



Nicola Maiorana
agente Edises Università per
Piemonte, Liguria e Pavia.
Thieme reseller
Via L.Capriolo, 60/C 10139
Torino
Mob.+393472641291
nicolmaior@gmail.com





VIROLOGIA GENERALE

Parte 2

Prof.ssa Vivian Tullio



REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI

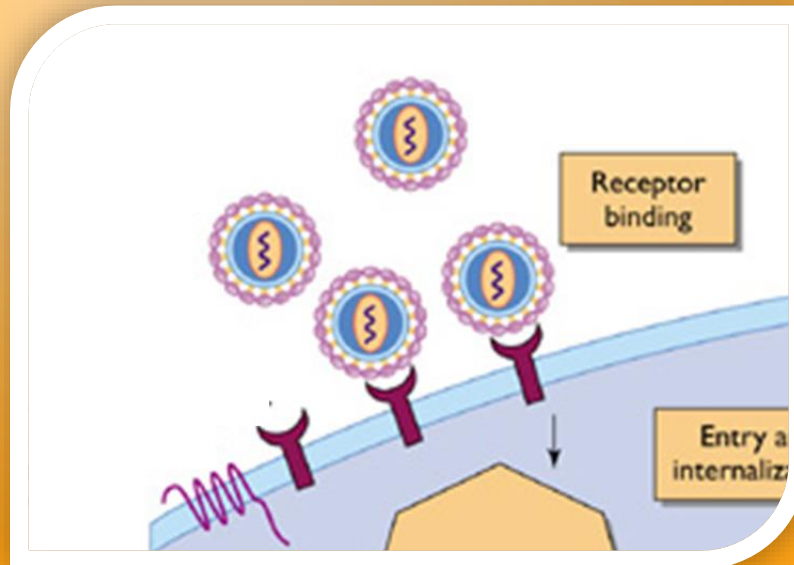
TAPPE



REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI

ADSORBIMENTO

E' mediato da molecole presenti sulla cellula (recettori e co-recettori) e da molecole presenti sui virus (antirecettori)




REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI



PENETRAZIONE

Consiste nell'ingresso nella cellula del virus intero, del capside o del solo genoma.



Di solito è un processo che richiede una cellula viva e dispendio di energia cellulare.



Può avvenire per attraversamento, per fusione del pericapside con la membrana cellulare, per endocitosi della particella virale

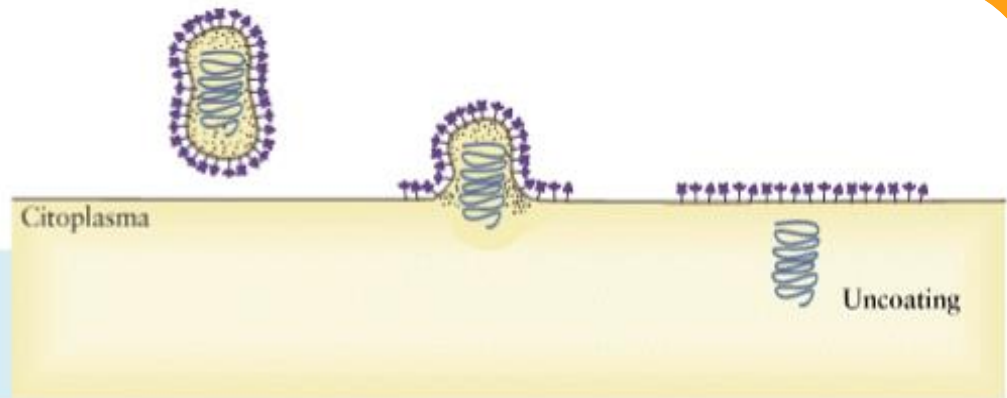
REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI



FUSIONE

Penetrazione per fusione con la membrana citoplasmatica (pH-indipendente)

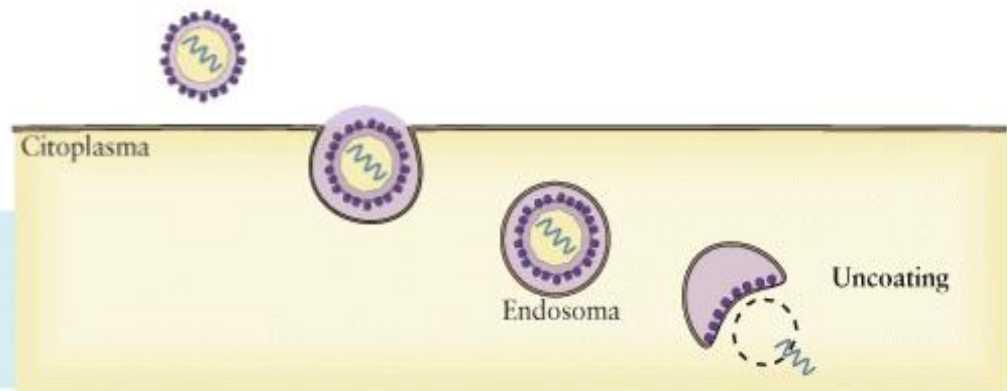
(c)



ENDOCITOSI

Penetrazione per endocitosi ed uncoating per fusione con la membrana endosomale (pH-dipendente)

(d)

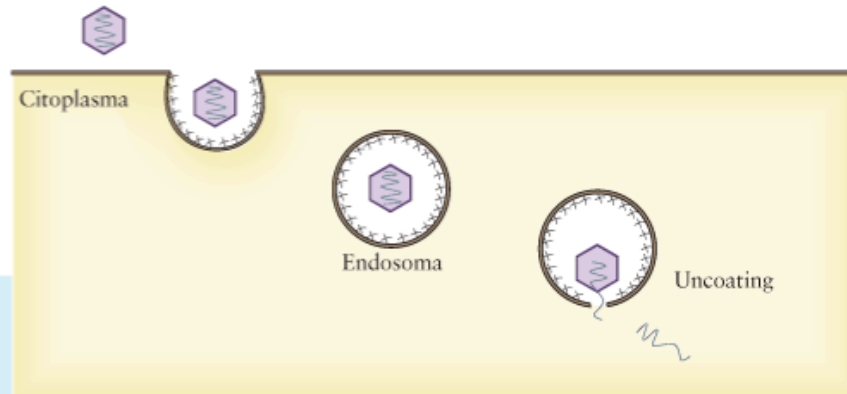


REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI

ENDOCITOSI

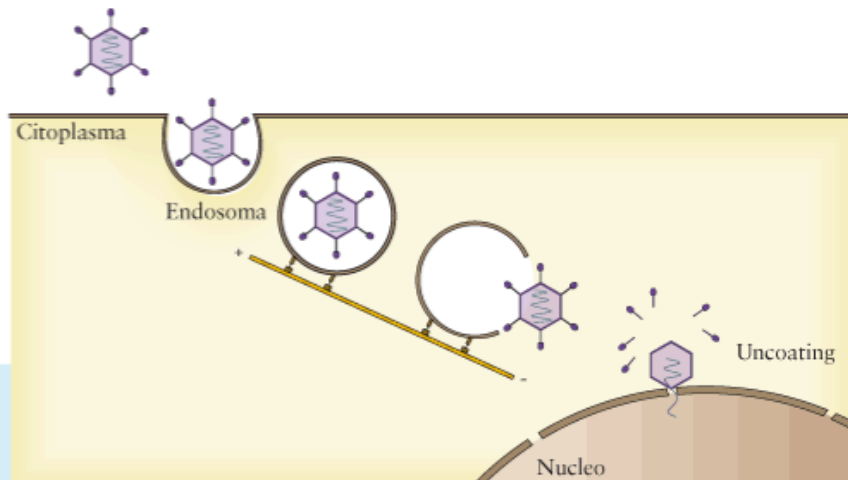


Penetrazione per endocitosi
ed uncoating alla membrana
endosomiale



(a)

Penetrazione per endocitosi
ed uncoating alla membrana
nucleare



REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI



DECAPSIDIZZAZIONE (uncoating)

Consiste nella demolizione totale o parziale del càpside ad opera di enzimi cellulari.

Il buon esito del processo consente all'acido nucleico di iniziare la fase di sintesi.



REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI

TAPPE



REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI





La cellula ha solo nel nucleo gli enzimi cellulari per la trascrizione del DNA e non possiede gli enzimi necessari alla trascrizione dell'RNA.



Possono utilizzare le trascrittasi cellulari per la sintesi dei propri mRNA solo i virus con genoma a DNA che siano in grado di raggiungere il nucleo. Tutti gli altri tipi di virus devono avere i propri enzimi per sintetizzare gli mRNA.

REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI

EUCARIOTI



I Virus a DNA in grado di raggiungere il nucleo utilizzano sistemi trascrittivi della cellula per sintetizzare i propri mRNA



DNA → RNA polimerasi DNA dipendente → mRNA (nel nucleo)



Virus a RNA NO → mRNA

Quindi gli enzimi per la trascrizione RNA devono far parte del virus

STRATEGIE DI REPLICAZIONE DEI VIRUS A RNA

Virus a RNA a singola elica, a polarità positiva (+)
con intermedio a DNA

Genoma costituito da due molecole identiche di RNA (+)
(virus diploide)

RNA(+) viene retro-trascritto in DNA a doppia elica da
una DNA-polimerasi RNA-dipendente associata al
virione (**trascrittasi inversa**) → PROVIRUS

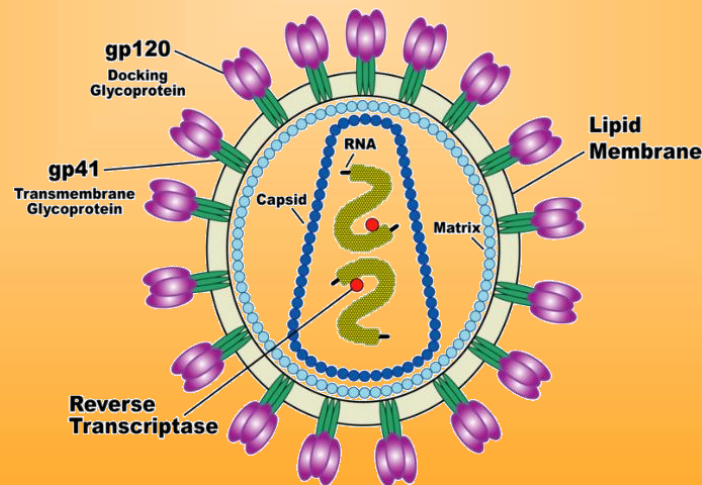
DNA provirus migra nel nucleo e si integra (tramite una
integrasi virale) nel genoma cellulare dove può rimanere
silente per anni



STRATEGIE DI REPLICAZIONE DEI VIRUS A RNA

Virus a RNA a singola elica, a polarità positiva (+)
con intermedio a DNA

In seguito a riattivazione viene trascritto dalla RNA polimerasi cellulare in mRNA(+) → formazione di **poliproteine** (scisse da proteasi virali) **RNA(+) genomici**



Retrovirus (HIV)



REPLICAZIONE DEI VIRUS

Assemblaggio

Raggruppamento in un particolare sito cellulare (citoplasma o nucleo a seconda del virus) di tutti i componenti del virione

Maturazione

Modificazioni strutturali nel virione (tagli e glicosilazione delle proteine capsidiche)

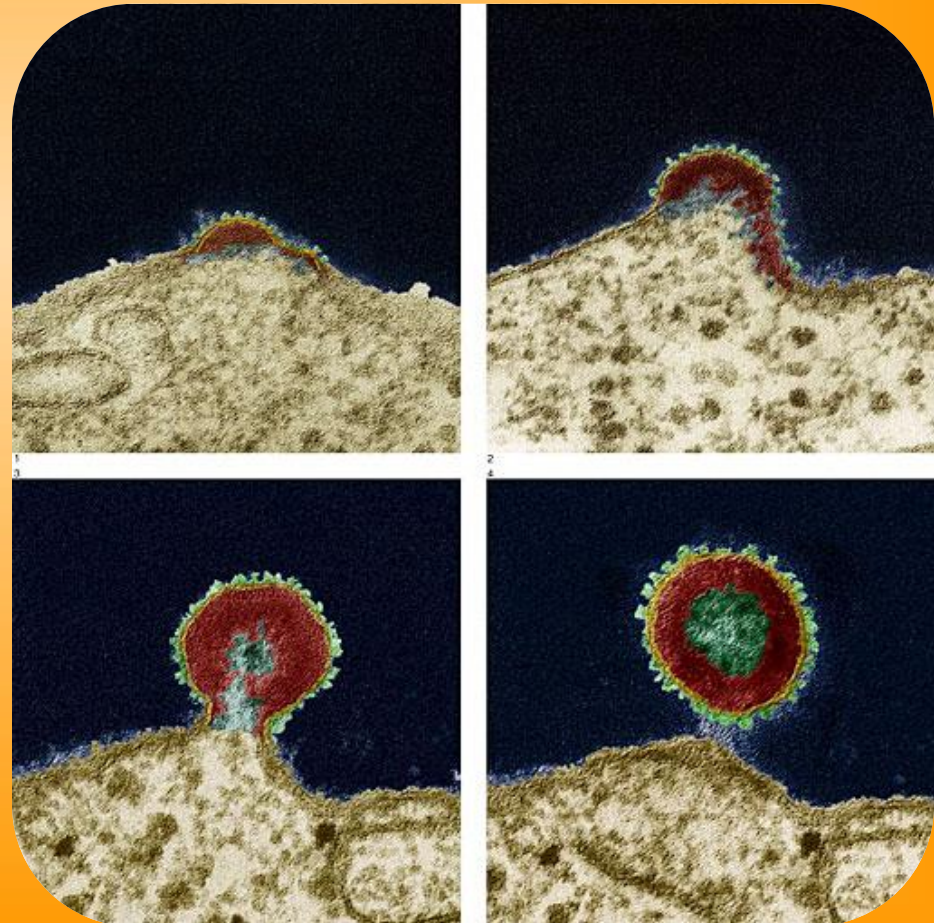
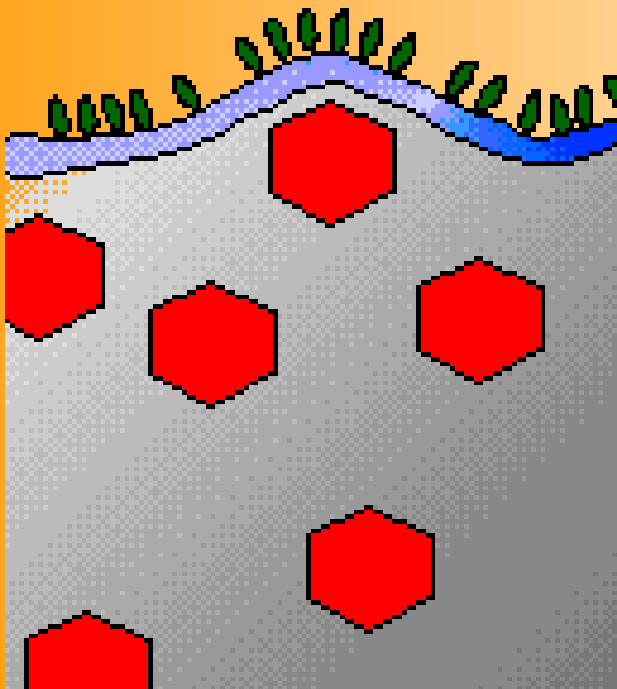
In questa fase il virus diventa infettante



ESOCITOSI

*Virus litici senza envelope:
lisi cellulare*

*Virus con envelope
(gemmazione):*



VIRUS VEGETALI



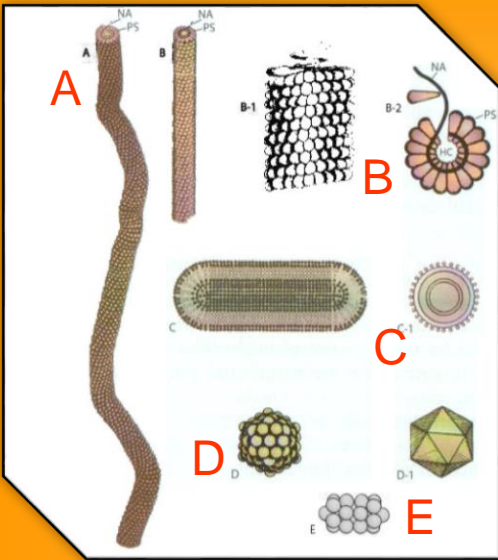
Le cellule delle giovani foglie vegetali infettate da virus mostrano **corpi di inclusione** che consistono di aggregati virali

Attualmente solo pochi sintomi possono essere associati con certezza a infezioni da virus, come il pattern a "**foglia di quercia**", **macchie anulari clorotiche e necrotiche**

Molti altri sintomi indotti da virus assomigliano a quelli indotti da mutazioni, deficienze nutrizionali, tossicità ambientale, danni da insetti

VIRUS VEGETALI

MORFOLOGIA DEI VIRUS VEGETALI



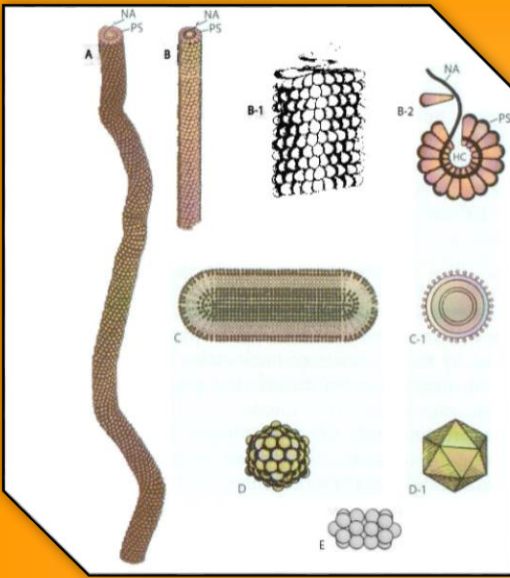
I virus vegetali possono essere di diverse forme e taglie

Piu' della meta' sono allungati (bastoncellari, A-B) e altrettanti sono sferici (D,E), i rimanenti sono cilindrici e bacilliformi (C)

Alcuni virus sono bastoncelli rigidi di circa 15-300 nm

VIRUS VEGETALI

MORFOLOGIA DEI VIRUS VEGETALI



In sezione trasversale i virus bastoncellari appaiono come tubi vuoti in cui le proteine formano le pareti e gli acidi nucleici sono intercalati sempre spiralmente tra 2 subunita' proteiche



La maggior parte dei virus vegetali e' a **RNA** ma ci sono esempi anche di virus a DNA

VIRUS VEGETALI

1

Esistono circa 700 virus fitopatogeni oggi conosciuti

sferica, il più piccolo virus è quello del *mosaico del cetriolo*

2

bacilliformi, fra i fitopatogeni esiste solo un virus con questa forma: il virus del *mosaico dell'erba medica*

3

tubuliformi, il virus del *mosaico del tabacco*, a questo gruppo appartiene anche il virus più grande cioè quello della *tristezza degli agrumi*

VIRUS VEGETALI

Virus tristezza degli agrumi

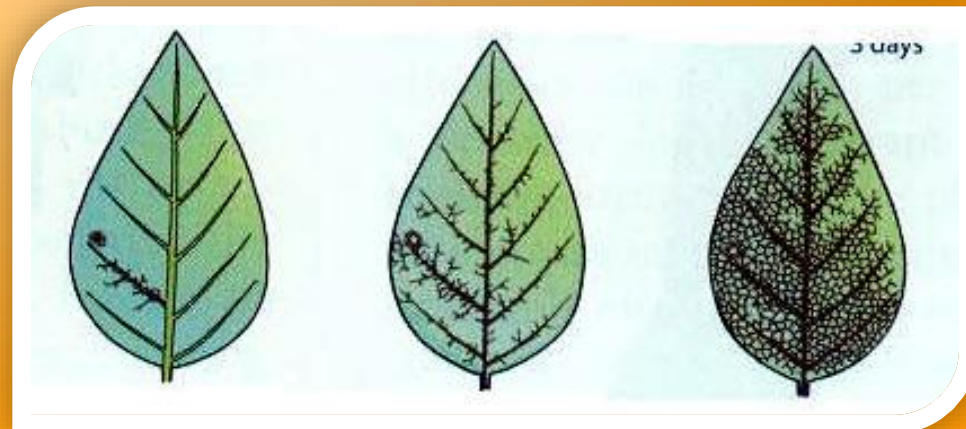


TRASLOCAZIONE DEI VIRUS VEGETALI

- Quando un virus infetta una pianta si muove da una cellula all'altra e si moltiplica in tutte le cellule
- I virus si muovono attraverso i **plasmodesmi** moltiplicandosi nelle cellule parenchimatiche

I virus entrano nelle piante attraverso ferite meccaniche o fatte da vettori

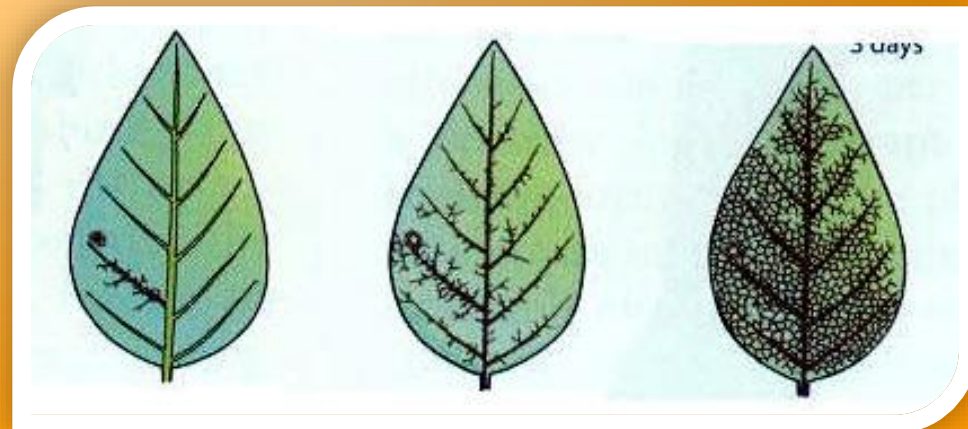
I primi virioni intatti compaiono nelle cellule 10 ore dopo l'infezione



TRASLOCAZIONE DEI VIRUS VEGETALI

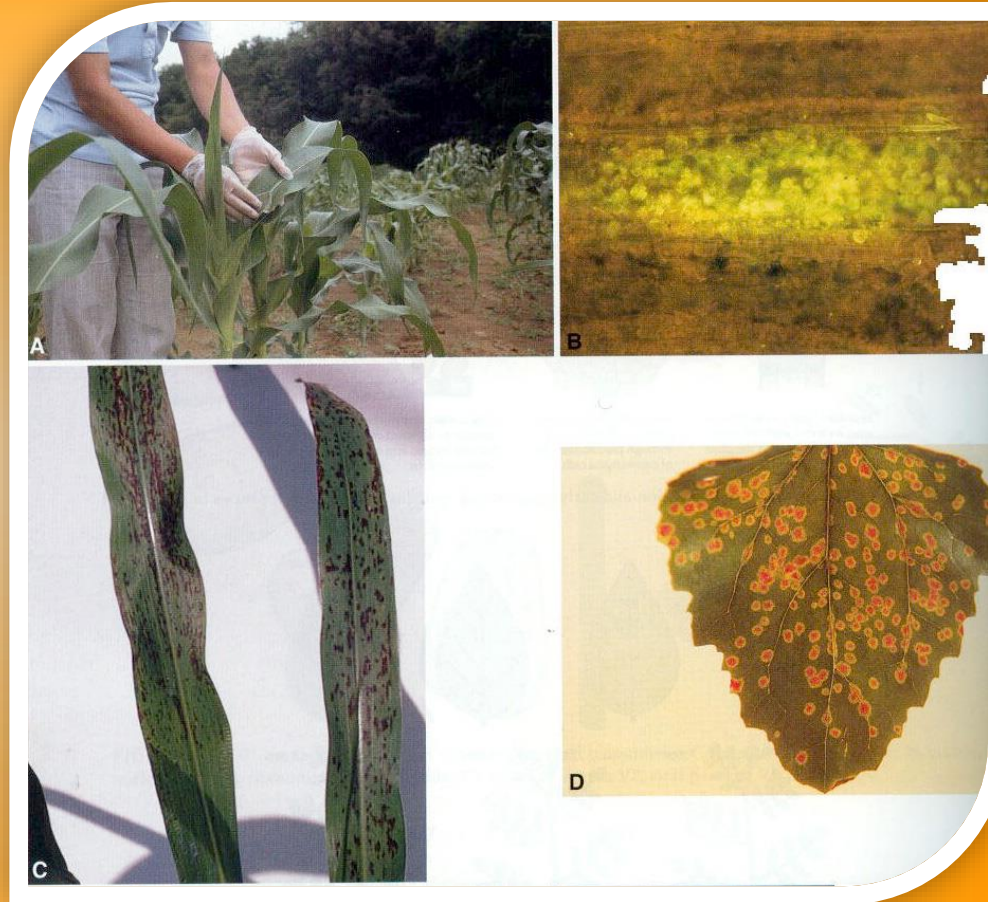
- Nelle cellule fogliari i virus si muovono di circa **1 mm (8-10 cellule) al giorno**
- Molti virus **richiedono 2-5 giorni per uscire da una foglia infetta**
- I virus raggiungono il floema e da qui vengono rapidamente trasportati verso i meristemi apicali

I virus a mosaico infettano tutti i tessuti della pianta e ogni cellula vegetale infettata può contenere anche 10 milioni di particelle virali



SINTOMI LOCALI

- Tutti le malattie virali sembrano causare **nanismo o appassimento della pianta intera** e la riduzione della produttività
- In molte piante inoculate artificialmente con virus compaiono piccole **lesioni clorotiche o necrotiche soltanto nei punti di inoculo (lesioni locali)**
- Molti virus infettano le piante senza causare lo sviluppo di alcun sintomo visibile (**latenti**)



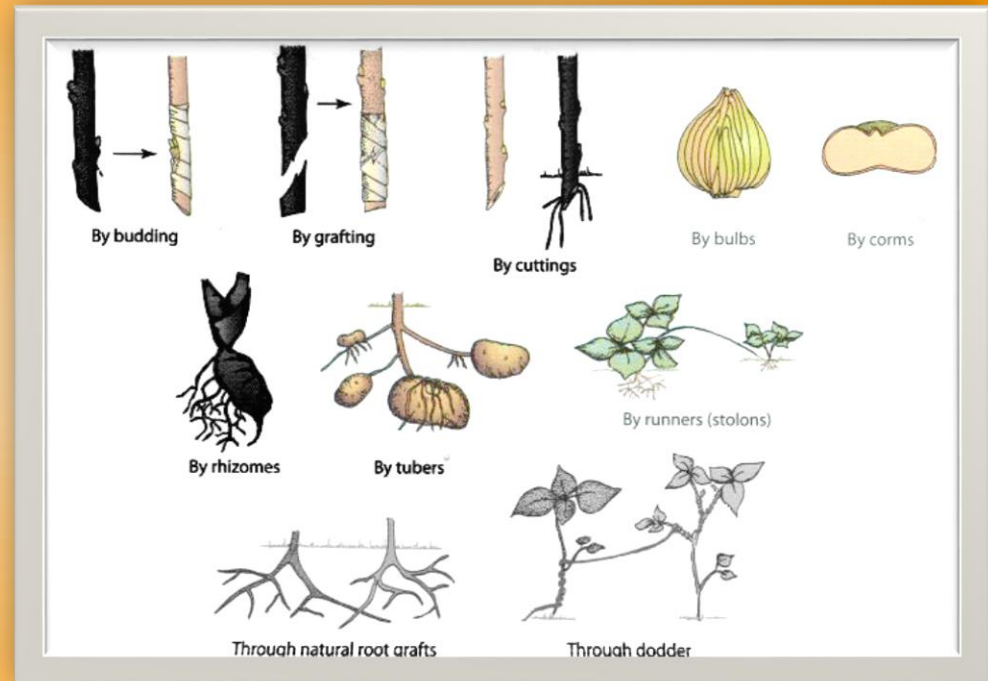
- ▶ In altri casi piante che sviluppano i sintomi dell'infezione possono non avere sintomi in certe condizioni ambientali (alte o basse T) (**sintomi mascherati**)

TRASMISSIONE DEI VIRUS

- ▶ Propagazione vegetativa, attraverso i fluidi cellulari, i semi, il polline, insetti, nematodi e funghi

- ▶ Propagazione vegetativa

- ▶ Quando le piante vengono propagate per innesto, talea o attraverso tuberi, bulbi o rizomi, gli eventuali virus presenti nella pianta madre sono trasmessi alla progenie
- ▶ Per molti virus di alberi l'unico modo di penetrazione e' il passaggio albero-albero attraverso gli innesti



CONTROLLO DEI VIRUS VEGETALI



- ▶ Il modo migliore per ottenere il controllo delle malattie virali e' avere un'area "**virus free**" grazie a misure di quarantena, ispezioni e certificazioni

(L'esistenza di ospiti senza sintomi, il periodo di incubazione e l'assenza di sintomi evidenti in semi, tuberi e sementi rende però la quarantena difficile da applicare)

- ▶ Il **breeding** (allevamento) con specie virus-resistenti può essere un valido mezzo per combattere le malattie virali

CONTROLLO DEI VIRUS VEGETALI

- ▶ In alcune malattie virali, la pianta può essere "immunizzata" se trattata in precedenza con ceppi virali ipovirulenti (cross protection)

Negli ultimi 10 anni sono state generate piante ingegnerizzate con frammenti di genoma virale. Queste piante trascrivono ed esprimono questi geni che in qualche modo interferiscono con la replicazione virale

- ▶ Inattivazione con il calore mediante immersione in acqua calda (35°-54°C)
- ▶ Non esistono sostanze chimiche (virucide) anche se la ribavirina ha qualche effetto

PATOGENESI DELLE INFEZIONI VIRALI

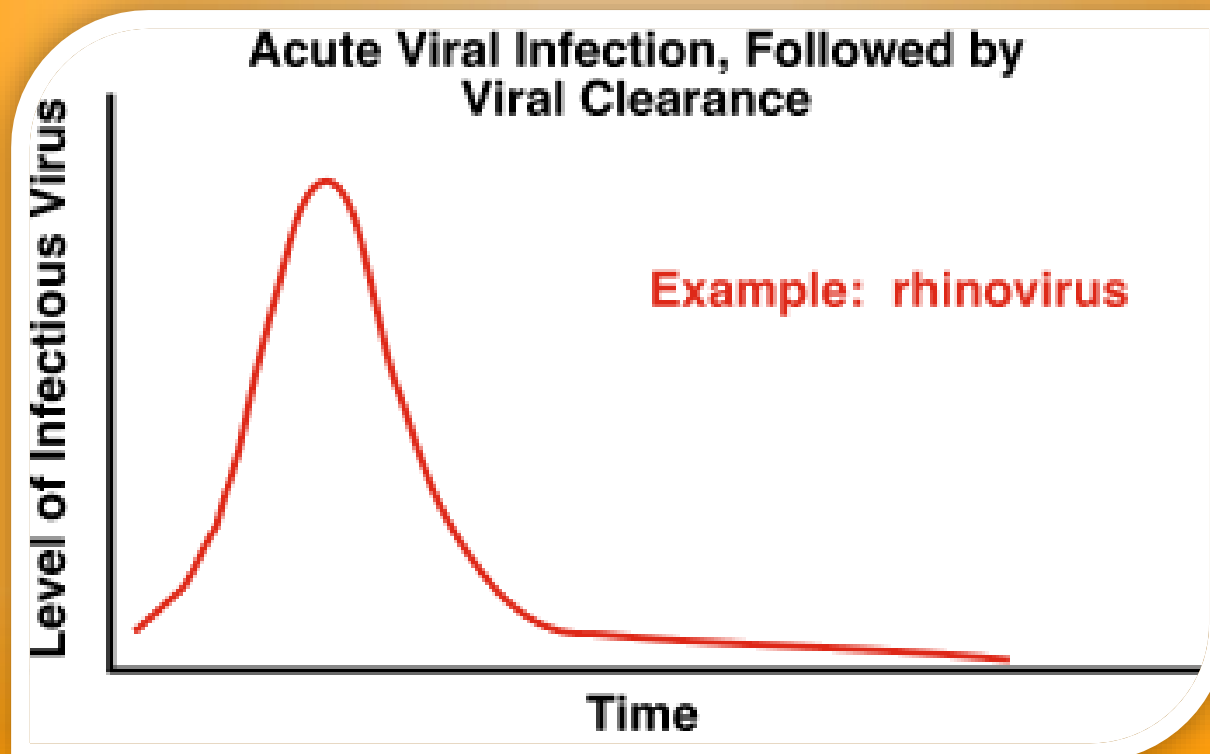
(uomo)



INFEZIONI ACUTE



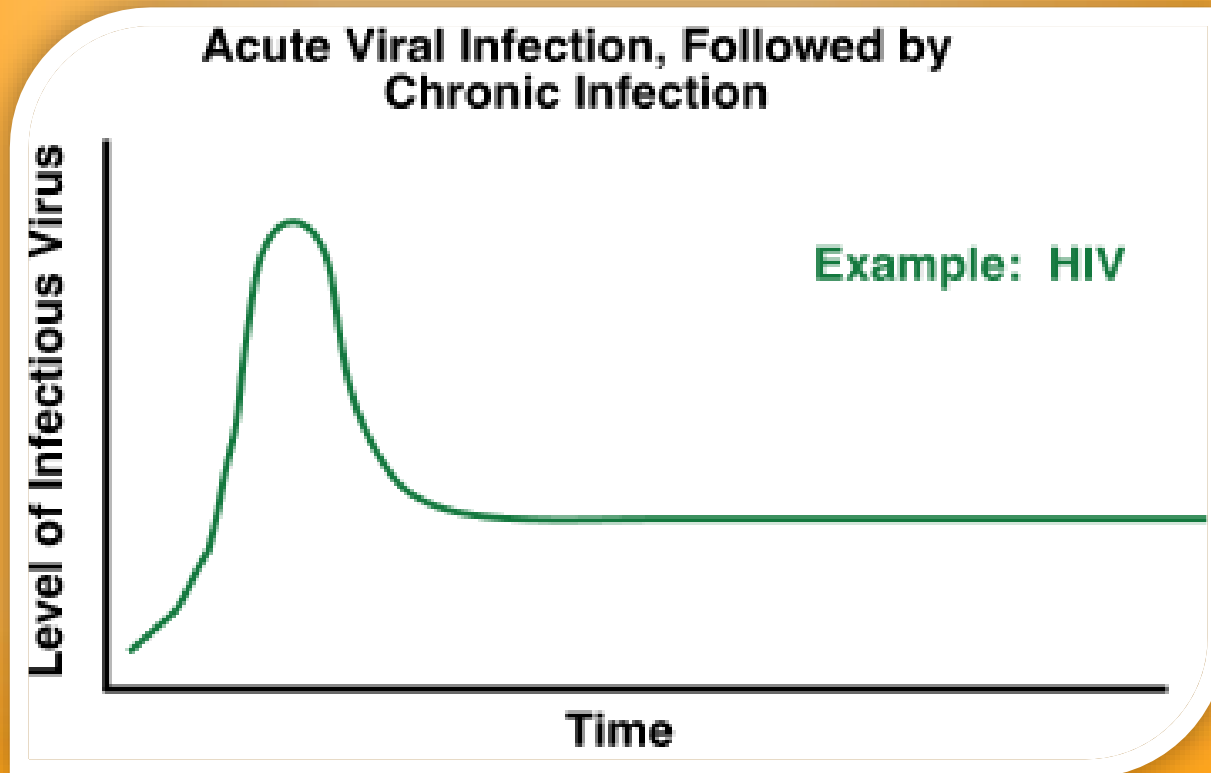
Raffreddore, influenza (*Orthomyxovirus*) guarigione;
febbri emorragiche (*Ebolavirus*): morte



INFEZIONI CRONICHE



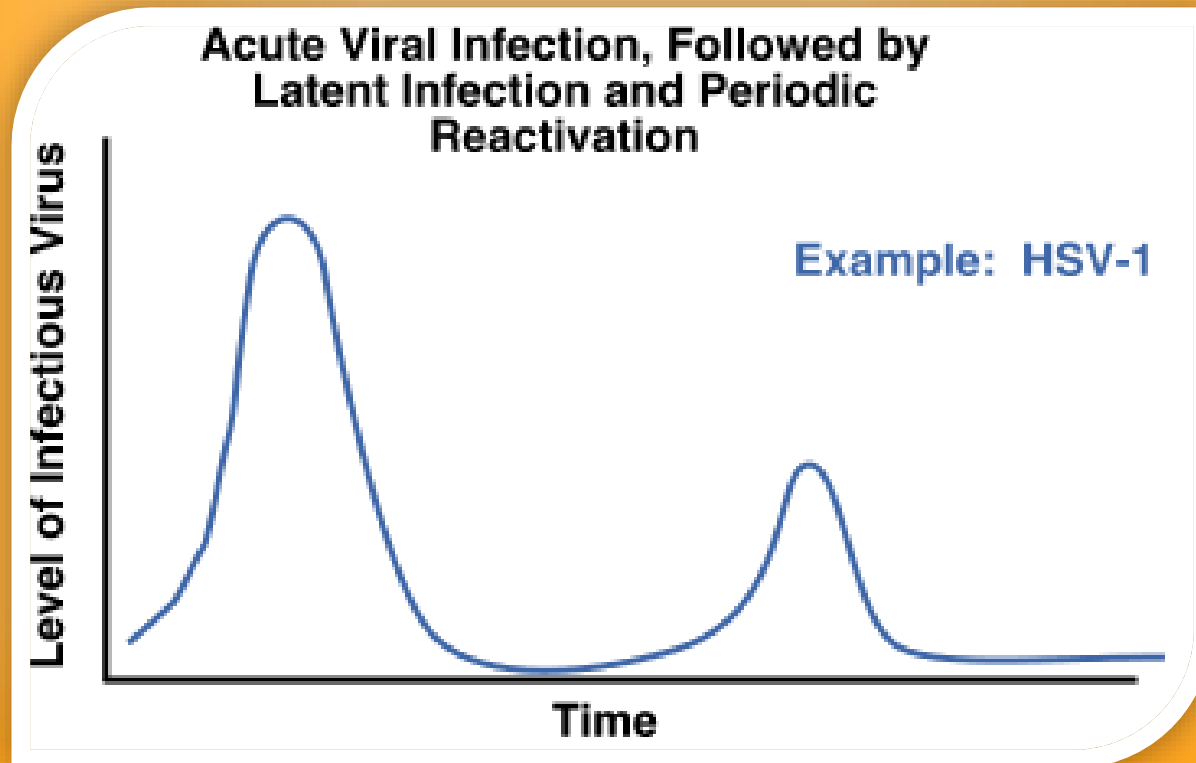
Esito: malattia ingravescente, morte



INFEZIONI LATENTI



Esito: episodi recidivanti



DIFESA DALLE INFEZIONI VIRALI



➔ Meccanismi aspecifici (immunità innata):

- Barriere fisico-chimiche (cute, mucose, pH)
- Febbre
- Complemento (via alternativa)
- Cellule Natural Killer
- Risposte antivirali intracellulari

➔ Meccanismi specifici (immunità acquisita):

- Anticorpi
- Complemento (via classica)
- Linfociti citotossici CD8⁺



DIFESA DALLE INFEZIONI VIRALI

Risposte antivirali intracellulari

Si basano sulla capacità della cellula di riconoscere la presenza di RNA a doppia elica.

esempio

il sistema Interferon.



DIFESA DALLE INFEZIONI VIRALI

SISTEMA INTERFERON

Si trova soltanto nei vertebrati ed è costituito da numerose proteine che lavorano in serie.

Ha tre principali effetti biologici:

- attività **antivirale**
- attività **antitumorale**
- attività **immunomodulatrice**



MECCANISMO DI AZIONE DELL'IF

SISTEMA INTERFERON

L'Interferon è una proteina specie-specifica che viene secreta dalla cellula e interagendo con recettori cellulari di membrana induce la sintesi di altre proteine che mediano gli effetti antivirali.

GUARIGIONE DALLE INFEZIONI VIRALI

E' mediata dai meccanismi
aspecifici (**cellule NK** e
interferon) e dai **linfociti T**
citotossici.

Gli **anticorpi**, che in genere
arrivano **dopo** la guarigione,
hanno l'importante funzione di
impedire le **reinfezioni**.

COLTIVAZIONE DEI VIRUS ANIMALI



IN VIVO

IN VITRO

SISTEMI ANIMALI

COLTURE CELLULARI



COLTIVAZIONE DEI VIRUS ANIMALI



ANIMALI DA LABORATORIO

Storicamente i metodi più antichi per studiare la propagazione dei virus:

- *scimmia* (poliomielite),
- *furetto* (influenzale),
- *coniglio* (pox= virus del vaiolo), *cavia* (herpes virus),
- *topolini* (molti virus).



SVANTAGGI

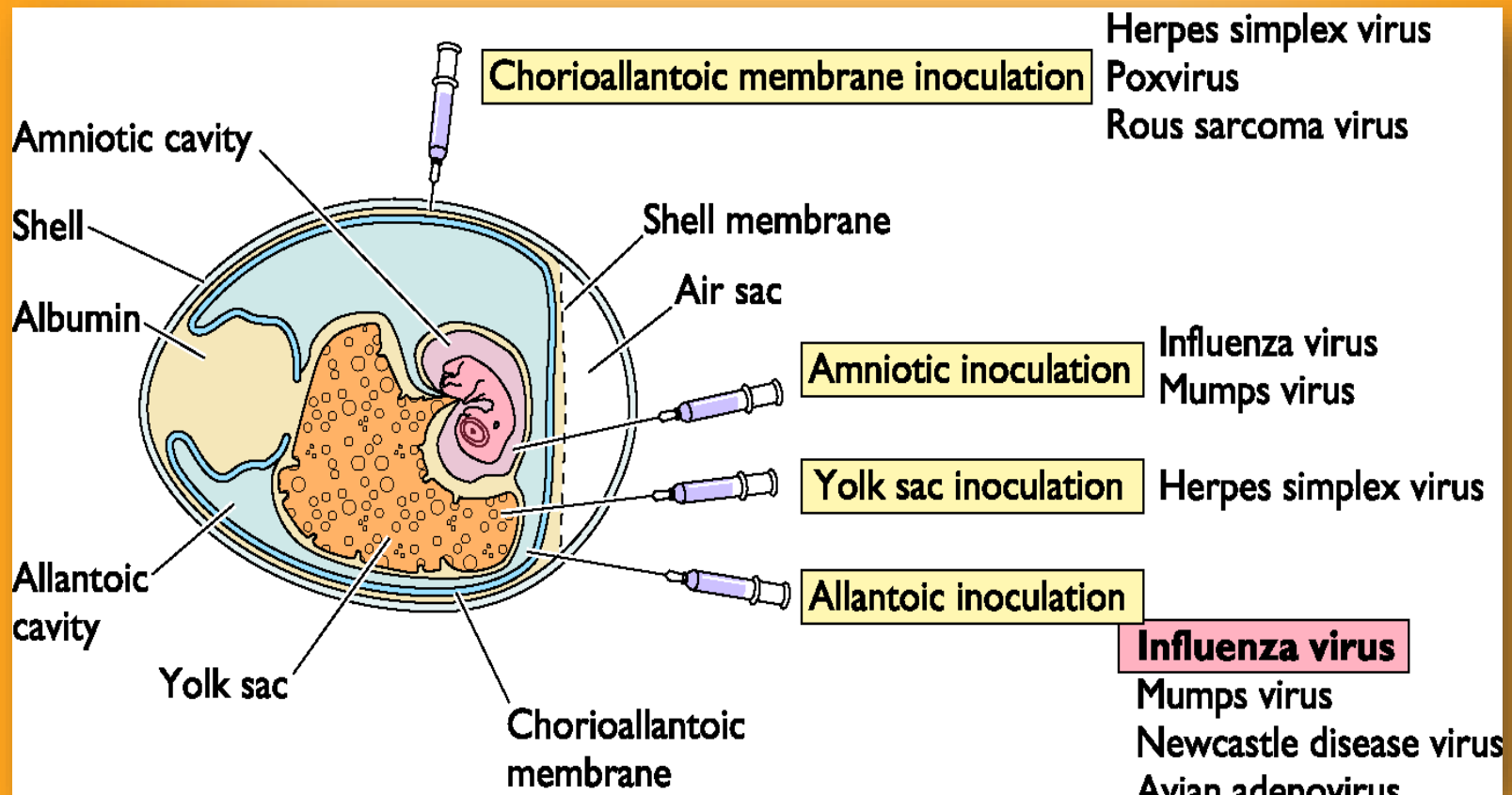
- 1) Costoso
- 2) non omogeneo
- 3) porta alla generazione di mutanti virali
- 4) problemi etici

VANTAGGI

- 1) fornisce informazioni sui meccanismi patogenetici del virus
- 2) alcuni virus possono essere studiati solo *in vivo*

COLTIVAZIONE DEI VIRUS ANIMALI

UOVO EMBRIONATO 15gg



Ogni sezione dell'uovo permette la coltivazione di un virus con la formazione di alterazioni morfologiche caratteristiche e riconoscibili



COLTURE CELLULARI

METODO MODERNO

Rappresentano il metodo di elezione per la coltivazione dei virus animali

suspensioni di cellule isolate, ottenute da tessuti diversi, dai quali vengono dissociate per via enzimatica (tripsina) o per mezzo di soluzioni con sostanze chelanti (versene).

Le cellule derivate da tessuti freschi → *cellule primarie* → *cellule secondarie* (subcolture)



COLTURE CELLULARI

Le cellule vengono immerse in contenitori (Bottiglie di Roux), creando un ambiente favorevole, adatta T° , pH 7-7.2, opportuna tensione di ossigeno e anidride carbonica, presenza di ioni inorganici, vitamine, aminoacidi, ecc.



*Le colture vengono lasciate immobili, le cellule aderiscono sul fondo piatto, si moltiplicano → formano un **monostrato di cellule***



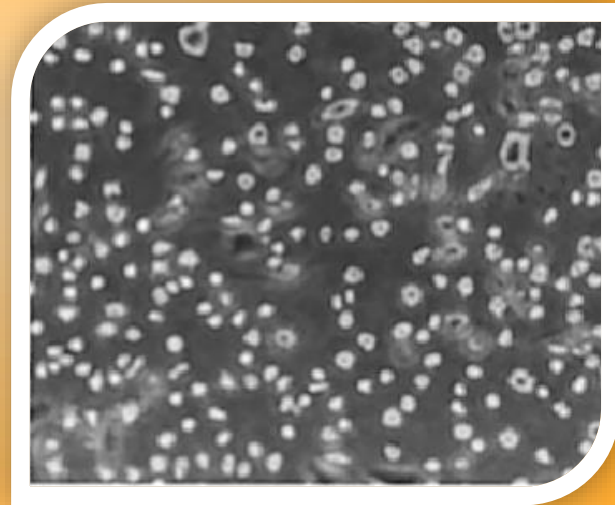
COLTURE CELLULARI

Cellule in monostrato



crescono su superfici solide (plastica, vetro).
Sono le più usate in virologia.

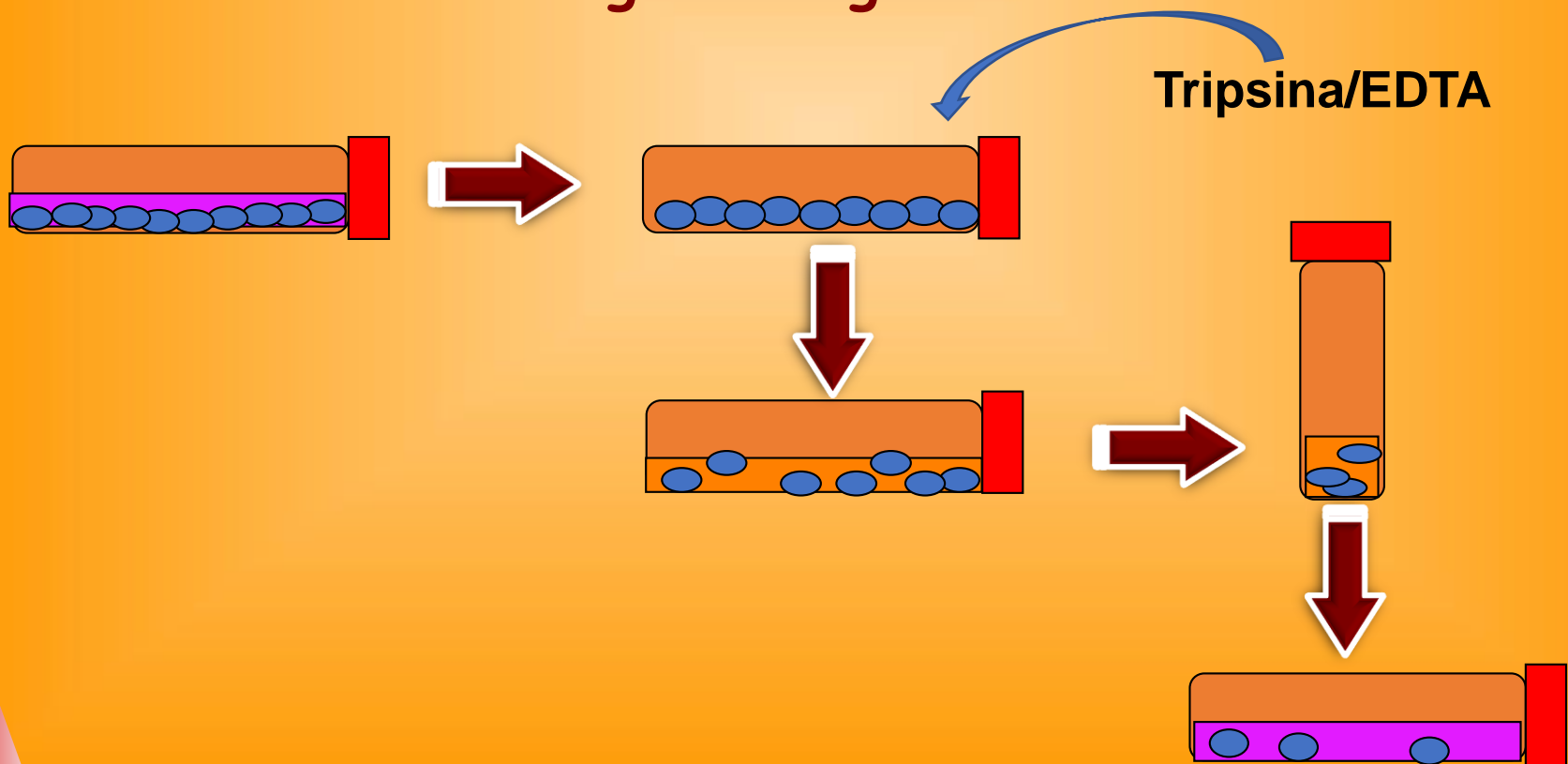
Cellule in sospensione





COLTURE CELLULARI

La maggior parte delle cellule in coltura si replica ogni 24-48 ore e deve essere sub-coltivata ogni 3-4 giorni.



COLTURE CELLULARI

Il monostrato si forma per un fenomeno di “**inibizione da contatto**”, impedendo la formazione di più strati.

Le colture vengono osservate al Microscopio ottico a luce invertita.

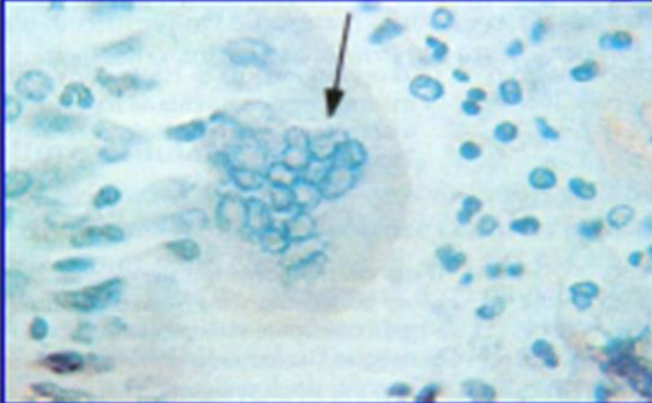


Alla moltiplicazione dei virus in coltura si accompagna un **effetto citolitico** → necrosi delle cellule (“**buchi**” nel monostrato = placche di lisi), **citopatico** → sincizi (fusione tra membrana infetta e virione), **cellule giganti**, **formazione di corpi inclusi**

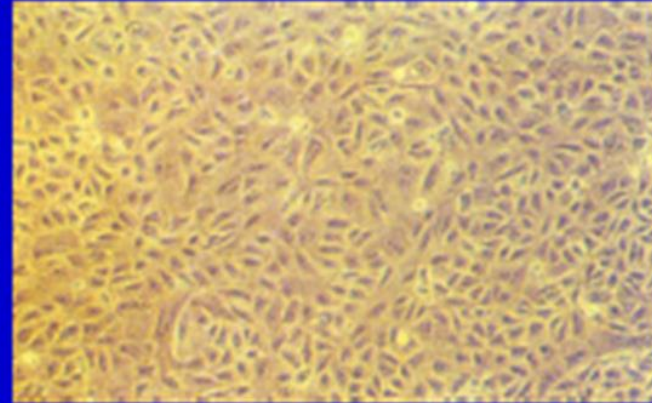


COLTURE CELLULARI

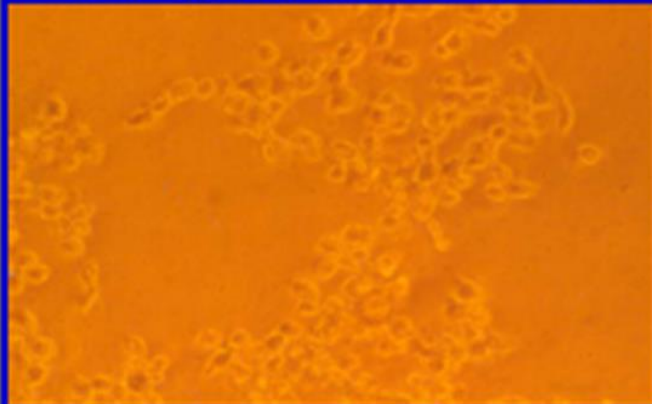
Effetti citopatici da virus



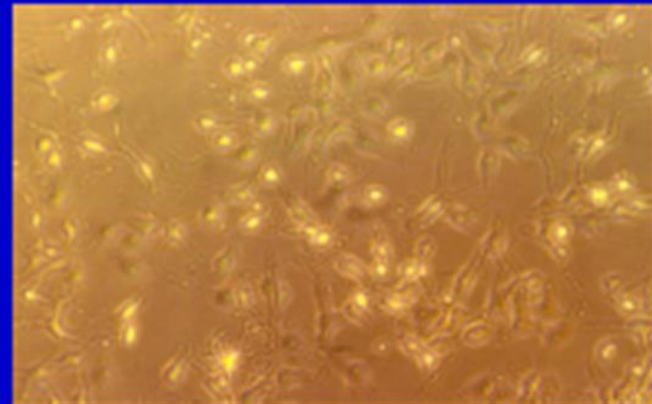
sincizio (virus del morbillo)
cellule giganti multinucleate (freccia)



cellule Vero (linea continua) non infettate



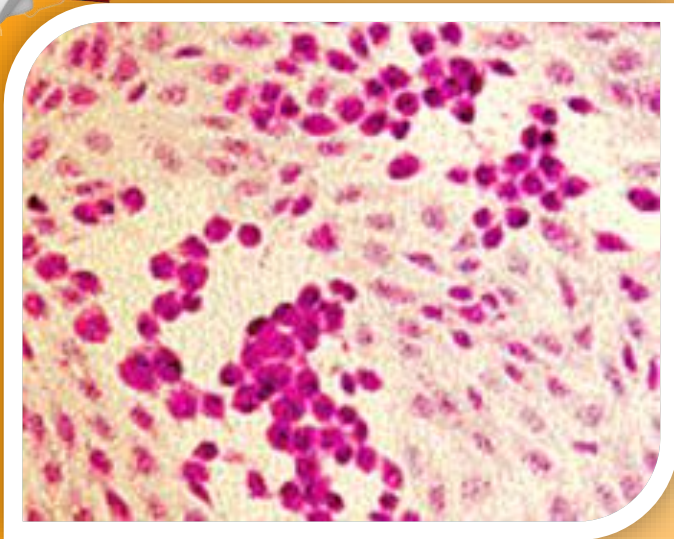
effetto litico su cellule Vero (Poliovirus)



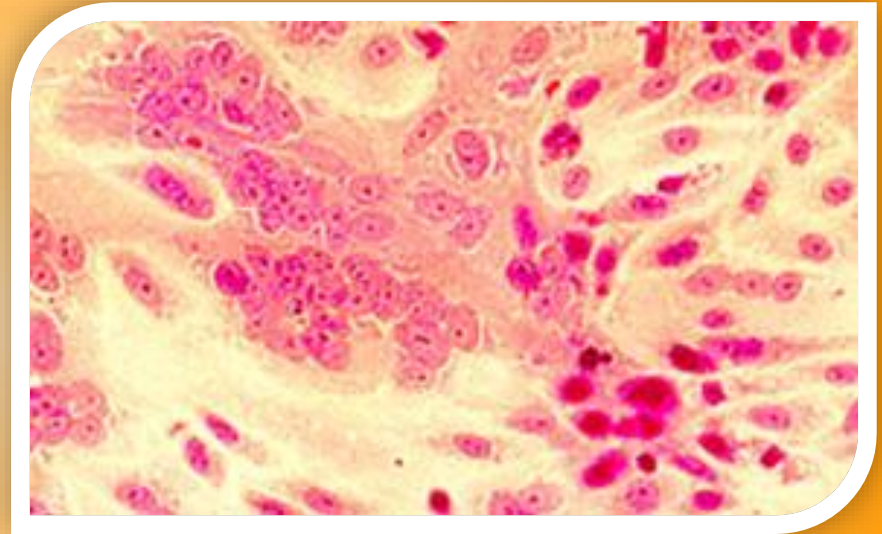
effetto litico su cellule Vero (Enterovirus)



COLTURE CELLULARI



**Effetto citopatico da
HSV1 (Herpes simplex 1)**



**Sincizi RSV (virus respiratorio
sinciziale) infezioni respiratorie
bambini**



COLTURE CELLULARI

*La quantità del virus
è detta **titolo** (il
titolo virale può
cambiare a seconda
del metodo usato)*

*Il titolo è la misura
della concentrazione
del virus e viene
espressa in **unità/ml***

*Può essere rilevato
mediante vari saggi:
saggio delle **placche**,
saggio di
emoagglutinazione,
ecc.*

TITOLAZIONE VIRALE



Saggio delle placche
unità formanti placca/ml = **U.F.P./ml**

Sopra il monostrato delle cellule si immette una sospensione virale (proveniente da colture conosciute o dal siero di un paziente in cui si sospetta infezione virale) contenente agar molle (serve per nutrizione e rallentamento della diffusione dei virus).

Le cellule vengono infettate dai virus (un virus infetta una sola cellula) e vengono lisate, dando origine ad uno spazio (un vuoto lasciato dalla cellula lisata = PLACCA).

Le UFP vengono contate e il conteggio permette di sapere quanti virus erano presenti nella sospensione iniziale.



Grazie

*Per qualunque domanda o problema
puoi contattarmi al*

- Tel: **3386428032**
- e-mail: vivian.tullio@unito.it