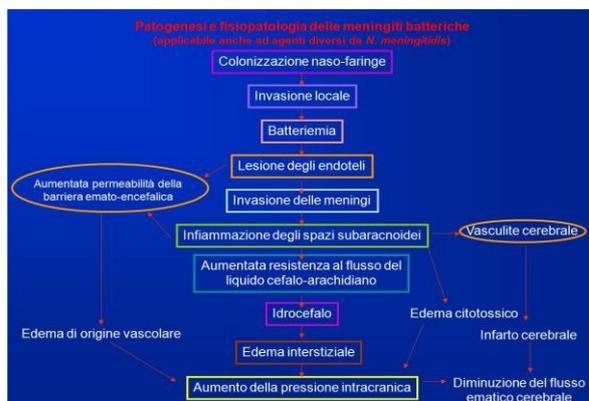
La *Neisserie meningitidis* causa un'infiammazione purulenta delle meningi, con rigidità nucale, cefalea, febbre, irritabilità, disturbi mentali, nausea e vomito fino a situazioni estreme in cui si sviluppano complicanze come sindrome di Waterhouse-Friedrichsen; ciò è dovuto alla presenza dei suoi antigeni di superficie che sono l'LPS e altri 10 gruppi di polisaccaridi nella sua capsula polisaccaridica.

INGRESSO E DIFFUSIONE NELL'ORGANISMO

La *N. Meningitidis*, una volta entrata nell'organismo tramite il cavo orale, si diffonde attraverso il sistema circolatorio e giunge nei distretti dove può andare a causare patologia quali liquido cefalorachidiano e meningi oppure dare luogo a rash cutaneo, collasso vascolare, e insufficienza polmonare per poi fuori uscire sempre dal cavo orale. Questo batterio, una volta entrato nel cavo orale, deve passare nel sangue in una certa quantità per poter infettare poi le



strutture a livello del SNC, ovvero si deve raggiungere una certa batteriemia. Una volta passato nel sangue, *N. meningitidis* dovrà sviluppare la capsula per non essere eliminato dal sistema immunitario; inoltre per dar luogo all'infezione il batterio dovrà passare attraverso la barriera emato-encefalica, dopodiché il processo infettivo sarà compiuto.



VIRULENZA E FATTORI DI VIRULENZA

N. meningitidis non è patogena per la produzione di tossine, ma per via della presenza di LPS in membrana. Tra i fattori di virulenza di questo batterio osserviamo:

- *N. meningitidis* causa un'infezione acuta con progressione veloce, caratteristica che porta rapidamente a morte il soggetto infettato, perché i distretti colpiti dal batterio sono in genere sterili (liquor, meningi...) ed è difficile andare ad intervenire in maniera tempestiva, perché alla comparsa dei sintomi l'infezione è già conclamata;
- la capsula di cui è dotato *N. meningitidis* lo protegge dalla fagocitosi;
- i recettori specifici per i pili meningococcici facilitano il loro insediamento nel nasofaringe;
- possono sopravvivere al killing intracellulare in assenza di immunità umorale
- la fase sistemica di questo batterio è associata anche a una condizione di freno dell'attività

à renale.

DIAGNOSI

La diagnosi di questo batterio deve essere distinta tra identificazione dei portatori sani o identificazione delle cause della meningite; la meningite infettiva può essere infatti data da diversi agenti infettanti (altri batteri, virus, ecc.). Per fare una diagnosi non ci si può basare solo sullo studio dei sintomi, ma bisogna ricorrere ad un'analisi del liquor o del sangue (anche se la ricerca di batteri nel sangue è molto più difficile rispetto che la ricerca nel liquor, perchè il sangue ha un volume più ampio e i batteri saranno più diluiti). La ricerca di batteri nel sangue va comunque condotta in parallelo all'analisi del liquor, in quanto quest'ultimo rappresenta il gold standard.

Essendo la diagnosi di meningite una diagnosi che deve essere effettuata in tempi molto rapidi, in genere non si effettua una coltura batterica con il campione prelevato, ma si passa all'analisi chimico-fisica dei campioni prelevati. Questi sono i tipi di analisi a scopo diagnostico che possono essere effettuati:

- colorazione di gram del liquido cerebro spinale: è una metodica sensibile e specifica, ma di limitato valore per campioni di sangue;
- IF sul sedimento di sangue;
- isolamento colturale: viene effettuato con coltivazione su agar cioccolato. Le colonie risultanti saranno ossidasi positive;
- identificazione biochimica e sierologica;
- test per identificare antigeni meningococchi.

Nel nasofaringe e nell'orofaringe dei portatori sani, la *N. meningitidis* può stare per molto tempo senza causare danno, finchè il sistema immunitario non lo elimina. Per arrivare a livello dell'SNC è necessario passare dal sangue, e quindi *N. meningitidis* dovrà sviluppare la capsula per non essere eliminata dai sistemi di fagocitosi.

EPIDEMIOLOGIA

N. meningitidis dà luogo a patologie esclusivamente umane, e si mantiene nella popolazione grazie alla possibilità di dare luogo a soggetti portatori sani (ed è questo il motivo per cui non la si riesce a debellare, perchè questo soggetto può non essere identificato). Si sta cercando di sviluppare una strategia vaccinale.

La diffusione da persona a persona si verifica per aerosolizzazione di secrezioni delle vie respiratorie e la più alta incidenza della malattia è in bambini di età inferiore ai 5 anni, persone che vivono in istituti e pazienti con deficit delle ultime componenti del complemento.

Il sierogruppo A di questo batterio è il più associato ai paesi in via di sviluppo, ma comunque l'infezione da *N. meningitidis* è una malattia a diffusione mondiale, più comune nei mesi dell'anno in cui fa freddo secco.

NEISSERIE GONORRHOEAE

CARATTERISTICHE GENERALI

Questo batterio può essere localizzato sia a livello genitale che a livello orofaringeo; esso è però sintomatico principalmente a livello genitale ma esiste anche l'orofaringite da *N. gonorrhoeae*.

Questo batterio è in grado di causare danno nell'organismo grazie ad una serie di antigeni di superficie quali:

- antigene capsulare polisaccaridico K;
- pili con grande variabilità antigenica;
- porine.

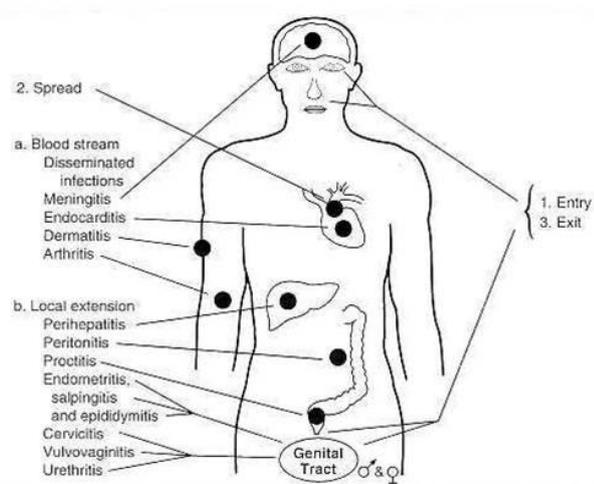
Anche per questo batterio esiste una condizione transitoria per la quale non dà patologia ma è presente nell'organismo: avremo quindi una presenza di portatori sani che però vigono in questo stato in tempi più brevi, cioè il passaggio dallo status di "infetto" a quello di "malato" è molto breve (inoltre, non esistono portatori sani per *N.gonorrhoeae* a livello orofaringeo).

N.gonorrhoeae è particolarmente presente nell'uomo, in cui da uretriti caratterizzate da produzione di pus; ciò è dovuto al fatto che una volta avvenuto il contatto, il batterio si localizza nell'epitelio stratificato colonnare dell'uretra, causando un processo infiammatorio con secrezione purulenta.

Nelle donne l'infezione da *N.gonorrhoeae*, essendo paucisintomatica, cronicizza facilmente (inoltre essendo i sintomi molto lievi, la donna assume gli stessi rischi di diffusione dell'infezione del portatore sano); nonostante tutto anche nella donna si possono avere infezioni sintomatiche (quali vulvovaginiti, cerviciti, salpingite e epidermite, endometrite, PERITONITE, periepatite).

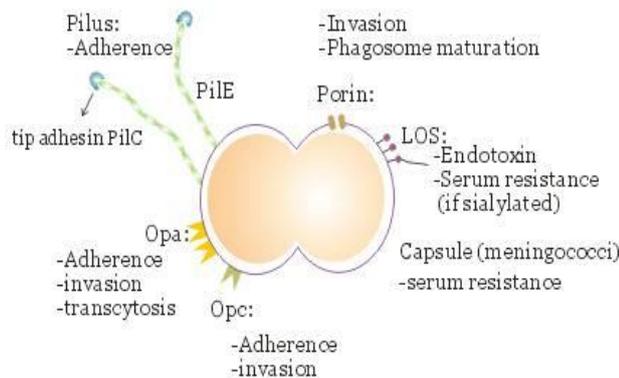
INGRESSO E DIFFUSIONE NELL'ORGANISMO

La *N.gonorrhoeae* quindi entra tramite i genitali, il cavo orale e gli occhi e, una volta nell'organismo questa viene diffusa per via ematica. Una volta all'interno dell'organismo questo batterio può andare ad infettare diverse sedi, che oltre alla già citata uretra comprendono l'SNC (provocando meningiti), l'endocardio (determinando endocarditi), articolazioni, ecc...

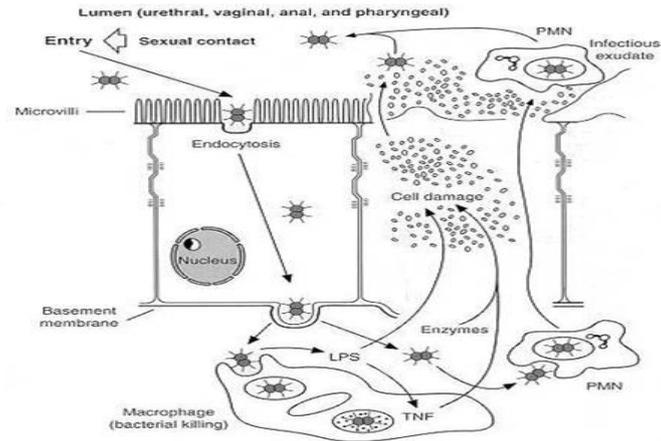


VIRULENZA E MECCANISMI PATOGENETICI

N.gonorrhoeae è dotata di alta capacità invasiva e agisce tramite la presenza di recettori, pili e proteine che gli conferiscono la capacità di aderire e attraversare le cellule; inoltre presenta sulla sua membrana l'LPS, che gli conferisce attività tossica. Tutti questi accessori fanno sì che una volta avvenuto il contatto, il batterio passa attraverso le cellule e passa nella sottomucosa, dove



sono localizzati molti degli attori della risposta infiammatoria; la presenza del batterio attiva le cellule del sistema immunitario, che accendono una risposta infiammatoria, che determina lo sfaldamento dell'epitelio dell'uretra, portando alla formazione di pus.



EPIDEMIOLOGIA

L'unico ospite naturale di *N.gonorrhoeae* è l'uomo e questo batterio è mantenuto in popolazione prevalentemente dalle donne, perchè il batterio da un'infezione paucisintomatica nella donna. Si trasmette per via ematica-linfatica (per contatto sessuale ed è infatti una malattia più comune nelle persone di età compresa tra i 15 e i 24 anni, cioè quella fascia di età sessualmente molto attiva. Il rischio di contrarre l'infezione è molto più elevato in pazienti con deficit delle ultime componenti del complemento.

DIAGNOSI

La diagnosi è molto semplice, soprattutto se siamo a livello uretrale maschile perchè basta eseguire l'analisi di un tampone uretrale su coltura con terreno agar cioccolato. In generale però possiamo effettuare diagnosi tramite 2 tipi di analisi:

- colorazione a fresco dell'essudato uretrale con blu di metilene;
- isolamento colturale sensibile e specifico

PSEUDOMONAS

CARATTERISTICHE GENERALI

Questo genere di batteri *Pseudomonas* è piuttosto ubiquitario nell'organismo umano, quindi circolano nella popolazione liberamente e possono fare parte della flora microbica normale anche nei soggetti immunocompetenti. Siccome uno dei fattori che andiamo a valutare di una popolazione batterica è la loro capacità di resistere, osserviamo che i batteri di questo hanno una resistenza molto accentuata a temperature molto varie (4-42°C), a vari agenti chimici, e anche agli antibiotici. Il genere *Pseudomonas*, essendo un genere ubiquitario, è responsabile di una grande varietà di infezioni opportunistiche (prevalentemente in pazienti immunodepressi o in condizioni di stasi); Data la loro resistenza, questi batteri possono crescere all'incirca in tutti gli ambienti (acqua, suolo, ecc...) ma in questi ultimi anni questi batteri si sono sviluppati molto in ambiente ospedaliero. Tra le specie che andremo a vedere in questo genere abbiamo:

- *P.aeruginosa* (il più importante);
- *P.mallei*;
- *P.pseudomallei*.

STRUTTURA

Questi batteri sono:

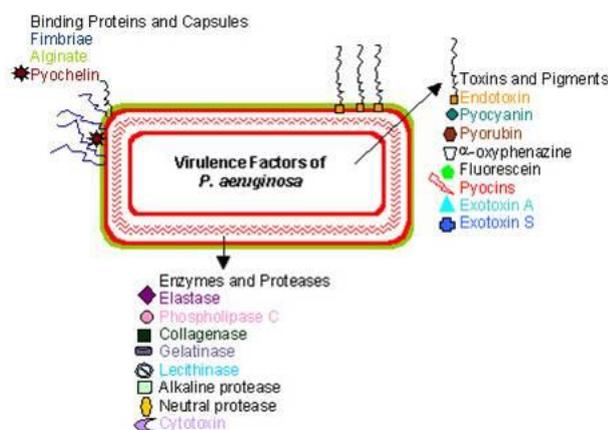
- piccoli e dalla forma bastoncellare;
- gram negativi;
- mobili, grazie alla presenza di un flagello polare;
- aerobi non fermentanti, ma possono crescere anche in anaerobiosi utilizzando nitrato o arginina come accettore alternativo di elettroni (anaerobi facoltativi);
- catalasi positivi;
- sono dotati di numerosi plasmidi che contengono informazioni riguardo caratteristiche metaboliche, produzione di sostanze tossiche e per la resistenza agli antibiotici. La presenza di numerosi plasmidi li rende anche dei batteri molto variabili nel tempo;
- sono dotati di capsula mucoide polisaccaridica.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

CARATTERISTICHE GENERALI

Tra le caratteristiche più rilevanti di questa specie batterica, osserviamo che:

- all'interno di questo genere, questa specie è quella che più frequentemente si trova in condizioni patologiche, perchè è il più patogeno;
- i ceppi più patogeni producono tossine, tra cui tossine idrolitiche che distruggono i tessuti, producendo un'infezione purulenta e ascesso;
- è resistente a tensioattivi e disinfettanti.



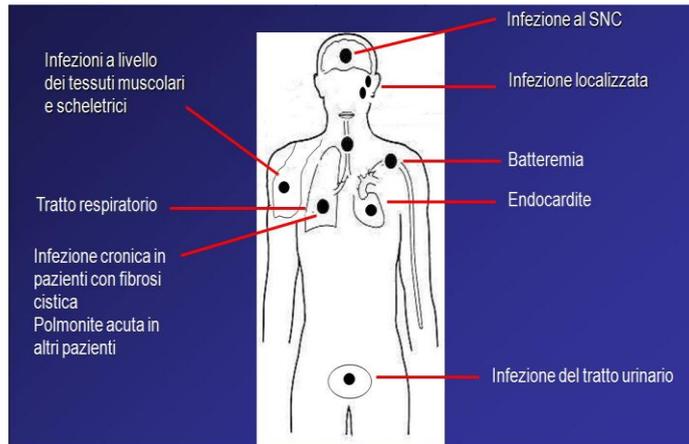
I fattori di virulenza dello *P.aeruginosa* sono principalmente legate ai ceppi più patogeni, che possono arrivare a produrre tossine; queste sono in genere tossine idrolitiche, che distruggono i tessuti, e causano un'infezione purulenta. Oltre alle tossine possono essere rilasciati anche enzimi che sostengono l'instaurarsi di un ascesso.

INGRESSO, SPREADING E USCITA

P.aeruginosa può infettare qualunque tessuto e può penetrare nel nostro organismo da qualsiasi punto, e in particolare da tutti i tipi di ferite (chirurgiche, da taglio, ustioni). In particolare le infezioni degli ustionati sono spesso da *Pseudomonas*. Possiamo quindi osservare come *P.aeruginosa* sfrutti una qualsiasi interruzione della barriera cutanea per andare da questa

localizzazione primaria ad altri siti, tendendo ad approfondirsi (da infezione cutanea, a infezione muscolare fino a causare un'infezione ossea molto difficile da eradicare).

Quindi se questo batterio non viene eliminato dalla localizzazione primaria, questo batterio può passare nel sangue, innalzando la batteriemia; inoltre, essendo



capsulato, può utilizzare il circolo ematico come sistema di spreading per causare infezione all'apparato respiratorio, al cuore, al SNC, ecc.... In genere questo batterio sfrutta situazioni di immunosoppressione o comunque predisponenti all'infezione per entrare nell'organismo da infettare; l'unica infezione che il soggetto immunocompetente può andare a sviluppare è l'otite.

DIAGNOSI

La diagnosi è molto semplice da effettuare perchè sono batteri che crescono benissimo su diversi terreni di coltura (grazie alla loro resistenza) e quindi possono essere semplicemente coltivati; è facile da identificare perchè produce delle pigmentazioni verdastre particolari quando coltivato; ciò è dovuto alla produzione di 2 pigmenti che sono fluoresceina (responsabile della fluorescenza verdastra) e piocianina. Inoltre, le colonie a cui da origine questo batterio sono molto grandi, cremose, emolitiche e che emanano un odore di frutta fermentata. Oltre la coltivazione è anche possibile effettuare test biochimici quale il test dell'ossidasi.

ENTEROBATTERIACEAE

Sono bacilli gram negativi più frequentemente isolati durante il decorso di una patologia infettiva, perchè tutti questi batteri fanno anche parte della flora microbica normale e tendono ad accumularsi in ambiente ospedaliero e tendono a sviluppare resistenza agli antibiotici. Attaccano prevalentemente soggetti predisposti

CARATTERISTICHE GENERALI

La principale specie all'interno della famiglia delle entero batteriacee è E.coli, che ha altissima variabilità intraspecie; inoltre si può osservare come la famiglia delle enterobatteriacee contiene molti generi e molte specie. Le caratteristiche comuni tra questi organismi sono:

- gram negatività, caratteristica a cui si riconduce la loro capacità di danneggiare l'organismo per via della presenza di LPS;
- sono organismi di forma bastoncellare (3-5 micron);
- sono asporigeni;
- possono essere aerobi o anaerobi facoltativi;
- molti sono mobili;
- sono ubiquitari e sono presenti anche nell'intestino degli animali (non si baciano i cani eh,

mi raccomando);

e hanno anche una serie di caratteristiche metaboliche comuni che sono:

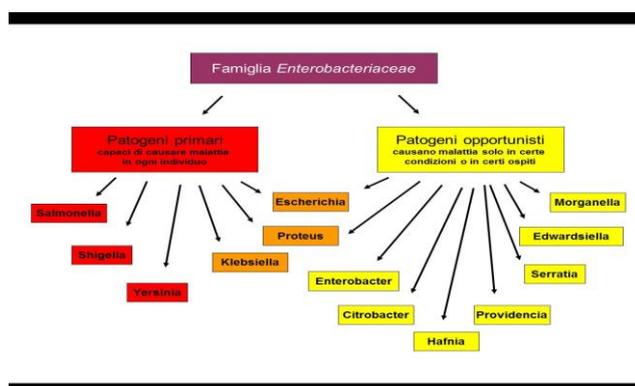
- capacità di fermentazione del glucosio;
- al test della citocromo-ossidasi risultano essere negativi.

La fermentazione del lattosio invece è legata solo a specie opportunistiche, ed è utilizzata per identificare questi organismi su piastra; questa reazione è evidenziabile su terreni di coltura contenenti lattosio, perchè la fermentazione dello zucchero dà luogo ad abbassamento del pH, che determina alterazioni della colorazione del terreno, per via della presenza di un indicatore.

CLASSIFICAZIONE

Ci sono almeno 40 generi di enterobatteriacee, e più di 150 specie che possono essere presenti in un referto microbiologico.

Le enterobatteriacee si possono dividere, da un punto di vista applicativo, in queste 3 categorie:



- patogeni opportunisti (quelli gialli), che sono batteri ubiquitari, presenti sia nell'intestino degli animali che nell'uomo; sono dotati di basso grado di patogenicità e tendenzialmente non danno malattia; approfittano di una situazione favorevole nell'organismo da infettare;
- patogeni primari (quelli rossi), sono quelli appartenenti alle specie Salmonella, Shigella, e Yersinia e sono sempre patogeni e danno malattia anche nel soggetto sano;
- batteri che sono tendenzialmente patogeni, ma la cui variabilità intraspecie fa sì che vi sia la possibilità di dar luogo a ceppi che si integrano nella flora microbica normale (quelli arancioni); possono dare la patologia anche in un soggetto sano e sono i batteri del genere Proteus, Escherichia e Klebsiella.

Ciò che interessa a noi sono solo gli ultimi 2 generi, ovvero quelli che possono dare patologia.

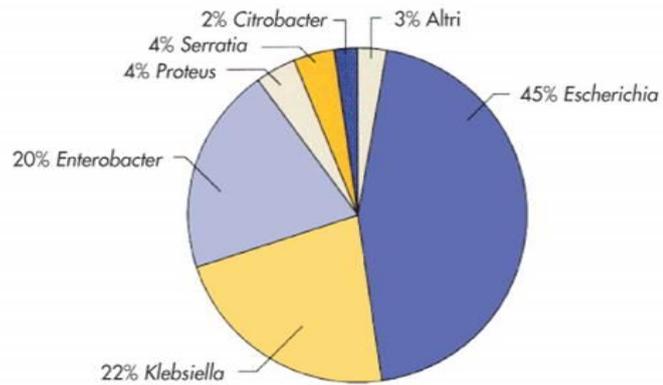
IMPORTANZA MEDICA DELLE ENTEROBATTERIACEE

L'importanza medica delle enterobatteriacee è dovuta al fatto che questo tipo di batteri si riscontra spesso nelle infezioni ospedaliere (il 50% delle setticemie è dovuta a infezione da enterobatteriacee). Le enterobatteriacee inoltre sono diffuse nelle infezioni delle vie urinarie, per via della vicinanza anatomica tra regione anale (da cui vengono eliminate con le feci) e uretra esterna, a cui passano facilmente per determinare un'infezione. Le condizioni che favoriscono le infezioni non sono associate solo all'immunodepressione, ma anche:

- cateterizzazione, perchè il catetere giunge dall'esterno e inevitabilmente porta con sé dei batteri (oltre al fatto che il suo inserimento induce infiammazione dovuto a sollecitazione meccanica);

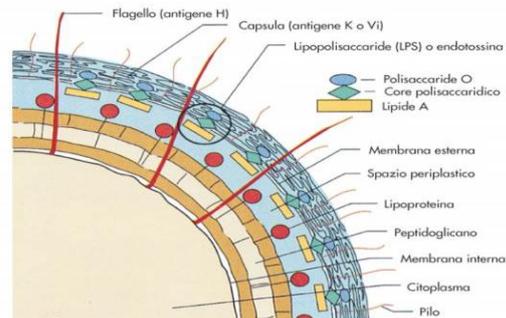
- malnutrizione;
- diabete;
- ustioni;
- tumori;

L'incidenza di infezioni da parte dei vari generi di enterobatteriacee è caratteristico di ciascuno di questi, ma osserviamo che l'incidenza di infezione è nettamente propensa verso l'infezione da E.coli.



Gli antigeni delle enterobatteriacee sono associati a fattori di virulenza e patogenicità, che possono essere utilizzati a scopo diagnostico: infatti la tipizzazione biochimica ci permette solo di identificare la specie, mentre per identificare il ceppo all'interno della specie devo usare anticorpi specifici che si legano a antigeni specifici di questi ceppi batterici. Gli antigeni delle enterobatteriacee sono:

- l'antigene H (o antigene flagellare),
- l'LPS, che l'antigene O (o antigene somatico)
- l'antigene K (o antigene capsulare), presente solo nelle enterobatteriacee capsulate, ed è di natura polisaccaridica;
- l'antigene F (o antigene fimbriale), che è presente solo nelle enterobatteriacee con fimbrie. Queste strutture hanno un importante ruolo nell'adesività dei batteri alle mucose (in particolare nel distretto urinario, dove queste strutture permettono anche delle infezioni in senso ascendente), e in particolare in E.coli.



Gli enterobatteri sono in grado di produrre la capsula, il che costituisce un aggiuntivo fattore di virulenza;

ACCERTAMENTO DIAGNOSTICO

Se devo isolare un enterobatterio lo posso fare mediante coltura su terreno selettivo che inibisce la crescita di altri microorganismi (quali McConkey agar, EMB o altri terreni che inibiscono la crescita degli altri batteri) e che agiscono anche da terreni differenziali, perchè contengono come zucchero il lattosio, che può essere fermentato e determinare variazione del pH (rilevabile tramite presenza di un indicatore).

I batteri del genere Salmonella (e quelli patogeni primari in generale) sono più esigenti dal punto di vista colturale, e richiedono di essere prima coltivate in un brodo di arricchimento, che favorisce la crescita delle specie che ci interessano maggiormente rispetto a quelle altre presenti nel campione (costituito in genere da delle feci) e una volta che si sono adattate, queste possono essere coltivate su

piastra per poter condurre ulteriori analisi. Piastrare direttamente le feci nella piastra può far sì che altre specie presenti nel campione (in particolare E.coli) inibiscano la crescita delle specie patogene. Una volta isolati i batteri devo effettuare la tipizzazione biochimica per individuare la specie e il ceppo tramite gli antigeni specifici di superficie.

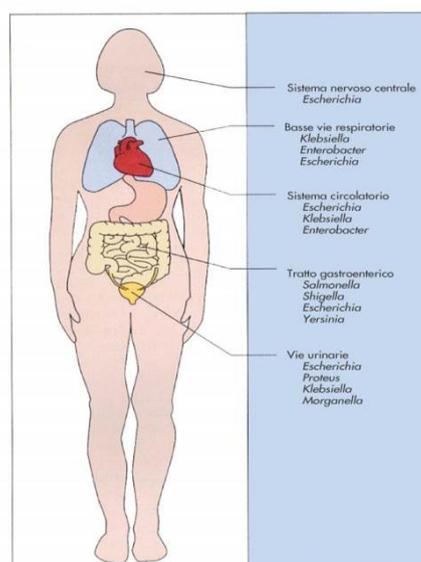
IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

Si vanno a testare una serie di processi metabolici mettendo la miscela batterica del campione in delle cellette, in ognuna delle quali c'è un certo substrato e un indicatore che ci riferisce se quel substrato è stato processato, trasformandola in prodotto; i risultati di positività/negatività nelle diverse cellette ci forniscono il cosiddetto "profilo metabolico" del batterio.

La diagnostica batteriologica viene portata avanti con il test di resistenza agli antibiotici, con cui in genere concludo l'opera diagnostica. Se voglio continuare la distinzione in ceppi, invece posso continuare marcando i batteri con anticorpi specifici per gli antigeni di superficie.

SITI DI INFEZIONE

Come si diceva prima, le enterobatteriacee si ritrovano in qualunque campionamento biologico, appunto perchè ubiquitarie e possono infettare tutti gli apparati (cute, vie genito urinarie, ecc...), ma la distribuzione dei generi è leggermente diversa a seconda del distretto.



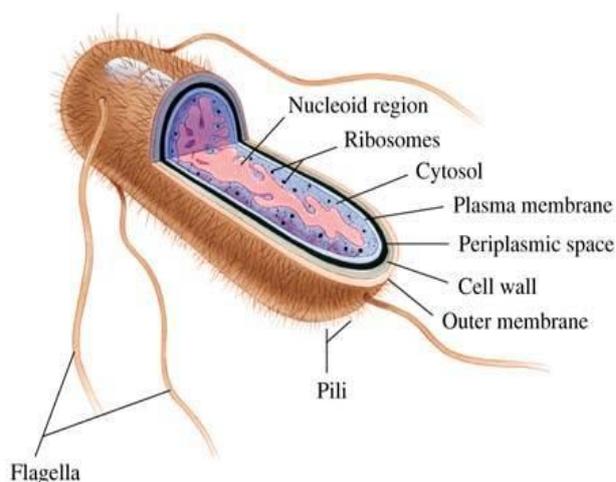
GENERE ESCHERICHIA

L'unica specie che ci interessa è la specie Coli, perchè è l'unico che ci interessa dal punto di vista della patologia. E.coli è un comune commensale all'interno dell'intestino dell'uomo come anche di altri animali ed è dotato di elevata variabilità intraspecie, che fa sì che esistano ceppi diversi di E.coli, che hanno sempre lo stesso profilo metabolico (e appartengono sempre alla stessa specie), ma sono dotate di capacità patogenetica diversa. Tra le diverse caratteristiche metaboliche di E.coli, l'unica di una certa rilevanza è la loro capacità di fermentare il lattosio; questa capacità non è presente in tutti i ceppi, in quanto abbiamo anche numerosi ceppi (che peraltro sono in genere quelli patogeni), che sono lattosio negativi.

CARATTERISTICHE GENERALI

Osserviamo le caratteristiche generali di questa specie:

- essendo gram negativi, sono dotati di LPS che costituisce l'antigene somatico di questi batteri (antigene O);
- presentano polisaccaride capsulare, che costituisce la capsula dei ceppi



capsulati.

- È positivo per i test a: indolo, lisina decarbossilasi, fermentazione mannitolo, fermentazione lattosio, formazione di gas dal glucosio, emolisi su agar sangue, Beta-glucuronidasi

QUADRI PATOLOGICI

Le infezioni da E.Coli possono essere di 2 tipi:

- endogene, cioè quando non c'è stato alcun evento di infezione, e E.coli proviene dalla flora microbica normale, che significa che è cambiato l'equilibrio omeostatico; queste infezioni sono costituite da un'espansione (in cui il batterio si espande troppo nella stessa sede) o una redistribuzione della massa batterica (in cui il batterio migra in una sede in cui non doveva stare); la redistribuzione del batterio nelle vie urinarie è data in genere da ceppi con pili; un altro esempio di infezione endogena è la meningite neonatale, in cui c'è stata una penetrazione di E.coli nel liquor (batteri provenienti dal canale del parto); infezioni endogene nel distretto peritoneale (che è sterile), dovuto alla presenza di una continuità del lume intestinale con il cavo peritoneale, e che costituiscono la gran parte degli eventi infettivi da parte di E.coli;
- esogene, che avvengono quando c'è stato un evento di infezione, in cui il ceppo infettante è sempre un ceppo patogeno e arriva dall'esterno dell'organismo; queste sono dovute a ceppi patogeni introdotti per via orofecale.

I ceppi di E.coli da infezioni esogene sono quasi sempre associati ai fenomeni gastroenterici che si associano a contaminazioni di alimenti, alle comunità o a condizioni di viaggio e distribuzioni degli alimenti. Questi ceppi patogeni sono divisi per

- capacità tossigena (che sono quelli che danno infezione attraverso la produzione di tossine e che non possono essere flora microbica normale). Le tossine prodotte da questi ceppi sono abbastanza ben definite e sono la LT e la ST, dove la prima è la tossina TermoLabile mentre la seconda è la tossina TermoStabile; in qualsiasi caso agiscono

Infezioni (esogene) intestinali

Gli stipiti EPEC e gli stipiti ETEC si localizzano a livello dell'intestino tenue, provocano comparsa di enteriti diarroiche per azione diretta (distruzione dei microvilli) sugli epitelii mucosi (stipiti EPEC) o produzione di enterotossine, in alcuni casi con effetti simili a quelli della tossina colerica (stipiti ETEC)

Gli stipiti EIEC e gli stipiti EHEC (=VTEC) si localizzano a livello dell'intestino crasso e provocano la comparsa di enteriti dissenteriche a seguito dei fenomeni infiammatori conseguenti all'invasione della mucosa (stipiti EIEC) o per la produzione di tossine VERO (Shiga-simili). Le infezioni da stipiti EHEC possono essere complicate da colite emorragica, sindrome uremico-emolitica e segni di compromissione nervosa centrale

prevalentemente al di fuori delle cellule e sono quelli che danno meno dissenteria (dovuta in genere a lesione della mucosa, con presenza di muco e sangue) e più diarrea (cioè ad un aumento della massa fecale per aumento dell'espulsione di liquidi);

- capacità invasiva che danno infezione attraverso la loro capacità di penetrare attraverso gli enterociti; danno più dissenteria che diarrea.

(disse che lei non vuole sapere le sigle tipo EPEC, EHEC, ETEC)

FATTORI DI VIRULENZA

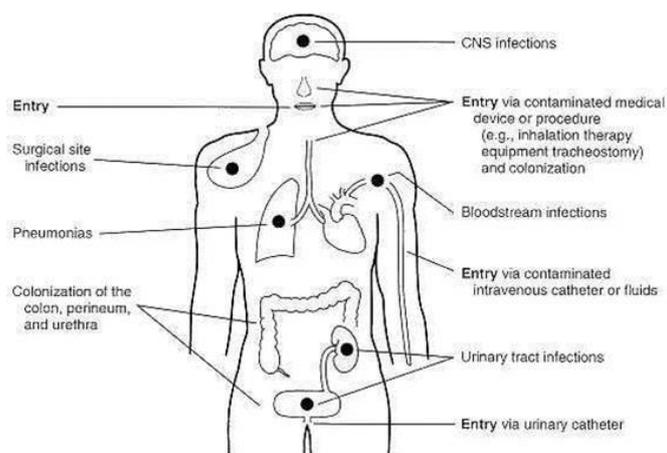
Tra i meccanismi patogenetici di cui può essere dotato E.coli osserviamo quindi:

- la capacità di aderire alle mucose;
- la capacità di produrre esotossine;
- la capacità di penetrare attraverso gli enterociti

DISTRIBUZIONE

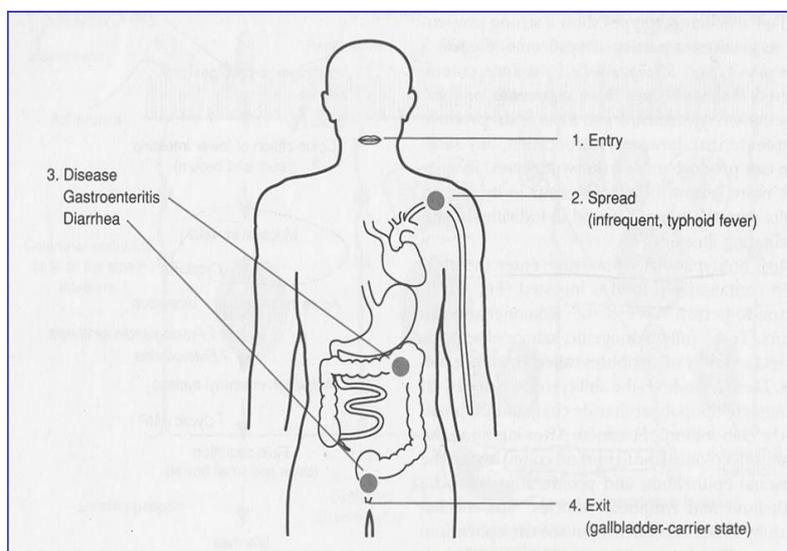
Comunque è ubiquitario e dà distribuzione per via ematica, permettendo a E.coli di fare uno spreading generalizzato, in grado di raggiungere anche l'SNC. Inoltre, potendo passare nel sangue, E.coli determina aumento della batteriemia, che può diventare sintomatica, dando luogo a setticemia sistemica.

L'entrata di questi batteri (ammesso che vi sia stata e che non si tratti di un fenomeno endogeno) può avvenire pressochè da qualsiasi punto (via orofecale, ferite, ferite chirurgiche, ecc...)



GENERE SALMONELLA

Questi batteri sono sempre patogeni, infatti sono sempre batteri negativi per la fermentazione del lattosio. I batteri del genere salmonella sono ubiquitari come tutte le enterobatteriacee, ma ci sono alcune specie, soprattutto umane, come S.typhi e S.paratyphi, la cui distribuzione è abbastanza limitata se vengono mantenute le condizioni igienico sanitarie, fondamentali per il



processamento degli alimenti; inoltre l'infezione nella popolazione da parte di questi 2 ceppi patogeni viene mantenuta dalla presenza di portatori sani per queste specie (peraltro questi batteri si trasmettono per contatto interumano).

CARATTERISTICHE GENERALI

Tutti i batteri appartenenti al genere salmonella, presentano le seguenti caratteristiche comuni:

- sono mobili;
- non fermentati il lattosio;
- sono negative a test per l'indolo;
- rispondono positivamente al rosso metile;
- si trasmettono per contaminazione fecale di acqua e cibi animali;

Le salmonelle costituiscono sempre un'infezione esogena, in cui è possibile sia lo scambio interumano che il contagio da altre fonti, ed entrano nel nostro organismo sempre per via oro-fecale e arrivano a livello intestinale; si distinguono 2 tipi di salmonelle:

- le salmonelle maggiori, che danno prevalentemente infezioni localizzate a livello sistemico e dette appunto salmonellosi maggiori (febbre tifoide se data da *S.typhi* e *S.paratyphi*); le salmonelle maggiori infatti sono capaci di spreading ematico;
- le salmonelle minori (gastroenterite), che danno prevalentemente infezione localizzata nell'intestino, dette salmonellosi minori; le salmonelle minori sono limitate nel tratto intestinale.

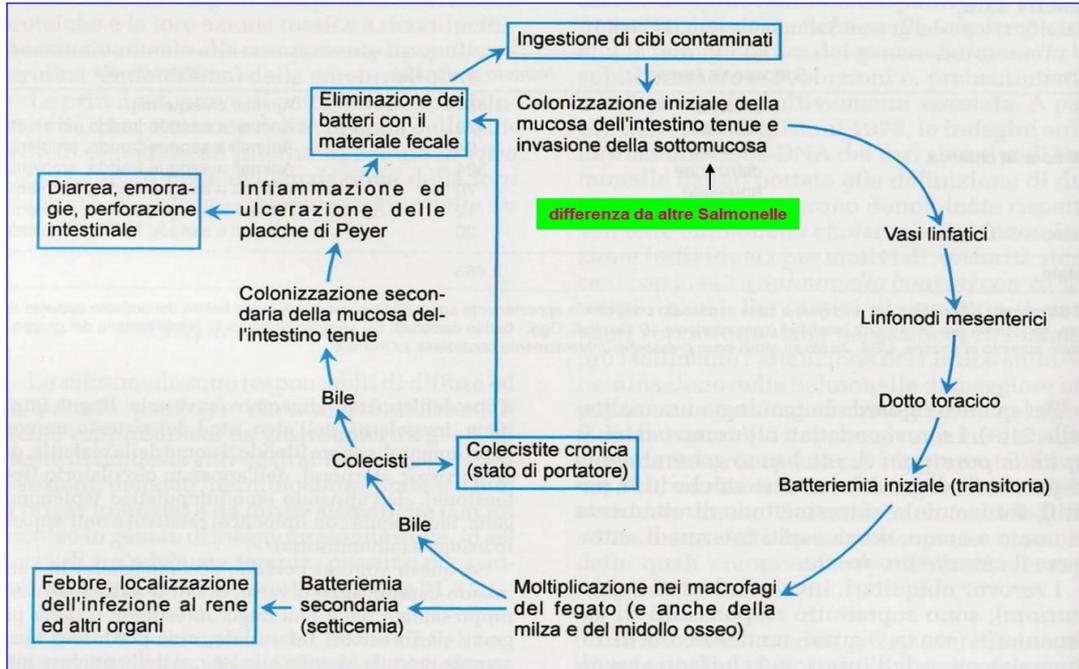
Essendo le salmonelle presenti non solo nell'organismo umano, ma anche negli animali, questi ultimi possono essere fonte di contagio (in particolare i polli).

La distinzione tra salmonelle maggiori e salmonelle minori può essere effettuata sulla base del periodo di incubazione, dove osserviamo che le salmonelle maggiori (*S.Typhi* e *S.paratyphi*) hanno tempi di incubazione molto lunghi, mentre le minori hanno tempi di incubazione molto brevi. Avendo tempi di incubazione maggiori, le patologie indotte dall'infezione di salmonelle maggiori hanno anche maggior durata e effetti molto più gravi (febbre tifoide), rispetto alla minore dove la durata è più breve e gli effetti più "blandi".

DIAGNOSI

La diagnostica si basa sulle differenze che esistono tra salmonelle maggiori e salmonelle minori:

- le salmonelle maggiori, dato che passano nel sangue, sono osservabili tramite emocultura già nel periodo di incubazione della malattia; per questi batteri la coprocultura (coltura del campione di feci) si positivizza più avanti, quando la quantità di batteri nell'intestino si accresce e diventa appunto evidenziabile;
- le salmonelle minori invece si evidenziano per coprocultura; si possono usare anche degli anticorpi, solo che attraverso quest'analisi bisogna aspettare un periodo di attesa affinché l'individuo espliciti una risposta umorale identificabile.

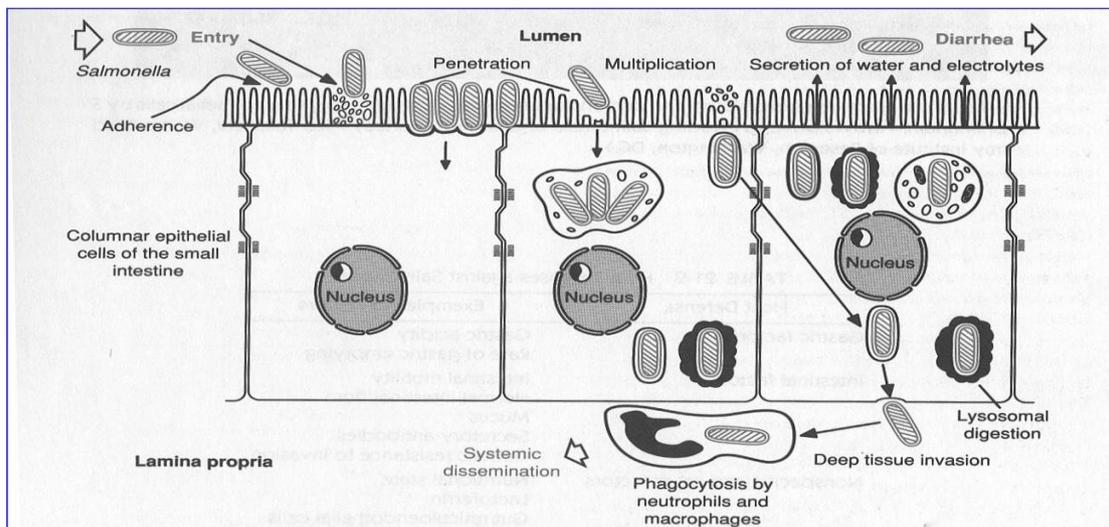


CICLO BIOLOGICO DELLE SALMONELLE MAGGIORI

Dopo l'evento infezione (le cui modalità abbiamo già definito), osserviamo come nei primi periodi di incubazione (che possono essere di alcune settimane), il batterio passa dal sito di infezione al sangue, dove dà batteriemia, fondamentale per la loro disseminazione e per il loro passaggio a livello intestinale. La seconda localizzazione dell'infezione da salmonella maggiore è quindi la mucosa intestinale.

In questo ciclo osserviamo che il batterio, oltre a dare batteriemia a cui conseguono conseguenze cliniche anche importanti, è in grado di andare a infettare la colecisti, dove rimangono in latenza (condizione di portatore sano); da questa sede le salmonelle possono poi passare a livello intestinale insieme alla bile.

Le salmonelle maggiori invadono la mucosa e passano nella sottomucosa, mediando la distruzione o addirittura perforazione della mucosa intestinale; le salmonelle sono in grado di fare ciò grazie alla loro capacità di penetrare nell'enterocita e resistere all'azione dell'endolisosoma intracellulare.



...riprendiamo il discorso di mezzora fa sugli enterobacteaceae...

Shigella

Batterio sempre patogeno, è immobile, non avrà quindi l'antigene flagellare. Abbiamo quattro specie all'interno di questo genere. La trasmissione è di tipo oro-fecale da uomo a uomo, non infetta animali (ad eccezione di alcuni primati). Da una patologia gastroenterica, in particolare dissenteria con forti dolori addominali. Causano lacerazione della mucosa intestinale e di qui penetrano nella sottomucosa, dove restano dando infezione localizzata, non sistemica. Hanno capacità di penetrazione con conseguente reazione infiammatoria, oltre ad essere in grado di produrre tossine (vedi tossina Shiga). La diagnosi prevede l'isolamento del batterio, la tipizzazione biochimica e l'identificazione degli anticorpi.

Iersinia

Sempre patogeno, a questo genere appartiene la peste. I nomi da ricordare sono: pestis, enterocolitica e pseudotuberculosis. La prima è una zoonosi, con trasmissione principalmente dovuta alle pulci dei roditori, tanto che il principale fattore di scomparsa della peste è il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie. La peste da bubboni nel punto di puntura della pulce, dà poi sintomi polmonari per cui si ha diffusione per via aerea.

Proteus

Si trova normalmente nell'intestino e da patologia causando infezioni urinarie. La specie più diffusa è mirabilis, produce ureasi che rende più basico il pH dell'urina permettendo la sopravvivenza e causando però tossicità per le cellule renali e favorendo la deposizione di calcoli. Diffonde dall'intestino.

Klebsiella

Varie specie in questo genere, si tratta comunque di un batterio ubiquitario responsabile di molte infezioni ospedaliere. Il più diffuso è pneumoniae, dà quindi spesso polmonite in soggetti particolarmente esposti come quelli ospedalieri o in remissione da influenza per sistema immunitario debilitato. Da infezione del tratto nasale, spesso asintomatica o responsabile di manifestazione lesive con infiammazione della mucosa nasale. La trasmissione è prevalentemente per secrezione respiratorie. Si tratta comunque di flora microbica normale delle alte vie respiratorie. Sul giallo non diremo nulla, non c'è nulla da ricordare in particolare, fanno parte della flora microbica normale e se restano nella loro sede non danno patologie.

Campilobacter ed Elicobacter

Generi responsabili di gastroenteriti che però non rientrano nella famiglia dei batteri appena descritti.

Elicobacter

Si tratta di bacilli Gram- con una tipica forma ricurva a spirale. Sono dotati di grande motilità e da, come vedremo, un'elevata attività ureasica (soprattutto per quelli gastrici, non per quelli enterici).

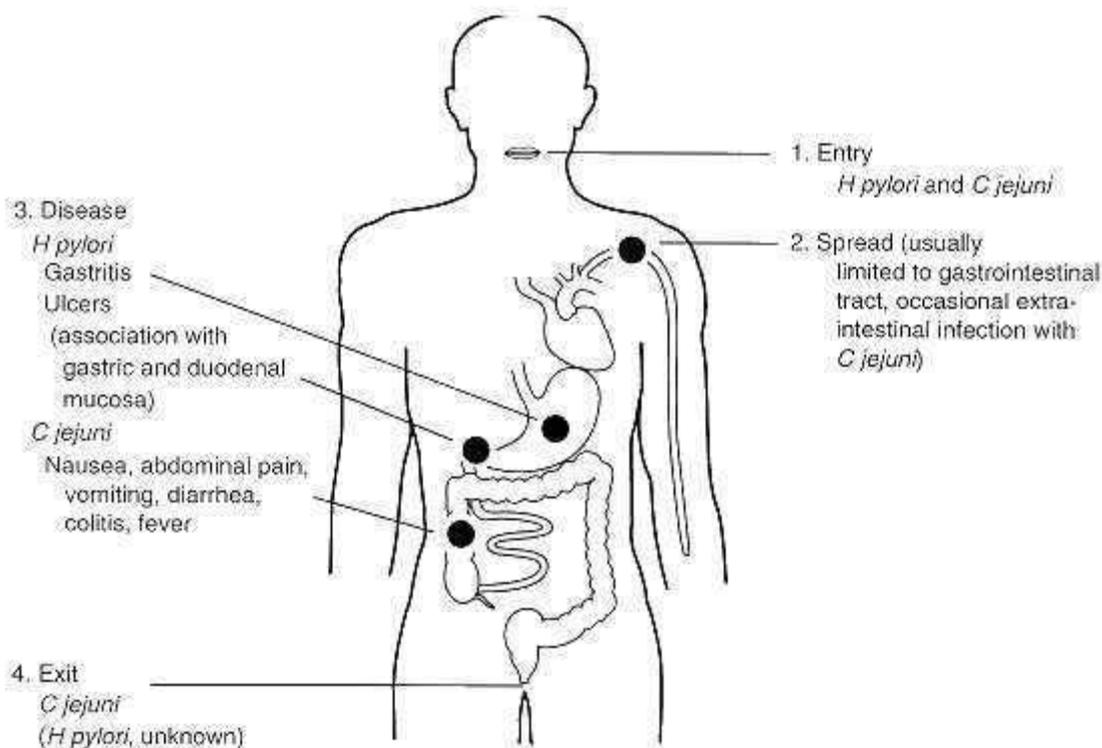
La specie più importante e studiata di questo genere è Elicobacter Pylori. Dà infezione cronica. È sito a livello gastrointestinale, in particolare a livello gastrico: qui abbiamo pochi batteri a causa del pH acido e grazie ad esso non abbiamo una grande espansione. La diagnosi, a causa della bassa carica microbica, può risultare difficile. La manifestazione quindi non è acuta, ma cronica per la lenta crescita. La gastrite può evolvere poi in ulcera (fino a diventare perforante), inoltre possiamo avere poi carcinoma gastrico per l'infiammazione cronica. Sono bacilli Gram- con forma ricurva a spirale.

La trasmissione è interumana sicuramente per via oro-fecale, ma potrebbe essere anche per via respiratoria ed si stanno effettuando ricerche anche per un'eventuale contagio da animali. È un'infezione molto diffusa nella popolazione, favorita ovviamente da condizioni igieniche scarse, ma comunque diffuso in tutto il mondo. Come detto, provoca infiammazione cronica a livello gastrico. L'individuazione parte quasi sempre con un'indagine anatomopatologica, essendo questo batterio una delle più frequenti cause di gastrite.

L'attività patogenetica è diversa da quelle viste fino ad ora, perché come detto si tratta di batteri che non fanno massa. I fattori di virulenza sono:

- La motilità è indispensabile perché i flagelli permettono al batterio di muoversi nel muco gastrico e nello strato mucosale dove prospera.
- L'elevatissima attività ureasica caratteristica di questi batteri gli consente di crearsi una nicchia a livello dello stomaco dove il pH risulta leggermente più basico e favorevole. A dimostrazione dell'enorme importanza dell'attività delle ureasi, si è notato che batteri privati di tali enzimi sono incapaci di proliferare.
- Grande capacità di adesione, grazie alla produzione di adesine: queste, quando il batterio entra a contatto con la mucosa gastrica, favoriscono un riarrangiamento del citoscheletro che migliora l'adesione del batterio

Il meccanismo di riconoscimento da parte dei PRR è infine molto importante: i batteri sono pochi, ma sono in grado di attivare processi di signaling intracellulari che portano alla produzione di citochine proinfiammatorie. Se l'elicobacter è in grado di produrre le tossine questa attivazione infiammatoria sarà più evidente: in particolare, la capacità di produrre tossine dipende dalla presenza delle cosiddette isole di patogenicità, zone del genoma identificabili con PCR che codificano per tossine che attivano appunto molecole proinfiammatorie. Queste componenti proteiche sono indispensabili per la diagnosi differenziale di gastrite da elicobacter.



La diagnosi è, come detto in precedenza, differente dalle altre specie. Si tratta di un batterio difficilmente coltivabile, con determinate esigenze colturali e di atmosfera (sono microaerofili). Anche il prelievo stesso non è semplice, in quanto stiamo parlando di mucosa gastrica. Si parte comunque da una biopsia gastrica e con un'analisi istologica di essa posso già vedere l'eventuale presenza di *elicobacter*. Si fa poi un'analisi dell'attività ureasica, se alta è molto probabile un'infezione di questo batterio che utilizza ampiamente questo enzima per sopravvivere. Inoltre è possibile sfruttare un'indagine anticorpale, fattibile perché stiamo parlando di infezione cronica: quella acuta non ha produzione di anticorpi, a meno che non abbia un periodo di incubazione molto lunga. La presenza di anticorpi può però essere dovuta ad un'infezione di *elicobacter* passata, non correlata con la diagnosi che sto cercando. Se non ci sono scarto invece *elicobacter* come causa. La conferma più diretta è però data o dalla biopsia o dal test del respiro: faccio ingerire al soggetto urea marcata, monitoro poi il gas liberato dalle vie aeree in seguito a trasformazione da parte delle ureasi. Più è alto il livello di ammoniaca nel respiro, più è alta l'attività ureasica e l'infezione da *elicobacter*. È un test molto utile, poco invasivo che posso ripetere più volte per controllare il funzionamento della terapia. Inoltre è quantitativo, molto chiaro. È stato poi messo a posto un test che individua l'antigene di *elicobacter* nelle feci.

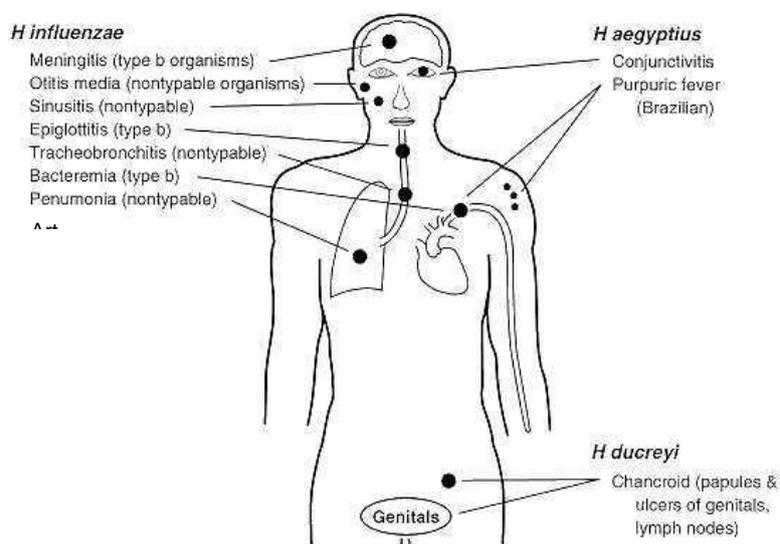
La terapia prevede l'utilizzo di più farmaci combinati come antibiotici ed antiacidi, viene protratta per più settimane e bisogna evitare che porti alla comparsa di ceppi resistenti.

Campilobacter

Anche questo è un bacillo gram- dotato di flagelli, a forma di virgola, con più specie all'interno di questo genere, con specie più patogene e altre meno. La trasmissione non è soltanto interumana, anche da animale a uomo. Le carni che lo portano devono essere cotte per eliminare il batterio. È importante ricordare che il contenuto intestinale della mucca infetta anche il latte, non bisogna mai darlo crudo. Batteri presenti nell'intestino dell'animale possono infettare qualsiasi derivato da esso, che sia appunto il latte o la carne.

La patogenicità di *campilobacter* è data da distruzione della mucosa intestinale. Hanno grande capacità di invasività e di distruzione. Si trasmette prevalentemente per via oro-fecale.

La diagnosi non è semplice, come *elicobacter* si tratta di un batterio difficile da coltivare. Si può andare per esclusione, se ho dissenteria e non trovo né *shigella* né *salmonella*, molto probabilmente è *campilobacter*. Il campionamento parte dalle feci, in cui devo comunque tentare di coltivarli a 42°. Dopo aver trovato il genere, devo individuare la specie sulla base della tipizzazione biochimica, indispensabile per individuare le specie patogeni da quelle scarsamente patogene.



Emophilus

Parliamo comunque di bacilli gram-, ma ci spostiamo nell'apparato respiratorio. Il nome "emofili" deriva dalla loro necessita di fattori X e V per crescere. Troviamo ovviamente varie specie all'interno di questo genere: *influenzae*,

parainfluenzae, ducrey e egyptius.

Emophilus influenzae e *parainfluenzae* è il tipico batterio che resta nelle alte vie respiratorie per poi spostarsi nel sistema nervoso centrale dando meningite o nei polmoni causando polmonite. Le altre due specie sono diffuse soprattutto in paesi come il sudamerica che danno rispettivamente ulcere genitali, trasmissibile sessualmente, e infezioni oculari.

Le specie importanti dal punto di vista sanitario sono evidentemente le prime due, che danno infezioni nasali, paranasali e a livello dell'orecchio. Insieme a *pseudomonas* gli emofili sono l'altra causa di otiti. Il fatto che *emophilus* passi in circolo è ovviamente associata alla capacità di produrre una capsula. Esiste un vaccino contro *emophilus influenzae*, importante nei bambini perché si tratta di una patologia a cui i bambini sono più esposti.

La diagnosi è relativamente semplice, si tratta di batteri che crescono facilmente su agar cioccolato e sui quali posso poi individuarli come bacilli gram-. A livello delle meningi è ancora più semplice, perché con un prelievo di liquor posso trovare solo questo o *neisseria meningitidis*, sapendo che si tratta di un sito normalmente sterile.

VIBRIONACEAE

In questa famiglia ci interessa in particolare il genere *Vibrio*, tra cui c'è l'agente eziologico del colera (*V.cholerae*), ma anche altri vibrioni che danno patologie più leggere, ma con un ciclo biologico simile a *V.cholerae* (per es. *V.parahemolyticus*).

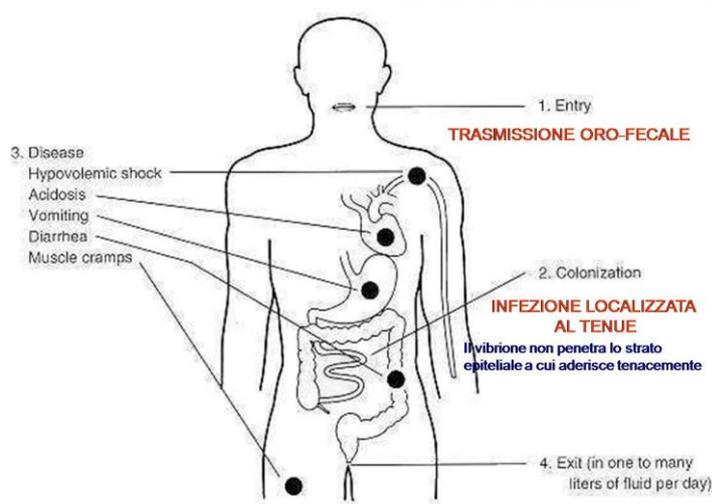
CARATTERISTICHE GENERALI

I vibrioni presentano le seguenti caratteristiche generali:

- hanno forma a bacillo;
- sono gram negativi (quindi hanno l'LPS);
- hanno una forma ricurva;
- sono mobili per presenza di flagello polare (monotrichi);
- non sono dotati di grande invasività;
- non sviluppano la capsula;
- non entrano nelle cellule;
- sono in grado di fermentare vari zuccheri (tra cui l'indolo).

VIBRIO CHOLERAEE

Arriva nell'intestino per via orofecale e produce danno attraverso la produzione della sua tossina, cioè la tossina colerica. Questo organismo si trasmette per via orofecale e non è mai presente nella flora microbica normale; nei paesi occidentali il colera non è molto diffuso perché bastano le normali condizioni igieniche per impedirne la sopravvivenza e tenere sotto controllo l'infezione.



Il vibrione aderisce alla mucosa intestinale ma non la penetra, quindi tutta l'attività patogena è data solo dalla tossina, ed essa non consiste solo della diarrea, ma determina la comparsa anche di sintomi sistemici dovuti alla perdita di liquidi e della conseguente ipovolemia (shock ipovolemico, ma anche acidosi, vomito e crampi muscolari); l'infezione è localizzata però solo a livello intestinale.

Il vibriocolerae è presente in tutti gli ambienti e il modo più semplice per contrarre il *V.cholerae* è mangiare pesci, molluschi e crostacei crudi

VIBRIOCOLERAEE

Il vibriocolerae presenta diverse tipizzazioni perché in ogni epidemia ci sarà un diverso sierotipo; esistono diversi sierotipi in base all'antigene somatico O presente (da O1 a O139). La

classificazione non si arresta qua in quanto ogni sierotipo sarà ulteriormente suddiviso in biotipi, ognuno dei quali può essere suddiviso in ulteriori sierotipi.

I fattori di virulenza sono solo la tossina e la capacità di aderire alle mucose intestinali.

La tossina colerica è una tossina multimerica, con una subunità di legame (b) e una subunità ad attività enzimatica (a). La subunità b si lega al suo recettore specifico (recettore gangliosidico GM1) così la porzione attiva entra nella cellula e attiva l'adenilato ciclasi (in quanto la subunità ha azione ADP-ribosilante di una proteina G, che continua ad attivare l'AC). L'aumento di cAMP intracellulare che consegue a ciò, determina un'attiva secrezione di sodio e bicarbonato nel lume intestinale, che richiama acqua nel lume, con conseguente diarrea. In teoria una situazione del genere sarebbe trattabile con una giusta idratazione e con una terapia antibiotica adeguata, ma l'infezione dovrebbe essere diagnosticata in tempi brevi; inoltre, questo tipo di infezione in genere si manifesta su individui che presentano già problemi di tipo nutrizionale.

DIAGNOSI

la diagnosi si basa sulla coltivazione del vibrione (in terreno monsur), direttamente da campione fecale previo arricchimento in acqua peptonata (che è un brodo di coltura con pH basico, in quanto i vibriani crescono meglio a pH alti).

Non esiste un vaccino funzionante contro questo agente infettante e l'unica vera profilassi sono le condizioni igienico sanitarie.

VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

Non produce la tossina colerica, quindi non ha la stessa capacità tossica del *V.cholerae*. Anche questo vibrione si trasmette per via orofecale, e in particolare tramite le acque, pesci, crostacei e molluschi crudi. Dopo alcune ore dall'assunzione di queste pietanze possono comparire manifestazioni diarroico-gastroenteriche, meno importanti di quelle che abbiamo osservato per *V.cholerae* e meno durature.

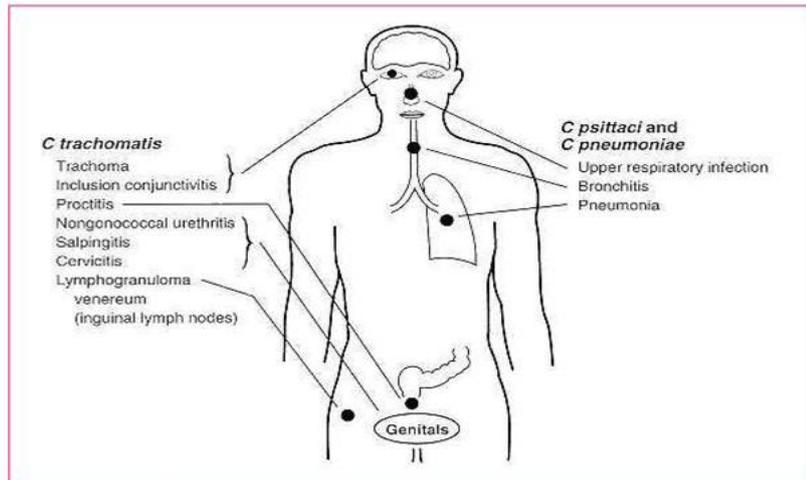
VIBRIO VULNIFICUS (di quest'ultima specie in realtà sembrava non fregargliene un granchè, probabilmente per la scarsa rilevanza clinica)

Questo organismo lo si può trovare nelle acque (soprattutto in quelle salate) soggette ad inquinamento fecale (inquinando per esempio i pesci che fanno parte della nostra dieta); trova la sua via di ingresso con modalità orofecale o attraverso ferite e piccole lesioni della cute e una volta all'interno dell'organismo dà infezione a cute, tessuti molli e manifestazioni gastroenteriche soprattutto in pazienti immunodepressi.

CHLAMYDIACEAE

Non essendo in grado di vita autonoma tendono a persistere nelle cellule dell'individuo; questa caratteristica fa sì che questi batteri siano presenti nella popolazione, ma nonostante ciò non fanno parte della flora microbica normale. Questo avviene perchè sono parassiti intracellulari obbligati (dimensioni <0.45 micron), ed entrando nella cellula ospite, determinano la modificazione dell'aspetto morfologico della cellula ospite e dando origine a corpi di inclusione che rappresentano i centri di replicazione di questi virus. Moltiplicandosi solo dentro le cellule non le si potrà coltivare in piastra, ma si dovrà usare un sistema simile a quello usato per i virus. L'infezione a cui danno luogo questi batteri non è di tipo purulento; ciò è dovuto al fatto che, replicandosi all'interno delle

cellule arruoleranno tutti gli elementi dell'infiammazione, ma non indurranno la produzione di pus (perchè ricordiamo che il pus è formato da leucociti e batteri morti)

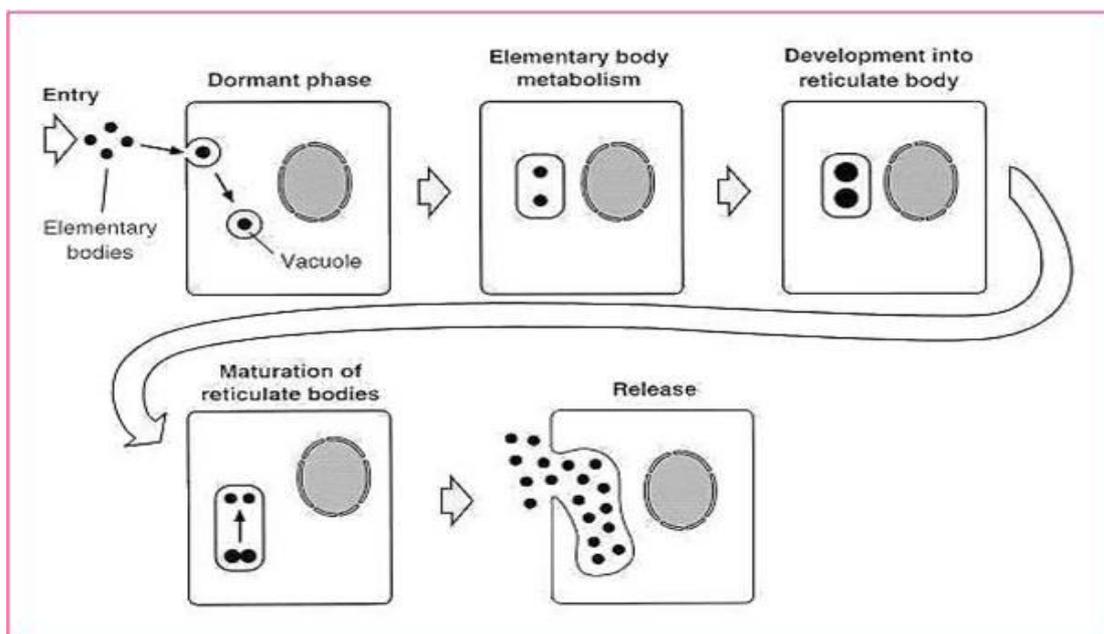


CARATTERISTICHE GENERALI

- nonostante la colorazione di gram non possa essere effettuata su questo tipo di organismi, questi sono classificati come gram negativi (tramite identificazione con analisi biochimiche della struttura della parete), quindi hanno l'LPS;
- Non hanno lo strato di peptidoglicano, ma hanno una parete complessa priva di questa struttura;
- Non sono mobili;

Le clamidie hanno sviluppato 2 tipi di ciclo vitale:

- il corpo elementare, (che non è una spora perchè non ha i rivestimenti tipici della spora) che rappresenta una forma metabolicamente inattiva della cellula, e che costituisce l'agente infettante che trasmette l'infezione da una cellula all'altra e quindi la mantiene nella popolazione;
- corpo reticolare, che è la forma intracellulare metabolicamente attiva e replicante, che non è infettante, appunto perchè locata all'interno della cellula. All'interno della cellula si moltiplica per scissione binaria.



Il corpo elementare entra nella cellula, matura nella forma di corpo reticolare, diventa metabolicamente attivo e poi comincia a moltiplicarsi, dando origine ad altri corpi elementari, che possono uscire dalla cellula (quando questa va incontro a lisi) e vanno a infettare altre cellule. Questo ciclo è estremamente complicato (non va saputo) ed è caratteristico del genere chlamydia.

Del genere Chlamydia consideriamo almeno 3 specie, importante dal punto di vista clinico:

- C.trachomatis;
- C.pneumoniae;
- C.psittaci;

Le infezioni da chlamydia sono paucisintomatiche, quindi sono più difficile da diagnosticare, perché presentano sintomi meno caratteristici; in particolare modo osserviamo che queste infezioni tendono a cronicizzare.

All'interno di queste specie c'è una enorme variabilità di sierotipo (cioè ci sono diversi ceppi) che si associano diverse patologie.

C.TRACHOMATIS

Ci sono alcuni sierotipi di questa specie che danno luogo a una patologia nota come linfogranuloma venereo, che presenta una distribuzione specifica di alcune zone del mondo; l'infezione delle vie genito-urinarie mediata dagli stessi ceppi che causano il linfogranuloma è invece distribuita equamente in tutto il mondo, quindi questa è la vera patologia che ci interessa. C.Trachomatis può dare luogo anche a tracoma (un'infezione della congiuntiva e della cornea che rende l'occhio "ruvido"), ma anche questa è una patologia tipica dei paesi in via di sviluppo, quindi non è propria della patologia dei nostri luoghi. In genere C.trachomatis si trasmette per via sessuale (per via del fatto che risiede più che altro nelle vie genito-urinarie).

C.PSITTACII E C.PNEUMONIE

Ambedue questi organismi danno polmonite, perché possono stare nel tratto respiratorio. C.Psittaci la distinguiamo dalla C.pneumonie perché la prima è una zoonosi che si trasmette soprattutto dagli uccelli (in particolare da quelli esotici), mentre C.pneumonie ha un tipo di trasmissione interumana; per ambedue le specie in genere la trasmissione è per aerosolizzazione.

(metti tabella blu)

(metti omino)

DIAGNOSI

Per tutte le clamidie la tecnica clinica utilizzata è sempre la stessa, qualunque sia il loro distretto.

Per il linfogranuloma venereo si hanno dei bubboni, che si sviluppano nel distretto genitale, in cui è possibile trovare il batterio; in altri casi si può andare a osservare la presenza di corpi di inclusione (che hanno caratteristiche morfologiche tipiche per questo genere) nei preparati istologici.

La certezza che un'infezione sia dovuta a un batterio del genere clamida lo si può avere però solo tramite esame con anticorpi specifici anti-clamidia; la diagnosi di infezione da clamidia è quindi in parte istologica e in parte sierologica. Siccome le clamidie non possono essere coltivate, per identificarle in un campione posso andare a cercare il genoma delle clamidie nel campione tramite

PCR quantitativa, che rispetto a una PCR normale ci dà anche informazioni sulla carica batterica, per distinguere un'infezione transitoria (caratterizzata da una bassa carica batterica) da un'infezione di rilevanza clinica. Le clamidie infatti possono essere presenti nella popolazione nonostante non sono flora microbica normale, e gli individui più assoggettati alla presenza di questi batteri sono le persone sessualmente attive, che sono più esposte al contagio.

Le clamidie possono anche venire ricercate nella risposta anticorpale dell'organismo, cercando anticorpi rivolti contro questo agente; lo studio degli anticorpi ci permettono anche di definire il sierotipo. Tutti questi test, a volte combinati, ci permettono di confermare una diagnosi di infezione da clamidia.

TERAPIA

Non avendo lo strato di peptidoglicano non possono essere trattati con farmaci che inibiscono la sintesi di questo strato (tipo le penicilline). Le infezioni da clamidia vengono infatti trattate con gli antibiotici della famiglia delle tetracicline.

C.PNEUMONIE

Questa specie dà infezioni che tendono ad essere croniche e subdole, che colpiscono l'apparato respiratorio e si trasmettono per aerosolizzazione. C.pneumonie è responsabile di polmoniti, che sarà una polmonite che, dal punto di vista radiologico è molto diversa da quella prodotta da altri batteri, perché caratterizzata da necrosi tissutale, senza dare produzione di pus; inoltre il quadro sarà aggravato da una condizione infiammatoria che spesso è cronicizzante.

Per questo agente patogeno, non c'è serbatoio animale, quindi ha scambio interumano.

C. PSITTACI

Questo agente dà luogo a polmoniti interstiziali, difficili da diagnosticare perché la clamidia si replica in via intracellulare, e quindi è difficile da identificare; anche in questo caso l'agente patogeno può essere identificato tramite ricerca degli anticorpi nella risposta dell'organismo infettato. Questa specie, diversamente da C.pneumonie, presenta un serbatoio animale, da cui può partire il contagio.

La differenza di serbatoio tra questa clamidia e quella trattata precedentemente, costituisce un'importante valutazione da fare durante l'anamnesi per determinare la diagnosi.

GENERE CLOSTRIDIUM

CARATTERISTICHE GENERALI

Le caratteristiche comuni che accomunano tutti i clostridi sono:

- sono batteri gram positivi;
- sono sporigeni;
- sono anaerobi stretti;
- sono presenti nel suolo e nell'intestino dell'uomo e degli animali (fanno quindi parte della flora microbica normale);
- le esotossine prodotte da questi batteri svolgono un ruolo patogenico primario;

Essendo batteri sporigeni, i clostridi sono organismi che vivono sotto 2 forme: la prima è quella

vegetativa, che si manifesta durante l'infezione; la seconda è la spora ed è la responsabile del mantenimento dell'infezione nella popolazione (per eliminare questa forma in genere non basta la bollitura, ma bisognerà trattare i dispositivi o gli ambienti da sterilizzare con altissime temperature o con esposizione ai raggi gamma).

Le spore sono quelle che in genere determinano l'infezione del paziente.

Nel genere clostridium ci sono tante specie che danno diverse patologie. Di queste specie noi osserveremo:

- C.botulinum, che producendo la tossina botulinica costituisce il principale agente eziologico del botulismo;
- C.tetanii, che producendo la tossina tetanica è il principale agente eziologico del tetano;
- C.difficile, responsabile della colite pseudomembranosa;
- C.perfringens, che è uno dei tanti in grado di provocare gangrena gassosa (che si sviluppa quando c'è un tessuto necrotico contaminato da spore); può dare anche intossicazioni alimentari.

I clostridi che infettano l'uomo sono moltissimi, ma tutte quante presentano le caratteristiche generali precedentemente elencate.

CLOSTRIDIUM BOTULINUM

CARATTERISTICHE GENERALI

Le caratteristiche che accomunano tutti i ceppi di questa specie sono:

- gram positività,
- l'essere anaerobi obbligati
- le richieste nutrizionali esigenti
- la produzione di una delle 7 varianti della tossina botulinica (che hanno però tutte gli stessi effetti, variano solo nell'antigenicità);
- produzione di lipasi da parte dei ceppi che danno patologia nell'uomo, nonché la capacità di fermentare il glucosio, idrolizzare la gelatina e digerire le proteine del latte;

Il C.botulinum non causa una normale infezione, ma una tossinfezione, causata appunto dall'azione della tossina botulinica da esso prodotta; la presenza di diverse varianti antigeniche della stessa tossina rende più difficile lo sviluppo di un vaccino efficace.

La tossina botulinica impedisce la trasmissione del neurotrasmettitore (Ach) a livello della placca neuromuscolare, causando paralisi flaccida.

INGRESSO E MECCANISMO DELLA TOSSINFEZIONE

La tossinfezione ha quasi sempre inizio per ingestione delle tossine (botulismo alimentare), anche se ci possono essere casi in cui la spora germina all'interno di una ferita dando luogo alla forma vegetativa che produce e mette in circolo la tossina (botulismo da ferita), oppure nell'intestino dei

bambini, che non hanno ancora una flora intestinale ben sviluppata, in grado di esercitare una competizione contro la germinazione di spore di clostridium botulinum, che saranno quindi in grado di produrre e mettere in circolo la tossina (botulismo infantile); gli ultimi 2 casi considerati sono però molto rari.

Il botulismo è una malattia molto grave perché quando si manifesta significa che c'è già la tossina in circolo, e maggiore è la dose di tossina in circolo maggiore è la gravità della tossinfezione. La tossina è assolutamente termolabile, quindi basta qualsiasi processo di riscaldamento (cottura) per evitare qualsiasi intossicazione.

Per dare infezione di tipo alimentare si devono innanzitutto sviluppare delle condizioni di anaerobiosi affinché la spora possa germinare nella sua forma vegetativa, la quale deve trovare un ambiente ideale per attivarsi metabolicamente, proliferare e produrre la tossina; dopodiché l'alimento dovrà essere mangiato crudo per permettere il mantenimento della struttura della proteina tossica.

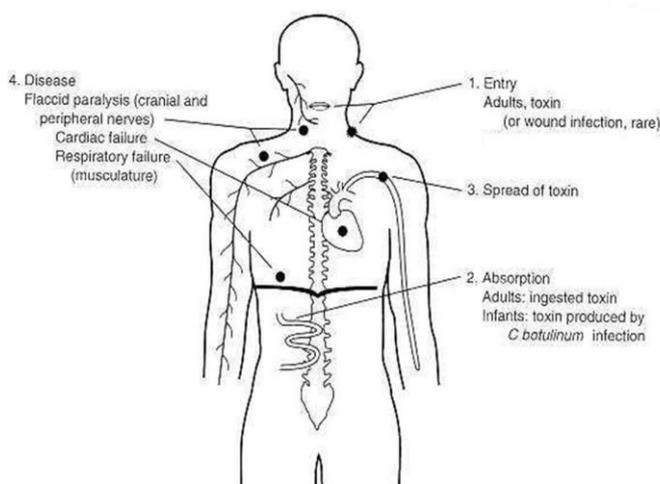
CLOSTRIDIUM TETANI

CARATTERISTICHE GENERALI

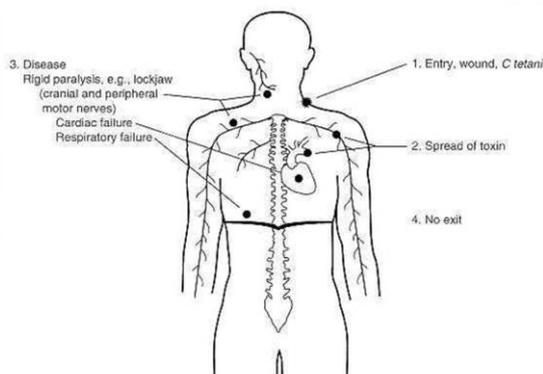
Le caratteristiche che accomunano tutti i ceppi di C.tetani sono:

- gram positività;
- anaerobi obbligati;
- difficoltà nell'isolamento nei campioni clinici;
- sporigeni;
- produzione di esotossine tra cui la tossina tetanica (che è una neurotossina termolabile, che blocca il rilascio di trasmettitori

PATOGENESI DEL BOTULISMO CAUSATO DA C. BOTULINUM



PATOGENESI DEL TETANO CAUSATO DA C. TETANI



quali GABA e glicina nelle sinapsi inibitorie);

C.tetani, al contrario del precedente, dà luogo a una vera e propria infezione, che ha inizio con il contagio da spore.

INGRESSO E MECCANISMI DI INFEZIONE

La tossina in genere entra tramite soluzioni di continuità della cute (ferite, lacerazioni, punture, ferite chirurgiche, ecc...). Una volta entrata la spora germina dando origine alla forma vegetativa che (se l'individuo non è vaccinato) prolifera nel punto in cui è stato inoculato (perché questi batteri sono dotati di bassa capacità invasiva) e inizia a produrre la tossina, che poi può entrare in circolo e andare ad esplicare i suoi effetti su tutto l'organismo. La fuoriuscita di questo batterio non avviene da nessuna parte, quindi non ci si infetta da un individuo affetto da tetano.

La tossina botulinica agisce sempre a livello della muscolatura, inducendo paralisi spastica e perdita della funzionalità muscolare. Siccome questa tossina è presente in un'unica forma antigenica è stato possibile sviluppare un vaccino, che è un vaccino ricombinante, cioè una molecola che contiene gli antigeni della tossina determinando la produzione di anticorpi contro di essa.

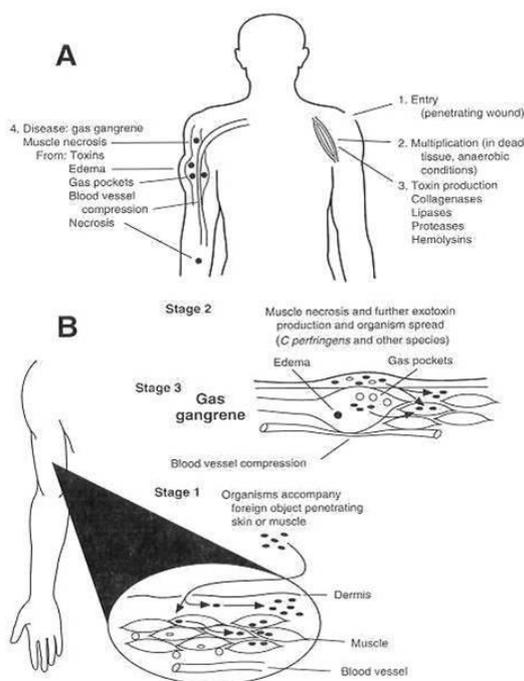
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

CARATTERISTICHE GENERALI

Le caratteristiche che accomunano i ceppi batterici di questa specie sono:

- gram positività;
- forma larga e rettangolare;
- capacità di produrre spore;
- alta velocità di replicazione;
- capacità di produrre tossine ed enzimi emolitici;
- capacità di produrre lecitinasi;
- suddivisione in 5 sottotipi sulla base della variante antigenica della tossina prodotta.

Questo clostridio è responsabile della gangrena gassosa, cioè dell'infezione di tessuti molli. Questa infezione è di tipo distruttiva, perché a seguito della contaminazione di una ferita con spore di *C.perfringens*, si ha la germinazione delle spore (perché in una ferita c'è scarsa ossigenazione), e si vengono a formare le forme vegetative che producono le tossine e gli esoenzimi tipiche di questa specie, che distruggono i tessuti (si parla di tossine necrotizzanti). Dal punto di vista sintomatico si



osserva la formazione di bolle, dovute al metabolismo batterico; la formazione di queste bolle è essenziale per il mantenimento del batterio, perchè costringono i capillari e riduce l'ossigenazione dei tessuti, mantenendo questo stato di anaerobiosi necessario per il mantenimento della forma vegetativa. La necrosi prodotta determina la distruzione dei tessuti.

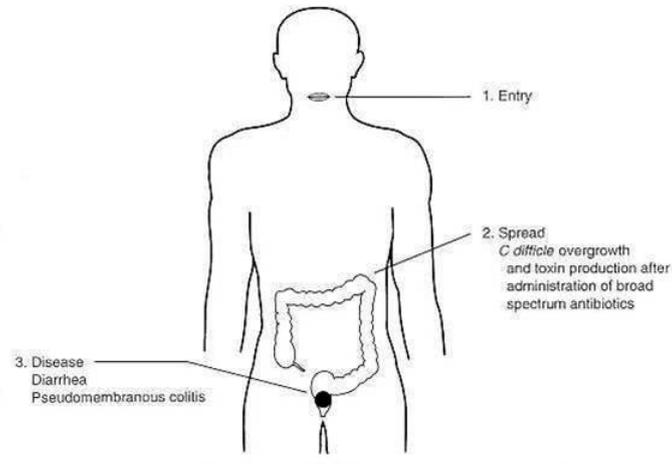
CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Il *C.difficile* è un esempio di infezione causata da terapia antibiotica, in quanto quest'infezione è tipica di soggetti sottoposti a lunga terapia antibiotica, che altera la flora microbica normale (anche le prolungate terapie con cortisone producono lo stesso effetto).

Ciò che avviene è appunto

l'alterazione della flora microbica intestinale, lasciando spazio alla germinazione di spore di *C.difficile* (che possono essere presenti nella popolazione).

C.difficile dà una patologia intestinale che si manifesta con eventi diarroici che possono portare a una forma di colite cronica detta colite pseudomembranosa, in cui la mucosa intestinale viene sostituita da tessuto fibrotico.



GENERE BACILLUS

CARATTERISTICHE GENERALI

In generale, i batteri di questa categoria presentano le seguenti caratteristiche in comune:

- sono di forma bastoncellare;
- sono reattivi alla colorazione di Gram (gram+);
- sono immobili;
- sono uno dei 2 generi sporulanti di interesse medico;
- sono saprofiti (sono nella flora microbica normale);

B.ANTHRACIS

Questo genere comprende il bacillus anthracis, agente eziologico del carbonchio, che attualmente ha scarsa rilevanza clinica perchè debellato nei paesi industrializzati. Il batterio presenta dimensioni di 3-8 micron e una morfologia in cui è disposto come singole cellule o a coppie (solo nei campioni clinici) oppure formando lunghe catene serpentiformi (nelle colture cellulari).

BACILLUS CEREUS

Il B. cereus è un bacillus di grande importanza medica, che da un'intossicazione alimentare, con modalità di manifestazione di 2 tipi:

- emetica; manifestazione che si evidenzia poco tempo dopo l'ingestione degli alimenti, quando la tossina, oltre al batterio, era già presente in grande quantità negli alimenti;
- diarroica; questa manifestazione si evidenzia in modo più tardivo, in quanto la tossina non era presente nell'alimento infetto, ma solo il bacillus, il quale si sviluppa a livello intestinale; qui germinano le spore, con periodo di incubazione un po' più lungo.

Queste 2 modalità di manifestazione si spiegano con il fatto che esso produce 2 tipi di enterotossine:

- la tossina emetica, stabile al calore e di basso peso molecolare, che causa il vomito;
- la tossina diarroica, sensibile al calore e di alto peso molecolare, che causa diarrea;

Tra le altre caratteristiche di B.cereus ricordiamo come esso sia gram positivo, aerobi facoltativo, mobile ed emolitico e sporigeno. L'intossicazione da B. cereus è molto frequente e riguarda quasi tutti i tipi di alimenti.

BRUCELLE (zoonosi)

CARATTERISTICHE GENERALI

Sono parassiti endocellulari facoltativi, ovvero sono batteri classici che possono crescere sui normali terreni di coltura, però il loro ciclo biologico può prevedere la loro persistenza nelle cellule, in particolare nei macrofagi; grazie a questa proprietà questi batteri tendono a dare infezioni croniche. Le Brucelle sono coccobacilli gram-, non capsulati e immobili. Nel genere Brucella ci sono molte specie che danno la brucellosi (B.abortus, B.melitensis, B.suis e B.canis), ed in genere proliferano a livello della placenta degli animali e meglio qua perchè è ricco di eritrolo, (zucchero che non è presente nella placenta umana) e possono dare origine a episodi abortivi. Nella placenta umana invece non è presente eritrolo.

TRASMISSIONE DEL BATTERIO E INGRESSO NELL'ORGANISMO

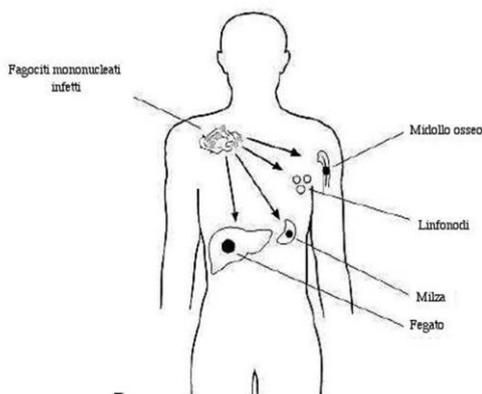
Questi batteri non sono trasmessi per contatto interumano, ma si trasmettono dall'animale infetto. Il controllo della malattia negli animali ha ridotto l'incidenza delle infezioni nell'uomo. Tutti gli animali domestici possono trasmettere la malattia, sia per contatto diretto che attraverso il latte, attraverso il contatto oppure durante la macellazione. Nell'uomo la via di ingresso del batterio è per inalazione o per ingestione, ma può entrare anche attraverso piccole lesioni della cute.

Una volta penetrati, qualunque sia la via di ingresso, i batteri danno origine a brucellosi, che è una patologia sistemica, in cui si ha infezione dei macrofagi del sistema reticolo-endoteliale, con penetrazione all'interno del macrofago stesso. Il sintomo principale sono lesioni granulomatose.

GRANULOMA: lesione infiammatoria localizzata dovuta a un evento (in questo caso infettivo).

Le brucelle in questo caso costituiscono dei PAMPs, che inducono infiammazione e formazione del granuloma. I granulomi si formano in vari distretti corporei (vedi omino), quali milza, fegato, linfonodi e fagociti mononucleati.

Localizzazione



MICOBATTERI

Sono batteri ubiquitari e massicciamente diffusi nella popolazione. Danno una forma di infezione cronica, perchè possono esistere in una forma latente, che può riattivarsi quando le condizioni sono favorevoli, come nel caso di una situazione di deficit del sistema immunitario.

CARATTERISTICHE GENERALI

Questi microorganismi presentano alcune caratteristiche comuni:

- sono bacilli aerobi;



Per diagnosticare la brucellosi di solito si utilizzavano i sintomi sistemici, ed in particolare ci si basa su l'andamento ondulante della febbre in questo tipo di patologia; si affianca a queste osservazioni, test biochimici, necessari per la conferma della diagnosi, quali l'analisi degli anticorpi anti-brucella.

La brucella può essere poi coltivata direttamente da campioni di sangue (emocoltura) o da campioni di midollo osseo (prelievo tramite biopsia).

- sono lunghi 2-4 micron;
- sono immobili;
- asporigeni;
- non capsulati

Appartengono alla linea evolutiva degli attinomiceti (ma non appartengono a questa classe di procarioti, in quanto i micobatteri sono eucarioti) e hanno una parete cellulare molto complessa, che non assomiglia nè a quella dei gram + nè a quella dei gram-; infatti non si colora con la colorazione di gram. La caratteristica principale della loro parete è che è molto ricca di lipidi (che costituiscono più del 50% del peso secco della parete), al di sotto dei quali c'è un piccolo strato di peptidoglicano. Questo spesso strato lipidico presente nella parete dei micobatteri è il motivo della loro mancanza di reattività alla colorazione di gram; Questi organismi quindi vengono identificati tramite la colorazione di Ziehl-Neelsen, che necessita di una fase di riscaldamento della coltura microbica, che fa "aprire leggermente i lipidi dello strato esterno della parete, permettendo al colorante di andare a interagire con le strutture proteiche della parete. Questa colorazione permette di evidenziare i micobatteri e permette di distinguerli da qualunque altra specie presente nel campione, perchè solo i micobatteri si evidenzieranno in colore rosa, quindi con questa colorazione possiamo fare una colorazione diretta su un campione preso da sito con flora microbica normale. Questo non può essere fatto con altre colorazioni, perchè otterremmo un risultato caotico, mentre con la colorazione di Ziel-Neelsen otterremmo la messa in evidenza dei micobatteri. L'unico campione biologico che può essere direttamente colorato con colorazione di gram è il campione di liquido cefalo-rachidiano, perchè normalmente sterile, e quindi una qualsiasi positività alla colorazione rappresenterebbe un'importante evidenza diagnostica.

TASSONOMIA DEI MICOBATTERI

Nel genere *Micobacterium* ci sono tantissime specie che sono state isolate (circa 74), il che ha imposto la necessità di stipulare una classificazione dei micobatteri.

La classificazione dei micobatteri è cambiata moltissimo negli ultimi anni (in particolare i discriminanti delle varie sottoclassi, come per esempio la velocità di crescita, la produzione di pigmenti, ecc...). A questa classificazione in base a caratteristiche discriminanti, in quest'ambito preferiremo suddividere i batteri in batteri del gruppo "tuberculosis", che sono i più patogeni, e batteri del gruppo "non-tuberculosis", meno patogeni dei precedenti. I batteri del *tuberculosis complex* sono le specie:

- *M.tuberculosis*;
- *M.bovis*;
- *M.microtii*;
- *M.africanum*;

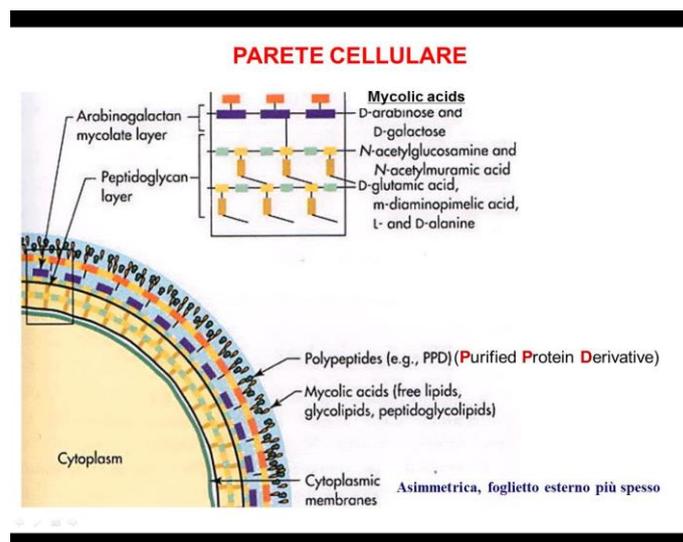
e sono quelli che noi associamo alla malattia tubercolosi.

I batteri del gruppo "non-tuberculosis" (vedi tabella) circolano nella popolazione e possono essere responsabili di reattività nella popolazione a micobatteri; questa classe di micobatteri non è facilmente identificabile, perché i sintomi delle patologie da essi causate sono meno marcati e meno caratteristici (Esempio. In un paziente affetto da un micobatterio del gruppo "tuberculosis", se l'infezione è a carico del apparato respiratorio, possiamo trovare caratteristiche caverne tubercolari, che sono un segno patognomico dell'infezione da questo tipo di batterio; nell'infezione da batteri del gruppo "non tuberculosis" non troviamo caverne tubercolari come nelle tuberculosis).

Diapositive sulla parete dei micobatteri (mettilo un disegno)

STRUTTURA DELLA PARETE DEI MICOBATTERI

Nella parete sono presenti diversi tipi di acidi micolici, complessati con degli zuccheri, che rappresentano le strutture più esterne sulla parete dei micobatteri e quindi responsabili della antigenicità del micobatterio stesso; queste strutture sono molto importanti anche per la patogenicità dei micobatteri, in quanto essa si basa unicamente sullo sviluppo di una risposta infiammatoria, con stimolazione attraverso l'esposizione di strutture appartenenti alla famiglia dei PRR.



FATTORI ANTIGENICI E DIAGNOSI

Tutte le strutture presenti sulla superficie della parete possono essere polisaccaridi o proteine; gli

TABELLA 29-1. Classificazione di micobatteri patogeni per l'uomo

Organismo	Patogenicità	Frequenza negli U.S.A.
Non gruppo di Runyon		
<i>M. tuberculosis</i>	Patogeno stretto	Comune
<i>M. leprae</i>	Patogeno stretto	Non comune
<i>M. africanum</i>	Patogeno stretto	Raro
<i>M. bovis</i>	Patogeno stretto	Raro
<i>M. bovis (BCG strain)</i>	Qualche volta patogeno	Raro
Runyon gruppo I (Fotocromogeni a crescita lenta)		
<i>M. kansasii</i>	Normalmente patogeno	Comune
<i>M. marinum</i>	Normalmente patogeno	Non comune
<i>M. simiae</i>	Normalmente patogeno	Non comune
Runyon gruppo II (Scotocromogeni a crescita lenta)		
<i>M. szulgai</i>	Normalmente patogeno	Non comune
<i>M. scrofulaceum</i>	Qualche volta patogeno	Non comune
<i>M. xenopi</i>	Qualche volta patogeno	Non comune
Runyon gruppo III (Noncromogeni a crescita lenta)		
<i>M. avium complex</i>	Normalmente patogeno	Comune
<i>M. genavense</i>	Normalmente patogeno	Non comune
<i>M. haemophilum</i>	Normalmente patogeno	Non comune
<i>M. malmoense</i>	Normalmente patogeno	Non comune
<i>M. ulcerans</i>	Normalmente patogeno	Non comune
Runyon gruppo IV (A crescita rapida)		
<i>M. abscessus</i>	Qualche volta patogeno	Comune
<i>M. chelonae</i>	Qualche volta patogeno	Comune
<i>M. fortuitum</i>	Qualche volta patogeno	Comune
<i>M. mucogenicum</i>	Qualche volta patogeno	Non comune

I micobatteri danno origine a strutture granulomatose che progrediscono, perché questi micobatteri non vengono distrutti dal sistema immunitario e si possono fondere portando alla formazione di cavità sempre più grosse nel polmone; ciò avviene se l'infezione è localizzata. Se l'infezione da batteri del gruppo "tuberculosis" è diffusa, è ancora ad oggi molto difficile da curare e da identificare perché si evidenziano sintomi aspecifici.

antigeni proteici dei micobatteri sono le strutture di superficie utilizzati a scopo diagnostico.

L'infezione da micobatterio è quasi sempre un'infezione da riattivazione di un'infezione primaria, il che significa che la risposta del nostro organismo a questa riattivazione è una risposta secondaria. Grazie a questa osservazione, soprattutto nella fase iniziale della riattivazione, si può diagnosticare l'infezione da parte di questo tipo di batteri usando i PPD (purified protein derivative) (antigeni utilizzati per la ricerca degli anticorpi), i quali verranno legati dagli anticorpi già presenti, dovuti all'esistenza della memoria immunologica. La coltivazione dei micobatteri non si può fare nelle piastre di Petri, in quanto questi batteri necessitano di lunghi tempi di incubazione, che determinerebbero l'essiccazione del terreno nell'incubatore. La coltivazione di questi organismi avviene in delle provette di vetro, chiuse con un tappo, in cui il terreno viene fatto solidificare "a becco di canarino" (cioè in modo che la superficie colturale sia obliqua rispetto all'orlo della provetta), e su questo piano obliquo verranno inoculati i batteri, che daranno origine a una patina. I micobatteri sono molto esigenti dal punto di vista della crescita, infatti questi terreni sono molto ricchi di grassi. Inoltre, i micobatteri non danno una grande espansione batterica (cioè rimangono numericamente scarsi) e quindi l'indagine colturale è di solito meno efficace (appunto per la scarsità di materiale da analizzare).

La diagnosi definitiva di infezione da micobatterio tubercolosi necessita però dell'esecuzione in parallelo sia dell'esame sierologico che dell'esame colturale.

Eseguita la coltivazione del batterio ed effettuato il suo isolamento, si può fare la tipizzazione del ceppo attraverso test di tipo biochimico.

M. TUBERCOLOSIS

Questa specie è l'agente eziologico della tubercolosi umana e può dare luogo a 2 tipi di infezione:

- infezione primaria; avviene quando la carica microbica è troppo alta, cosa che avviene se il soggetto si trova in una condizione di immunodepressione o se la clearance del batterio è bassa. Se i batteri arrivano nella parte bassa del polmone, entrano nei macrofagi e stimolano una risposta infiammatoria. Inizialmente l'infezione si mantiene silente, cioè fino a quando i batteri si moltiplicano nei granulomi. Si parla di tubercolosi miliare quando i granulomi sono dispersi in tutto l'organismo e può portare a morte l'individuo. Nella grande parte dei casi l'infezione primaria però si risolve, cosa che può avvenire in 2 modi: tramite la sterilizzazione di questi granulomi; tramite silenziamento del batterio, che però rimangono in alcuni distretti dell'organismo dove possono riattivarsi. La diffusione dell'infezione primaria da micobatterio può poi espandersi dal sito iniziale polmonare determinando un'infezione generalizzata in tutto l'organismo.
- Quando l'omeostasi viene meno, il batterio silenziato viene riattivato dando luogo all'"infezione post-primaria". Questa secondo tipo di infezione da origine a lesioni granulomatose, al centro delle quali vi sono zone con episodi di necrosi caseosa, nelle quali con colorazione di Ziehl-Neelsen si possono trovare i micobatteri.

Da quanto visto precedentemente, l'infezione tubercolare da *M.tuberculosis* è una infezione primaria che può fermarsi oppure silenziarsi; se non si silenzia può dar luogo a un'infezione post-primaria che può poi espandersi a livello sistemico.

DIAGNOSI

Se io valuto soltanto la memoria immunitaria nel paziente non posso sapere lo stato del batterio nel paziente (ovvero se esso è stato rimosso, è silenziato o si sta riattivando), ma questa analisi mi dirà se l'individuo è venuto a contatto o meno con il batterio. Uno dei segni più utilizzati per la conferma di una diagnosi di infezione da micobatterio è l'analisi del complesso primario di Ghon, composto da:

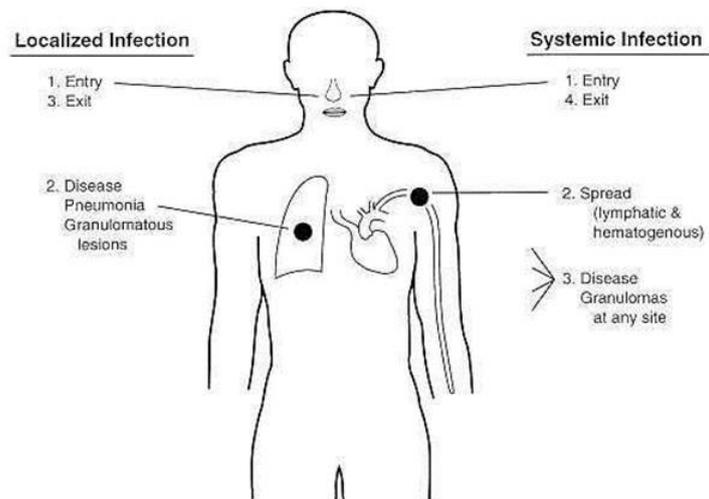
- lesione parenchimale e subpleurica (solitamente nel polmone di destra) nella scissura interlobare fra lobo superiore e medio;
- lesione linfonodale ilare caseosa;
- adenopatia satellite;

Le infezioni primaria e post-primaria possono anche essere classificate come localizzata o sistemica:

- nell'infezione localizzata l'ingresso del batterio nell'organismo avviene per inalazione, per poi spostarsi nel polmone (dove dà origine a polmonite e lesioni granulomatose) per poi potersi diffondere ad altri distretti ed essere espulso nuovamente per aerosolizzazione;
- l'infezione è sistemica quando il batterio va ad instaurarsi in tutti i tessuti dove riesce a dare origine a questi granulomi;

PATOGENESI

I micobatteri in genere infettano i macrofagi e possono resistere all'interno di essi, in quanto resistono al killing intracellulare operato da queste cellule; questa loro abilità gli permette di mantenersi, anche in forme latenti, all'interno dell'organismo. Allo stesso tempo però la presenza di questi organismi estranei nell'organismo, gli permette di attivare una risposta immunitaria che ne permette l'eliminazione; questo ciclo di risposta infiammatoria e resistenza permette di mantenere l'esistenza del granuloma.

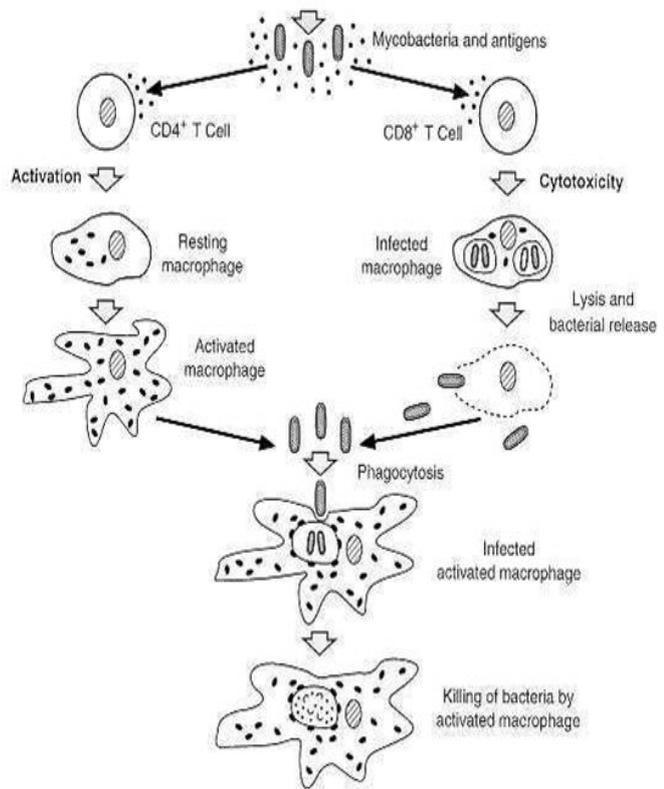


VIRULENZA

I micobatteri non producono né capsula né tossine, infatti la loro virulenza si basa semplicemente sulla loro capacità di resistere all'interno delle cellule, che è un processo mediato grazie alla presenza di specifiche proteine. Fondamentale è inoltre la predisposizione genetica dell'individuo a questo tipo di infezione.

Riassumendo quindi possiamo osservare come i fattori di virulenza dei micobatteri siano:

- il fatto di essere capace di replicare nei macrofagi non attivati e possono sopravvivere per anni in uno stato quiescente;
- la malattia dipende dalla risposta immunitaria dell'ospite all'infezione, più che da un azione diretta di enzimi batterici o tossine;
- la parete ricca di lipidi caratteristica di questi organismi gli conferisce una buona resistenza a disinfettanti, detergenti, antibiotici, antibatterici e colorazioni tradizionali



MICOBATTERI (continua lezione precedente)

PROCESSO INFETTIVO

I micobatteri, una volta penetrati all'interno dell'individuo, possono seguire un percorso diverso e a stadi successivi:

- innanzitutto avviene il contatto con il batterio, ma è possibile una rapida eliminazione dello stesso, e assenza di manifestazioni;
- se il batterio non viene eliminato, avviene il raggiungimento degli alveoli, dove vengono inglobati dai macrofagi; parte dei batteri vengono uccisi dai macrofagi e liberano antigeni caratteristici che possono dare luogo a una risposta infiammatoria;
- i batteri che resistono all'azione dei macrofagi danno inizio alla formazione di un granuloma tubercolare, detto anche tubercolo;
- lo sviluppo del tubercolo può esitare nella continuazione della proliferazione batterica o nella sterilizzazione ad opera del sistema immunitario del sito infettivo; in qualsiasi caso, una volta arrivati a questo punto, rimane la memoria immunologica per il batterio;
- se il tubercolo non viene sterilizzato dall'azione immunitaria, si passa alla fase cronica con persistenza del batterio nell'organismo

La persistenza dei micobatteri nell'organismo può non dare luogo a patologia se la sorveglianza immunologica del complesso primario è sufficiente, ma se essa viene meno si può riattivare il complesso primario e portare alla formazione di nuovi granulomi, anche in sedi diverse da quella polmonare: si possono avere infatti tubercolosi renale, meningea, ossea, ecc... Questa variabilità di sede dell'infezione rappresenta un ulteriore ostacolo nel giungere a una diagnosi.

DIAGNOSI

I sintomi dell'infezione all'inizio sono assolutamente generici, in quanto all'inizio i granulomi sono piccoli e possono essere poco visibili alle indagini radiologiche; esistono però una serie di test che si basano sulla risposta immunitaria dell'organismo contro l'agente infettivo, ma anche test microbiologici. I 4 test più importanti per la diagnosi di infezione da micobatteri sono:

- test cutaneo per valutare la risposta immunitaria, o test di mantoux;
- analisi microscopica con colorazione di Ziehl-Neelsen, molto importante quando c'è un campione biologico disponibile (che può essere un campione di espettorato o prelievi diretti di materiale biologico come la broncoscopia), che, qual'ora possibile, deve essere sempre fatto;
- PCR quantitativa per la ricerca del genoma batterico, che può però essere falsata dal fatto che esistono più di 40 specie di micobatteri, e trovare dei primer che siano in grado di riconoscere tutte queste specie è molto difficile;
- test colturali, per ottenere la coltura e farne la tipizzazione biochimica

La colorazione di Ziehl-Neelsen fa sì che i micobatteri diventino rosa, mentre il resto dei batteri presenti nel campione diventano blu, il che evidenzia la forma bastoncellare e allungata dei micobatteri.

I Micobatteri presentano caratteristiche metaboliche molto esigenti e crescono solo su terreni

specifici, quali il terreno di Petraghani. Per far crescere i micobatteri si deve fare test di decontaminazione, soprattutto se si parte da secrezioni respiratorie, perchè contengono molti batteri, che possono interferire con la crescita dei micobatteri; con questo trattamento (simile all'arricchimento che si fa con le salmonelle nei campioni fecali) si va ad eliminare le specie non micobatteriche, permettendo quindi di isolare quest'ultimi. Una volta isolate sui terreni di coltura, i batteri possono essere esaminati biochimicamente per identificare specie e ceppo del micobatterio.

REAZIONE DI MANTOUX

La parete dei micobatteri contiene una serie di antigeni, anche di natura proteica, che vengono utilizzati per preparare la PPD (Purified-Protein-Derivative), che vengono inoculati con iniezione intradermica nel test della tubercolina, che è un esame che è in grado di identificare soggetti che sono venuti a contatto con il *M.tuberculosis* e si va a osservare una reazione di ipersensibilità di tipo ritardato; questa consiste nella formazione di un ponfo rosso nel giro di 24/48h se il soggetto è venuto a contatto con l'organismo. Il test può essere falsato dalle condizioni immunitarie del soggetto. Questo test mi permette di dividere i soggetti tra "negativi", che vanno esclusi da successive indagini e "positivi", su cui invece andranno condotti ulteriori test.

TEST QUANTIFERON

Nell'indagine diagnostica per infezioni da micobatteri si può proseguire con test immunologici e radiologici; in particolare, un nuovo esame che è stato collaudato negli ultimi anni è il test quantiferon, che si basa sul fatto che i linfociti T periferici, se sono stati sensibilizzati a un determinato antigene e vengono messi a contatto nuovamente con quell'antigene, producono notevoli quantità di INF-gamma. La quantificazione dell'INF-gamma serve per quantificare la risposta dei linfociti T, il che ci serve per osservare se questi sono già stati sensibilizzati; in questo caso, la produzione di INF-gamma sarà aumentata. Il vantaggio di questo test è che mi permette di effettuare una valutazione quantitativa della risposta immunitaria: più alta è la risposta immunitaria più alta è la sensibilità dell'individuo e con essa la probabilità che vi sia un'infezione in corso.

ALTRI ESAMI

Fatti questi test immunologici, la diagnosi viene completata ricercando i granulomi tipici di questi batteri con un prelievo biotico, che verrà utilizzato anche per allestire una coltura cellulare, che mi permetterà di effettuare la tipizzazione biochimica e confermare la diagnosi.

TERAPIA

La terapia contro la tubercolosi è una terapia multifarmaco che deve essere prolungata nel tempo (per 3 settimane circa). I farmaci sono specifici per il micobatterio tubercolosi (che sono in grado di penetrare la spessa membrana cellulare ricca di steroli) ma possono comunque produrre alterazioni della flora microbica normale, quindi un soggetto che sta eseguendo una terapia antibiotica può sempre essere soggetto a tutte quelle patologiedovute a tale alterazione.

LA LEBBRA (sulla lebbra non si è soffermata per nulla)

Questa patologia è dovuta all'infezione di un micobatterio, che da manifestazione soprattutto cutanea, ma anche polmonare. (fine)

I MICOPLASMI

Sono sempre batteri atipici e per questo la loro diagnosi è sempre difficile, perché danno sintomi aspecifici e non caratteristici. Tendono a dare infezioni croniche e sono importanti soprattutto a livello polmonare (in particolare, prenderemo in considerazione micoplasma pneumoniae). La coltivazione di questi organismi presenta particolari difficoltà.

PROPRIETÀ	MICOPLASMI	BATTERI	CLAMIDIE	VIRUS
Dimensione (diametro)	0,3 μm^*	1-2 μm	0,3 μm	<0,5 μm
Parete cellulare	-	+	+	-
Presenza simultanea di DNA ed RNA	+	+	+	-
Moltiplicazione in terreno acellulare	+	+	-	-
Moltiplicazione dipendente dall'acido nucleico dell'ospite	-	-	-	+
Richiesta di steroli per la propagazione	+	-	-	-
Metabolismo energetico intrinseco	+	+	+	-
Range di specificità dell'ospite generalmente limitato	+	-	-	+
Resistenza agli antibiotici attivi sulla parete batterica (penicilline)	+	-	-	+

* I più piccoli organismi in grado di replicarsi

CARATTERISTICHE GENERALI

- sono organismi molto piccoli (0,3 micron) e sono i più piccoli microorganismi in grado di replicarsi;
- sono privi di parete batterica, ma hanno una membrana plasmatica ricca di steroli;
- sono resistenti agli antibiotici che agiscono sulla sintesi della parete batterica;
- le infezioni che causano sono generalmente croniche e subdole.

CLASSIFICAZIONE

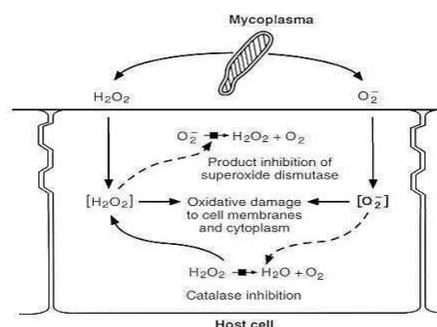
I micoplasmi appartengono alla classe dei "mollicutes", in cui sono presenti i generi mycoplasma e ureaplasma; Le specie che andremo a considerare nel genere mycoplasma sono il micoplasma pneumoniae e il micoplasma hominis (ci sono altre 10 specie che danno sempre patologia nell'uomo ma che non andremo a considerare); nel genere ureaplasma ha un ruolo rilevante invece l'ureaplasma urealyticum:

- M.pneumoniae è in genere associato alle patologie delle vie respiratorie superiori;
- M.hominis è associato a infezioni dell'apparato genitourinario, con impatto sanitario minore delle infezioni causate da M.pneumoniae;
- U.urealyticum è associato a infezioni dell'apparato genitourinario, dove dà luogo a uretriti non-gonococciche.

M.PNEUMONIE

PATOGENESI

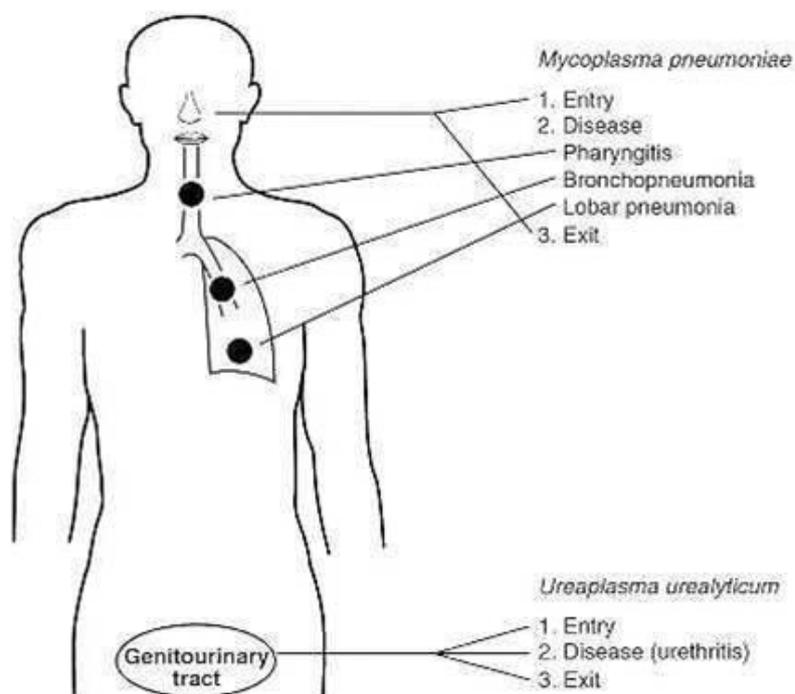
M.pneumoniae è l'unico aerobio obbligato e dà luogo ad una polmonite atipica primaria dovuta all'innescimento di un processo infiammatorio cronico del parenchima polmonare, che si spiega attraverso un meccanismo di adesione dei batteri al parenchima stesso (metti diapositiva) e con un meccanismo di intossicazione di tipo ossidativo;



producono infatti anione superossido, che porta alla formazione anche di perossido di idrogeno, che causa danno ossidativo alle cellule parenchimali polmonari e del distretto respiratorio. I micoplasmi a livello respiratorio entrano e si diffondono per aerosolizzazione nell'ambiente esterno.

U. UREALYTICUM

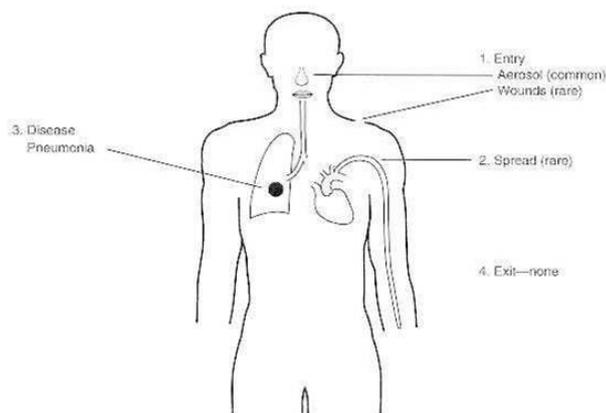
Questo agente produce infezioni a livello genitale, dove però può essere presente come infezione transitoria dovuta a rapporti sessuali; quindi se io trovo questo batterio in un uretrite, non è detto che sia proprio lui la causa di infezione, ma dovrò fare una PCR quantitativa per valutare la carica batterica: se è bassa, l'agente eziologico sarà un altro. La via di ingresso segue la via genitourinaria, con trasmissione sessuale.



LEGIONELLE

Le legionelle danno tendenzialmente infezioni a livello dell'apparato respiratorio e in particolare polmoniti.

Sono state scoperte abbastanza recentemente, in quanto davano epidemie di polmoniti nelle legioni militari; successivamente si è capito che la contaminazione da legionelle arrivava dall'acqua stagnante, che a seguito di aerosolizzazione viene diffusa nell'ambiente, da dove potrà essere inspirata e andare a contagiare l'ospite. Il genere legionella in realtà



contiene più di 50 specie, ma noi interessa solo *L.pneumophila*;

Le legionelle sono sempre state studiate come epidemia, in particolare di *L.pneumophila*, anche se negli anni è stata evidenziata anche un altro tipo di legionella nell'epidemia denominata pontiac (nome della città in cui si è sviluppata l'epidemia). Questo secondo tipo di epidemia da sintomi sistemici simili a quelli influenzali e polmonite.

L'ingresso di questi batteri comunque entrano e si diffondono per aerosolizzazione di acqua che viene inspirato ed espirato.

Tra le caratteristiche generali osserviamo inoltre che sono batteri gram negativi.

La loro patogenicità è dovuta al fatto che si replicano nei macrofagi.

SPIROCHETE

CARATTERISTICHE GENERALI

Anche le spirochete sono batteri atipici e all'interno di questo gruppo ci sono 3 generi importanti dal punto di vista clinico:

- genere *Treponema* a cui viene associata la sifilide (data da *T.pallidum*);
- genere *Borrelia* a cui viene associata la borreliosi o malattia di Lyme;
- genere *Leptospirae* a cui viene associata la leptospirosi

Questi sono 3 generi completamente diversi che differiscono per molte caratteristiche e anche per la modalità di trasmissione. L'unica caratteristica che accomuna tutti e 3 questi generi è che sono spirochete; le caratteristiche generali delle spirochete sono:

- che sono gram negativi;
- che sono caratterizzate dal fatto che sono molto lunghi (15-20 micron);
- che sono spiraliformi (da cui deriva anche la seconda denominazione "spirilli");
- che si muovono grazie all'azione dei loro endoflagelli (flagelli che stanno dentro il corpo batterico);

La loro larghezza a volte non supera gli 0,5 micron e per questo necessitano di essere colorati per essere visti al microscopio ottico, per aumentare il contrasto tra corpo batterico e sfondo. Ad eccezione dei treponemi, che possono essere coltivati solo nel testicolo del coniglio, tutte le spirochete possono essere coltivate in terreni specifici senza troppe difficoltà.

DISTRIBUZIONE

Treponema pallidum, come abbiamo già detto, è l'agente eziologico associato alla sifilide, che è una malattia a trasmissione sessuale, controllabile però con semplici regole igienico-sanitarie.

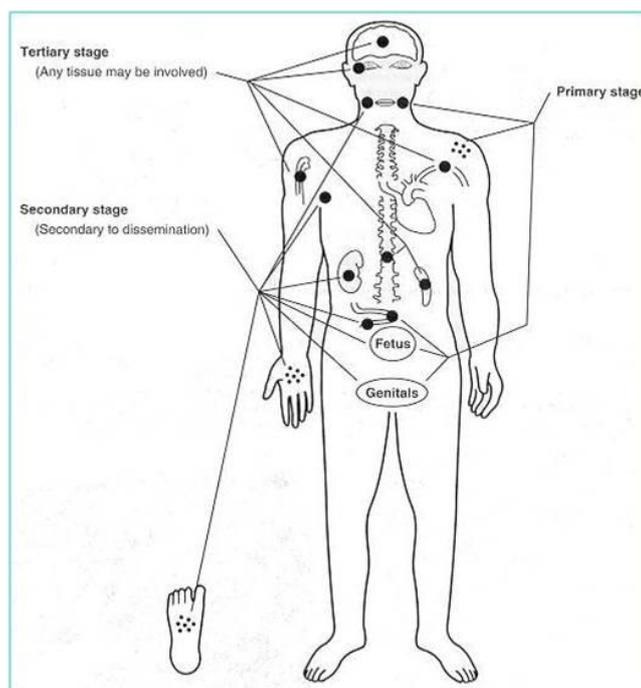
I batteri del genere *Borrelia* e *Leptospira* sono invece zoonosi con serbatoio animale e la loro trasmissione è mediata dagli animali stessi:

- *Borrelia* è associata all'esposizione alle zecche, che stanno in particolari aree geografiche e danno luogo alla malattia nota come "borreliosi" o malattia di Lyme; in questo genere ricordiamo la specie *B.Burgdoferi*;
- *Leptospire* hanno serbatoio animale, in particolare nei roditori, e penetrano nell'organismo attraverso soluzioni di continuo della cute che entrano in contatto con le urine dei roditori.

TREPONEMA PALLIDUM E SIFILIDE

La sifilide (o lue) è una malattia a contagio interumano e trasmissione sessuale con incubazione di circa 3 settimane. La sifilide è una malattia progressiva che parte dal distretto genitale ma si diffonde a tutto l'organismo e diventa una malattia sistemica, seguendo un percorso a 3 stadi separati:

- sifiloma primario: ulcera genitale linfoadenite dei linfonodi della regione genitale, cioè tumefazione della mucosa genitale che interessa anche i linfonodi. La diagnosi deve essere fatta in questa prima fase per evitare la diffusione della malattia;
- sifiloma secondario: in cui si ha la comparsa di esantemi cutanei;
- sifiloma terziario: si ha coinvolgimento di SNC e sistema cardiovascolare.



La patogenicità è legata soprattutto alla sua capacità invasiva.

Esiste anche una forma di sifilide congenita, in cui la trasmissione coinvolge una madre infetta che contagia il feto.

DIAGNOSI

Non essendo il treponema coltivabile, la diagnosi di infezione da *T.pallidum* non segue delle vie classiche; l'indagine è resa anche più complicata per via del fatto che l'infezione presenta un iniziale periodo in cui non ci sono sintomi o sono pochi.

I test per identificare la sifilide sono test immunologici, che vanno a ricercare gli anticorpi nel siero diretti contro il *T.pallidum*, e appartengono a tutta una serie di test di screening che vengono fatte per popolazioni che lo necessitano per particolari motivazioni (lavoro, comunità, ecc...). Anche questo monitoraggio viene effettuato attraverso indagine sierologica.

Il campione di partenza per queste analisi è chiaramente un campione di sangue, da cui si separa il siero, sul quale effettuerò dei test, quali:

- VTRL (Venereal Disease Research Laboratory), nel quale si usa un antigene alternativo che è la cardioplipina, che cross-reagisce con gli anticorpi anti-treponema; questo è un tipico esame di screening;
- test di flocculazione, nel quale si va a valutare la formazione di complessi antigene-anticorpo;

- somministrazione di antigeni del treponema veri e propri (tecniche TPHA), con cui si ha la certezza di identificare la presenza di anticorpi specifici per il treponema in caso di formazione di precipitati (in alcuni casi si mette a contatto il siero del paziente con coltivazioni di treponemi miti e si va ad osservare la reazione immunologica); questo è un esame costoso che viene utilizzato per confermare un sospetto infetto positivo a test di screening

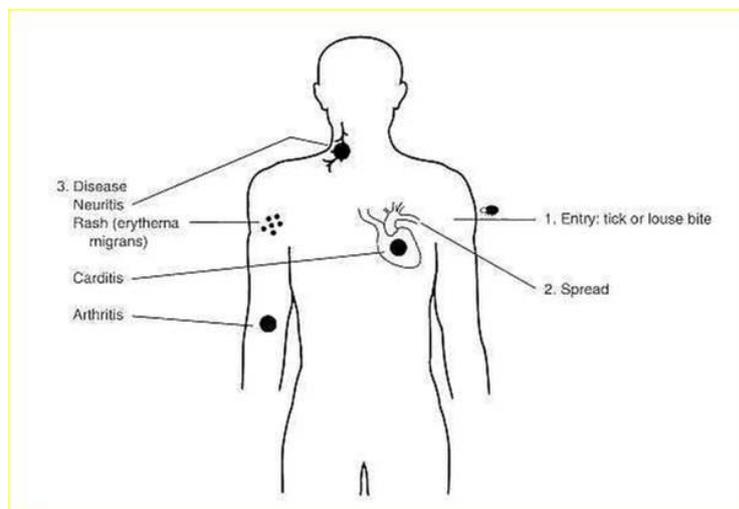
Queste indagini sierologiche possono andare a osservare le concentrazioni relative delle classi anticorpali IgM (che in una risposta immunitaria arrivano prima) e IgG (che nella risposta primaria arrivano tardivamente). In un paziente in corso di infezione primaria saranno presenti inizialmente molte IgM, a cui si sovrappone una bassa concentrazione di IgG: chiaramente se trovo IgM significa che l'infezione è primaria e che ci troviamo nelle fasi iniziali dell'infezione, mentre se trovo più IgG significa che l'infezione può essere secondaria, o che comunque mi trovo in un'infezione in corso da molto più tempo rispetto alla precedente.

TERAPIA

La sifilide viene trattata con terapia antibiotica, in genere con penicillina. Nonostante la presenza di una terapia molto efficace, la sifilide è una malattia che tutt'oggi è presente nella popolazione

GENERE BORRELIE

Sono spirochete con serbatoio animale (zecche), quindi è una zoonosi, ed è responsabile della borreliosi. La malattia è una febbre detta "febbre ricorrente", caratterizzata dalla comparsa di un eritema cutaneo nella zona in cui è avvenuta la puntura della zecca, detto eritema cutaneo "migrante", perchè si allarga; questa è una reazione locale dovuta all'inoculazione in situ delle borrelie. Il problema sussiste nel fatto che questi batteri si espandono e portano infatti a sintomi sistemici (febbre, dolori muscolari, stanchezza). Possono andare a colpire anche le articolazioni e anche il cuore e dare origine così a infezioni croniche se non trattate con terapie antibiotiche in tempi brevi. Contro le Borrelie è disponibile un vaccino.



DIAGNOSI

Le indagini diagnostiche mirano a cercare le borrelie nel sangue del paziente, anche con visualizzazione microscopica diretta tramite:

- striscio ematico e visualizzazione al microscopio;
- emocoltura;

- ricerca del genoma tramite PCR;
- indagini sierologiche

TERAPIA

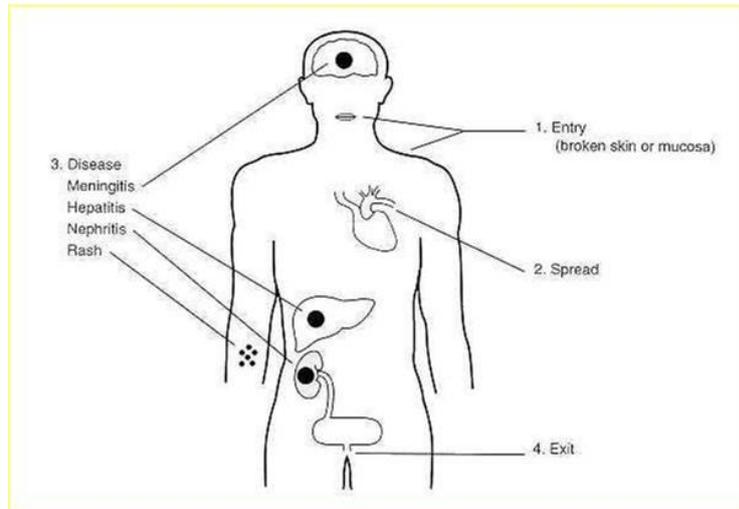
Si esegue una terapia antibiotica

GENERE LEPTOSPIRAE

Sono spirochete classiche che riguardano tutti gli ambienti e sono associate alle condizioni igienico-sanitarie. Come già detto sono organismi con serbatoio animale (roditori), la cui trasmissione è mediata dal contatto con le urine di questi animali e presenza di soluzioni di continuità della cute.

La leptospirosi è una malattia relativamente grave,

innanzitutto perché il contatto con l'agente patogeno non lascia un segno come avviene per esempio nella puntura di zecca, e quindi non ce ne accorgiamo, lasciando il tempo al batterio di proliferare; inoltre la leptospirosi diventa sistemica, colpendo tessuti vitali (fegato, rene, meningi...) con manifestazione di tipo emorragico, con un quadro clinico generale che è costituito da febbre emorragica.



DIAGNOSI

L'indagine diagnostica mira a identificare:

- leptospirae nel sangue del paziente tramite striscio ematico o emocoltura;
- identificazione di anticorpi anti-leptospirae;

TERAPIA

Si prosegue con terapia antibiotica

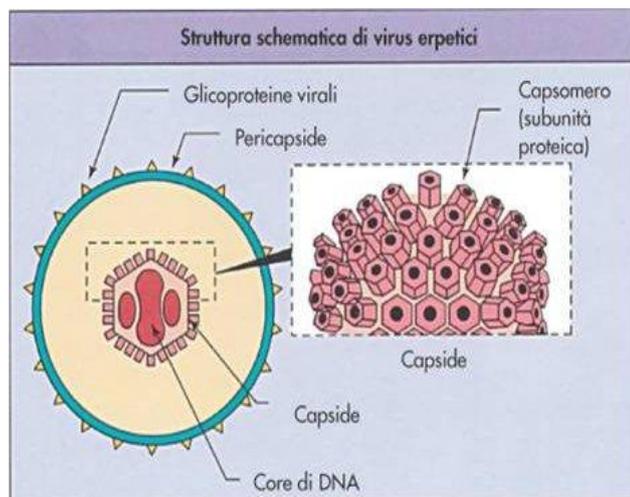
HERPESVIRUS (FAMIGLIA HERPESVIRIDAE)

Sono molto importanti perchè sono molto presenti nella popolazione umana in quanto si sono adattati all'organismo ospite e lo danneggiano poco. Questi virus sono in grado di andare in latenza e rimangono nelle cellule sotto forma di DNA. Gli herpesvirus sono in grado di riattivarsi, anche in maniera silente (riattivazione subclinica) e asintomatica, rilasciando particelle virali nei liquidi biologici e facendo diventare i soggetti contagiati potenziali soggetti in grado di infettarne altri (ANCHE QUANDO NON SI HA LA MANIFESTAZIONE); questa riattivazione silente è alla base del mantenimento nella popolazione di questa famiglia di virus. Il metodo di trasmissione è in genere per aerosolizzazione.

STRUTTURA DELLA PARTICELLA VIRALE

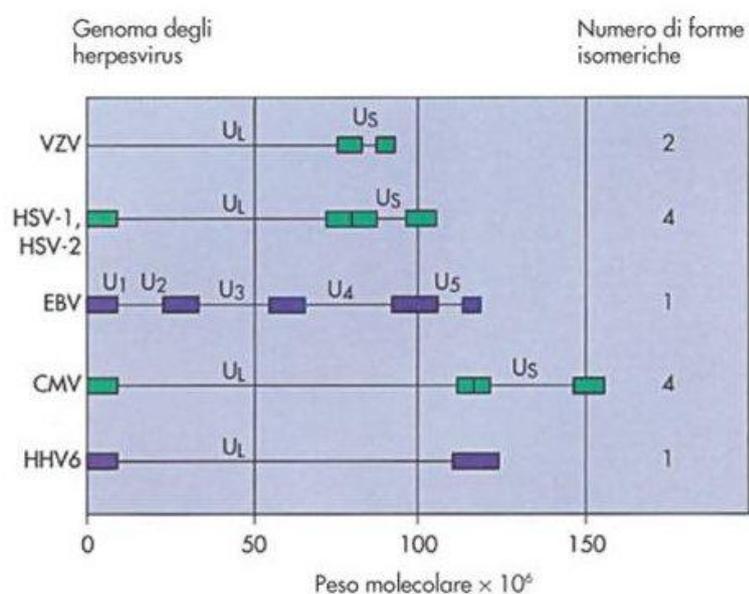
La particella virale presenta il pericapside, che ha una forma molto irregolare e costituzione prevalentemente lipidica. Il capside invece ha una struttura compatta, rotondeggiante, di natura proteica, che costituisce la vera protezione del genoma virale.

Il pericapside è dotato di una serie di glicoproteine virali, che rendono la membrana virale virus-specifica, determinano la specificità antigenica della particella virale e serve per mediare le prime fasi dell'infezione (in quanto sono le strutture che permettono l'internalizzazione della particella).



CARATTERISTICHE DEL GENOMA

Il DNA di questi virus è un DNA a doppia elica, lineare, molto lungo (100-150kbasi); in questo DNA saranno quindi presenti molte regioni codificanti (perchè il genoma è molto grande) che permettono al virus di produrre moltissime proteine virali (tutti gli herpesviridae si fanno la loro DNA polimerasi). Il genoma degli herpesviridae può essere



diviso in frammenti lunghi e corti, che possono essere invertiti tra loro, permettendo la formazione di isomeri.

CLASSIFICAZIONE

Gli herpesviridae si dividono in 3 sottofamiglie

- alfa-herpesviridae, cui appartengono le specie HSV-1, HSV-2 e VZV;
- beta-herpesviridae, cui appartengono le specie CMV, HHV-6 e HHV-7;
- gamma-herpesviridae, cui appartengono le specie EBV e HHV-8.

Tutte e 3 le sottofamiglie sono in grado di andare in latenza, condizione dalla quale possono dare origine a fenomeni di riattivazione; sia durante l'infezione primaria che quella da riattivazione sono una grossa problematica per i soggetti immunocompromessi.

Alcuni di questi virus hanno delle sequenze responsabili di isomerizzazione, che vengono invertite e ripetute, che permettono di scambiare di posizione fra loro (queste sono le sequenze UL e US), in diverse combinazioni, aumentando la variabilità genetica del virus.

NOMENCLATURA

La nomenclatura degli herpesviridae prevede per alcune specie 2 nomi:

- uno (quello appartenente al metodo di classificazione più recente) che è costituito dal prefisso HHV (che sta per Human-Herpes-Virus) seguito da un numero progressivo;
- il secondo nome è stato assegnato prima dell'avvento dell'attuale sistema di classificazione in base a fattori secondari (prendendo spunto dall'effetto citotossico, dal nome dello scienziato che lo ha scoperto, ecc...).

Il citomegalovirus, per quanto riguarda il secondo metodo di classificazione è indicato come CMV, mentre nella nuova classificazione è indicato come HHV-5.

Nella famiglia herpesviridae non ci sono generi, ma ci sono le sottofamiglie e poi subito le specie; il parametro che ci permette di distinguerli è la cellula bersaglio nell'infezione primaria e durante la fase di latenza.

Tabella 38.1 Classificazione dei virus appartenenti alla famiglia *Herpesviridae*.

Sottofamiglia	Via di trasmissione	Cellule bersaglio Infezione primaria	Cellule bersaglio Fase latenza
<i>Alpha</i>			
HHV1 (HSV-1)	Contatto diretto	Epitelio squamoso stratificato	Neuroni
HHV2 (HSV-2)	Contatto diretto	Epitelio squamoso stratificato	Neuroni
HHV3 (VZV)	Contatto diretto	Epitelio squamoso stratificato	Neuroni
	Aerosol		
<i>Beta</i>			
HHV5 (CMV)	Contatto diretto	Epiteli, monociti, endoteli	Monociti
	Trasfusioni	Epiteli, ?	Midollo osseo
	Trapianto d'organo		
HHV6	Contatto diretto	Linfociti	Linfociti, ?
HHV7	Contatto diretto, ?	Linfociti	Linfociti, ?
<i>Gamma</i>			
HHV4 (EBV)	Contatto diretto (saliva)	Linfociti, epiteli	Linfociti B
HHV8 (KSHV)	Contatto diretto	Linfociti e altre cellule	?

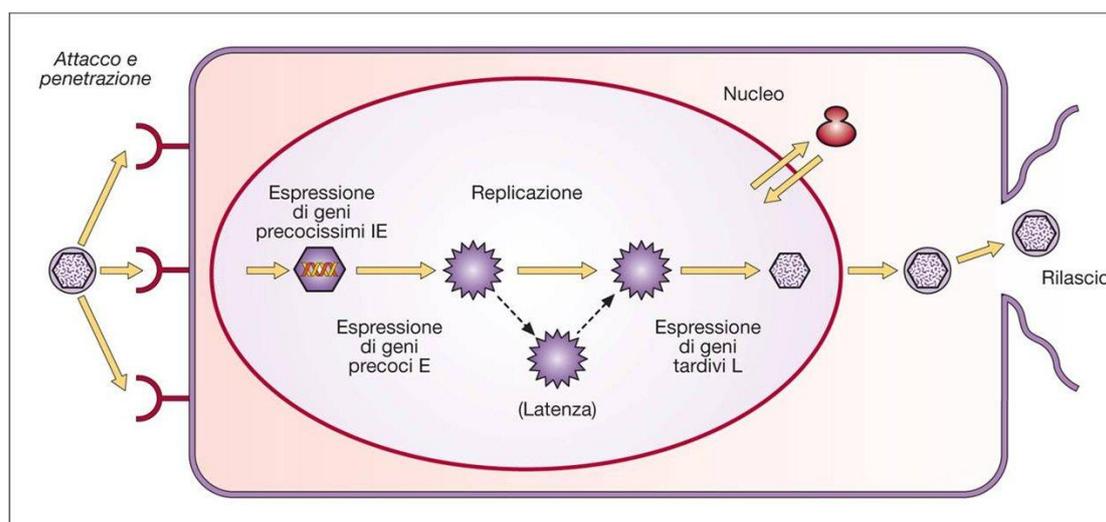
CELLULE BERSAGLIO

La cellula bersaglio dell'infezione primaria spesso è anche la cellula bersaglio della latenza; in

alcuni casi però i 2 bersagli cellulari sono diversi:

- I virus della sottofamiglia alfa hanno cellula bersaglio dell'infezione primaria il cheratinocita, mentre come cellula di latenza il neurone (in questa famiglia sono inclusi HHV-1,2 e 3, dove HHV-3 è varicella zoster);
- per la sottofamiglia beta, cui appartiene CMV, che va in latenza in vari tipi di cellule ma in particolare monociti e cellule del midollo osseo, mentre come bersaglio primario dell'infiammazione non ha un vero e proprio bersaglio specifico, ma attacca, fibroblasti, monociti, cellule endoteliali, ecc.... è importante per i trapianti d'organo, perchè il normo trapiantato rischia il rigetto se gli viene trapiantato un organo proveniente da un soggetto CMV-positivo e per i soggetti immunodepressi cronici; i HHV-6 e 7 li associamo prima di tutto ai linfociti, sono molto diffusi nella popolazione e non sono stati associati a manifestazioni cliniche importanti;
- nella sottofamiglia gamma esistono l'HBV (detto HHV-4) e l'HHV-8 (detto anche KSHV, Kaposi-Sarcome HerpesVirus), che è stato identificato in una forma di tumore ad eziologia virale, che è il sarcoma di kaposi. Tutti e 2 hanno un tropismo particolare per i linfociti ma HBV in fase di infezione primaria infetta anche l'epitelio dell'orofaringe e va poi in latenza nei linfociti B.

Tutti i membri della famiglia herpesviridae si replicano come quelli del 1° gruppo nella classificazione di baltimore e la caratteristica di questi virus è che hanno una distribuzione della trascrizione genica virale cronologicamente definita, cioè che dopo attacco e penetrazione ecc... il DNA virale viene liberato nel nucleo, e una volta che il DNA è stato liberato, inizia la trascrizione genica del set di geni detti "immediati precoci", dopo di cui vengono trascritti i "precoci" e infine viene replicato il DNA (con intervento della DNA polimerasi virale); le fasi che seguono permettono la ricostruzione della particella virale e la sua fuoriscita (previo budding che avviene a livello della membrana nucleare, invece che a livello della membrana plasmatica, da cui fuoriescono attraverso un processo di esocitosi) al fine di andare a infettare altre cellule. La DNA polimerasi virale è bersagliata da farmaci anti-herpetici.

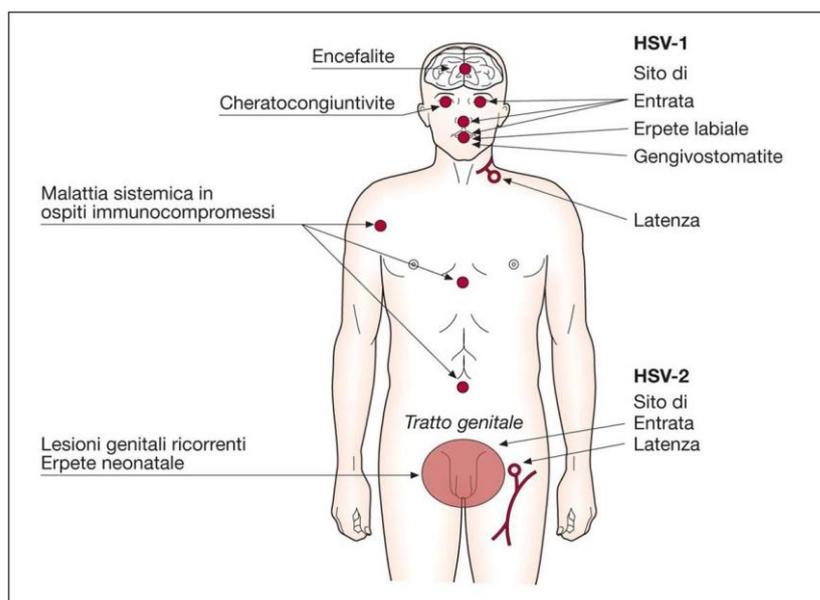


HSV1 e HSV2 (SOTTOFAMIGLIA ALFA)

CARATTERISTICHE GENERALI

Questi 2 virus sono indicati per esteso come "herpes simplex" e si assomigliano molto tra di loro (c'è alta omologia), ma nonostante abbiamo lo stesso tropismo cellulare (epitelio piatto stratificato), non hanno lo stesso tropismo anatomico (HSV-1 colpisce le cellule epiteliali del volto e della mucosa orale, mentre HSV-2 colpisce prevalentemente i genitali)

Tutti e 2 danno infezioni litiche nelle cellule bersaglio dell'infezione primaria (cheratinociti), che rimangono in latenza nei neuroni topograficamente associati alla zona dell'infezione primaria (per le infezioni facciali e orali, i virus vanno in latenza nei neuroni del ganglio del trigemino, mentre se l'herpes è genitale va a finire nei gangli nervosi associati alle radici dorsali del midollo spinale lombo-sacrale). Le lesioni sono lesioni di tipo vescicolare-sieroso che tendono a espandersi e a fondersi tra di loro.



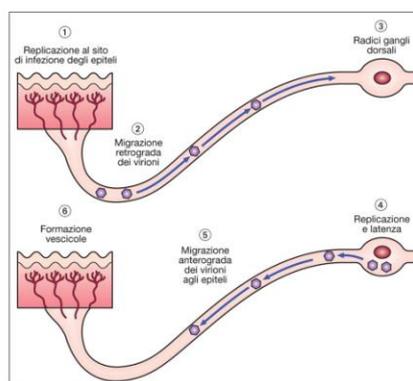
HSV-1 e HSV-2 hanno una distribuzione anatomica ben precisata, ma ciò non significa che non possiamo trovare distribuzioni invertite o miste.

Le modalità di trasmissione sono diverse per i 2 tipi di herpes simplex:

- HSV-1 si trasmette per contatto diretto;
- HSV-2 si trasmette per contatto sessuale.

Il contagio avviene in genere nelle prime fasi nella vita, dopodiché i 2 virus vanno in latenza nei neuroni, che vengono raggiunti per via assonale; la loro sede di latenza è molto problematica, perché se il virus si riattiva nei neuroni può dare encefalite, che è la complicanza più seria nelle infezioni da herpesvirus.

L'infezione segue quindi una via retrograda, perché dalla periferia va al centro, dove però non si integrano nel



genoma cellulare, in quanto possono compiere il processo inverso, cioè dare esattamente le stesse vescicole presenti nell'infezione primaria, presumibilmente passando dalla stessa via.

Le vescicole erpetiche si possono suppurare quando vengono infettate anche da batteri, facendo diventare la vescicola da sierosa a purulenta.

Oltre alla tipica manifestazione vescicolare, l'infezione da HSV può andare a causare manifestazioni nevralgiche (nevralgia del trigemino), che possono diventare anche molto severe, e queste manifestazioni sono dovute alla presenza di questi virus nel SNC, dovuta appunto ai fenomeni di infiammazione localizzata dovuti alla loro presenza (encefaliti, meningiti, infezione intrauterina).

DIAGNOSI

Nel caso di herpes esterno, la diagnosi è assolutamente clinica, ma se volessi eseguire delle indagini osservo che se cerco all'interno delle vescicole il genoma dell'herpes simplex questo è facilmente identificabile; herpes simplex volendo è anche coltivabile ma essendo la diagnosi clinica così evidente di solito non si vanno ad effettuare altre indagini laboratoriali. L'unica condizione in cui si possono andare a fare delle diagnosi è in caso di encefalite erpetica: in questo caso si esegue un prelievo di liquor in cui si va a cercare, tramite PCR, il genoma virale.

TERAPIA

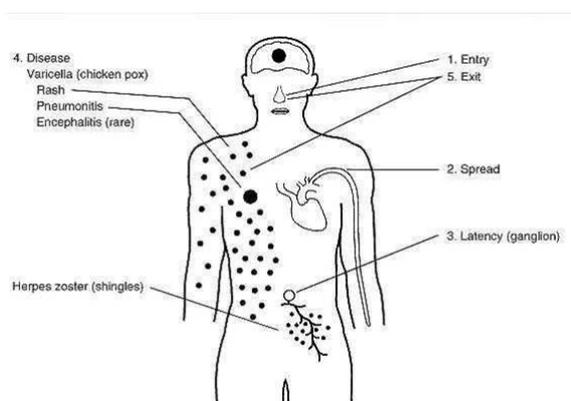
La terapia contro l'herpes si basa sull'utilizzo di aciclovir, che come abbiamo già visto nelle lezioni precedenti è un analogo nucleosidico che inibisce la DNA polimerasi virale. L'aciclovir è un pro-nucleoside.

VIRUS VRICELLA ZOOSTER (VZV-SEMPRE SOTTOFAMIGLIA ALFA)

CARATTERISTICHE GENERALI

Questo virus è detto anche HHV-3 e presenta molte caratteristiche in comune con i virus herpes simplex; rispetto ai precedenti differisce per il fatto che infetta per aerosolizzazione e ha capacità di infezione primaria a livello dell'epitelio dell'orofaringe. Inoltre:

- può dare infezioni litiche in cellule epiteliali e fibroblasti;
- la cellula bersaglio di latenza è il neurone;
- rappresenta l'agente eziologico della varicella e del fuoco di sant'Antonio (zooster);
- l'infezione in genere avviene entro l'adolescenza;



PATOLOGIE DA INFEZIONE DA VZV

VZV dopo essere entrato dall'orofaringe si dissemina a livello sistemico, e potendo passare nel sangue, questo si ridistribuisce a livello cutaneo; a livello locale può dare luogo a riattivazione.

Le vescicole date nell'infezione da VZV (peraltro caratterizzata da alti livelli di viremia) sono vescicole sierose, che spesso si infettano e diventano purulente; quando parte la risposta immunitaria queste vescicole regrediscono e i virioni vanno in latenza nei gangli di tutto il midollo spinale associati ai distretti cutanei infettati; la riattivazione di questo virus è in genere molto scarsa (anche se il trend di riattivazione è in aumento), ma se si riattiva dà luogo alla manifestazione clinica nota come zooster, che è l'esito del processo contrario del virus, in cui dal neurone il virus ritorna in periferia; questa patologia si nota perchè la manifestazione è emilaterale, e in particolare nelle zone che sono innervate dai neuroni che appartengono al ganglio in cui si è riattivato il virus (metti immagine del dermatomero toracico). Qualora vi sia la formazione di vescicole, è sufficiente la diagnosi clinica; se nella riattivazione che provoca lo zooster però non sono presenti le vescicole ma è presente solo la nevralgia, la diagnosi è molto più complessa, ma si dovrà andare per esclusione.

EPIDEMIOLOGIA

Questa infezione si riesce a mantenere nella popolazione per via del fatto che già durante le prime fasi a seguito del contagio, la carica virale è molto alta e il soggetto è molto infettante; questo rappresenta quindi un altro caso in cui la trasmissione in cui in genere viene trasmessa nel periodo di incubazione del virus (1-2 settimane) e i sintomi non sono ancora presenti, o sono in forma ridotta.

VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV) (SOTTOFAMIGLIA GAMMA)

CARATTERISTICHE GENERALI

Questo virus è l'agente eziologico della mononucleosi infettiva e attualmente ha un ruolo sempre più importante perchè si è scoperto che va in latenza nei linfociti B; nelle condizioni di immunodepressione cronica il virus trova le condizioni ottimali per una riattivazione, determinando l'immortalizzazione dei linfociti B infetti, facendoli proliferare all'infinito, senza la necessità dell'azione di fattori di crescita (ciò avviene soprattutto quando il virus non è nel suo ciclo litico). Questa capacità di EBV fa insorgere sindromi mieloproliferative, che sono stati di precancerosi; questi stati sono aumentati negli ultimi anni per via dell'aumento di soggetti immunodepressi cronici.

EBV ha anche delle capacità proliferative nei confronti delle cellule che infetta, dove a seconda delle localizzazioni geografiche, viene associato a manifestazioni tumorali; esistono 2 pattern epidemiologici diversi a seconda che si parli di paesi sviluppati o in via di sviluppo:

- Nei paesi sviluppati abbiamo prevalentemente manifestazioni di mononucleosi infettiva, che è una malattia tipicamente associata alle prime fasi della vita; siccome va in latenza e si hanno quindi possibilità di impatto di manifestazioni neoplastiche a livello leucocitario, in particolare per quanto riguarda i linfociti B;
- nei paesi in via di sviluppo, il virus è associato con forme tumorali specifiche, e in particolare in africa con il linfoma di Burkitt e in cina con il carcinoma nasofaringeo; l'associazione di questi tumori in queste zone geografiche è dovuta al fatto che, nelle cellule colpite da modificazione neoplastica si ha anche positività all'infezione da virus EBV (grazie all'analisi della presenza di DNA e proteine virali in queste cellule).

Continua Virus Epstein-Barr (EBV)

MALATTIE ASSOCIATE A EBV

- la forma infettiva primaria, cioè la mononucleosi infettiva, che si verifica al primo contagio; il primo contagio da EBV può essere asintomatico o paucisintomatico e quindi misconosciuta (cioè non viene diagnosticata); la diagnosi di infezione da EBV può essere effettuata solo nelle forme sintomatiche, in cui si manifestano segni patognomonicici tipici di quest'infezione, come la formazione di placche;
- manifestazioni neoplastiche: nei paesi poco sviluppati il problema più grosso degli herpesviridae sta nella riattivazione del virus, che non riattiva da solo ma necessita di una condizione favorente (immunodepressione, altre infezioni, ecc...); in queste situazioni il virus può causare lesioni neoplastiche, quali il linfoma di Burkitt e il carcinoma nasofaringeo;
- sindromi infiammatorie e linfoproliferative: la riattivazione del virus nell'immunodepresso fa sì che la particella virale si moltiplichi, dando luogo a infiammazione quali leucoplachie orofaringee, mononucleosi cronica, fenomeni polmonari e sindromi linfoproliferative; quest'ultime sono dovute alla riattivazione dell'EBV che va in latenza nei linfociti B, dove può rimanere silente oppure essere espresso nel loro genoma e causare eccessiva proliferazione di questa popolazione cellulare. Queste sindromi sono proliferazioni policlonali di linfociti (tanti linfociti diversi che proliferano) e non sono quindi dei linfomi (in quanto in questi ultimi si ha l'espansione di un solo clone di linfociti B); le sindromi linfoproliferative possono essere molto pericolose perché un'altra mutazione che favorisce la crescita può dare un tumore monoclonale.

TRASMISSIONE E MECCANISMI PATOGENETICI

La saliva rappresenta sia il mezzo attraverso il quale il virus entra, che quello attraverso il quale il virus esce, perché il sito di replicazione primario di EBV è a livello delle cellule epiteliali squamose dell'orofaringe (grazie alle quali si moltiplica).

Nel soggetto, dopo la proliferazione primaria nell'orofaringe, il virus va ad infettare i linfociti B (passando nel circolo sistemico), dove determina i seguenti cambiamenti, utili a livello diagnostico:

- l'aumento della presenza di anticorpi eterofili (immunoglobuline prive di bersaglio antigenico specifico);
- aumento dei linfociti (linfocitosi), con presenza di linfociti atipici (caratteristica sfruttata a scopo diagnostico);
- ingrossamento delle stazioni linfatiche (in particolare quelle regionali orofaringee), ma anche di fegato (epatomegalia) e milza (splenomegalia);

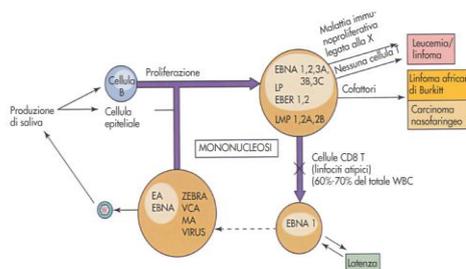


FIGURA 51-12. Progressione dell'infezione da EBV. L'infezione può produrre infezione litica, latente o immortalizzante, distinguibili sulla base della produzione virale e l'espressione di differenti proteine ed antigeni virali. Le cellule T limitano la proliferazione delle cellule B infettate da EBV e mantengono l'infezione latente. EA = Antigene precoce; EBEB = RNA codificato da Epstein-Barr; EBNA = antigene nucleare di Epstein-Barr; LMP = proteina latente di membrana; LP = proteina latente; VCA = antigene del capside virale; MA = antigene di membrana; ZEBRA = peptide codificato dalla regione genico Z.

Murray - Rosenthal - Kobayashi - Pfaller
Microbiologia
Edises

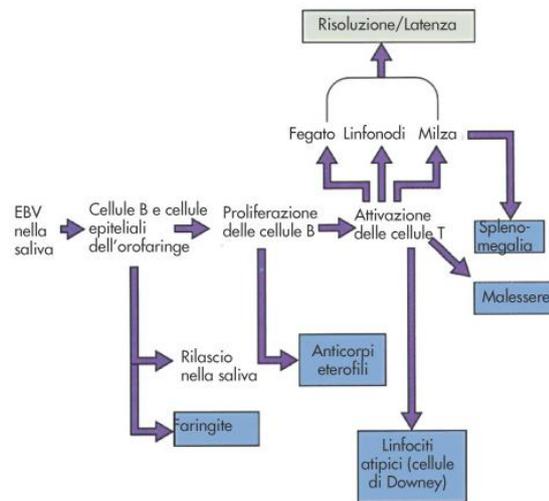
- ci possono essere placche a livello orofaringeo; questo avviene nell'infezione primaria.

L'infezione si risolve con una risposta immunitaria, che manda in latenza il virus, senza eliminarlo.

CICLI DI EBV

L'EBV nei linfociti B può dare:

- una proliferazione dei linfociti, in cui abbiamo un'espressione parziale del genoma di EBV, in cui il genoma virale viene trascritto per permettere la traduzione di proteine virali che fanno aumentare la proliferazione dei linfociti;
- un'infezione litica, in cui si ha la replicazione delle particelle virali e una loro espansione nelle cellule adiacenti; in questo tipo di infezione si ha la produzione di proteine virali, che sono in grado di interagire con il ciclo cellulare del linfocita, alterandolo;
- un'infezione latente, in cui c'è solo espressione genica, ma molto limitata (il genoma virale non è integrato).



La proliferazione dei linfociti B è quella che determina nell'infezione primaria la mononucleosi infettiva, ma è anche associata a tutte le altre patologie che abbiamo osservato prima. La latenza è invece solo una fase di conservazione del genoma.

LINFOMA DI BURKITT

Questa manifestazione è delimitata in alcune aree geografiche o a persone che sono cresciuti fin dall'infanzia in Africa (che è la zona in cui il linfoma di Burkitt è endemico); è una forma tumorale dei linfociti B, dove il virus gioca un ruolo fondamentale nei primi stadi di comparsa della malattia, sostenendo la proliferazione di questa popolazione cellulare; l'altro fattore predisponente allo sviluppo del linfoma di Burkitt non è ancora noto (potrebbe giocare un ruolo fondamentale l'infezione malarica) ma in qualsiasi caso è necessario un secondo evento di mutazione genica che porta allo sviluppo del tumore monoclonale.

Nelle cellule colpite da linfoma di Burkitt si trova una traslocazione cromosomica che coinvolge l'oncogene c-myc, che nella sua nuova localizzazione viene controllato dal promotore delle immunoglobuline: siccome i linfociti B producono molte immunoglobuline si attiva molto l'espressione dell'oncogene. EBV è

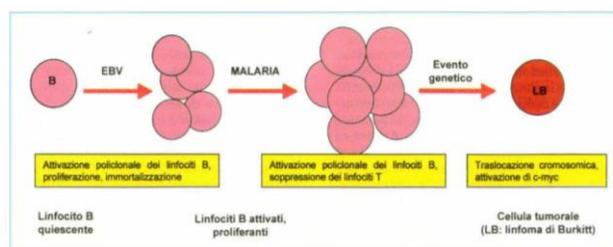


Figura 50.1. Patogenesi multifattoriale del linfoma di Burkitt endemico.

responsabile di questa fase iniziale di eccessiva proliferazione (EBV causa sindromi linfoproliferative anche nei soggetti immunodepressi dei paesi sviluppati, ma siccome non sono esposti al secondo evento mutante (malaria) non sviluppano la modificazione neoplastica).

CARCINOMA NASOFARINGEO

Questa manifestazione colpisce le cellule epiteliali squamose della mucosa orofaringea che possono essere infettate da EBV. Nelle regioni in cui l'infezione da questo virus è endemica si può osservare come tutte le cellule interessate da questa modificazione neoplastica siano tutte positive per la presenza di genoma di EBV. Per la patogenesi di questo carcinoma, non sono noti i meccanismi molecolari.

LATENZA E RIATTIVAZIONE IN PAZIENTE IMMUNODEPRESSO

Nel paziente immunodepresso il carico virale degli herpesviridae v'è sempre tenuto sotto controllo perchè altrimenti potrebbero riattivarsi. Se il paziente è immunodepresso perchè in terapia immunosoppressiva posso sospendere la cura; se la carica virale è troppo alta posso invece intervenire con farmaci antivirali.

Nei soggetti immunodepressi ha particolare rilevanza clinica l'insorgenza della sindrome linfoproliferativa (LPD).

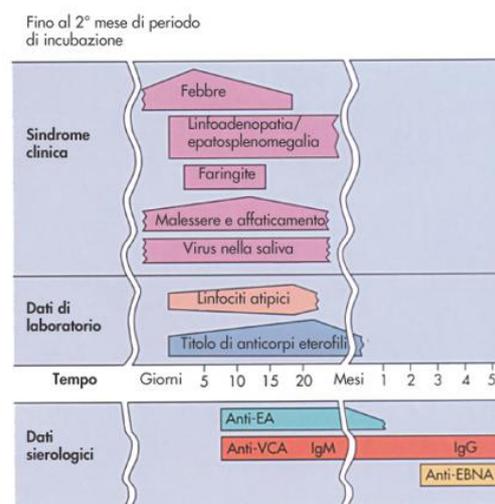


FIGURA 51-15. Decorso clinico della mononucleosi infettiva e reperti di laboratorio. L'infezione da EBV può essere asintomatica o produrre i sintomi della mononucleosi. Il periodo di incubazione può prolungarsi per più di 2 mesi. EA = Antigene precoce; VCA = antigene del capsid virale.

SINDROME LINFOPROLIFERATIVA (LPD)

In questa condizione EBV si è riattivato e determina un aumento della proliferazione dei linfociti. Questa condizione patologica è innanzitutto l'anticamera per la comparsa di manifestazioni tumorali, ma provoca anche un malfunzionamento del sistema immunitario del soggetto, perchè questa estrema proliferazione porta alla formazione di numerosi linfociti atipici. La malattia linfoproliferativa ha una frequenza maggiore nei soggetti trapiantati, e in particolare nei trapiantati di cuore, dove la frequenza è molto elevata (circa il 10-13% dei trapiantati va incontro a LPD), ed è quindi una condizione che v'è assolutamente monitorata in anticipo.

DIAGNOSI

La diagnosi di latenza per infezione da EBV è sierologica, quindi dovrò andare a ricercare nel plasma del paziente gli anticorpi diretti contro gli antigeni di superficie di EBV: il kit si basa sulla somministrazione di antigeni di EBV diversi, che possono andare a richiamare o IgG o IgM.

Quando l'infezione è in atto ho un alto livello di IgG; quando l'infezione è cronica ho alti livelli sia di IgM che di IgG; quando l'infezione è pregressa ho solo alti livelli di anticorpi IgM nel siero. Queste considerazioni mi permettono di capire se il paziente è nella fase di incubazione (fase prodromica), se è nella fase di convalescenza (ovvero quando il carico virale si inizia ad abbassare per via dell'azione del sistema immunitario) oppure se è solo un paziente con pregressa infezione

da EBV.

CITOMEGALOVIRUS (HHV-5, SOTTOFAMIGLIA BETA)

Questa specie virale appartiene alla sottofamiglia beta degli herpesviridae. Il CMV è chiamato così per via dell'effetto citopatico di ingrossamento delle cellule. I tipi cellulari infettati da CMV possono essere veramente moltissimi: cellule epiteliali, muscolari, macrofagi.... quindi questo virus ha un'espansione elevatissima ed è pressochè ubiquitario; riattivandosi infatti può dare luogo a diversi tipi di patologia, con particolare importanza a livello delle cellule endoteliali.

Le cellule endoteliali infatti sono presenti in quasi tutti gli organi, quindi se parte l'infiammazione endoteliale, parte anche l'infiammazione dell'organo; infatti il problema più grosso del CMV è la riattivazione nei trapiantati, con conseguente danneggiamento dell'organo trapiantato o rigetto del trapianto.

CICLO DEL VIRUS

Il CMV è un classico herpesviridae, e quando entra in una cellula, segue il ciclo già spiegato in generale per tutti i virus appartenenti a questa famiglia:

- si ha l'attacco e la penetrazione;
- espressione di geni precocissimi (IE);
- espressione di geni precoci (E);
- Replicazione,
- Espressione di geni tardivi (L-Late), che in genere codificano per le proteine del capsido;
- gemmazione e formazione del pericapsido

DIAGNOSI

Per la diagnosi si prevede l'utilizzo di anticorpi diretti contro le proteine espresse dai geni immediati precoci; questo ci permette di avere dei risultati entro 24-48h dal contagio. La diagnosi per infezione da CMV può anche essere effettuata tramite coltivazione su piastra e analisi della comparsa dell'effetto citopatico: siccome questa metodica richiede diverse settimane, si preferisce l'utilizzo del primo metodo.

EPIDEMIOLOGIA

L'infezione da CMV è molto diffusa nella popolazione, infatti si arriva a una positività sierologica dell'80-90% degli individui adulti. L'elevata distribuzione di questo virus nella popolazione la si deve al fatto che in genere l'infezione primaria è asintomatica o paucisintomatica (si possono osservare solo blande manifestazioni para-influenzali); infatti non è l'infezione primaria ad essere la principale problematica legata all'infezione da questo virus, ma la sua riattivazione (in particolare modo in soggetti trapiantati).

L'unica infezione primaria da parte di CMV di interesse clinico è quella nella donna in gravidanza, soprattutto nelle prime fasi perchè poi potrebbe essere trasmesso al feto e dare danni fetali; più la gravidanza va avanti più i danni sono minori, ma il rischio di una sindrome citomegalica esiste comunque. Il bambino può comunque subire un contagio da CMV al momento del parto, in particolare quando la donna è sieronegativa perchè, non ha le difese immunitarie accese.

Nell'infezione da CMV i soggetti che devono essere più seguiti sono gli immunodepressi,

soprattutto se cronici o trapiantati e i malati di AIDS.

ESITI DELL'INFEZIONE

I soggetti infettati da CMV possono andare incontro a 3 esiti:

- Nel soggetto normale l'infezione da CMV non porta a nessuna manifestazione clinica rilevante, ma il soggetto diventa un portatore asintomatico, in grado di mantenere il virus nella popolazione. Il virus si mantiene nella popolazione grazie al suo adattamento all'ospite, perchè si mantiene l'equilibrio tra ospite e agente infettante. Questo equilibrio è stato modificato con l'introduzione delle terapie antibiotiche, ma si trova anche modificato quando sono in corso altre infezioni che modificano la funzionalità del sistema immunitario, quale quella da HIV;
- nei bimbi di madri sieronegative potrà avere insorgenza di malattie da inclusioni citoplasmatiche;
- Nei soggetti trapiantati, in cui il punto debole è proprio l'organo trapiantato. In questi soggetti il monitoraggio non mi serve tanto per capire se il soggetto è sieronegativo/positivo (se il soggetto è sieronegativo esso si trova nella condizione peggiore che ci potesse essere, perchè il virus è ampiamente diffuso nella popolazione; se il soggetto è sieropositivo, durante il trapianto dell'organo abbasso le difese dell'ospite e favorisco la riattivazione) ma quanto che accorgimenti attuare sull'individuo

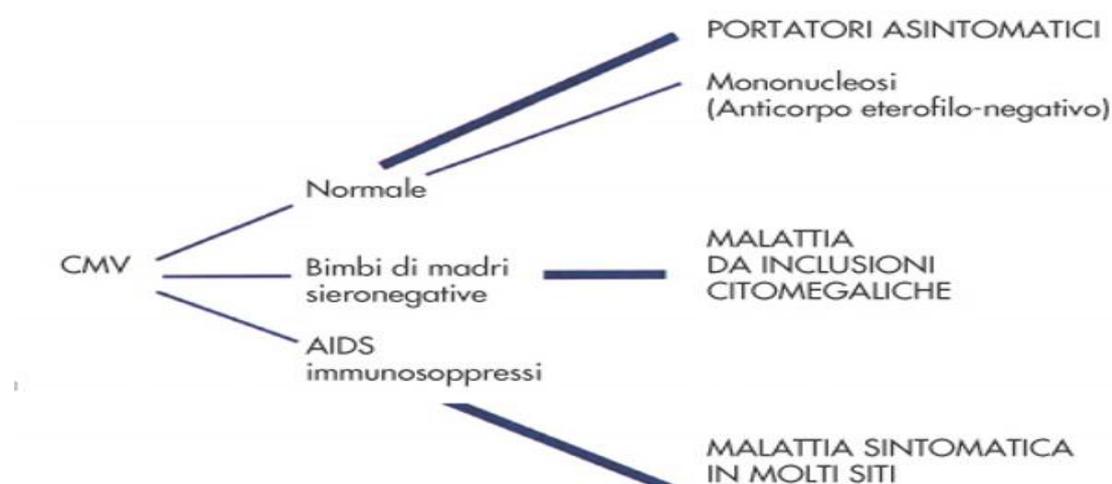


FIGURA 51-17. Conseguenze dell'infezione da citomegalovirus (CMV). Dipendono fortemente dallo stato immunologico del paziente.

DIFFUSIONE NELL'OSPITE

Le varie cellule e i vari tessuti infettati da CMV sono:

- cellule endoteliali: l'infezione di maggiore importanza è quella a livello dell'endotelio, perchè causa infiammazione vascolare e quindi danno a tutti gli organi; in queste cellule inoltre si manifesta l'effetto citopatico dovuto all'infezione (vedi immagine);
- CMV infetta anche i leucociti polimorfonucleati, dove però non si replica. Esso viene

fagocitato da questi leucociti, che agiscono da carrier e diffondono per via ematica in tutti i distretti. Queste cellule possono passare il contenuto virale alle cellule endoteliali.

In quest'ultimo punto abbiamo visto come cellule endoteliali e leucociti possono scambiarsi il contenuto virale. La diffusione dell'infezione virale dalle cellule endoteliali a tutti i distretti avviene infatti grazie al fatto che la cellula endoteliale infettata richiama i leucociti, che interagiranno con essa tramite delle apposite proteine; a seguito di quest'interazione il virus passa da una cellula all'altra, sfruttando un momento di fusione tra le cellule. Tramite lo stesso meccanismo i leucociti andranno a portare la particella virale in tutto l'organismo.

TRASMISSIONE

Questo virus può essere trasmesso in differenti modi:

- la saliva risulta essere il mezzo di trasmissione più semplice;
- con le urine e le secrezioni genitali;
- con il sangue (anche se in realtà il virus nel sangue è molto associato a cellule, quindi la trasmissione è più difficile);

Nonostante sia un virus che è in grado di andare a infettare quasi tutti i distretti del nostro organismo, esso ha alcune preferenze come la retina (nei soggetti con AIDS), causando retinite (con perdita della vista) e gli organi trapiantati.

Proprio a causa di questa flessibilità nell'infettare diverse sedi, le infezioni da CMV devono essere monitorate.

DIAGNOSI

La diagnostica delle infezioni da CMV non si basa sulla sierologia, più che altro per via della forte presenza del virus nella popolazione (quasi tutti i soggetti sarebbero positivi all'esame sierologico per CMV: anche tu che leggi).

Il monitoraggio del CMV (soprattutto nei pazienti immunosoppressi) si basa su un'indagine virologica, in cui si va a cercare fisicamente il virus; inoltre devo valutare un possibile stato di riattivazione del virus. Gli approcci diagnostici sono vari, e dipendono anche dal sito di riattivazione del virus (ES. se ho una polmonite, posso cercare CMV nel lavaggio bronco-alveolare, isolandolo su colture cellulari; posso effettuare la stessa cosa con prelievo di liquido amniotico). La tecnica di coltivazione del virus su piastra cellulare è efficace, ma molto lenta, perché il virus impiega diversi giorni a dare il suo effetto citopatico. Per determinare la riattivazione del virus andrò a effettuare una tecnica detta DEAFF, che si fa in 2 modi:

- infettando dei fibroblasti in coltura e dopo 24/48h le metto a contatto con un anticorpo diretto contro le proteine IE; se nel sangue era presente il virus si ha la formazione di immunocomplessi; utilizzando questo metodo posso valutare la viremia in qualunque liquido corporeo;
- test dell'antigenemia, che può essere effettuato solo su sangue, perché solo in questo liquido biologico sono presenti i leucociti che contengono al loro interno il virus. Nel soggetto con alta viremia, questi leucociti infettati possono essere evidenziati su uno

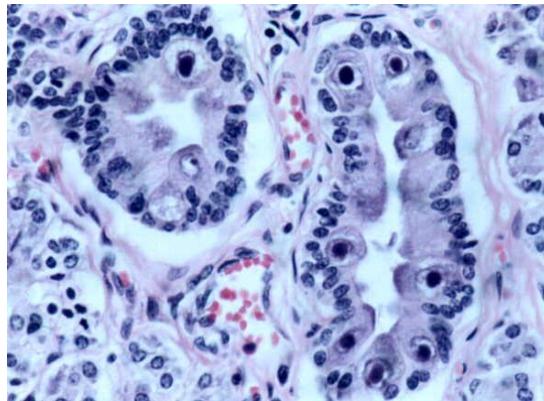
striscio di sangue per le proteine del tegumento (proteine presenti nel capsido del virione); tanto maggiore è il numero di leucociti positivi, tanto più alta è l'antigenemia, tanto più alta è la carica virale .

- Tramite PCR quantitativa; questo test rispetto ai precedenti è il più utilizzato, in quanto in clinica è spesso necessario ripetere più volte un test, quindi una caratteristica essenziale che deve avere è sia la ripetibilità che l'economicità, e questo test le possiede tutte e 2. Questo test ci dà la cosiddetta DNAmia (viral load=carico virale), cioè ho una valutazione del numero di copie di genoma virale, presenti nel sangue del paziente per volume di sangue.

La continua valutazione della carica virale mi permette di dosare le varie terapie necessarie per mantenere CMV in uno stato di silenzio.

EFFETTO CITOPATICO

L'effetto citopatico dell'infezione da CMV è evidenziabile all'esame istologico, con la presenza di cellule a "occhio di gufo"; la morfologia caratteristica di queste cellule è dovuta alle inclusioni virali che si formano nella cellula infettata, che (essendo il CMV un virus molto grande), determinano una variazione morfologica importante della cellula.



HHV-6 e HHV-7

Di questi virus si sa molto poco. Sono virus molto diffusi nella popolazione e rientrano nella sottofamiglia beta degli herpesviridae. Questi virus infettano i linfociti e a questi virus non sono associate particolari patologie (HHV-6 può dare una malattia esantematica nel bambino detta "roseola infantu" caratterizzata da febbre, che quando scompare lascia il passo a una manifestazione esantematica).

HHV-8 O KSHV

Appartiene alla sottofamiglia dei gamma-herpesviridae (stessa sottofamiglia di EBV). Questo virus è stato inizialmente chiamato KSHV (Kaposi-Sarcoma-HerpesVirus). Essendo un herpesviridae è in grado di andare in latenza (nelle cellule endoteliali e nei linfociti B) e, in genere, l'infezione primaria è asintomatica.

Questo virus sembra che non dia manifestazioni patologiche di rilevanza clinica nei soggetti immunocompetenti, ma nei soggetti immunodepressi è responsabile di una manifestazione tumorale cutanea detta sarcoma di Kaposi (dal nome del dermatologo ungherese che ha definito il sarcoma). Questa manifestazione è una forma tumorale ematogena, cioè determina la proliferazione dei capillari; si è osservato che nella gran parte delle cellule colpite da questa modificazione neoplastica si ha anche la positività all'HHV-8.

PATOGENESI

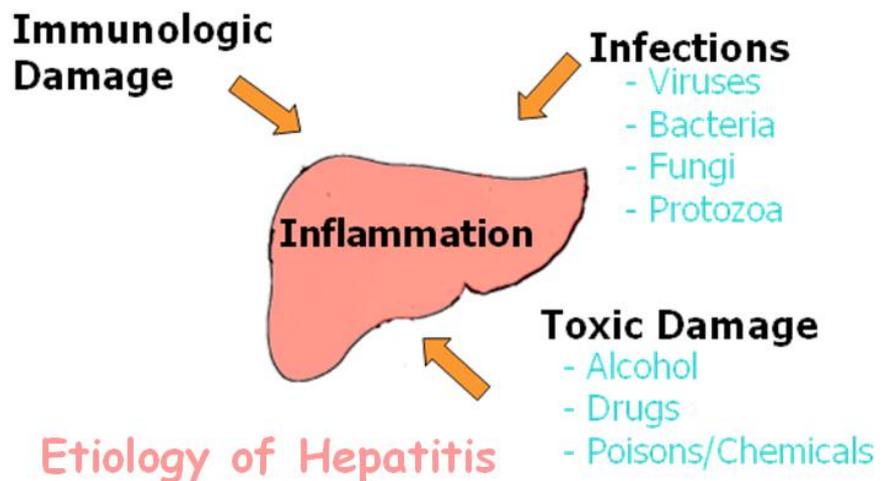
HHV-8 fa proliferare a dismisura le cellule endoteliali dei capillari che prendono una caratteristica morfologia detta "a fuso". Questo tumore non è molto aggressivo, ma può diventare problematico quando diventa sistemico. HHV-8 è molto diffuso nella popolazione e sembrava non essere coinvolto in altre manifestazioni patologiche. Nonostante ciò è stato notato che molte delle proteine di HHV-8 sono molto simili a proteine umane e che quindi possono andare a inserirsi in alcuni pathway biochimici (e in particolare con meccanismi di regolazione del ciclo cellulare), alterandoli; questo è un altro possibile meccanismo patogenetico di HHV-8. Si è infatti osservato che HHV-8 può essere correlato ad altre manifestazioni proliferative oltre al sarcoma di Kaposi, quali il linfoma primitivo esclusivo e la malattia di Castleman.

VIRUS RESPONSABILI DI EPATITE

Sono virus molto diffusi, in parte dovuto al fatto che alcuni di questi virus tendono a dare delle infezioni di tipo cronico.

Parlando di virus responsabili di epatite non possiamo parlare di un'unica famiglia di virus, perchè sono moltissime le specie in grado di dare delle infezioni a livello epatico; alcuni di questi hanno un

tropismo specifico per il fegato, e sono detti infatti "virus epatitici". Tutti questi virus determinano una patologia infiammatoria del fegato (appunto "epatite"), che in questo caso ha eziologia infiammatoria.



CLASSIFICAZIONE VIRUS EPATITICI

Le più importanti classi virali che determinano epatite infettiva sono almeno 5:

- virus dell'epatite A, che appartiene alla famiglia dei picornavirus (cui appartiene anche il poliovirus). I picornavirus sono dei virus ad RNA a singola elica a polarità positiva, molto piccoli, senza pericapside, che si trasmettono per via orofecale e tendono a non dare una infezione cronica, ma solo un episodio acuto; essi si mantengono nelle acque contaminate.
- virus dell'epatite E, che appartiene alla famiglia dei calicivirus. Questa famiglia di virus è costituita da virus con RNA a singola elica a polarità positiva, che si trasmettono per via orofecale e tendono a non dare una infezione cronica, ma solo un episodio acuto;
- virus dell'epatite B, che appartiene alla famiglia degli hepadnavirus; hanno trasmissione parenterale e tendono a dare infezioni insidiose e cronicizzanti. ;
- virus dell'epatite C, che appartiene alla famiglia dei flavivirus hanno trasmissione parenterale e tendono a dare infezioni insidiose e cronicizzanti (cronicizza nell'80% dei casi); non uccide mai nell'infezione primaria, ma determina morte per tumore epatico o cirrosi quando cronicizza;
- delta virus, che non ha una precisa localizzazione di famiglia; hanno trasmissione

parenterale e tendono a dare infezioni insidiose e cronicizzanti.

Hepatitis Viruses



Virus Family	Hepatitis A Picornavirus	Hepatitis E Calicivirus	Hepatitis B Hepadnavirus	Hepatitis C Flavivirus	Delta virus Satellite virus (only in combination with HBV)
Commonality	All generate conditions of illness in the liver				
Symptoms (acute)	All the same – malaise, dark urine, anorexia, nausea, vomiting, jaundice				
Transmission	Enteric (food and water)		Sex, blood and close contact		
Chronic condition	No	No	Yes	Yes	Yes
Virus genome	+ss RNA	+ss RNA	DNA with reverse transcriptase activity	+ss RNA	-ss RNA
Virus antigens	HA Ag	HEV ORF2 proteins	HBsAg HBcAg HBeAg	Many – core E1 E2 NS3	Delta antigen
Incubation	1 month (15 – 50 d)		4 months (45 – 160 d)	2 months (15 – 150 d)	1 – 2 months
Current therapeutics	No specific treatment	No specific treatment	Interferon alpha, Lamivudine, Adefovir, Etecavir	Interferon alpha + ribavirin, Pegylated Interferon	Follow HBV therapy
Vaccines available?	Yes Havrix (GSK) Vacta (Merck)	No	Yes Engerix-B (rHBsAg) GSK Recombivax B (Merck)	No	Can be prevented by vaccination against HBV

Tutti questi virus hanno un'unica cosa in comune, cioè il tropismo specifico per il fegato. Tutti i virus epatitici sono nominati utilizzando una sigla che inizia per la lettera "H", che sta per "hepatitis", poi da una lettera dell'alfabeto e poi da "V" che sta per virus.

Tutti questi virus determinano un aumento della probabilità di sviluppo di tumori epatici, sia per via della presenza di proteine virali all'interno delle cellule, che per l'induzione di uno stato infiammatorio cronico (quando l'infezione da virus epatitico è cronica), che certamente favorisce la modificazione neoplastica e di manifestazioni extraepatiche (deposito di immunocomplessi a livello glomerulare e malfunzionamento del glomerulo). L'insorgenza dei sintomi causati dall'infezione da parte di uno di questi virus è molto diversa tra loro, ma in genere sempre molto prolungata; per questo si predilige spesso una diagnosi sierologica.

Per le 3 classi di virus a trasmissione parenterale sono presenti vari tipi di farmaci: inizialmente il farmaco maggiormente era l'interferon dato in maniera esogena (purtroppo non funzionava su tutti gli individui); sono stati sviluppati allora farmaci che agissero sulla riattivazione del virus, come la ribavirina; gli ultimi farmaci (diretti soprattutto contro HCV) che sono stati prodotti sono inibitori delle proteasi.

VIRUS DELL'EPATITE B (HBV)

CARATTERISTICHE GENERALI

Appartiene alla classe degli Hepadnaviridae, che secondo la classificazione di Baltimore appartengono alla classe 7. HBV è l'agente eziologico dell'epatite B, un tempo detta "epatite da siero" perchè era l'unica forma di epatite nota a trasmissione parenterale (I primi ad essere

conosciuti furono HAV e HBV, e il primo è a trasmissione orofecale). Le caratteristiche generali di questa particella virale sono le seguenti:

- i virioni possiedono il pericapside;
- è molto piccolo (47nm);
- infetta solo l'uomo, quindi la trasmissione è esclusivamente interumana;
- possiedono un genoma a DNA circolare, parzialmente a doppio filamento;
- la replicazione avviene attraverso un intermedio ad RNA;
- il virus codifica una retrotrascrittasi (cioè una DNA polimerasi RNA-dipendente, che è la RNasi H), che è già contenuta nel virione, insieme a una DNA polimerasi virale DNA-dipendente;
- le cellule infettate da HBV producono una grande quantità di particelle che determinano alti livelli di antigene HBs in circolo; queste particelle possono essere di vario tipo:
 - particella virale completa (particella di Dane), che possiede capsid, pericapsid e genoma;
 - particelle virali incomplete, costituite solo dall'envelope, che possono essere sia di forma sferica che di forma filamentosa e sono molto importanti perché sono monitorabili quando vado a valutare quantitativamente la presenza di antigene HBs in circolo;
- il genoma di HBV può arrivare ad integrarsi nel genoma dell'ospite, evento predisponente per l'induzione di modificazioni neoplastiche.

STRUTTURA DEL GENOMA

Il genoma di HBV è suddiviso in 4 regioni geniche:

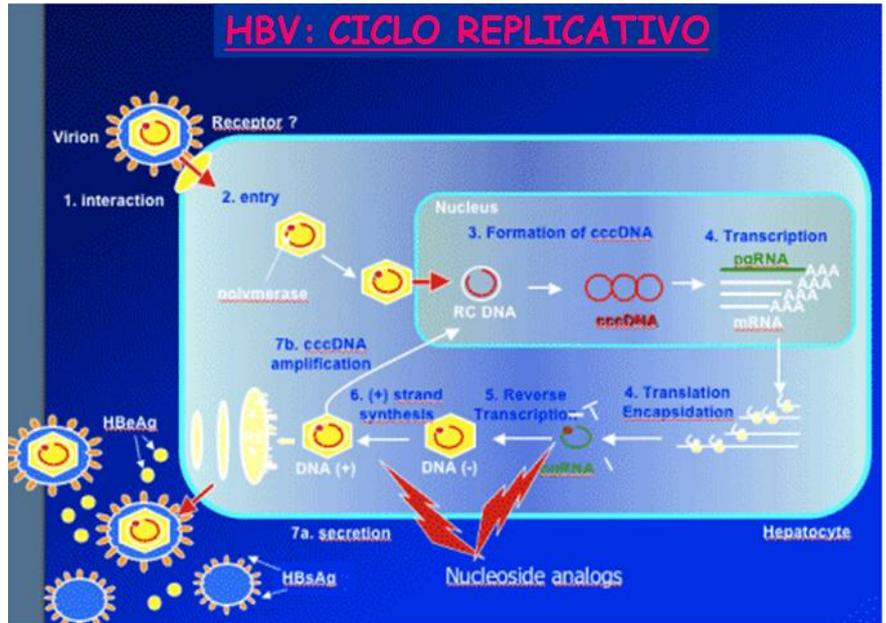
- regione P, che contiene il gene che codifica per la trascrittasi inversa virale;
- regione C, che contiene i geni che codificano per le proteine del core, cioè HBcAg e HBeAg;
- regione X, che contiene il gene che codifica per una proteina ad attività trans-attivante che lega regioni virali e regioni cellulari, e regola quindi la trascrizione sia di geni cellulari che virali. Questa proteina sembra essere quella maggiormente implicata nell'attività trasformante espletata da HBV;
- regione S.

MECCANISMO REPLICATIVO E PATOGENETICO

Il recettore cellulare con cui interagiscono le proteine virali per entrare nella cellula non è ancora stato identificato, ma una volta avvenuta l'interazione, il DNA viene processato dalla DNA polimerasi virale, per completare la doppia elica (formando il cccDNA "covalently close circular DNA", che sono quelle strutture a DNA che possono rimanere nel nucleo delle cellule epatiche, in genere non integrate, che possono determinare riattivazione della replicazione virale in condizioni di immunodepressione), e dopodiché viene trasferito nel nucleo dove viene trascritto dalla DNA polimerasi cellulare, dando inizio alla produzione dei vari trascritti pregenomici e alla trascrizione degli mRNA. I trascritti pregenomici sono quelli che poi daranno origine ai genomi dei nuovi

virioni, che avendo genoma a DNA, dovranno essere sintetizzati a partire da questi precursori a RNA grazie all'attività della retrotrascrittasi virale (RNAsi H).

Una volta avuto inizio l'espressione del genoma virale e prodotte le proteine da esso codificate, la maturazione dei virioni avviene a livello del reticolo endoplasmatico; una volta assemblati, usciranno dalla cellula attraverso un processo di esocitosi.



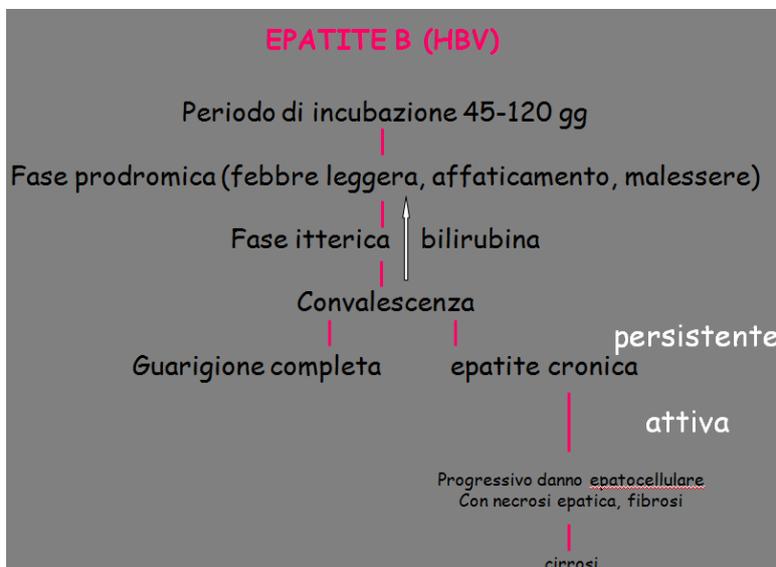
La patogenesi è dovuta all'indirizzamento della risposta immunitaria dell'organismo ospite contro le cellule infettate dal virus, perchè esse presenteranno proteine virali (HBcAg) su MHC di classe II, che verranno riconosciuti dai linfociti T che attaccheranno la cellula attraverso una risposta cellulo-mediata.

La carica virale di questo virus è alta unicamente nel sangue e negli essudati, e per questo la via parenterale rappresenta la via di trasmissione migliore; in altre secrezioni (saliva, sperma, liquido vaginale, urine, sudore, latte, ecc...) la carica virale è molto più bassa, e ciò rende più difficile l'infezione per queste vie (ma è comunque possibile la trasmissione madre-figlio durante il parto e per via sessuale).

FASI DELL'INFEZIONE

HBV è molto diffuso nella popolazione, anche se la sua frequenza di infezione sta diminuendo per via dello sviluppo del vaccino. La sua diffusione deve in parte il suo successo grazie al lungo periodo prodromico (45-120 giorni), che rende l'individuo un portatore asintomatico.

Il virus in fase acuta ha un'intensa attività di proliferazione a livello epatico, fino a che non si ha



l'intervento del sistema immunitario che può portare o a guarigione completa (80-90% dei casi) oppure portare ad epatite cronica, rimanendo nell'organismo ospite, il quale smette di produrre anticorpi contro gli antigeni di superficie (HBs) e non può così eliminare il virus.

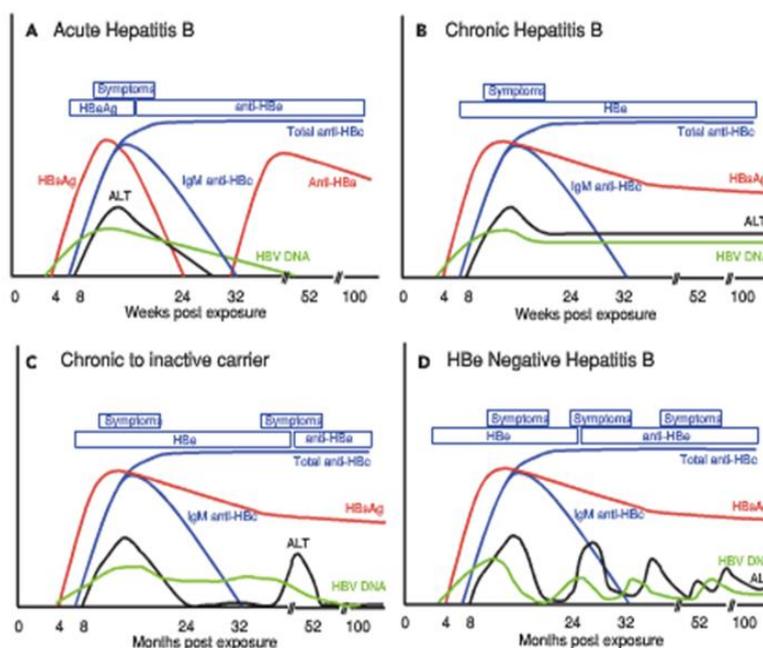
L'infezione cronica può

essere inattiva, che non dà grossi danni e dà origine a un individuo portatore asintomatico o paucisintomatico, oppure può essere attiva, e l'individuo manifesta sintomi acuti, che si accompagnano a fibrosi epatiche con perdita della funzione dell'organo. Lo sviluppo delle condizioni patologiche dovute alla presenza del virus avviene in tempi estremamente variabili, che dipendono dal soggetto infettato, dall'età del paziente, dalla presenza di cofattori (alcol), dalla terapia ecc... Nell'infezione cronica possiamo avere anche lo sviluppo di patologie extraepatiche. La differenza tra "infiammazione persistente" e "infezione cronica attiva" è dovuta al fatto che nel primo caso abbiamo un basso livello di replicazione virale e scarsa manifestazione sintomatica, mentre nel secondo caso abbiamo un alto grado di replicazione virale, che continua massivamente a distruggere il fegato.

ANDAMENTO DEI MARCATORI VIRALI NELL'INFEZIONE CON GUARIGIONE COMPLETA

L'antigene che compare più precocemente è HBsAg, che è presente sia sulle particelle incomplete che sull'involucro esterno del virione. HBsAg segnala un'infezione in corso, aumenta all'inizio della malattia e diminuisce fino a scomparire con la guarigione; contro questo antigene sono prodotti gli anticorpi HBsAb, che compaiono tardivamente e svolgono una funzione protettiva. HbeAg è una proteina associata al nucleo del virione, che può trovarsi disciolta nel siero del paziente e che indica uno stadio di replicazione attiva e quindi di infettività. La scomparsa di questi antigeni e la comparsa dei rispettivi anticorpi segna la via della guarigione.

La presenza di HbcAg è espressione di replicazione in atto. Trattandosi di una struttura interna del virione, gli anticorpi diretti contro di esso non sembrano svolgere un ruolo di difesa significativo. Anche il dosaggio della DNA-polimerasi virale permette di identificare la fase acuta dell'infezione.



ANDAMENTO DEI MARCATORI VIRALI NELL'INFEZIONE CRONICA

Nel caso in cui la malattia evolva verso un'epatite cronica attiva, la concentrazione di HBsAg, HBeAg e DNA-polimerasi permane elevata e l'unico anticorpo prodotto in continuazione è l'HBcAb.

Nei portatori cronici sani la presenza dei marcatori è simile a quella rilevabile in caso di epatite acuta, con la sola differenza rispetto a HBsAg che, seppur in assenza di danno epatico, continua a persistere nel siero.

DIAGNOSI

La diagnosi si basa sulla ricerca nel siero di 3 particolari antigeni (o relativi anticorpi) prodotti da questa specie virale, che sono:

- HBsAg, detto anche antigene "Australia" (termine non più utilizzato; attualmente è detto antigene di superficie), che è l'antigene glicoproteico del pericapside ("s" sta per "superficie"). Scompaiono dal siero del paziente quando vengono prodotti gli anticorpi specifici HBsAb, che sono gli anticorpi responsabili dell'immunizzazione, che compaiono tardivamente e non scompaiono più;
- HBcAg, che è un antigene del core, non solubile, che si trova soltanto a livello epatico, dove stimola la risposta immunitaria: nel siero troveremo solo gli anticorpi specifici per questo antigene, ma non l'antigene, che è presente solo a livello epatico ("c" sta per "core"). Determina la sintesi di anticorpi HBcAb quando l'infezione è in atto, che compaiono precocemente;
- HBeAg, che è un antigene del core, solubile, ed è il primo antigene a comparire durante l'infezione ("e" sta per "envelope"). Sono antigeni indicatori di una possibile cronicizzazione della malattia, soprattutto se vi è l'assenza dei rispettivi anticorpi HBeAb, che quando presenti indicano una bassa trasmissibilità.

La diagnosi si basa quindi su un'indagine sierologica rispetto a questi 3 fattori.

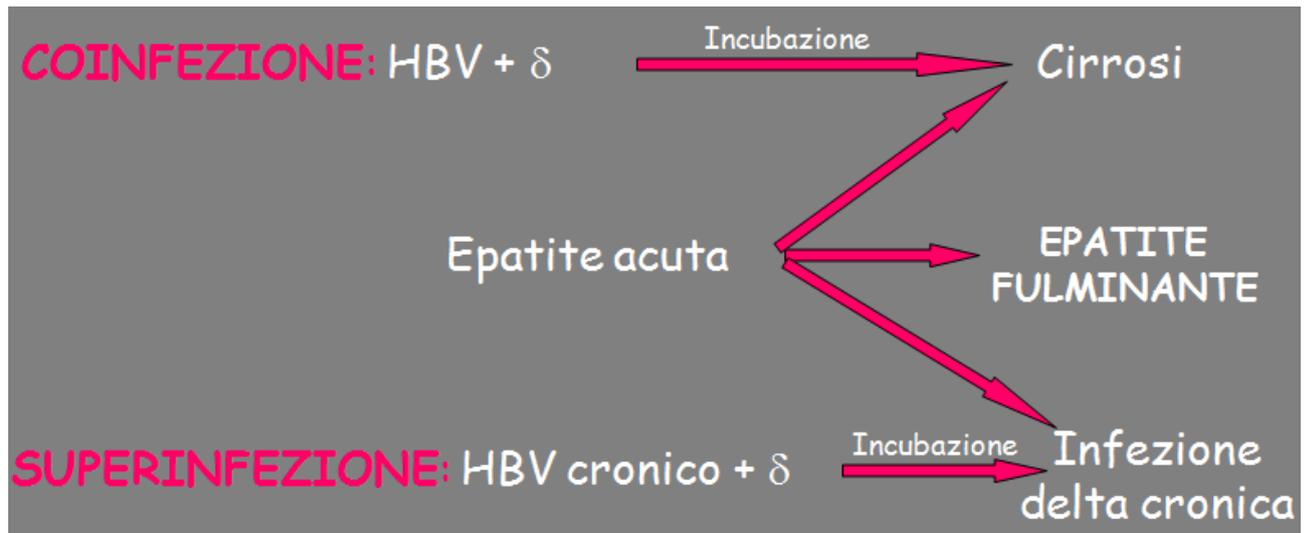
TERAPIA

Per questa specie virale esistono molti tipi di farmaci oltre all'interferon (Adefovir, Etecavir, ecc....) che possono essere inibitori delle proteasi o inibitori della retrotrascrittasi virale; ciò che è più importante nella terapia contro questo agente infettivo è che è disponibile un vaccino di tipo ricombinante, che viene prodotto utilizzando una proteina dell'envelope (la glicoproteina HBs, in forma ricombinante).

VIRUS DELL'EPATITE DELTA (HDV)

Questo virus è un virus "satellite" e determina infezione solo in associazione a infezione di HBV, in quanto questo è un virus difettivo. HDV agisce aggravando le condizioni infettive già determinate dall'infezione da HBV; le condizioni aggravate, determinate dall'agente delta, possono dare luogo a "epatite fulminante" (che determina la morte del soggetto) se l'infezione da questo agente avviene durante la fase acuta dell'infezione da HBV. Invece se HDV compare durante la fase cronica dell'infezione da HBV, l'infezione si aggrava comunque, ma ciò che è importante è che aumenta la velocità di sviluppo di cirrosi e l'aumento del rischio di sviluppo di carcinoma epatico.

L'antigene HBs, che abbiamo già visto su HBV, costituisce l'envelope del virione di HDV, ed è per questo motivo che questo agente necessita della presenza di un'infezione da HBV in corso per potersi mantenere (HDV utilizza lo stesso "vestito" di HBV).



Il genoma è formato da un RNA circolare a singola elica a polarità negativa; esso codifica per una particolare proteina che rappresenta l'antigene delta (delta-Ag), la cui identificazione è necessaria per la diagnosi.

VIRUS DELL'EPATITE C

CARATTERISTICHE GENERALI

Le uniche caratteristiche che lo accomunano a HBV sono la trasmissione per via parenterale, la capacità di cronicizzare, il fatto che determina un aumento del rischio di carcinoma epatico e il tropismo epatico.

Le caratteristiche specifiche di HCV invece sono:

- che appartiene alla famiglia dei Flaviviridae, in cui è contenuto il genere haepacivirus, che è il genere di HCV;
- ha genoma ssRNA a polarità positiva;
- ha il pericapside;
- la proteina del core (che costituisce il capsid) è la proteina C;
- la proteina che costituisce l'envelope è invece detta proteina E.

All'interno del genere Flavivirus abbiamo il gruppo degli Arbovirus, che sono i virus trasmessi dagli artropodi (gli insetti). Questi virus determinano infezioni classificabili come zoonosi e che si mantengono grazie al serbatoio nella popolazione animale. Gli Arbovirus sono in genere responsabili dello sviluppo di malattie emorragiche o encefaliti molto gravi, che colpiscono a livello sistemico.

STRUTTURA DELLA PARTICELLA VIRALE

Il virus dell'HCV è un virus piccolo, sia come dimensioni (circa 50nm) che come genoma. Il genoma di questi virus è intorno alle 10kb, il quale una volta penetrato nelle nostre cellule, viene rapidamente tradotto (in quanto l'RNA a polarità positiva ha già le caratteristiche dell'mRNA) e può rimanere nelle cellule epatiche dell'individuo, dando la persistenza all'interno dell'individuo, che è una delle caratteristiche fatali nell'infezione da HIV: la persistenza del genoma virale all'interno delle cellule attiva continuamente la risposta infiammatoria, che continua a produrre danno; inoltre

la presenza di genoma virale aumenta il rischio di modificazione neoplastica.

CICLO VITALE

Il ciclo vitale dell'HCV segue il normale flusso di un qualsiasi virus ad ssRNA con polarità positiva, il quale genoma normalmente non va nel nucleo, ma completa tutta la sua replicazione all'interno del citoplasma, associato alle membrane presenti all'interno del citoplasma (RE e apparato del Golgi); da queste membrane i nuovi virioni gemmano assumendo il pericapside ed escono attraverso un processo di esocitosi.

Chiaramente, essendo il genoma di questo virus ad RNA, questo non potrà essere replicato da un enzima cellulare, ma sarà necessaria una RNA polimerasi RNA-dipendente virale, che sarà quindi virus-specifica.

HCV, quando è fuori dalla cellula, si trova normalmente associato con delle lipoproteine (soprattutto LDL), che proteggono la particella virale dall'attacco del sistema immunitario e gli permettono di entrare nella cellula epatica grazie al recettore delle LDL; in questo modo HCV, replicandosi, altera il metabolismo lipidico a livello epatico, generando steatosi (accumulo di lipidi a livello epatico), ma anche perdita della funzionalità epatica e aumento della probabilità di sviluppo di modificazione neoplastica (anche dovuto al mantenimento di uno stato di infiammazione cronica).

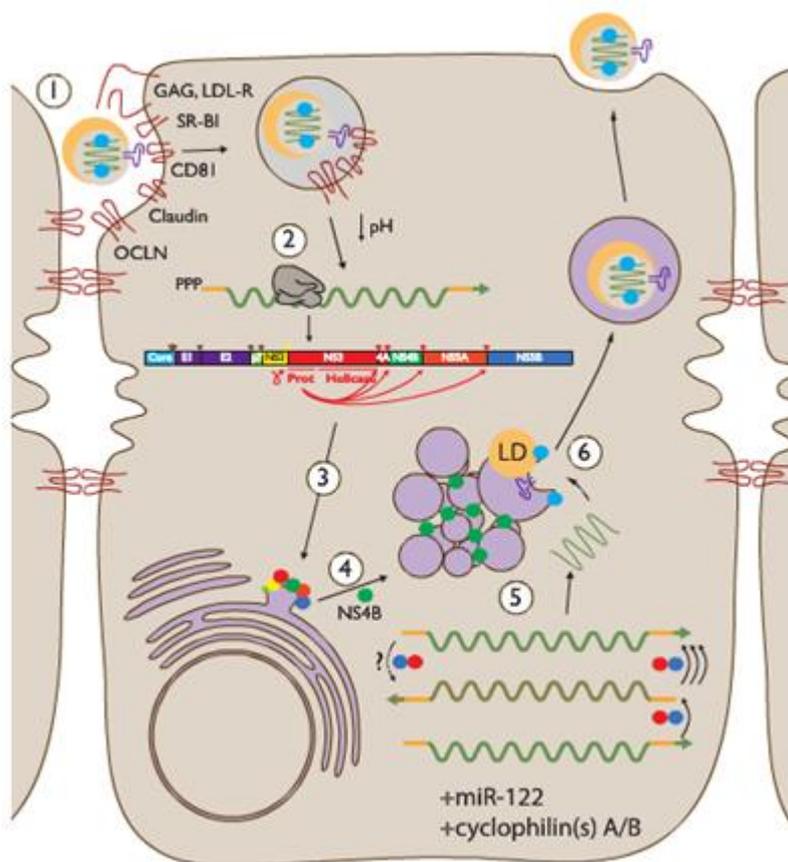
Quando il virione viene sintetizzato, esso ingloba delle molecole di LDL (che ricoprono il virione), e sembra che vi sia una connessione tra questo processo e la formazione di steatosi.

Quando il virione entra nella cellula rilascia immediatamente il proprio genoma nel citoplasma, che viene immediatamente attaccato dai ribosomi cellulari e tradotto; dalla traduzione del genoma virale deriva una poliproteina, che viene processata (tagliata tramite proteasi, che possono essere sia cellulari che virali) e riasssemblata sulle membrane plasmatiche per fare il pericapside.

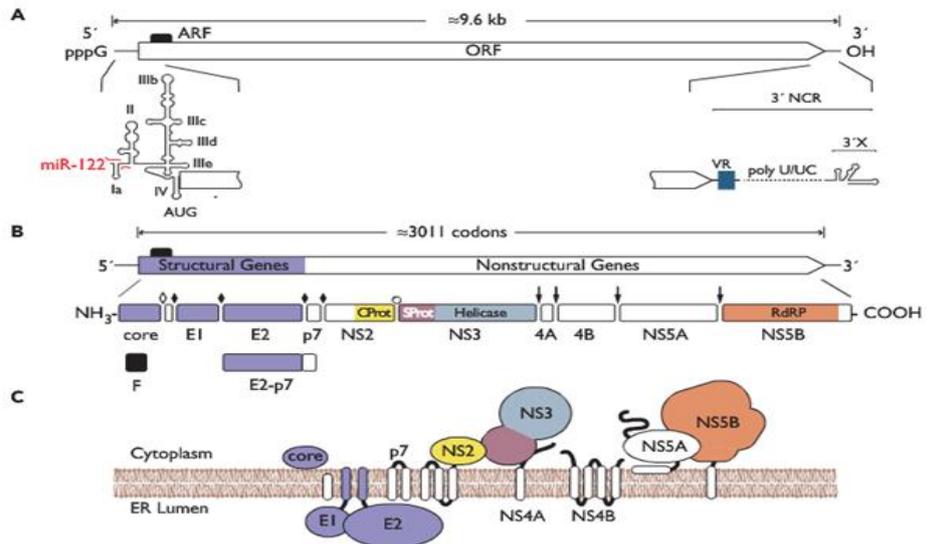
CARATTERISTICHE DEL GENOMA

Il genoma di HCV è molto piccolo (10.000bp), e spesso rimane nelle cellule epatiche dando origine a infezione persistente e possibilità di riattivazione; inoltre, siccome il genoma di questo virus è antigenico, può essere riconosciuto dai PRR e dare luogo a infiammazione cronica. Non può integrarsi, chiaramente perché è un genoma ad RNA.

Il genoma di questo virus si divide in:



- una regione strutturale, che contiene i geni che codificano per la proteina C (core) e per le 2 proteine dell'envelope E1 ed E2;
- una regione non-strutturale, che contiene una serie di geni, tra cui il gene che codifica per la RNA polimerasi RNA-dipendente. I geni contenuti in questa regione sono indicati con la sigla "NS" che sta per "Non-Structural" e una serie di numeri progressivi;
- una regione regolatrice che sta al 5' del genoma. A livello di questa regione si lega un miRNA (miRNA122, espresso solo a livello epatico, vedi immagine ciclo vitale) che regola l'espressione del genoma virale.



Tutte le proteine tradotte dal genoma vengono associate a una struttura membranosa di origine cellulare, e saranno tutte le proteine che andranno a formare il pericapside (E1 ed E2), a cui si associeranno tutte le altre proteine virali. Le proteine non strutturali sono quelle che saranno utilizzate come bersaglio degli anticorpi utilizzati a scopo diagnostico.

DIAGNOSI

La diagnosi di infezione da HCV si compone in genere di 2 step:

- nel primo step viene effettuato uno screening basato su indagine sierologica di anticorpi anti-HCV; se il soggetto è positivo prosegue con le indagini, se è negativo, il soggetto non è infetto;
- eseguo una Real-time PCR (PCR quantitativa) per ricercare copie del genoma virale (che è noto perchè è stato completamente sequenziato) nell'individuo sospetto; la presenza del genoma virale indica che l'infezione è in corso, la sua assenza invece non è in grado di assicurare l'assenza del virus nell'organismo ospite (perchè il genoma può non essere nel sangue). Sono stati identificati 6 genotipi diversi di HCV, e in base a quale di essi viene trovato ci si orienta sulla terapia da somministrare.

Essendo il 95% delle infezioni asintomatiche, spesso si giunge a una diagnosi in maniera casuale. Il soggetto che ha anticorpi contro HCV è soggetto che è sempre potenzialmente infettante, anche se non si trovano copie di DNA nel sangue (tramite PCR).

TERAPIA

Nella terapia contro l'infezione da HCV si attua in genere una strategia multifarmaco, in modo da

colpire il virus da più punti. I farmaci utilizzati sono:

- interferon esogeno;
- inibitori delle proteasi (che sono genotipo specifici);
- inibitori delle RNA polimerasi RNA-dipendenti virus specifiche.

Questa terapia aumenta la probabilità di successo e riduce la probabilità che si sviluppino ceppi resistenti.

DIFFUSIONE

Le diverse varianti genotipiche di HCV hanno diversa distribuzione: la più diffusa in assoluto è la variante 1B, ma in Italia è molto diffuso anche il genotipo 2.

HCV è un virus che si è espanso molto nella popolazione perchè in passato non sono state adottate le giuste misure preventive:

- per via delle trasfusioni e durante gli interventi chirurgici, per via degli scarsi controlli che venivano effettuati sui donatori di sangue;
- si è espanso anche tramite la pratica dei tatuaggi e l'uso di droghe, per via dell'uso di aghi e siringhe su più soggetti;
- si è espanso anche per via di pratiche non mediche o chirurgiche.

La diffusione del virus è anche facilitata dal fatto che di tutte le infezioni circa l'80% cronicizza, dando luogo a soggetti portatori sani potenzialmente infettivi.

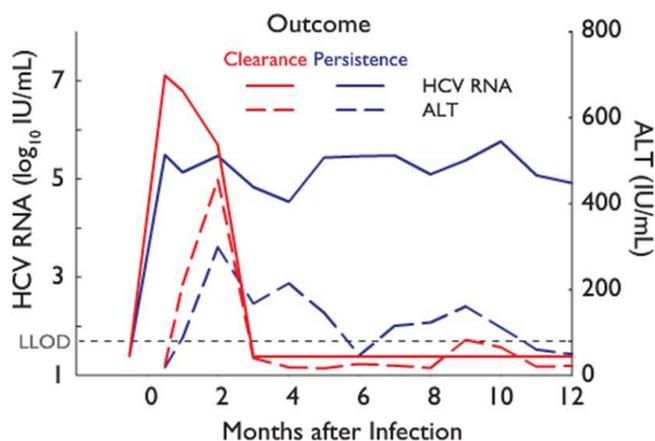


FIGURE 27.7. Patterns of acute hepatitis C virus (HCV) infection, resulting in spontaneous resolution or chronicity. The initial peak of viremia is followed by a peak in alanine aminotransferase (ALT) indicating cytolysis, temporally associated with the detection of cell-mediated responses to HCV that do not differ qualitatively by outcome when measured *ex vivo*.¹³³ Initial level of viremia is higher in those who clear compared with those who later progress to chronic infection.³⁸³

DECORSO SIEROLOGICO DEL VIRUS

La prof. ha detto che c'è tutto in didascalia

Papilloma virus

Molto importanti, si è riscontrata associazione certa con un particolare tipo di tumore umano, quello alla mucosa uterina. Non danno lisi cellulare, ma al contrario fanno proliferare le cellule, essenzialmente cellule epiteliali. Proliferazione significa quindi formazione di una massa, che può essere benigna e poi eventualmente evolvere in maligna.

Si tratta di una famiglia di virus molto ampia. I primi virus furono scoperti come riguardanti solo gli animali, poi si vide che non era così. Erano catalogati in un'unica grande famiglia detta papovaviridae che comprendeva appunto i papilloma virus e i polioma virus. Ora si conoscono solo per la specie umana oltre 180 genotipi di papilloma virus e 11 per il polioma. Non esiste più la categoria papovaviridae!

Parliamo soprattutto dei papilloma viridae. Esiste per esso un vaccino, basato sulla proteina L1, la principale componente del capsido, che è in grado una volta iniettata di autoassemblarsi, cioè di dare origine al capsido. Parliamo quindi di VLP, virus like particles (virus like perché ovviamente non c'è il genoma virale), scoperta importante appunto per la produzione del vaccino. La scoperta poi dell'associazione del virus con il carcinoma uterino è valse il premio nobel al tipo.

CARATTERISTICHE GENERALI (papillomi e poliomi sono molto simili)

- Molto piccoli
- Senza pericapside
- Genoma a DNA doppia elica circola molto piccolo 8 kb. Facilmente quindi analizzabile, il sequenziamento ha permesso la maggior parte delle scoperte.

Noi ci occupiamo solo di HPV, ovvero quelli umani, anche se molto papillomi infettano tutte le specie.

Nel genoma ritroviamo una regione regolatoria detta URR (o LCR), che controlla la trascrizione e la replicazione, la quale avviene sfruttando la DNA-polimerasi cellulare. Vengono poi codificate 7/8 proteine Early, proteine come sempre funzionali, e due proteine strutturali, L1 (quella del vaccino) ed L2. Tra le proteine funzionali troviamo E6 ed E7 (le prime in assoluto ad essere prodotte), che favoriscono la proliferazione cellulare. HPV spinge la cellula a sintetizzare DNA in quanto gli enzimi servono anche a lui per crescere. Esso infetta gli strati basali dell'epitelio e completa il ciclo replicativo nel corso della differenziazione delle cellule, per questo necessita di ambiente proliferante. Tutti gli epiteli infettati da HPV saranno quindi in attiva proliferazione ed ispessiti. Nel sistema immunitario funzionante da solitamente forme molto benigne come verruche, che risultano ovviamente molto pericolose nel soggetto immunodepresso. Come gli herpes quindi, papilloma e polioma sono virus diffusissimi nella popolazione, dove si è creato un equilibrio che permette il controllo da parte del sistema immunitario. Questo controllo risulta ovviamente alterato negli immunodepressi.

Le proteine del virus in grado di indurre proliferazione cellulare vengono in generale denominate E6 ed E7, ma sono ovviamente diverse nelle varie specie di virus. Le proteine ad esempio di HPV16 e 18 sono propriamente tumorigeniche. In generale l'epitelio pavimentoso stratificato è il bersaglio di questi virus. Per questo motivo sono difficilmente coltivabili in vitro.

La replicazione segue le modalità solite della relativa classe virale, sfruttando la polimerasi cellulare, quindi ci sono pochissimi farmaci utilizzabili.

CLASSIFICAZIONE

Abbiamo vari generi, i più importanti per l'uomo sono α e β . Ne troviamo anche alcuni che causano

verruche in γ e μ .

Tutti i genotipi che infettano l'uomo sono suddivisi sulla base del tropismo, mucosale non cheratinizzato (genitali interni ed esterni, alte vie respiratorie) e cutaneo cheratinizzato. Tra i mucosali riconosciamo virus cosiddetti a basso e ad alto rischio di trasformazione, dove basso darà condilomi e verruche mentre alto da tendenzialmente modificazioni tumorali.

- Mucosali a basso rischio: HPV 6 e 11
- Mucosali ad alto rischio: HPV 16 e 18

Tra quelli cutanei non suddividiamo invece tra basso e alto rischio: dobbiamo sapere che la verruca nel soggetto con sistema immunitario normale non è mai associata al genere β che è flora microbica normale, genere che determina invece manifestazioni cliniche nel soggetto immunodepresso. HA FATTO UN CASINO PAZZESCO, PRATICAMENTE NEL SISTEMA IMMUNITARIO NORMALE POSSO AVERE PATOLOGIE DA ALFA GAMMA MU E NU, MENTRE BETA DA VERRUCHE NELL'IMMUNOCOMPROMESSO. QUELLI MUCOSALI DETTI SOPRA APPARTENGONO AL GENERE ALFA – TRA I BETA RICORDIAMO HPV5 E 8.

TRASMISSIONE – possiamo parlare di trasmissione solo in alcuni casi, ad esempio per il virus della cervice uterina, nel caso dei genitali esterni no perché sono virus ubiquitari (?)

Esiste un effetto citopatico evidenziabile con il pap-test (che è appunto un esame anatomopatologico, non virologico). Con esso si vede appunto un eventuale modificazione morfologica. Quando la donna si infetta a livello dell'epitelio della cervice uterina, all'infezione fa seguito una clearance del virus che porta all'eliminazione di gran parte dei virus, ma restano probabilmente alcune copie negli strati basali dell'epitelio. Nell'80% dei casi il virus non si ritrova più, così come non si ritrova la proliferazione. L'eliminazione può avvenire in un tempo variabile, da pochi mesi a molti. Più il virus resta, più si moltiplica e con esso aumenta la proliferazione dell'epitelio. Si definisce quindi un grado di displasia crescente da 1 a 3 (CIN), dove 1 e 2 possono regredire. Il problema è che mancano dei marcatori che permettono di dire con certezza se una lesione 2 è destinata a regredire o peggiorare. In questa condizione si interviene chirurgicamente. Trovare HPV16 in una donna vuol dire poco, devo analizzare il tessuto per tenere sotto controllo l'eventuale evoluzione. Cofattori concomitanti all'infezione favoriscono l'evoluzione neoplastica. Non tutti i tumori hanno il genoma virale integrato: l'integrazione è un incidente per il virus, non ne permette l'ulteriore replicazione.

In condizioni di CIN1 la moltiplicazione del virus è molto elevata, l'epitelio prolifera poco e differenzia molto. Avremo un'espressione piuttosto elevata ed equilibrata di tutte le proteine del virus. In condizioni di CIN2 e poi CIN3 avremo sempre più rappresentate le proteine E6 ed E7 e sempre meno le altre, con l'epitelio che prolifera sempre di più e differenzia meno, quindi il virus non completa il ciclo replicativo. E6 ed E7 continuano poi ad essere prodotto a tumore sviluppato, anche grazie all'integrazione del genoma. Perché tale integrazione avvenga è necessaria la rottura del DNA circolare, rottura che solitamente avviene a livello di E2, proteina regolatoria di E6 ed E7 che viene così persa. Dal momento dell'integrazione è di fatto impossibile la regressione della displasia. Su tutte le donne che si infettano, una piccolissima quota presenta poi tumore alla cervice uterina. Questo perché lo sviluppo del tumore è di fatto un problema anche per il virus, perché la perdita di differenziazione non permette la sua replicazione ed è dovuta ad un caso conseguente all'elevata proliferazione, unico vero scopo del virus.

E6 ed E7 agiscono inibendo rispettivamente p53 ed Rb, bersaglio molto comune visto il loro coinvolgimento nella regolazione della proliferazione. Le capacità di legame e inibizione di p53 e

Rb è essenzialmente ciò che differenzia i vari HPV che causano verruche o tumore uterino.

DIAGNOSI

Citologia convenzionale, il test di screening detto pap-test. Come detto è un'indagine anatomopatologica volta ad individuare cellule morfologicamente alterate. Se ne vengono individuate si procede con un prelievo bioptico (quello precedente prevedeva cellule di sfaldamento). Sulla sezione bioptica possiamo fare indagini sulle singole cellule, mediante marcatori virali. Il problema è che i marcatori sono tanti i possibili genotipi che danno proliferazione. Faccio quindi una PCR, che però non mi dice le cellule specifiche colpite. A scopo di ricerca, e non ancora di diagnosi, viene utilizzato un anticorpo genotipo specifico per HPV16 come marcatore della proteina E4, proteina early che viene via via sempre meno prodotta con l'aumentare del carattere displastico: da CIN1 a CIN3 ne trovo sempre meno. Grosso problema è che non si è ancora riusciti ad individuare con immunofluorescenza E6 ed E7. Si può anche effettuare un test di ibridizzazione, in cui creo una sonda che va a cercare la sequenza specifica di un genotipo di riferimento. Il vantaggio rispetto alla PCR è che non devo amplificare, quindi non rischio contaminazioni.

VACCINO – si usa come detto le VLP di cui abbiamo detto sopra. Questo favorisce la formazione di anticorpi neutralizzanti in caso di contatto. Esiste un vaccino bivalente e uno tetravalente. Ha alcuni limiti, si sa che protegge per almeno 10 anni, oltre non si sa.

DUE PAROLE SUL GENERE Beta -.-

Tropismo cutaneo, non verruca banale che viene invece data dai generi γ μ e ν . Ho ispessimento, ma mai proliferazione come la cervice uterina. La lesione β non esiste nell'immunocompetente normale, sono ottimamente controllate. In alterazioni dell'equilibrio, il genere può manifestarsi, come accade ad esempio nell'epidermodisplasia verruciforme, dove si ha appunto un'aumentata suscettibilità al genere β . Si è evidenziato anche in molti soggetti trapiantati l'insorgenza di tumori epiteliali con elevato effetto citopatico dovuto soprattutto ad HPV14 in combinazione con cofattori come i raggi ultravioletti. Non esiste di fatto diagnostica, trattandosi di un problema piuttosto ristretto anche se in aumento.

DRITTE SUL POLIOMA VIRUS

È stato individuato un tumore con associazione certa a poliomavirus, denominato Merkel Cell Carcinoma. Si sviluppa a livello della cute, che si conosceva da anni ma solo nel 2008 si è scoperta la patogenesi virale. Spesso uccide i soggetti in pochi mesi, ma si è visto che in alcuni casi ha prognosi migliore. Il polioma che lo causa è indicato con lo stesso nome, ma si tratta di fatto di un virus ubiquitario. Il relativo tumore è quindi associato a disfunzioni del sistema immunitario o comunque alterazioni del normale equilibrio tra il virus e l'organismo, in particolare la cute.

I poliomavirus hanno molte caratteristiche in comune con i papilloma virus, molti dei quali sono stati individuati solo di recente mediante tecniche di sequenziamento. Particolarmente conosciuti e tra i primi ad essere scoperti sono BKV e JCV, il primo soprattutto nei trapiantati di rene e il secondo in generale nei trapiantati ed immunodepressi dove colpisce il sistema nervoso. La diagnostica è rivolta verso queste specie e prevede essenzialmente PCR nel sangue per individuarli. Il primo da nefropatie mentre JCV da leucoencefalopatia mielinizzante progressiva (PML).

Il fattore importante comunque da ricordare è che si tratta di virus che si riattivano negli immunodepressi, i due sopra sono ben caratterizzati, degli altri si sa pochissimo. Sono indicati come HPyV. Hanno genoma a DNA circolare con regioni early e late, nella prima abbiamo in

particolare Small e Large T antigen, le due proteine funzionali del polyoma che interagiscono con p53 ed Rb, da cui l'attività tumorale evidenziata nel merkel cell polyoma. Nei suddetti BK e JC causano infiammazione con le evidenti gravi conseguenze negli immunodepressi.

MICROBIOLOGIA 17-12

FAMIGLIA RETROVIRIDAE

Importantissima la presenza della retrotrascrittasi, molto utilizzata ora in biomol analizzare ad esempio i filamenti di RNA. I primi virus con caratteristiche oncogene furono scoperti proprio all'interno di questa famiglia. La prima scoperta riguardante questi virus fu proprio la possibilità di indurre l'insorgenza di tumore nel pollo sano, poi nel 1970 si scoprì la trascrittasi inversa. Alcuni anni dopo furono scoperti oncogeni di origine cellulare, mentre agli inizi degli anni 80 fu isolato l'HIV.

I retrovirus sono virus a RNA a polarità positiva (che non viene però direttamente prodotto) il quale è presente come doppia coppia nel capsido. Esso contiene anche alcune proteine virali, tra cui anche la trascrittasi inversa indispensabile per i primi step della replicazione e quindi incapsidata nei nuovi virioni. L'attività di questo enzima è ovviamente indispensabile per la formazione del relativo frammento a DNA, il quale viene poi integrato nel genoma cellulare. Tale integrazione è indispensabile per il virus, i retrovirus sono gli unici che integrano sempre il loro genoma e se ciò non avviene di fatto l'infezione non è completata.

Sono dotati di envelope, con le proteine tipiche di questo strato con le funzioni di riconoscimento e attacco del bersaglio e con le proteine antigeniche.

Il genoma dei retrovirus presenta sempre tre regioni genomiche essenziali sempre presenti: esse sono GAG POL e ENV. L'insieme di queste tre porzioni prende il nome di genoma semplice, tutti i retrovirus umani presentano altre sequenze geniche oltre a questo. Abbiamo poi sequenze regolatrici indispensabili per il corretto svolgimento della trascrizione. La trascrittasi inversa presenta due domini, una dna pol rna dipendente e un con attività RNAsica, interviene poi l'integrasi, altro enzima che come il precedente viaggia insieme al virus, in quanto devono intervenire nelle prime fasi dell'infezione, quando la trascrizione del genoma virale non è ancora iniziata. Grazie all'integrasi il DNA formato dalla trascrittasi inversa viene integrato nel genoma cellulare: parliamo quindi di provirus, termine che indica appunto il virus come DNA a doppia elica di un retrovirus integrato in un DNA cellulare. Il concetto di provirus è molto importante in quanto può essere utilizzato anche a scopo diagnostico. A questo punto il virus resta per sempre nella cellula, il retrovirus è impossibile da eliminare finché la cellula è viva. Una volta nella cellula, il virus viene trattato come una porzione qualsiasi di genoma cellulare, quindi come tale viene trascritto dalla polimerasi cellulare. La trascrizione è regolato dalle LTR, sequenze regolatrici molto potenti in grado di attrarre la polimerasi sui geni virali necessari. Grazie alle LTR il virus è in grado di attivare da un lato la trascrizione di proteine virali, ma anche modificare la normale trascrizione delle proteine cellulari. Vengono anche tradotte le proteasi virali, che si occupano del clivaggio di peptidi più lunghi che vengono appunto tagliati a proteine attive. Da qui come sempre si assemblano i nuovi virioni che vengono liberati per gemmazione.

Dove si trovano i retrovirus?

Essi si sono col tempo accumulati nel genoma delle cellule eucariote, comprese le nostre. Nelle nostre cellule si trovano i cosiddetti retrovirus endogeni, frammenti di genomi retrovirali trasmessi con l'evoluzione. Ad essi non sono associati processi patologici, riscontrati invece solo per i retrovirus esogeni.

Moltissimi retrovirus presentano nel loro genoma sequenze dette v-onc, essenzialmente analoghe agli oncogeni delle nostre cellule. Queste sequenze possono essere extra-genes (oltre a GAG POL e ENV), ma la maggior parte delle volte l'acquisizione di v-onc comporta la perdita di una porzione di genoma per far spazio a questa sequenza. Si parla quindi di trasformanti acuti, SOLO ANIMALI, in grado di dare trasformazione tumorale in tempi piuttosto brevi, ma parliamo anche di virus difettivi, in quanto la perdita di una delle sequenze di cui sopra non permette il corretto avvenimento del ciclo replicativo. I retrovirus trasformanti acuti agiscono mediante il v-onc e sono quindi tutti replicazione-difettivi, per moltiplicarsi necessitano di una concomitante infezione. Il v-onc è una sequenza derivante da un'altra cellula che subisce via via mutazioni fino ad essere appunto inserito nella cellula infettata, dove codificherà per una proteina modificata e dove la trascrizione sarà tendenzialmente aumentata in quanto sotto il controllo delle LTR.

Parliamo poi di retrovirus trasformanti cronici, anche questa modalità non evidenziata nell'uomo. Essi non portano v-onc nel genoma. Essi inducono trasformazione mediante la mutagenesi da inserzione, che avviene quando le LTR vengono inserite vicino ad oncogeni cellulari dell'animale (es. LTR vicino a myc). Hanno evidentemente un periodo di incubazione molto più lungo rispetto ai trasformanti acuti.

L'unico processo evidenziato nell'uomo è la transattivazione, dimostrato sui virus HTLV 1 e 2. Essi producono appunto proteine transattivanti, ossia proteine che legano il DNA in sequenze specifiche attivandone la trascrizione. Abbiamo quindi queste proteine virali che aumentano la trascrizione di proteine cellulari, causando solitamente iper-espressione di proteine e aumento della proliferazione.

I retrovirus umani appartengono essenzialmente a due generi: HTLV 1 e 2 appartengono al genere delta, mentre HIV appartiene ai Lentivirus. HTLV sono, per quanto detto prima, virus oncogeni, mentre HIV no. Hanno entrambi genoma complesso, con altre sequenze oltre a GAG, POL e ENV.

HIV

Identificato nel 1983, venne studiato poi mediante sequenziamento ed inserito così nei retrovirus. Si arrivò alla scoperta vedendo persone omosessuali che sviluppavano patologie associate a patogeni opportuniste a cui normalmente l'organismo è resistente. Si intuì quindi la trasmissione sessuale e la trasmissione da madre a feto, pensando quindi ad un virus che venne poi identificato. Si parlò quindi di AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome.

L'HIV deriva dalle scimmie, nel senso che c'è stata un'esposizione molto forte al SIV, il corrispondente virus delle scimmie. L'esplosione degli anni '80 è semplicemente dovuto ad un'espansione: il contatto con gli scimpanzé c'è sempre stato, ma chi lo contraeva restava isolato. Gli studi dicono che probabilmente un solo soggetto intorno agli anni '50 stava a contatto con le scimmie, si infettò e prima con la civilizzazione di paesi rischio come l'Africa, poi progressivamente con sesso non protetto e aghi infetti (droga ma anche pratiche sanitarie), ci fu l'espansione.

L'HIV è una delle maggiori epidemie nel mondo attuale, con circa 35 mln di persone infettate. Oggi si trasmette soprattutto tra gli eterosessuali. La trasmissione è essenzialmente sessuale per contatto di sangue (inoltre le secrezioni genitali hanno un alto contenuto virale) e dalla madre al feto.

L'HIV viene suddiviso in due gruppi, l'1 è quello diffuso in tutto il mondo, mentre il 2 è tipico di alcune zone dell'Africa equatoriale ed è meno aggressivo. Nell'1 abbiamo poi quattro sottogruppi,

M, O, N e P, di cui il più diffuso è l'M (oltre il 99% dei casi). Ogni gruppo deriva da una trasmissione differente del SIV, evidentemente uno si è adattato meglio e causa i danni.

Come abbiamo visto per gli altri retrovirus, abbiamo un RNA a doppia coppia racchiuso nel capsido insieme alle proteine necessarie alla replicazione (trascrittasi inversa ed integrasi). Le strutture proteiche di superficie hanno nomi specifici e alcune sono utilizzate a scopo diagnostico (es p24). Ricordiamo poi gp120 e gp41, determinanti antigenici del virus. Il genoma è complesso, non fa solo GAG POL ed ENV, è molto piccolo, circa 10000 bp ma con un alto potenziale di trascrizione.

Vediamo ora alcune proteine trascritte.

GAG: codifica per proteine costituenti del nucleocapside.

POL: codifica per tutti gli enzimi necessari all'avvio della trascrizione.

ENV: codifica per la glicoproteine di superficie derivanti da un unico precursore che è gp160.

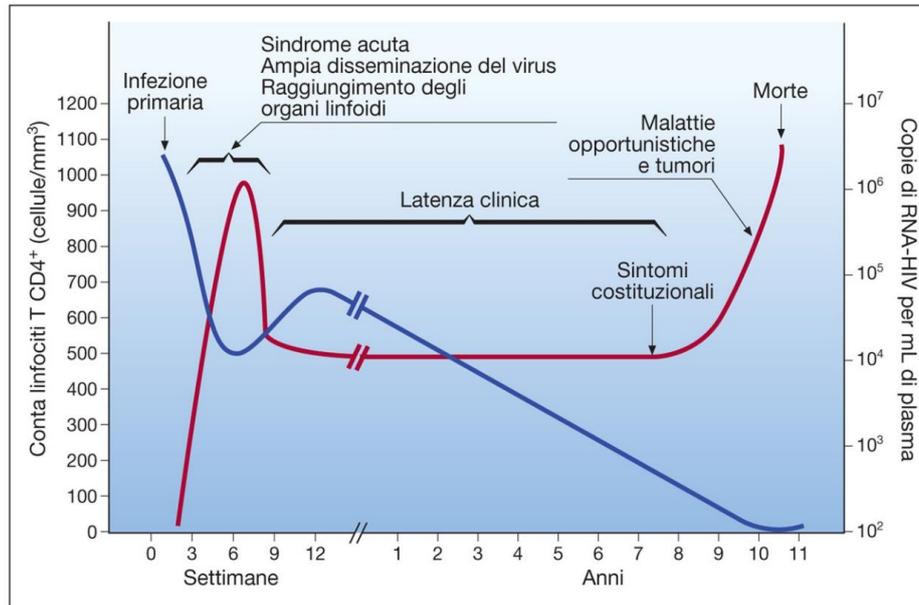
TAT: fattore di trascrizione, proteina transattivante con un omologo negli HTLV (TACS). Una volta prodotta nelle nostre cellule comanda la trascrizione sia di geni virali che cellulari.

Il riconoscimento della cellula bersaglio da parte di HIV avviene mediante interazione con il recettore CD4 e altri co-recettori chemochinici quali CCR5 e CXCR4. Il CD4 determina il tropismo del virus. Esso viene legato dalla gp120 a cui segue una modificazione conformazionale, il legame con il co-recettore e l'esposizione di gp41 che permette la fusione dell'envelope con la membrana cellulare. Sono stati identificati due ceppi sulla base del corecettore: ceppo M (macrofagi, CCR5) e ceppo T (linfociti T, CXCR4).

Segue poi la fase di replicazione dei retrovirus con integrazione del DNA.

CLINICA

Dopo l'arrivo del virus mediante le modalità di trasmissione suddette, esso deve trovare le cellule per cui è specifico per potersi replicare, fino ad arrivare nei linfonodi dove si replica in modo massiccio. Siamo quindi nell'infezione primaria, con una crescita fortissima della quantità di RNA nell'organismo. Il virus va quindi in latenza, la viremia è molto bassa e le difese immunitarie scendono sempre di più fino alla manifestazione dell'immunodeficienza. Questo accade senza terapia.



L'immunodeficienza comporta enorme suscettibilità alle infezioni opportuniste a cui normalmente siamo resistenti, ma anche danni al sistema gastroenterico e danni progressivi al sistema nervoso centrale (il virus infetta anche la microglia e causa infiammazione con danno). Come si vede dal grafico, in assenza di farmaci il virus sta in latenza per alcuni anni, poi il sistema immunitario cede definitivamente. Ora si hanno trattamenti che permettono un controllo sulla replicazione virale e consentono essenzialmente di allungare la latenza e aiutano la resistenza del sistema immunitario. Abbiamo anche altre due forme di evoluzione della malattia: il rapid progressor e il non progressor. Nel primo caso la fase di latenza è molto più breve, i sintomi da immunodeficienza si manifestano molto precocemente. Dipende essenzialmente da varianti genetiche individuali e spesso soggetti rapid progressor sono i bambini, già carenti dal punto di vista immunitario ed incapaci di combattere il virus. I non progressor invece sono pazienti infettati da HIV da anni che tardano però a manifestare i sintomi, probabilmente per una questione di recettori che favoriscono una minor suscettibilità al virus.

Le infezioni più importanti contratte dagli immunodeficienti per HIV sono protozoi (in particolare responsabile di polmonite), micobatteri e CMV. Spesso si ha inoltre l'insorgenza di tumori, ma assolutamente non dovuti all'effetto diretto di HIV ma alla sensibilità ad altri virus oncogeni (sarcoma di Kaposi da HHV8).

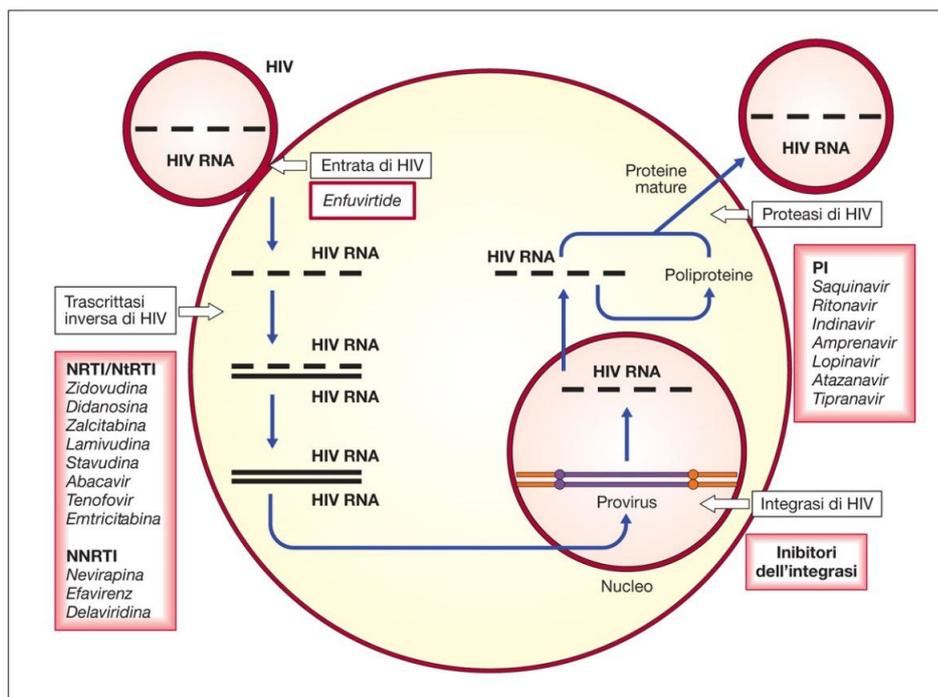
DIAGNOSI

Abbiamo diagnostica di screening, essenzialmente test ELISA per la ricerca di anticorpi contro il virus. Se risulta positiva, devono essere effettuati ovviamente altri test che escludano falsi positivi. Ripeto innanzitutto il prelievo ed il test. Effettuo quindi un test di conferma di ricerca degli anticorpi più sensibile (Wester blot). A questo punto la diagnosi è certa. Dal punto di vista della progressione della malattia, il ritrovamento degli anticorpi non è molto indicativo. Effettuo

quindi una real-time PCR che mi dica la carica virale e lo stato replicativo. In particolare, posso fare questa pratica sul provirus, che dice quante cellule più o meno sono infettate, ma non qual è lo stato replicativo del virus. La pratica veramente utile è una PCR sull'RNA del virus, che mi dice quanto genoma di HIV è presente nel sangue del paziente.

Anche i parametri immunologici sono molto importanti, primo tra tutti il valore dei linfociti T che scende molto rapidamente essendo il principale bersaglio del virus.

FARMACI



G. Antonelli e M. Clementi

Principi di Virologia Medica Copyright 2008 C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana

I farmaci vengono sfruttati in combinazione, per aumentare l'efficacia ma anche per diminuire le possibilità di sviluppo di resistenza verso di essi, visto che si tratta comunque di cure che vanno somministrate per moltissimi anni. Qualsiasi cura ovviamente non elimina il virus, è impossibile in quanto integrato, ne attenua solo la replicazione. Non esiste alcun vaccino.

HTLV

Lungo periodo di latenza, decenni circa per sviluppare il tumore. Il ruolo del virus è mantenere alta la proliferazione delle cellule infette, funzione svolta da TACS che lega sequenze specifiche di DNA, in particolare quelle che codificano per IL2 e IL2r. Aumenta così la proliferazione dei linfociti T. Si parla quindi di transattivazione, la proteina di origine virale va a regolare l'espressione di sequenze cellulari.

ORTOMYXOVIRUS (VIRUS INFLUENZALI)

Abbiamo tre tipi del virus dell'influenza, A B e C. Solo i primi due causano danni nell'uomo. Hanno pericapside e glicoproteine di superficie come sempre fondamentali per le fasi di attacco e

penetrazione e per l'antigenicità.

Abbiamo essenzialmente due proteine di superficie: HA (emoagglutinina) e NA (neuroaminidasi). Le sigle H ed N sono utilizzate per identificare i virus influenzali. Queste proteine sono i fattori responsabili della variabilità genetica associata ai virus influenzali. Ogni volta che veniamo in contatto con essi viene montata una determinata risposta immunitaria specifica che non funziona più la volta successiva a causa delle variazioni a carico di queste proteine.

Sono sottoposti a costanti analisi epidemiologiche in quanto sono soggetti ad alta variabilità genetica che può favorire aumento della gravità dei sintomi. Inoltre si diffondono molto facilmente per aerosol, hanno altissima capacità di contagio. È praticamente impossibile proteggersi. Inoltre sono virus che non danno morte solitamente, quindi si mantengono facilmente nella popolazione. Al massimo i virus influenzali danno polmoniti, possono però debilitare fortemente l'organismo che può essere colpito da microorganismi più pericolosi. Virus influenzali mortali sono invece alcune specie che infettano gli animali, in quanto danno sintomi sistemici a differenza di quelli umani che danno per lo più sintomi solo respiratori.

Il genoma è ad RNA a polarità negativa ma è frammentato. Nel virus influenzale umano i frammenti sono 8 e tale frammentazione li predispone alla cosiddetta ricombinazione per riassortimento. Quando il virus perde il capsido i vari frammenti vengono liberati nella cellula ospite e ognuno di questi viene trascritto. Alla fine, quando vengono costruiti i nuovi virioni, se la cellula è infettata da un solo virus essi si riformano nello stesso modo in cui sono entrati. Se essa è però infettata da virus diversi (sempre influenzali) di varie specie animali, posso avere ricombinazione. Questo può succedere in alcuni animali (soprattutto suini) che possono essere colpiti da virus di specie diverse. È molto pericolosa l'eventuale ricombinazione del virus umano con il virus H5N1, il quale ha una patogenicità altissima. Se avvenisse la ricombinazione, per noi sarebbe un disastro. A definire il virus concorrono, come abbiamo detto prima, le specie di emoagglutinina e di neuroaminidasi presentate. Nelle forme aviarie del virus abbiamo essenzialmente tutti le specie disponibili queste proteine, tra cui appunto quelle più pericolose. La specie aviaria può infettare anche altre specie, tra cui l'uomo, ma ciò avviene solo in condizioni di esposizione a quantità enormi di virus. Da qui però la trasmissione è sempre stata limitata al massimo a pochi individui, se non addirittura al primo colpito. Il problema può essere, come detto prima, la ricombinazione. Da questo momento non si tratta più di diffusione del virus animale, ma di un virus di fatto umano con caratteristiche di trasmissione umana elevata e danni altrettanto elevati derivanti dal virus aviario. Questo avviene soprattutto in zone rurali, dove vive un uomo nella stessa stanza di un maiale e un gallina (cit.). Il maiale può prendere i virus dell'uomo e della gallina. Le cellule infettate avranno quindi nel nucleo 8 frammenti del virus umano e 8 frammenti del virus della gallina. Nel momento in cui deve avvenire l'assemblaggio dei nuovi virus, esso può avvenire correttamente, ma possono anche avvenire errori che portano appunto alla ricombinazione per riassortimento. Gli ultimi virus influenzali più pericolosi derivano infatti dal maiale, che è quello che può essere colpito da più specie virali, dando poi il via all'infezione ricombinata. I fattori essenziali per la ricombinazione sono quindi il genoma frammentato e la possibilità di infettare specie differenti.

Abbiamo poi una seconda forma di variabilità a cui tutti i virus influenzali vanno incontro a prescindere dalla ricombinazione. Si tratta del Antigenic Drift, o deriva antigenica, dovuta essenzialmente alla variabilità degli epitopi di HA e NA. Queste variazioni sono dovute alle caratteristiche stesse del genoma, l'RNA può andare incontro facilmente a mutazioni che

generano forme differenti di proteine.

I vari virus influenzali possono inoltre variare le proprie caratteristiche patogenetiche. In generale comunque quelli umani danno sintomi localizzati a livello dell'albero respiratorio, mentre i sintomi sistemici sono dovuti all'attivazione della risposta infiammatoria.

VACCINI

I virus influenzali vengono coltivati nelle uova di pollo. Il virus viene costruito geneticamente mediante co-infezioni per creare in laboratorio un virus riassortito che cresca bene nell'uovo che contenga gli epitopi di HA ed NA dell'uomo. Si prende quindi il virus in circolo contro cui si vuole fare il vaccino per avere gli epitopi da combattere, ma si prende anche quello del pollo in modo che si moltiplichi e ne ottenga molte copie una volta inoculato nell'uovo: infetto quindi l'uovo con entrambe le specie virali affinché queste si ricombinino e analizzo tutte le ricombinazioni fino a trovare quello con le giuste combinazioni. Questo lo metto in molte uova in modo da ottenerne grandissime quantità, lo purifico, lo combino con adiuvanti che inducono una concomitante risposta infiammatoria e lo inoculo nell'uomo. Si tratta quindi di un processo molto lungo, di almeno alcuni mesi.

FARE PARAMYXOVIRUS CHE SONO SEMPLICE

PICORNAVIRUS

Famiglia di virus che si trasmette per via oro-fecale. All'interno di questa famiglia troviamo epatovirus (epatite A), rhinovirus responsabile del raffreddore (non si trasmette per via orofecale, unica eccezione dei picorna), enterovirus (tra cui poliovirus e altri). Fattore importante da ricordare degli enterovirus è che passano attraverso l'intestino per andare nel sangue e spesso danno patologie infiammatorie croniche sistemiche subdole, senza manifestazioni acute.

Abbiamo due tipi di vaccini contro la polio, uno fatto con vaccino ucciso e uno con virus vivo attenuato. Vaccinando i bambini con quello attenuato, oltre a far sviluppare la risposta immunitaria, mantengo nella popolazione il virus attenuato che compete con quello normale. Solitamente i due vaccini vengono intercalati o dati in modo alternato.

MICETI

I miceti sono microrganismi eucarioti presenti in due forme:

- Lieviti: singola cellula che si riproduce per gemmazione, di forma rotondeggiante
- Muffe: lunghi filamenti (ife) che crescono per estensione apicale

Vi sono poi funghi dimorfici, ossia che possono trovarsi in entrambe le forme poiché in grado di trasformarsi.

Sono organismi eterotrofi, aerobi o anaerobi facoltativi; sono dotati di un rivestimento esterno composto da:

- Capsula: di natura polisaccaridica
- Parete cellulare: detta tunica, rigida e stratificata
- Membrana cellulare: simile a quella dei Mammiferi

Hanno dimensioni maggiori rispetto ai batteri e si possono riprodurre sia per via sessuata che asessuata.

Danno infezioni endogene di tipo opportunistico, soprattutto in soggetti immunodepressi (Aspergilli e Candida) o infezioni esogene, in cui il patogeno entra per inalazione o attraverso una lesione causando infezioni superficiali, cutanee e sub cutanee (pelle, capelli, unghie), sistemiche (cuore, cervello, milza, fegato polmoni, reni), opportunistiche.

ASPERGILLI

Saprofita ubiquitaria, opportunisti che colpiscono soggetti immunodepressi. Portano a patologie delle vie aeree. Sono miceti filamentosi

DERMATOFITI

Funghi che danno infezioni superficiali a unghie, capelli e cute. Sono miceti filamentosi

CANDIDA albicans

Esempio di micete lieviti forme. Naturale commensale della cute e delle mucose delle cavità dell'uomo. Patogeni opportunisti che causano una serie di patologie che vanno sotto il nome di candidosi. Diffusa nei pazienti affetti da AIDS è la candidosi esofagea.

DIAGNOSI DI MICOSI

La diagnosi di micosi si effettua attraverso:

- ricerca microscopica dei miceti stessi nei materiali biologici (a fresco o in sezioni istologiche)
- esame colturale su terreni solidi

PROTOZOI

Microrganismi eucarioti, unicellulari, chemio sintetici ed eterotrofi.

Sono formati da una membrana esterna che fa da pellicola; all'interno di essa è presente un citoscheletro di actina e tubulina. Vi sono poi organelli come ribosomi, mitocondri e RE. Presentano un'apertura specializzata detta cistosoma per nutrizione ed eliminazione delle scorie (la nutrizione può avvenire anche per fagocitosi). Sono organismi mobili in quanto dotati di flagelli, pseudopodi e cilia. Si replicano per via sessuata e asessuata; ad esempio Plasmodium malariae si replica per via sessuata nella zanzara vettore e per via asessuata nell'uomo.

DIAGNOSI

Effettuata attraverso:

- Osservazione microscopica a fresco o dopo colorazione
- Prova biologica
- Prove colturali
- Indagine sierologica

Esistono farmaci specifici ad azione antiprotozoica.

PLASMODIUM

È uno dei generi di più alto interesse medico. È infatti l'agente eziologico della malaria. Comprende 120 specie di cui solo 4 patogene per l'uomo (falciparum, malariae, vivax, ovale).

La malaria è la principale causa di mortalità nel mondo, diffusa soprattutto in Africa, Asia e America Latina (zone intertropicali). Ha un serbatoio animale, infatti può essere trasmessa da insetti vettori all'uomo durante il pasto ematico dell'insetto femmina.

Ciclo vitale

La zanzara durante il pasto ematico inocula nell'uomo gli sporozoiti, elementi fusiformi che colonizzano gli epatociti, divenendo schizonti. Lo schizonte frammentandosi da origine a numerosi merozoiti. Questi infettano gli eritrociti umani e all'interno di essi maturano e infettano altri globuli rossi (merozoita-> schizonte-> merozoiti). I merozoiti possono inoltre differenziarsi in gametociti che passano alla zanzara durante il pasto ematico. Qui si formano macrogametociti e microgametociti. L'unione di un macro e un micromegalocita da origine allo zigote. Lo zigote perfora la parete intestinale dell'insetto e vi aderisce nella parte esterna come oocisti contenente gli sporozoiti che verranno rilasciati nel torrente ematico del soggetto punto dalla zanzara. Questo vale per P. falciparum e P. malariae, mentre per gli altri due il merozoita negli eritrociti entra in quiescenza, portando a forme recidivanti della patologia.

La diagnosi è effettuabile quando il plasmodium si trova nello stadio di schizonte e di gametocita nell'eritrocita.

Abbiamo diverse forme di malaria:

- Malaria terzana maligna: causata da P. falciparum, esordisce con eccessi febbrili, cefalea, brividi e prostrazione. Gli eccessi febbrili sono causati dalla rottura degli eritrociti infettati che rilasciano cataboliti tossici.
- Malaria terzana benigna: causata da P. ovale e P. vivax, è una forma meno grave e un periodo di incubazione più lungo.
- Malaria quartana: causata da P. malariae, presenta come sintomi eccessi febbrili ogni 72 ore circa ed è caratterizzata da periodi di incubazione che possono durare fino a 6-8 mesi, ma

solitamente dura circa 21-28 giorni.

Diagnosi

Concomitante agli accessi febbrili, è possibile la ricerca del plasmodio nel sangue (striscio) e la ricerca degli antigeni circolanti.

Terapia

Di notevole importanza è l'espansione della farmaco-resistenza di *P. falciparum* ai presidi terapeutici antimalarici, tra cui la Cloroquina; si utilizza quindi Meflochina o, se grave, Chinino dicloridrato o Pirimetamina- sulfamidico.

GIARDIA

Del genere *Giardia* va ricordata la specie *G. intestinalis*, patogena per l'uomo. Il suo ciclo vitale presenta due forme di sviluppo:

- Una forma vegetativa rappresentata dal trofozoite che si localizza a livello intestinale (mucosa duodeno-digiunale). Qui i trofozoiti si moltiplicano senza penetrare la mucosa, causando modificazioni dell'orletto a spazzola.
- Una forma di resistenza rappresentata da cisti responsabili della trasmissione oro-fecale del protozoo; si localizzano a livello colico; sono sfruttate in campo diagnostico attraverso la loro ricerca nelle feci o mediante biopsia duodenale.

L'infezione decorre nella maggior parte dei casi in modo asintomatico, generando una risposta anticorpale costituita da IgM, IgG e soprattutto IgA secretorie. Se la moltiplicazione raggiunge alti livelli si possono avere manifestazioni diarroiche acute o croniche, malassorbimento di grassi e modesta infiammazione.

Terapia

Il farmaco di elezione è il metronidazolo.

TRICHOMONAS

Tre specie patogene per l'uomo:

- *T. vaginalis*: vie genitali
- *T. hominis*: parassita del tratto gastroenterico
- *T. tenax*: parassita del cavo orale

T. vaginalis: non produce forme di resistenza (no cisti), si trasmette per contatto sessuale, molto fragile al di fuori dell'organismo umano. Nell'uomo l'infezione è spesso asintomatica ma può dare uretrite purulenta; mentre nelle donne può causare vaginite con leucorrea, prurito ed edema della mucosa vaginale.

La diagnosi è effettuata per ricerca diretta del protozoo negli essudati vaginali e nelle urine dopo 48 ore di astensione da rapporti sessuali. Farmaco di elezione: metronidazolo.

ENTAMOEBIA hystolitica

Protozoo ubiquitario, maggiormente presente nelle fasce intertropicali e nei climi caldi.

Ha localizzazione principalmente intestinale e trasmissione oro-fecale.

Ciclo vitale

Presenta una forma vegetativa (trofozoite) e una forma di resistenza (cisti). Il trofozoite colonizza il cieco, dove matura. L'infezione può essere asintomatica (portatori sani) o può evolvere in una forma maligna: in questo caso il parassita causa la lisi delle cellule coliche a cui aderisce penetrando nella

sottomucosa; da qui può raggiungere altri organi tra cui fegato e polmoni. Dal punto di vista clinico riconosciamo dunque:

- Amebiasi intestinale: acute o croniche, caratterizzate da scariche diarroiche e dolori addominali
- Amebiasi extraintestinale: caratterizzate da febbre, ascessi epatici e polmonari e grave compromissione dello stato generale. Interessamento anche di cute ed encefalo.

Diagnosi

Si effettua con la ricerca delle cisti nelle feci; difficile la ricerca diretta del protozoo a causa della difficoltà nel distinguere le forme non patogene da quelle patogene. Un'indicazione di forma patogena è data dalla presenza di residui eritrocitari, tipica delle sole forme patogene.

Terapia

Farmaci endoluminali associati a farmaci sistemici tissutali.

TOXOPLASMA GONDII

Parassita endocellulare dell'uomo. L'infezione è spesso asintomatica o simil-mononucleosica; diffusione cosmopolita; di grande importanza è la prevenzione durante la gravidanza per donne che risultano sieronegative al protozoo in quanto le forme connatali sono molto gravi e possono portare all'aborto o a gravi compromissioni per il feto (idrocefalo).

Ciclo vitale

Prevede una fase sessuata nell'ospite definitivo (gatto) dove si generano le cisti e una fase asessuata negli ospiti intermedi (uomo, animali domestici). L'infezione si trasmette all'uomo proprio attraverso le cisti che si ritrovano nelle feci di gatto: nell'ambiente esterno infatti si ha il processo di sporulazione; se l'uomo ingerisce queste spore, l'ooocisti inizia a replicarsi e a rilasciare merozoiti che si portano ai linfonodi. Si ha quindi parassitemia, unica fase durante cui si può avere trasmissione materno-fetale. La replicazione rallenta grazie all'instaurarsi dell'immunità specifica e dopo la fase acuta i protozoi si portano (per via ematica) al tessuto muscolare, al SNC e nell'occhio dove continuano a proliferare restando però quiescenti. In caso di immunodepressione queste forme parassitarie possono riattivarsi.

Diagnosi

È resa difficoltosa dal fatto che non è rintracciabile nelle feci (le cisti si formano solo nel gatto). È necessaria la ricerca di IgM su sangue funicolare e indagini sierologiche.