



**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 Tussio



REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI

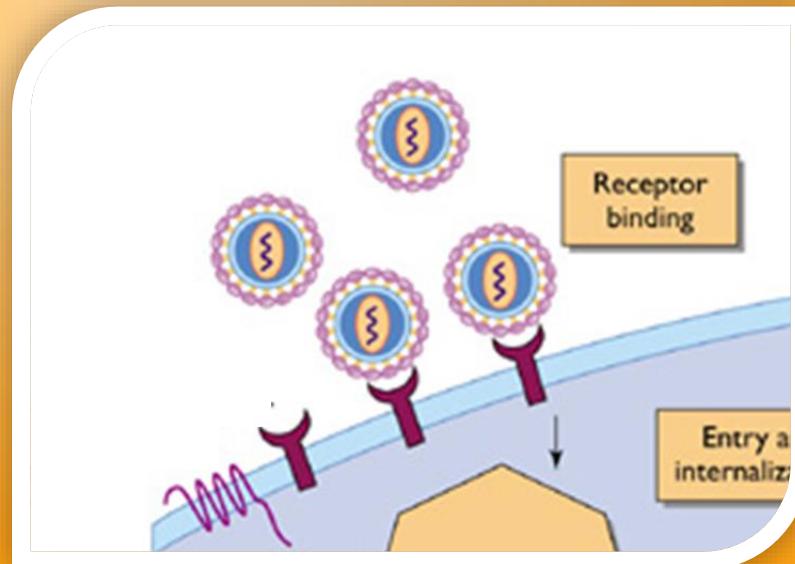
TAPPE



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 capsido 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 pericapsido con la membrana cellulare**, per **endocitosi** della particella virale

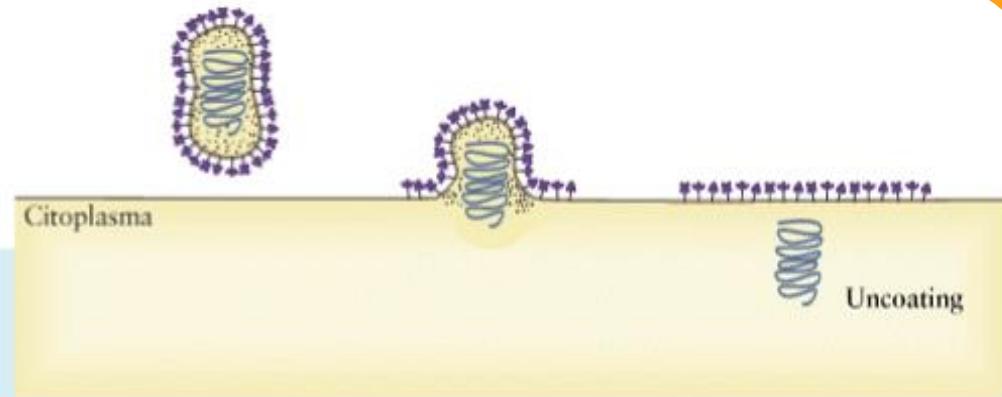
REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI



FUSIONE

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

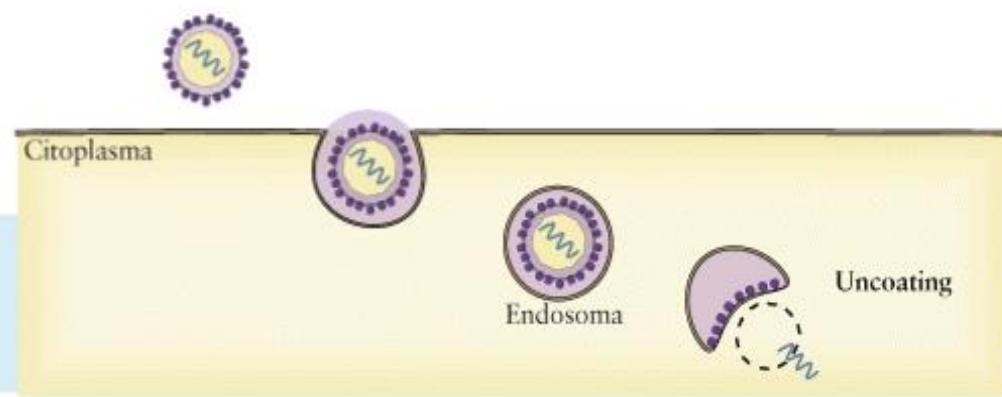
(c)



ENDOCITOSI

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

(d)



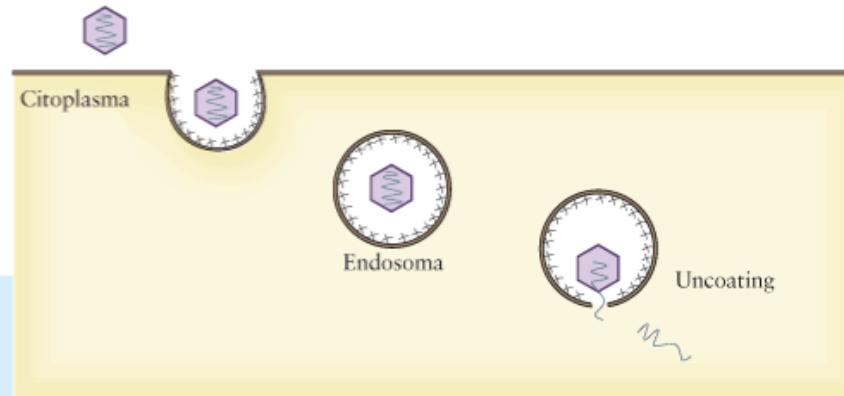
REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI



ENDOCITOSI

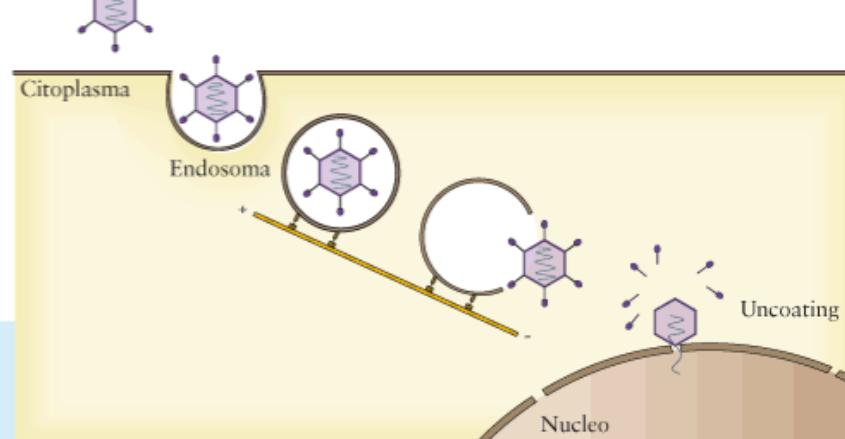
Penetrazione per endocitosi ed uncoating alla membrana endosomiale

(a)



Penetrazione per endocitosi ed uncoating alla membrana nucleare

(b)



REPLICAZIONE DEI VIRUS ANIMALI



DECAPSIDIZZAZIONE (uncoating)

Consiste nella demolizione totale o parziale del capside 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

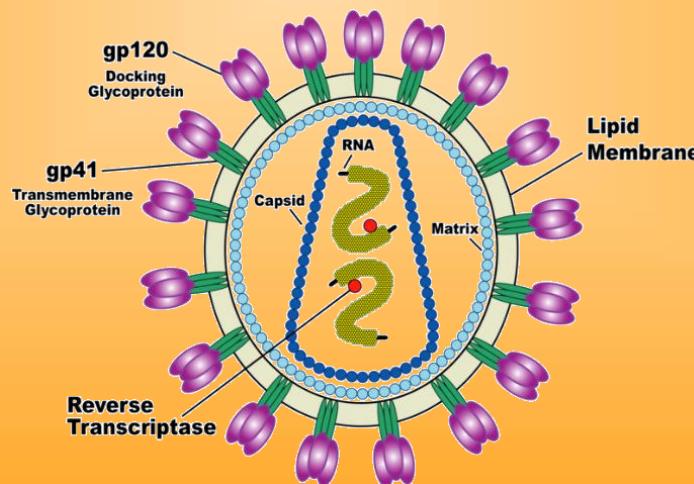
DNA provirus migra nel nucleo e si integra (tramite una
integrasi virale) nel genoma cellulare dove può rimanere
silente per anni



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)

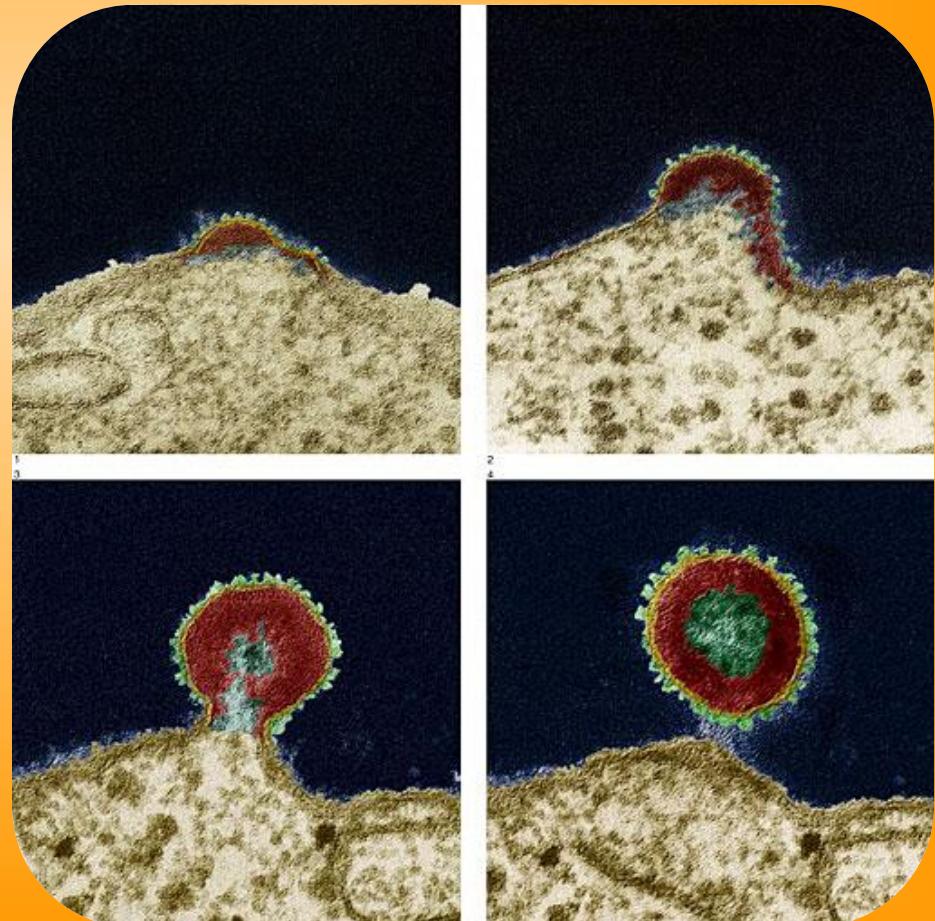
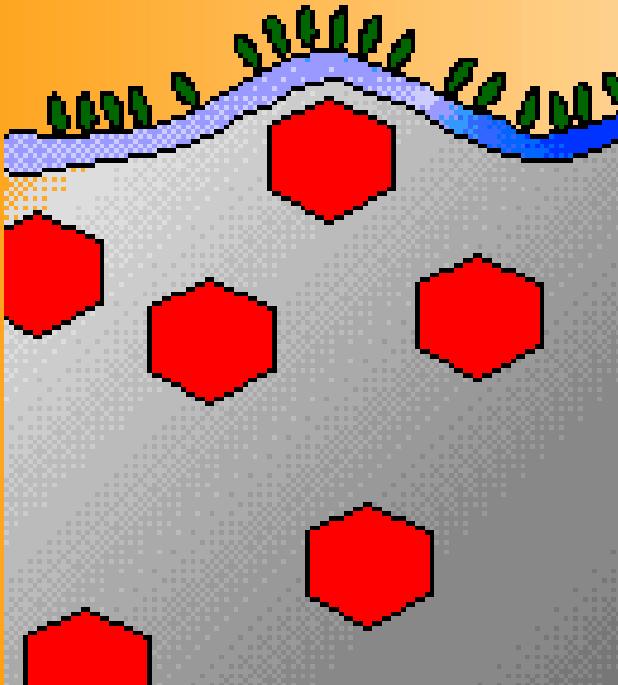
In questa fase il virus diventa infettante



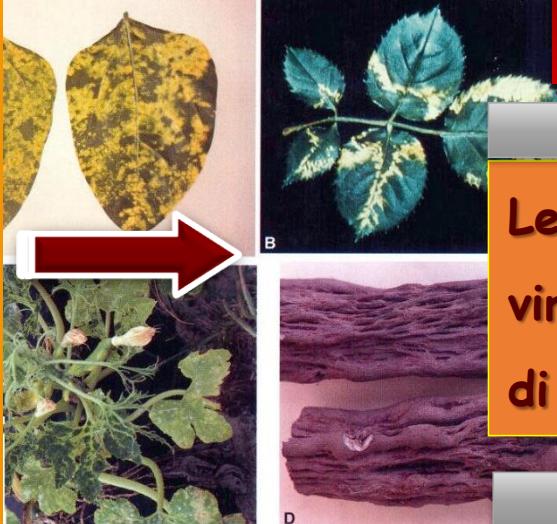
ESOCITOSI

*Virus litici senza envelope:
lisi cellulare*

*Virus con envelope
(gemmazione):*



VIRUS VEGETALI



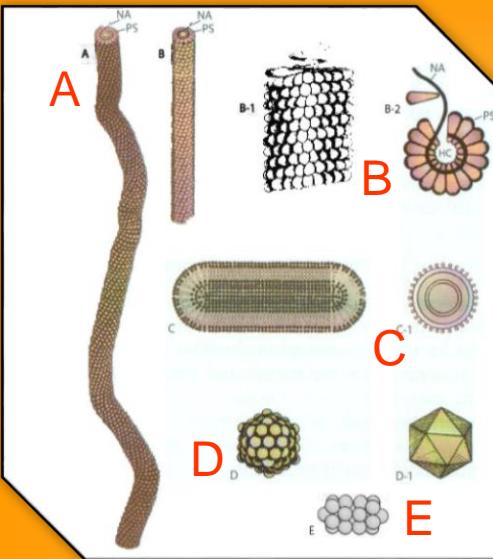
Le cellule delle giovani foglie vegetali infettate da virus mostrano **corpi di inclusione** che consistono di aggregati virali

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, tossicita' ambientale, danni da insetti

VIRUS VEGETALI

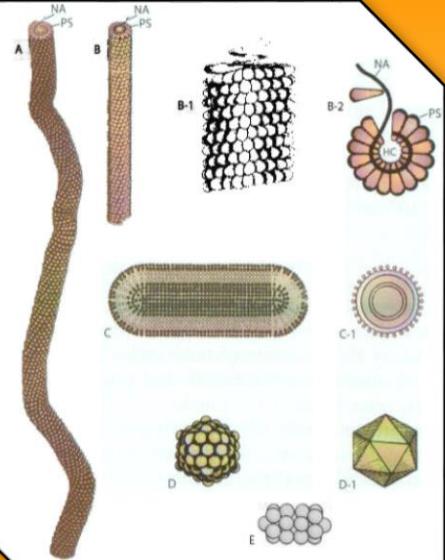
MORFOLOGIA DEI VIRUS VEGETALI



I virus vegetali possono essere di diverse forme e taglie

Piu' della metà 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 subunità proteiche

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

VIRUS VEGETALI

1

Esistono circa 700 virus fitopatogeni oggi conosciuti

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**

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

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

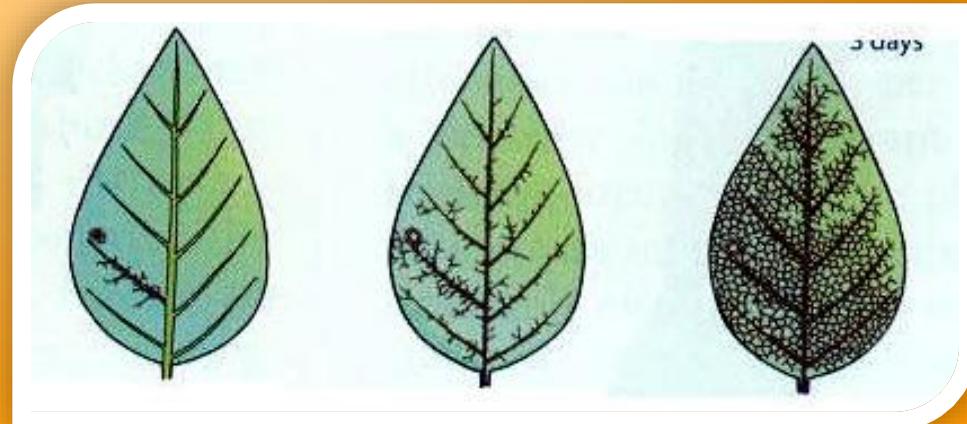
I primi virioni intatti compaiono nelle cellule 10 ore dopo l'infezione



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

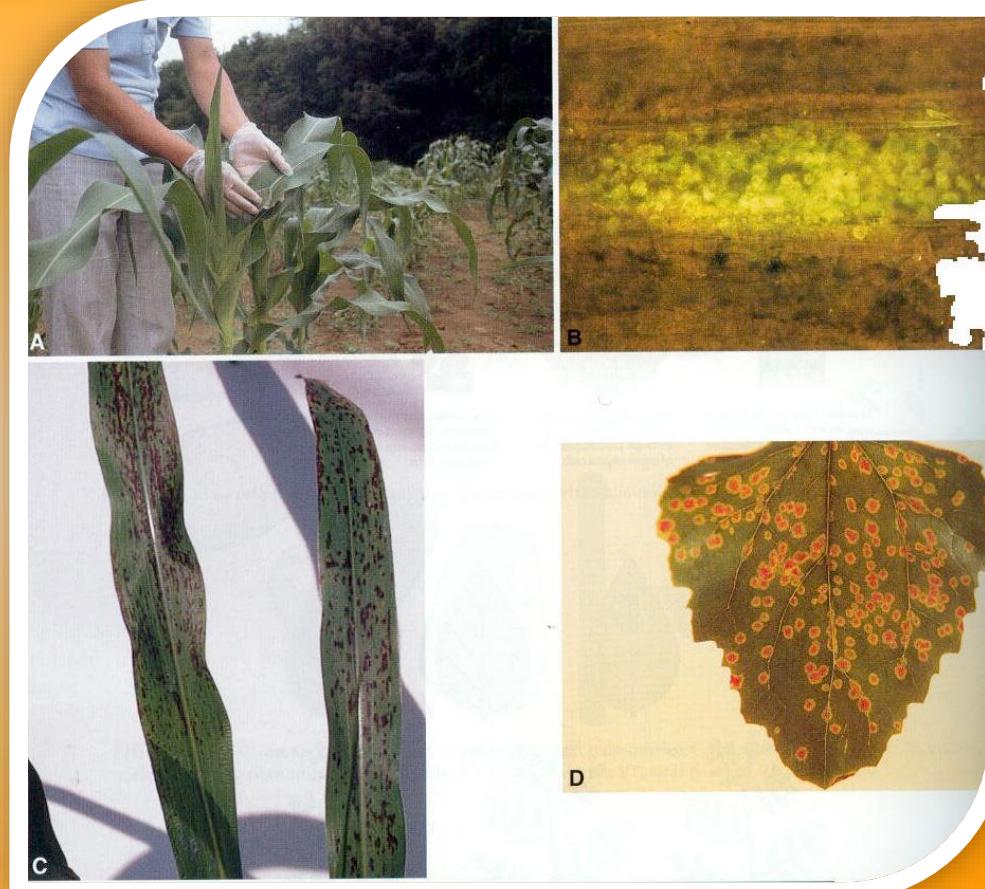
I virus a mosaico infettano tutti i tessuti della pianta e ogni cellula vegetale infettata puo' contenere anche 10 milioni di particelle virali



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)



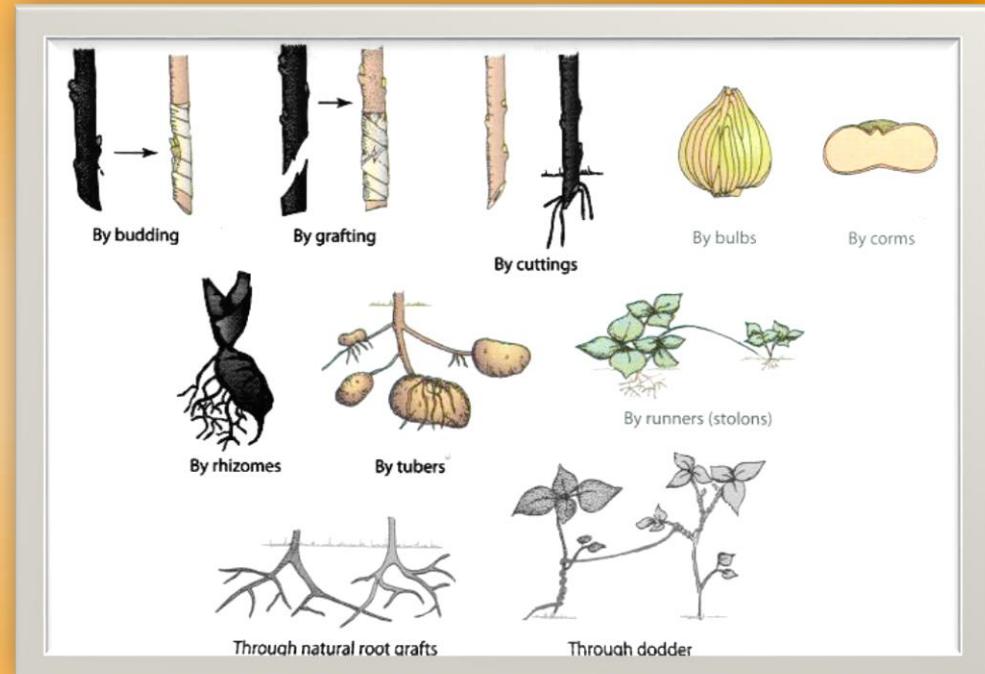
TRASMISSIONE DEI VIRUS

► 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 semenzali rende pero' la quarantena difficile da applicare)

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

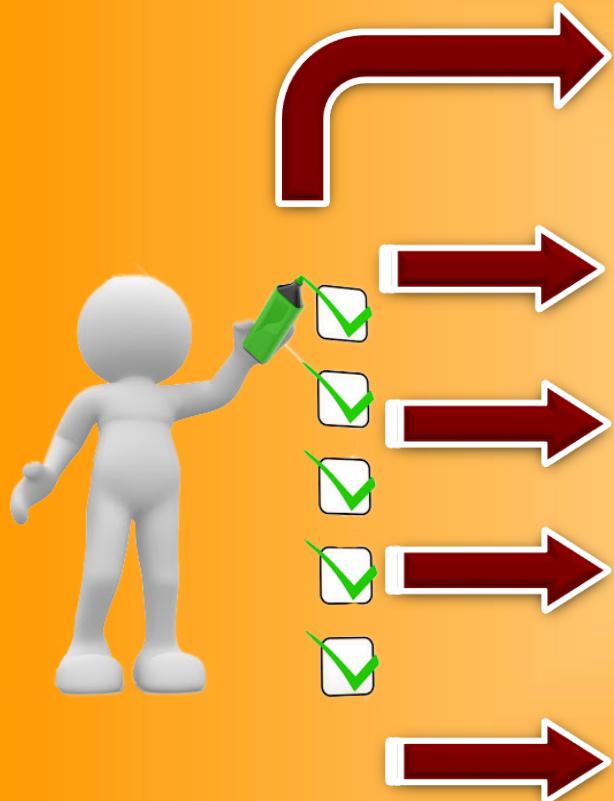
CONTROLLO DEI VIRUS VEGETALI

- ▶ In alcune malattie virali, la pianta puo' 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)



Contagio

Replicazione primaria nel sito di infezione
(spesso corrisponde al periodo di incubazione)

Diffusione per via ematica e/o linfatica

Replicazione secondaria negli organi bersaglio
(fase della malattia conclamata)

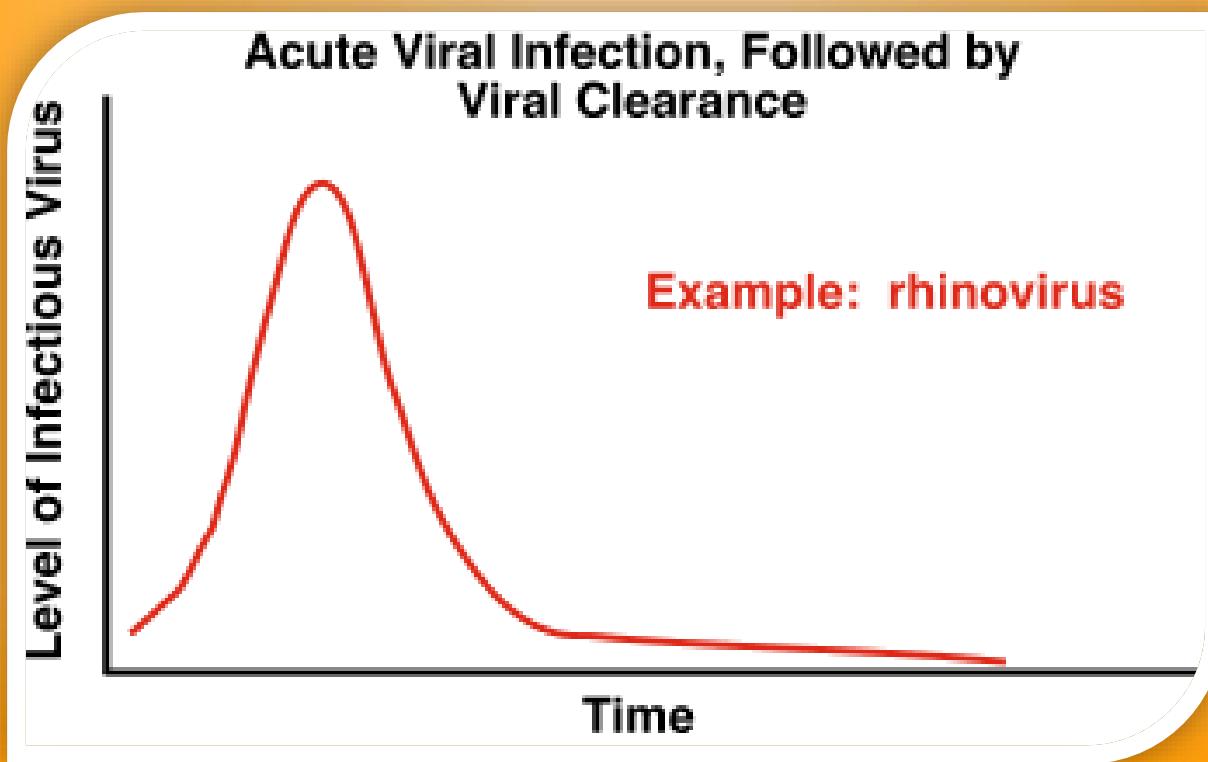
Esiti possibili:

- ▶ Fine della fase acuta: guarigione/morte
- ▶ Cronicizzazione
- ▶ Latenza

INFEZIONI ACUTE



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

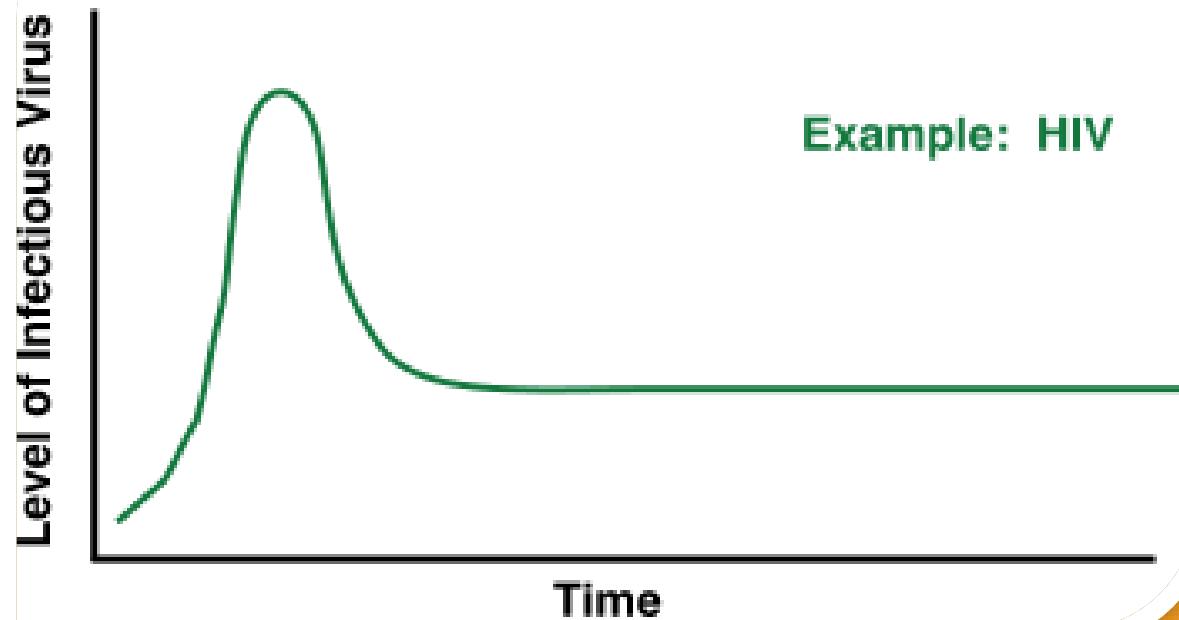


INFEZIONI CRONICHE



Esito: malattia ingravescente, morte

Acute Viral Infection, Followed by Chronic Infection



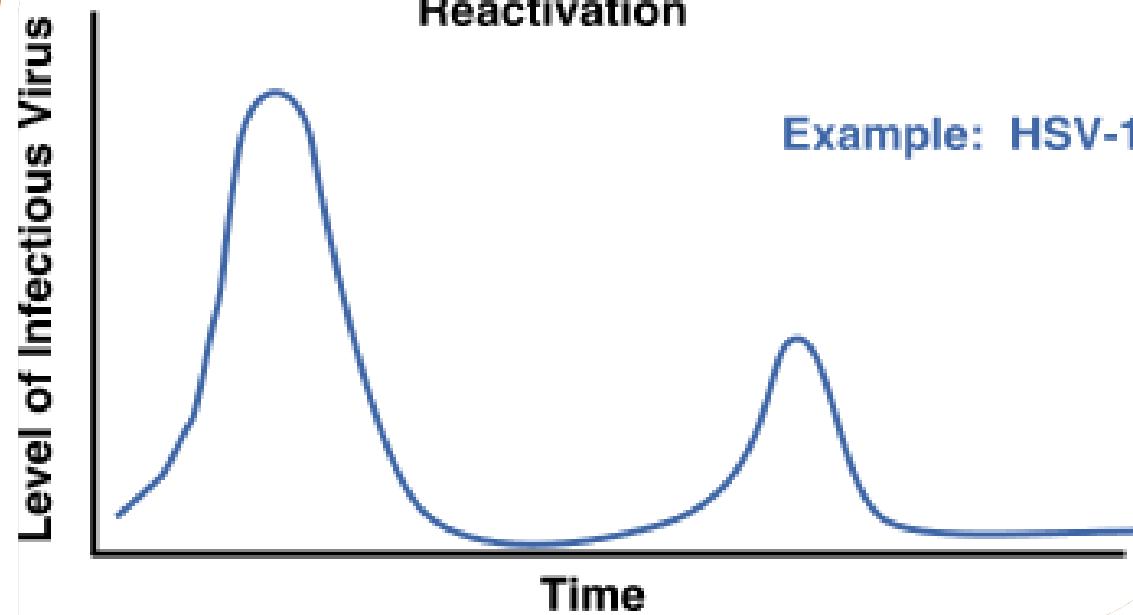
INFEZIONI LATENTI



Esito: episodi recidivanti

Acute Viral Infection, Followed by Latent Infection and Periodic Reactivation

Example: HSV-1



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

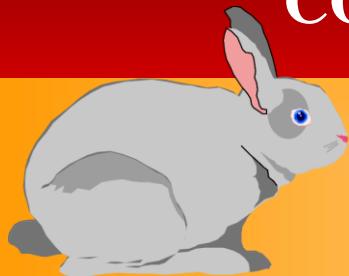
SISTEMI ANIMALI

IN VITRO

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

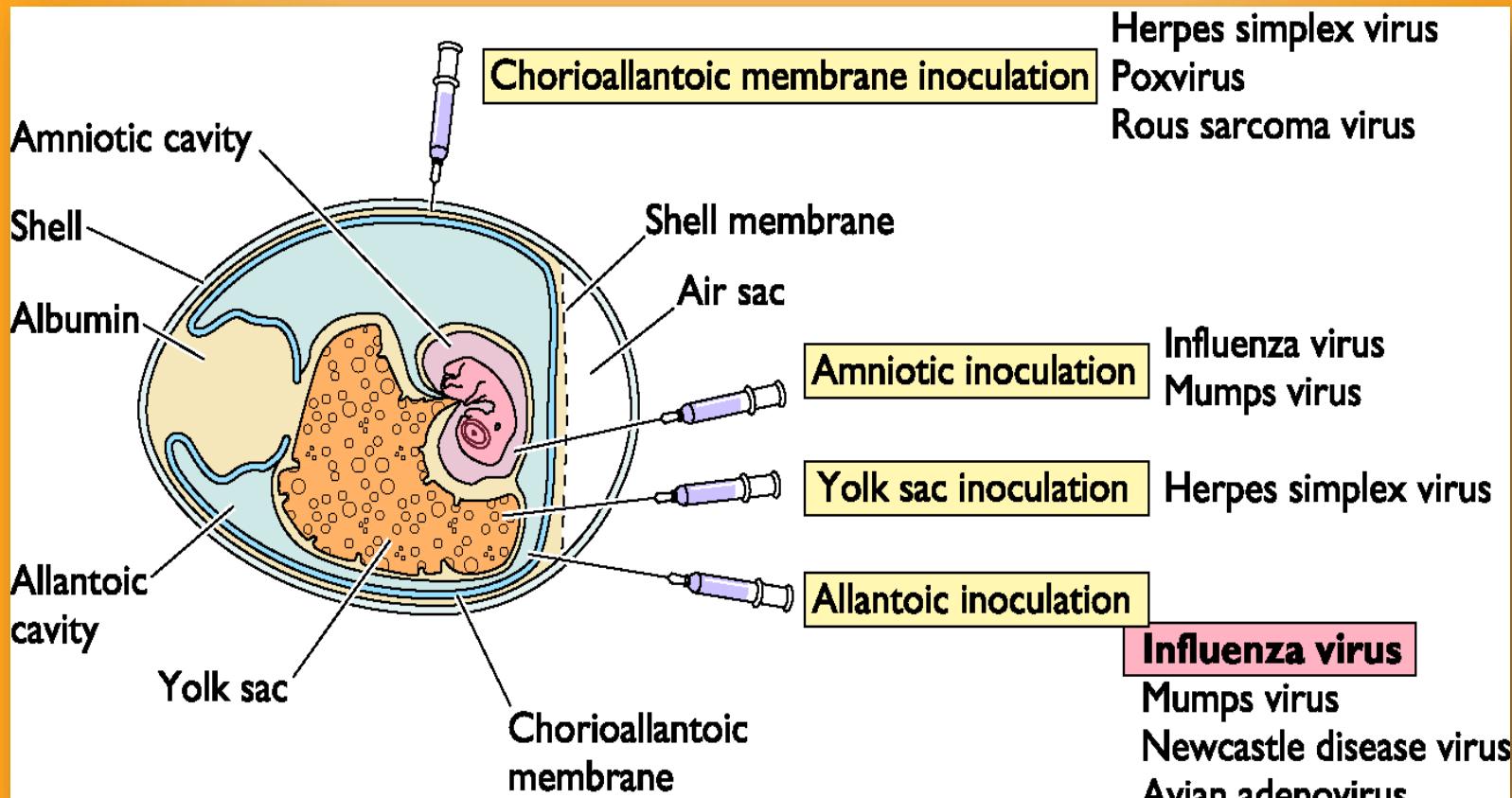


VANTAGGI

- 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

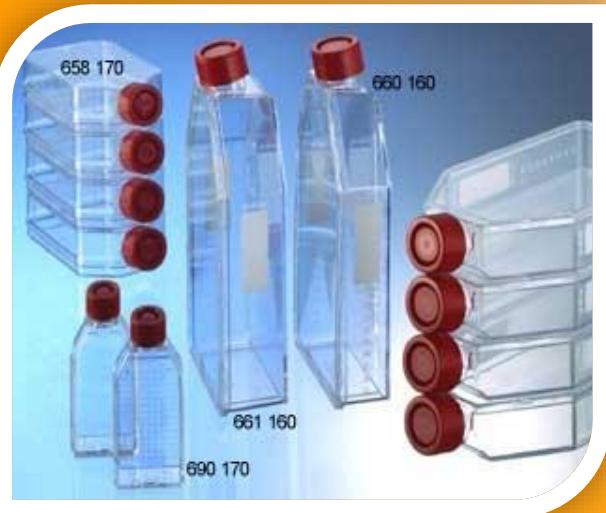
sospensioni di cellule isolate, ottenute da tessuti diversi, dai quali vengono dissociate per via enzimatica (tripsina) o per mezzo di soluzioni con sostanze chelanti (versene).

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



COLTURE CELLULARI

Le cellule vengono immesse 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.

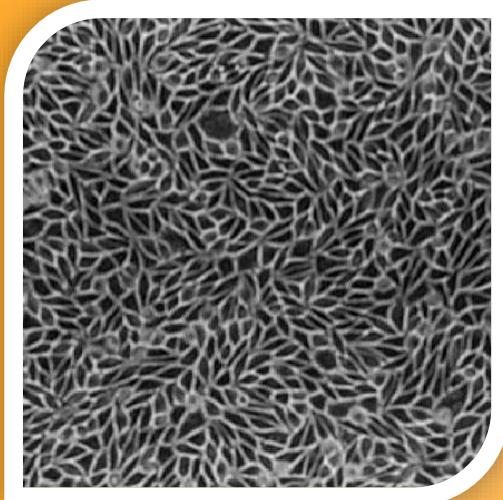


Le colture vengono lasciate immobili, le cellule aderiscono sul fondo piatto, si moltiplicano → formano un monostato di cellule

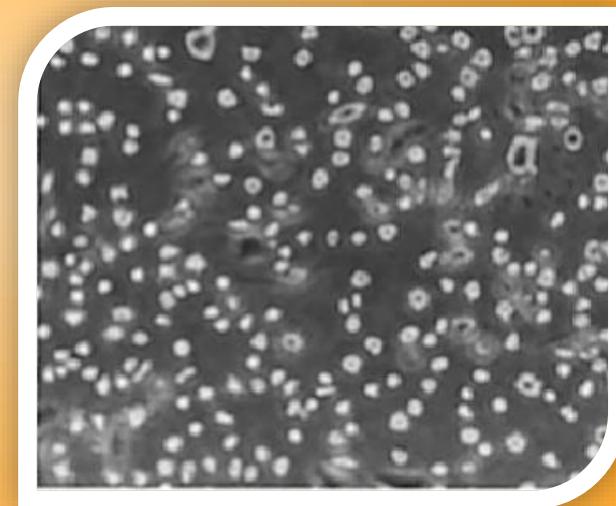


COLTURE CELLULARI

**Cellule in
monostrato**



**Cellule in
sospensione**



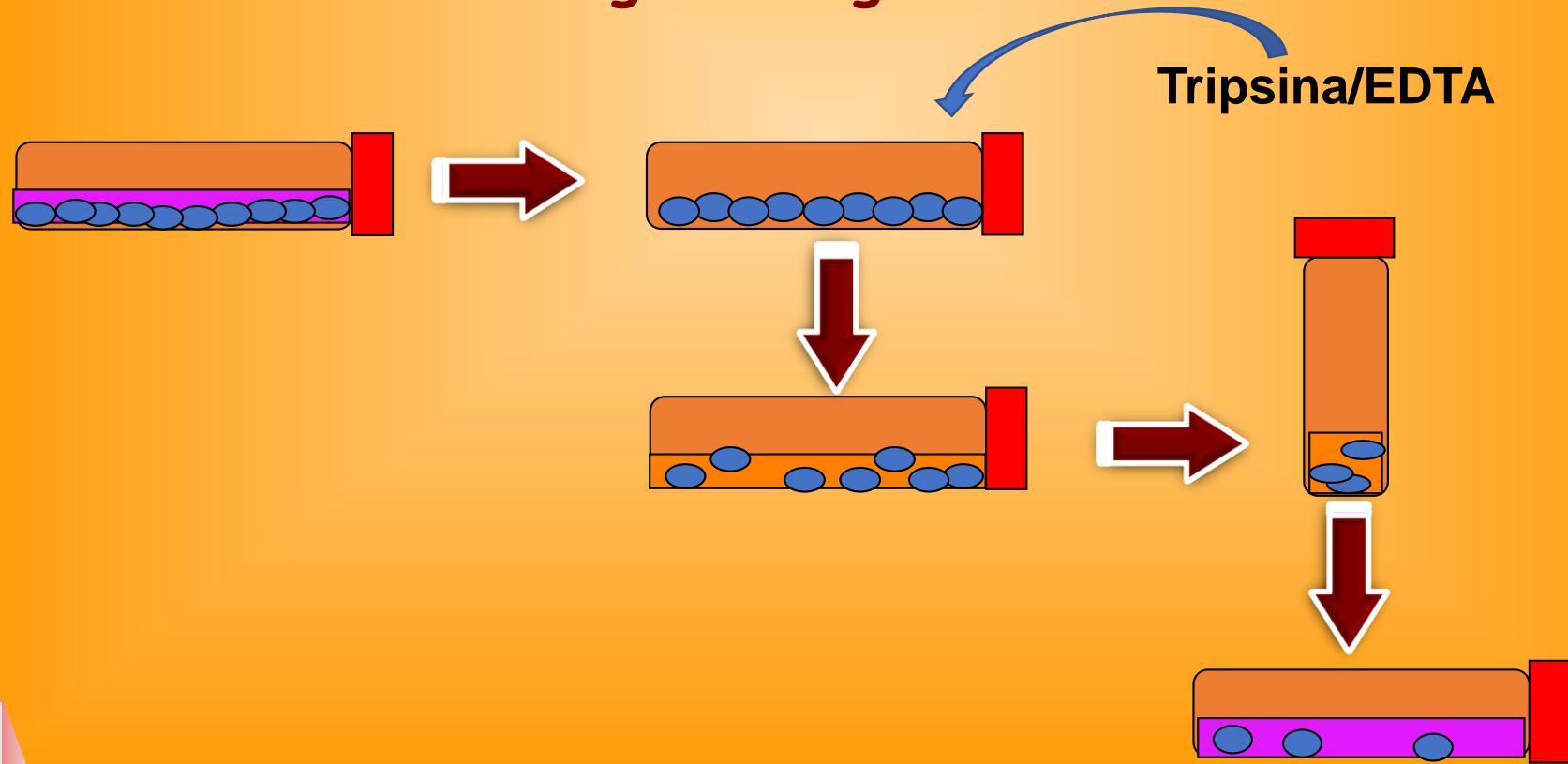
crescono su superfici solide (plastica, vetro).

Sono le più usate in virologia.



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

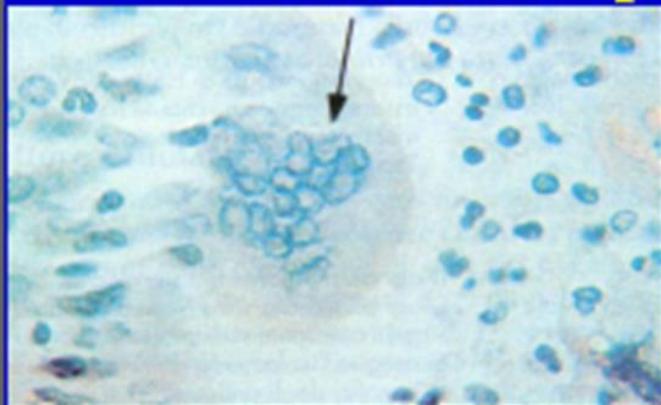
Le colture vengono osservate al Microscopio ottico a luce invertita.

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

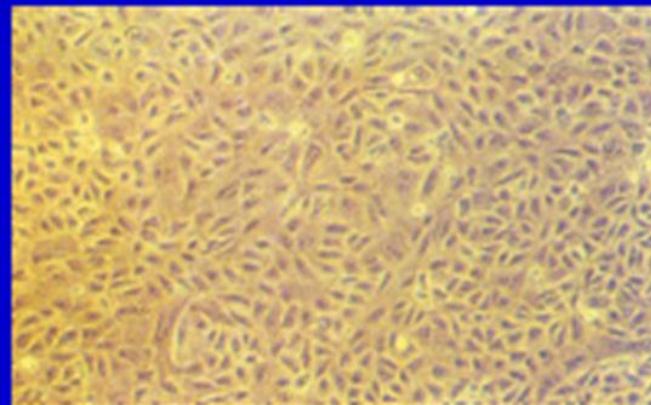
COLTURE CELLULARI



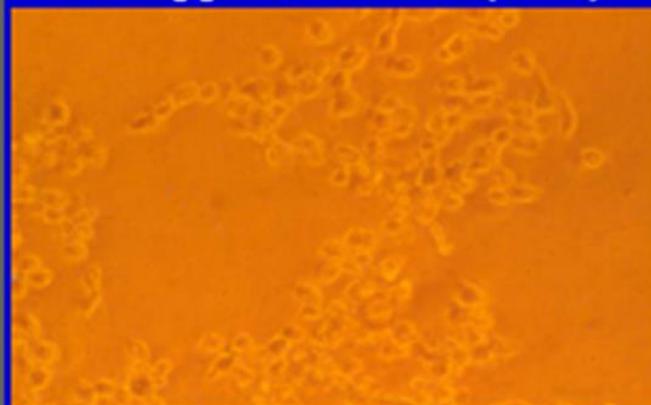
Effetti citopatici da virus



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



cellule Vero (linea continua) non infettate



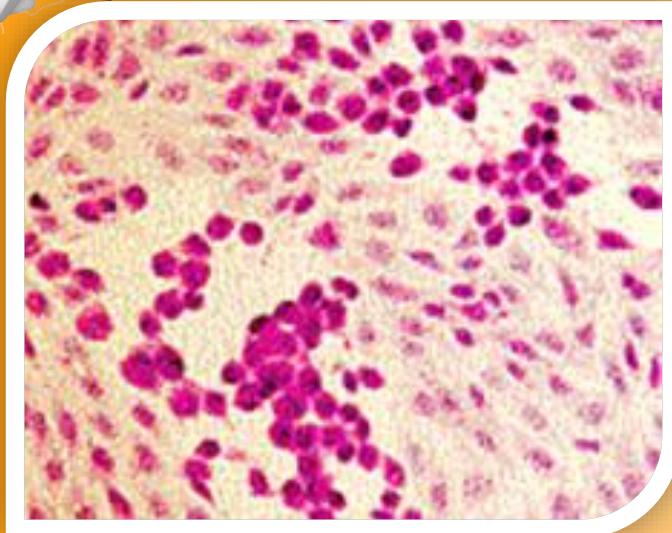
effetto litico su cellule Vero (Poliovirus)



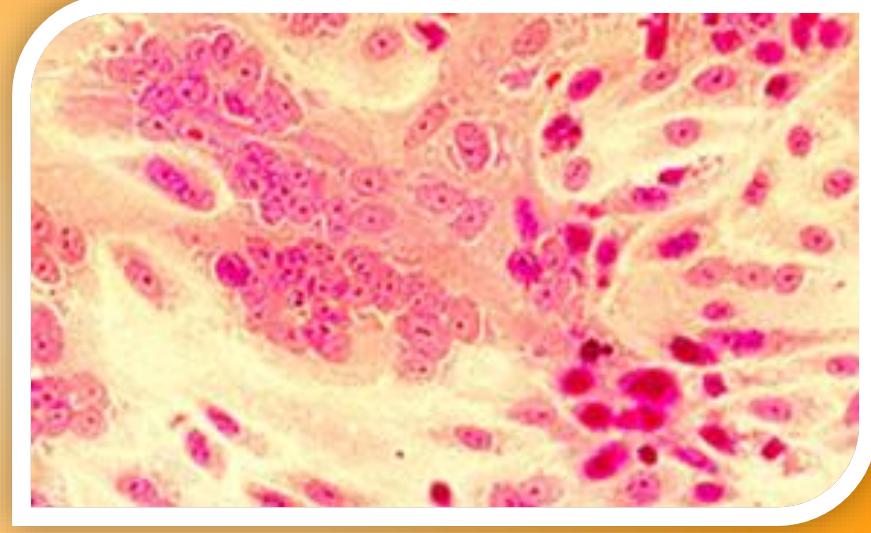
effetto litico su cellule Vero (Enterovirus)



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.



*Per qualunque domanda o problema
puoi contattarmi al*

- Tel: **338 642 8032**
- e-mail: vivian.tullio@unito.it