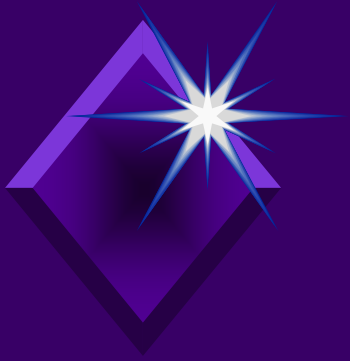




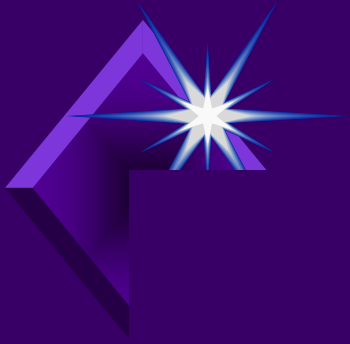
MYXOVIRIDAE

myxa: greco per muco

Famiglie:

- ◆ Orthomyxoviridae
- ◆ Paramyxoviridae





Caratteristiche

Orthomyxovirus

Paramyxovirus

Dimensione

80-120 nm

120-250 nm

Replicazione

nucleare

citoplasmatica

Genoma

segmentato

non segmentato

Variazioni genetiche

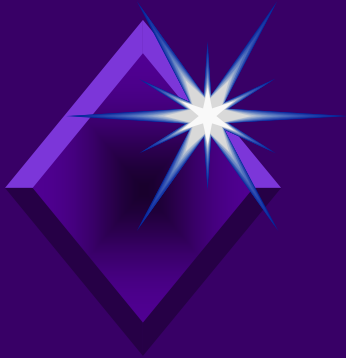
frequenti

assenti

Ribovirus a genoma negativo

Il loro genoma è formato da una o più molecole di RNA lineare a singolo filamento che **non** sono in grado di funzionare da messaggero.

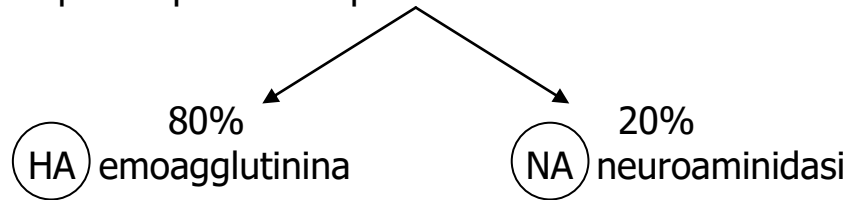




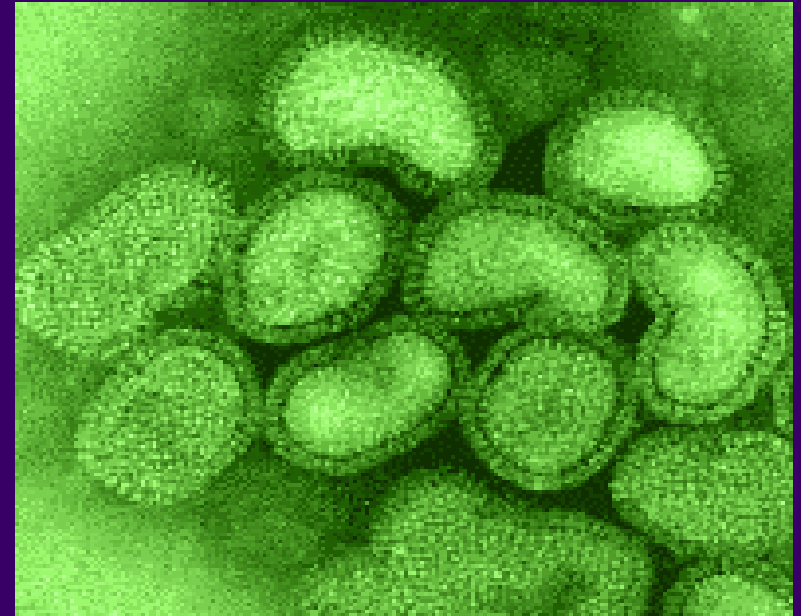
ORTHOMIXOVIRINAE

ORTHOS → in greco → VERO-REGOLARE

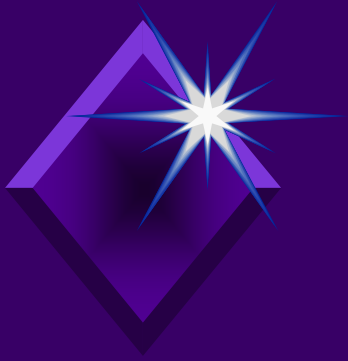
- Virioni di 100-200 nm di diametro di forma sferica
- Simmetria elicoidale
- Pericapside lipidico con proiezioni



•Entrambe fondamentali per l'infettività del virus



Particelle di virus influenzale.
Fotografia al m.e.



Orthomyxoviridae

In base agli **antigeni del nucleocapside (NP)** e della **proteina M**, (antigeni interni tipo-specifici)

i virus influenzali vengono suddivisi in tre tipi antigenicamente distinti:

- ◆ **Virus influenzale A**
- ◆ **Virus influenzale B**
- ◆ **Virus influenzale C**



All'interno dei tipi A e B si distinguono diversi sottotipi in base a differenze antigeniche dell' HA e della NA.

Nuove varianti antigeniche maggiori sono fonte di pandemie

Virus dell'influenza umana



Tipo A

Animali e uomo

Epidemie e pandemie

Tipo B

Solo l'uomo

Piccole epidemie, casi sporadici

Principalmente bambini

Tipo C

Solo l'uomo

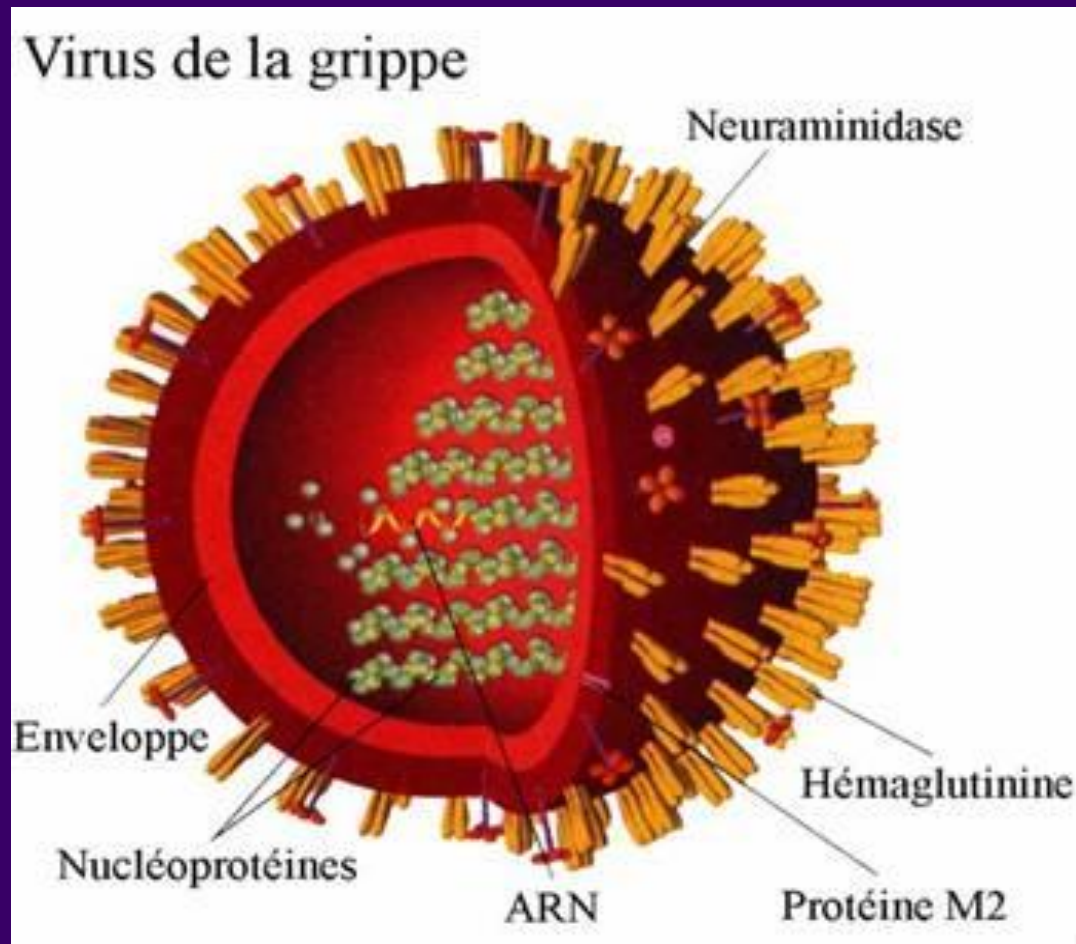
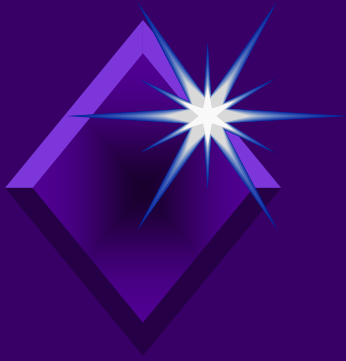
Non provoca epidemie

Forme cliniche molto lievi

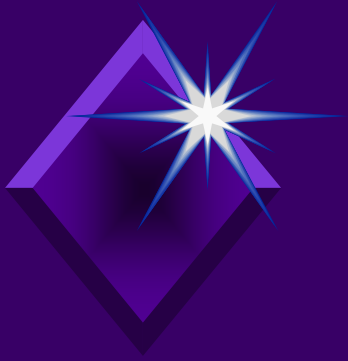
Il virus dell'influenza A può infettare differenti specie animali (volatili, suini, equini, mammiferi acquatici)

Il virus dell'influenza A è generalmente **specie-specifico**. Tuttavia, alcuni ceppi di influenza A possono infettare differenti specie animali.

Quelli che infettano gli **uccelli** (in particolare i migratori), il **maiale** e l'**uomo** sono ritenuti la più importante causa di **variabilità del virus**.

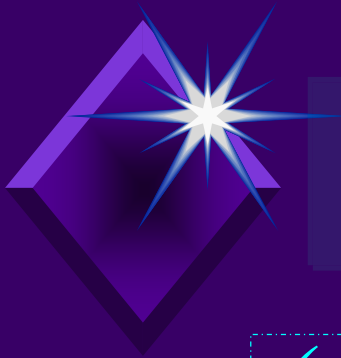


Il **genoma** è formato da 7 (C) o 8 (A e B) segmenti di RNA monocatenario lineare di senso negativo.



Le forme filamentose

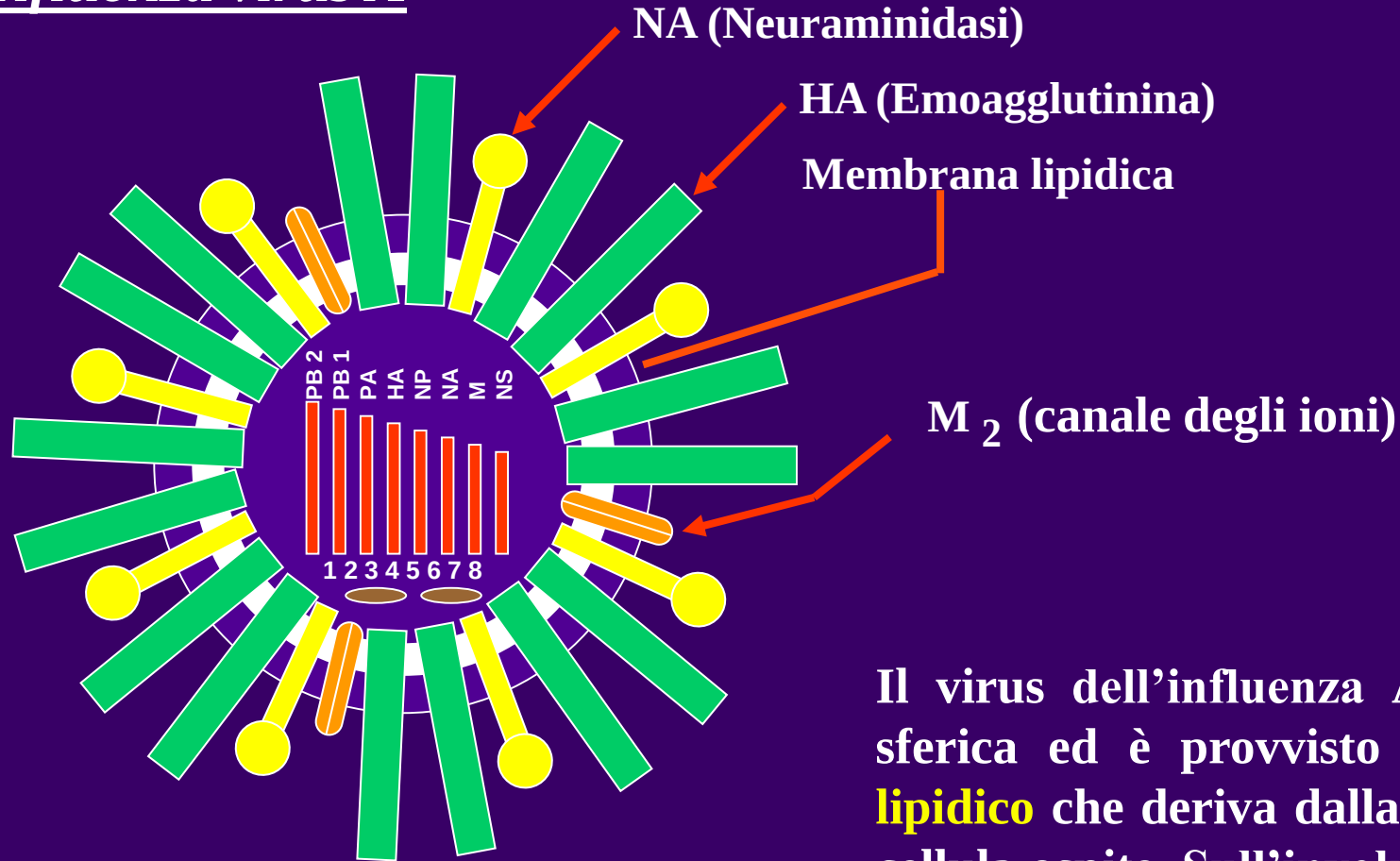
- ◆ Altamente pleiomorfe e frequentemente costituite da subunità sferiche.
- ◆ Si osservano nei ceppi di recente isolamento mediante microscopia in campo scuro
- ◆ I filamenti si assemblano a causa di un difetto nello sviluppo delle particelle e nella gemmazione dalla membrana cellulare
- ◆ La capacità di un virus influenzale di dare prevalentemente forme filamentose è un attributo genetico stabile del ceppo



Resistenza del virus

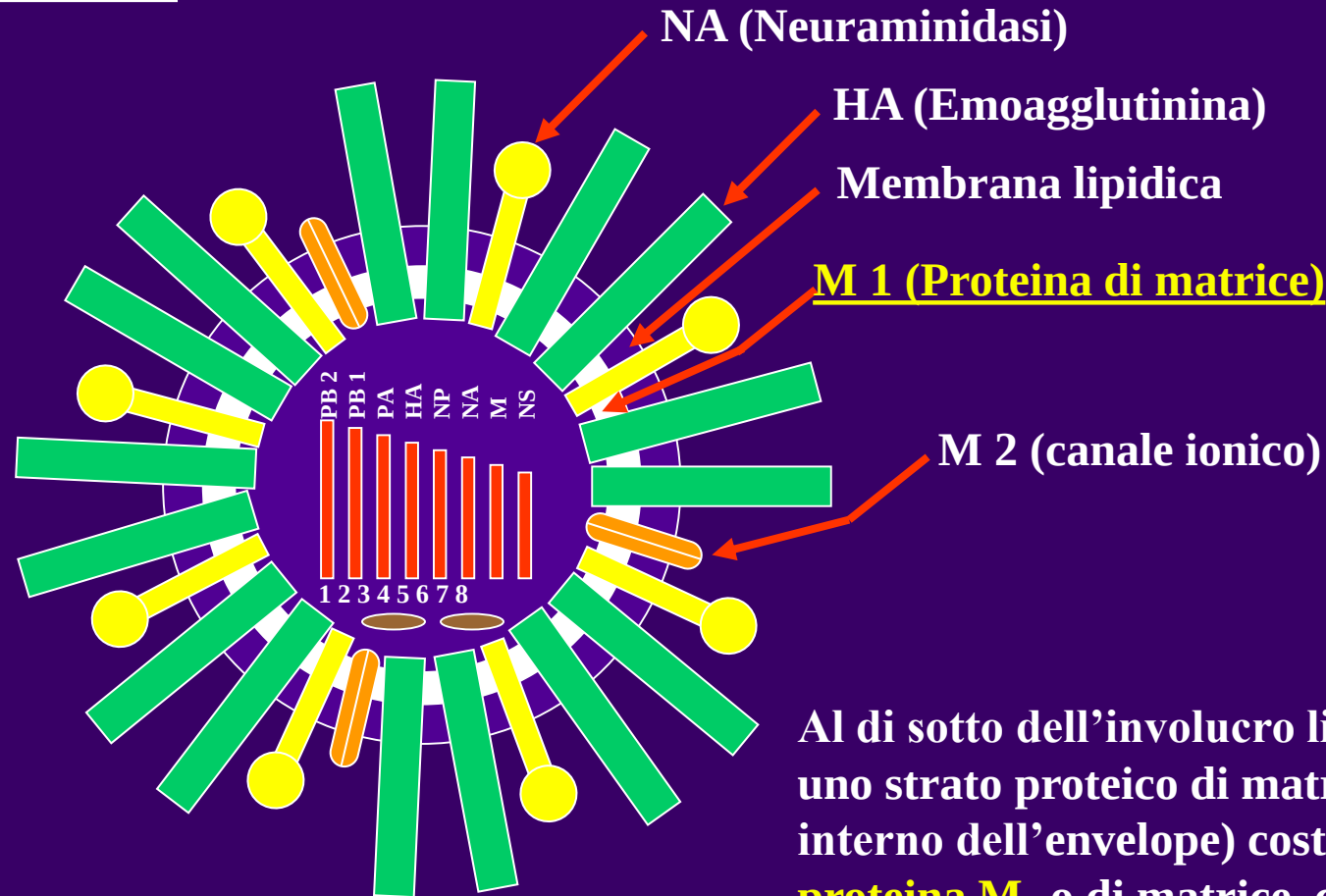
- ✓ Il virus, in quanto provvisto di envelope, è poco resistente e viene rapidamente inattivato da alcool, calore ($> 37^{\circ}\text{C}$), solventi organici e comuni disinfettanti
- ✓ Il virus può conservare la sua infettività per alcuni giorni, se mantenuto a 4°C in particolari condizioni (umidità e presenza di sostanze stabilizzanti) o per lungo tempo a -80°C
- ✓ Nell'organismo animale infetto il ritmo di replicazione virale elevato bilancia la velocità di termoinattivazione

Influenza virus A



Il virus dell'influenza A ha una forma sferica ed è provvisto di un **involucro lipidico** che deriva dalla membrana della cellula ospite. Sull'involucro lipidico sono inseriti 3 tipi di glicoproteine virus specifiche (**HA, NA, M2**).

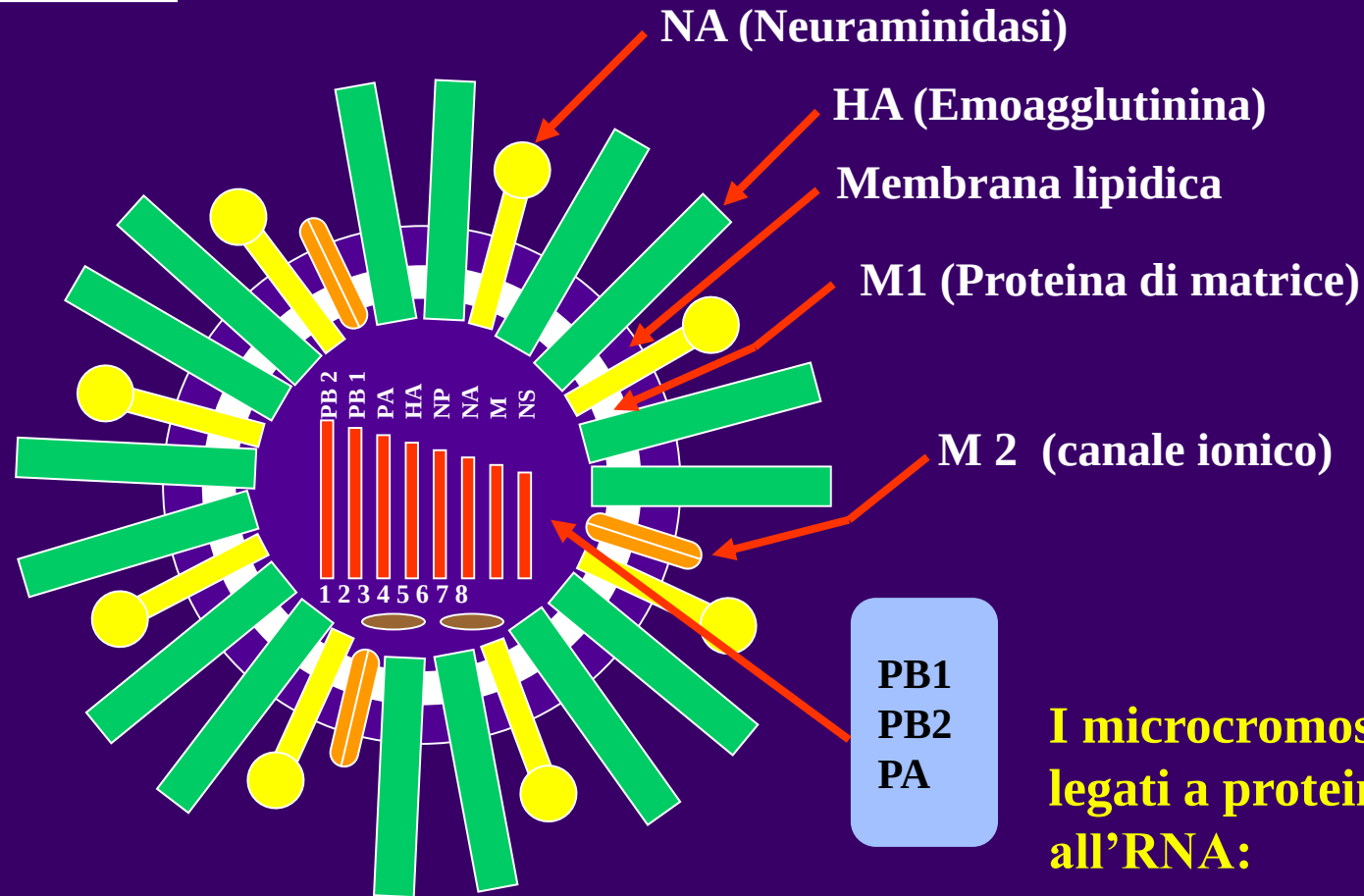
Influenza virus A



Al di sotto dell'involucro lipidico si trova uno strato proteico di matrice (strato interno dell'envelope) costituito dalla proteina M₁ o di matrice, che racchiude il genoma formato da 8 diversi e distinti segmenti (minicromosomi) di RNA monocatenario a polarità negativa.

La proteina di matrice M1 è la proteina più abbondante del virione e conferisce stabilità all'envelope

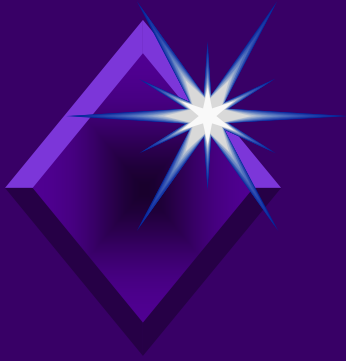
Influenza virus A



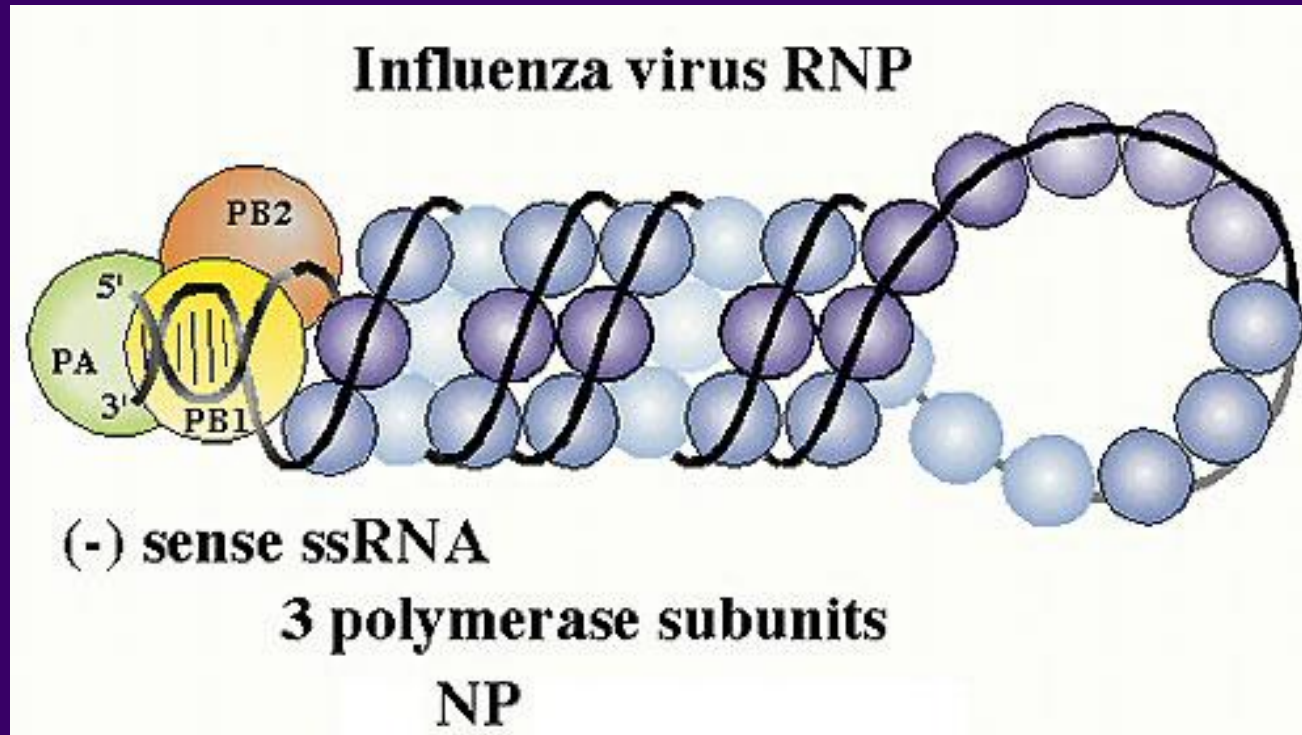
I microcromosomi sono legati a proteine associate all'RNA:

NP

PB1, PB2 e PA formano il complesso trascrittasi: RNA polimerasi virale

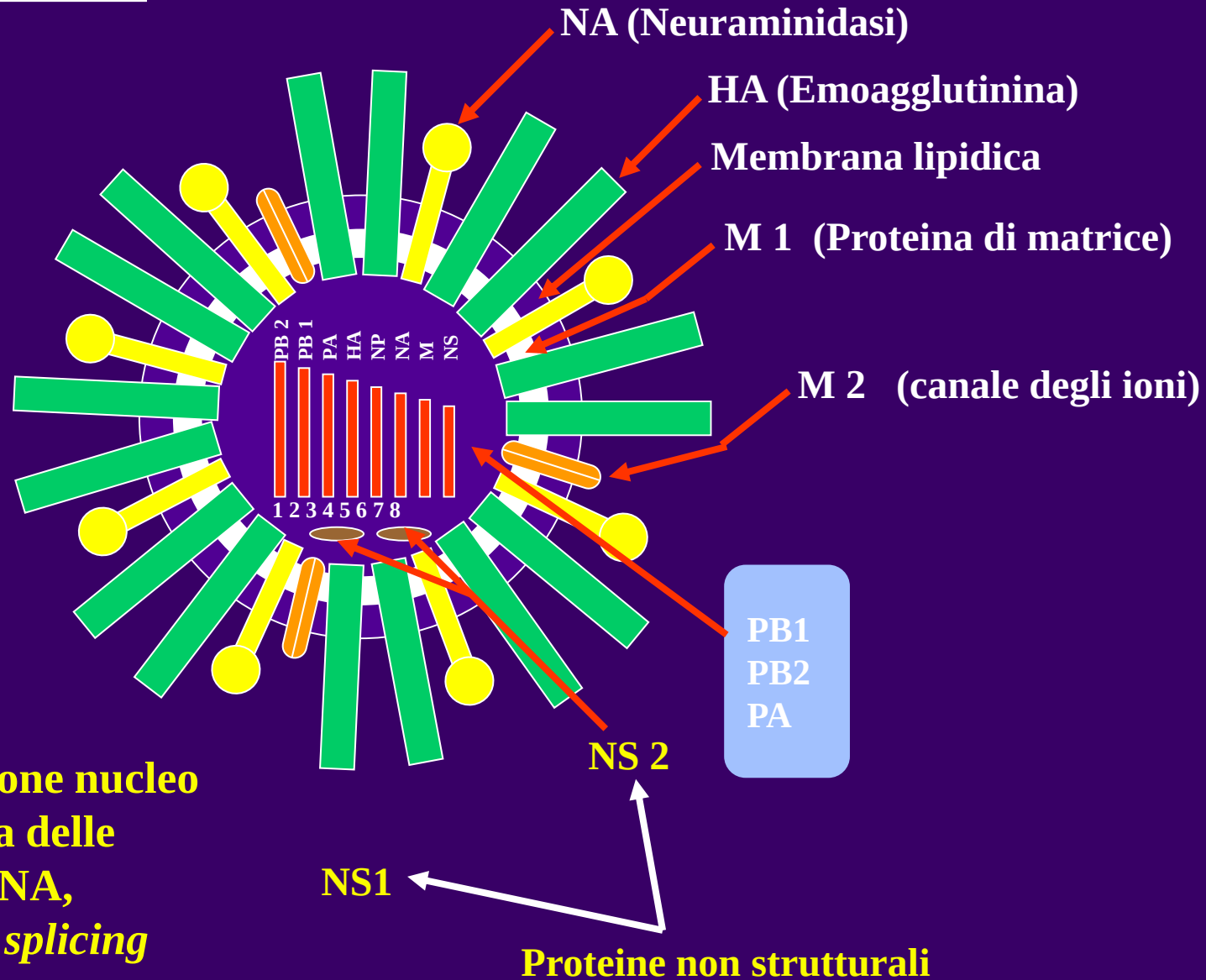


Complesso trascrittasi



La proteina nucleocapsidica NP è costituita da un unico polipeptide fosforilato, ha un ruolo strutturale e costituisce circa il 90% delle proteine associate con i frammenti di RNA

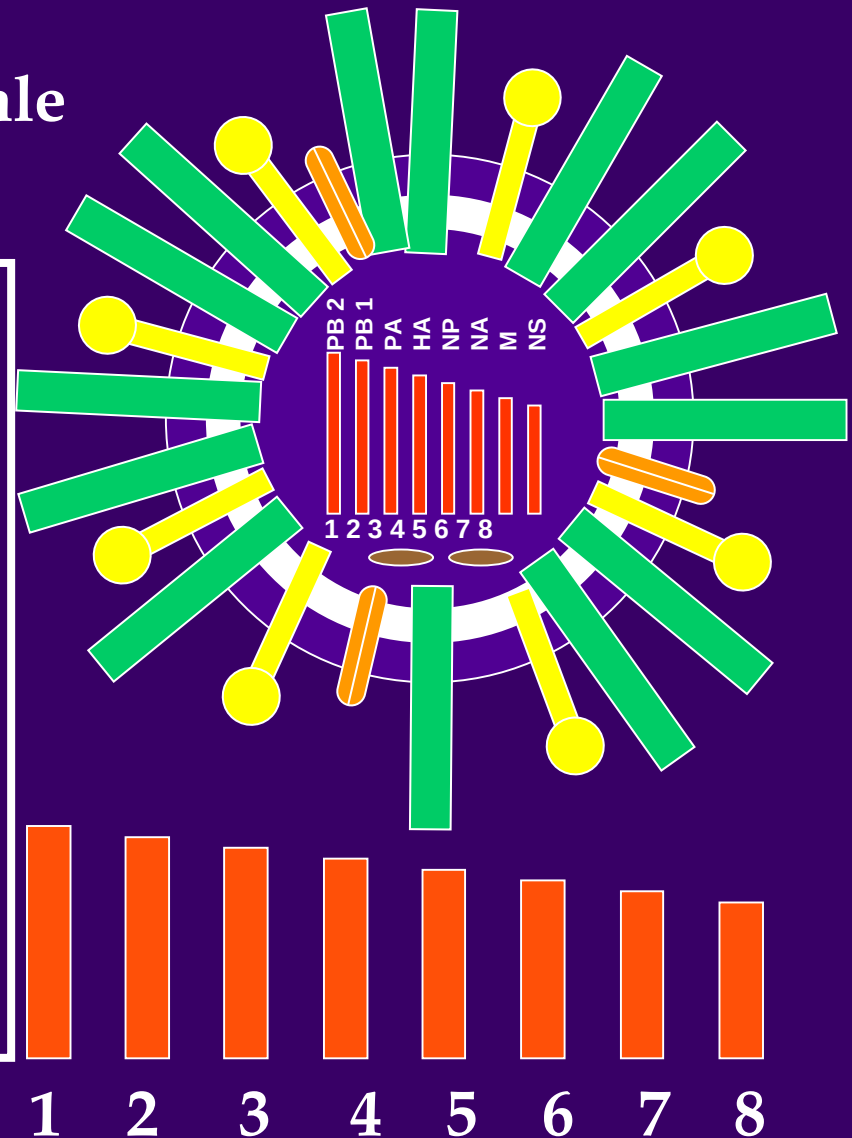
Influenza virus A



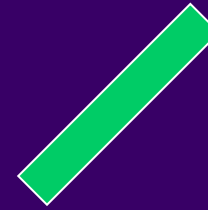
Virus influenzali

Segmenti del genoma virale

- 1:PB2 (p.basica)
- 2:PB1 (p.basica)
- 3:PA (p.acida)
- 4:HA *emoagglutinina*
- 5:NP *nucleocapside proteina*
- 6:NA *neuroaminidasi*
- 7:M= M1 e M2 *Proteina di matrice e proteina canale ionico*
- 8:NS1 e NS2 *proteine non strutturali*



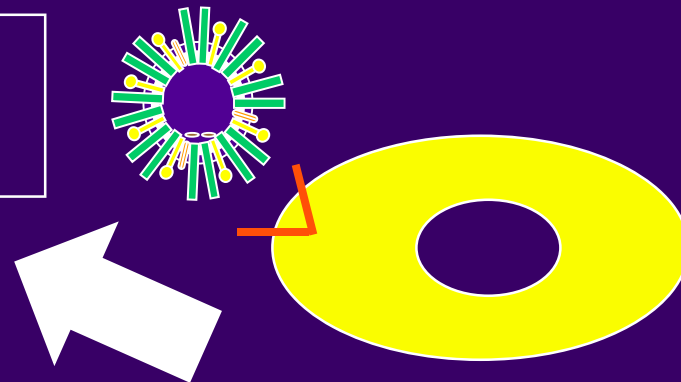
Emoagglutinina



- ◆ E' la più importante glicoproteina di superficie dal punto di vista antigenico
- ◆ Rappresenta l'**antirecettore** che lega il virione al **recettore** (**acido sialico**), presente nelle glicoproteine e nei glicolipidi presenti nella membrana cellulare.
- ◆ E' importante per l'attacco del virus sulle cellule e per l'inizio del processo di infezione (penetrazione)

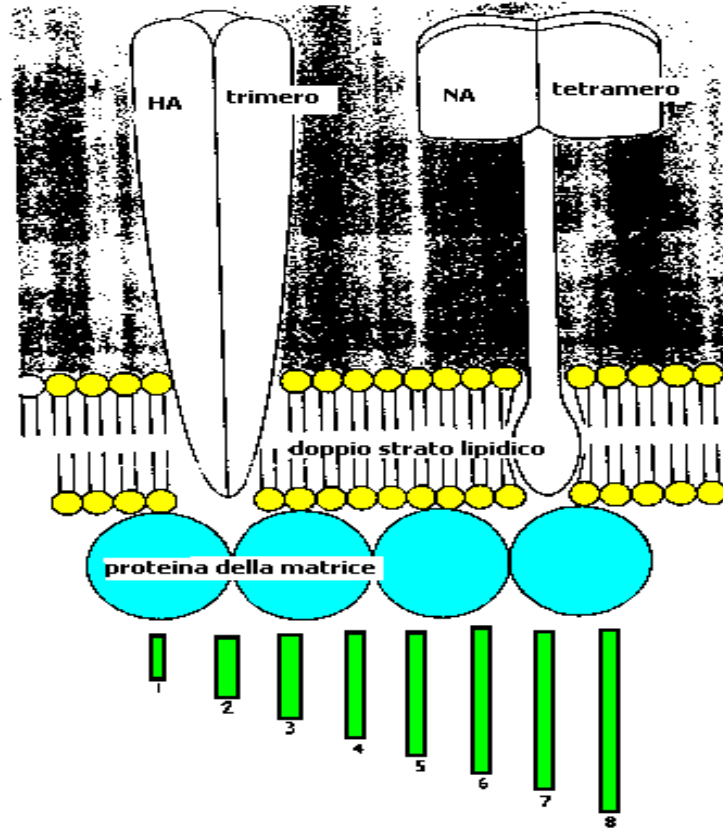
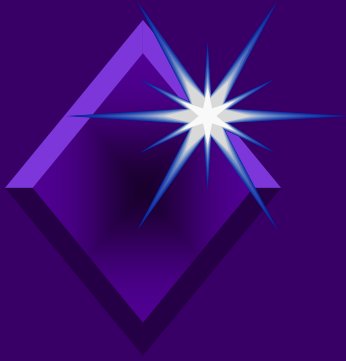
Recettore cellulare: acido sialico

Antirecettore : emoagglutinina



Neuroaminidasi /

- ◆ La **neuroaminidasi** ha il compito di impedire che il virione venga neutralizzato dal legame con l'acido sialico presente nelle glicoproteine del muco (mucose respiratorie)
- ◆ Consente, quindi, il contatto con la superficie delle cellule dell'epitelio mucoso.
- ◆ Ha funzione di rilievo nella **liberazione** dei virioni neoformati (idrolizzando i residui dell'acido sialico che possono legare i virioni alle membrane cellulari, ed impedendo l'aggregazione dei virioni rilasciati).



HA: glicoproteina di forma
bastoncellare
PM = 75 Kd circa

HA attiva $\xrightarrow{\text{proteasi cell}}$ HA1 50 Kd
+ HA2 25 Kd

↓
lega i RBC
lega il recettore (ac. sialico)

HA si complessa in trimeri
di PM = 210 Kd

90% del pericapside

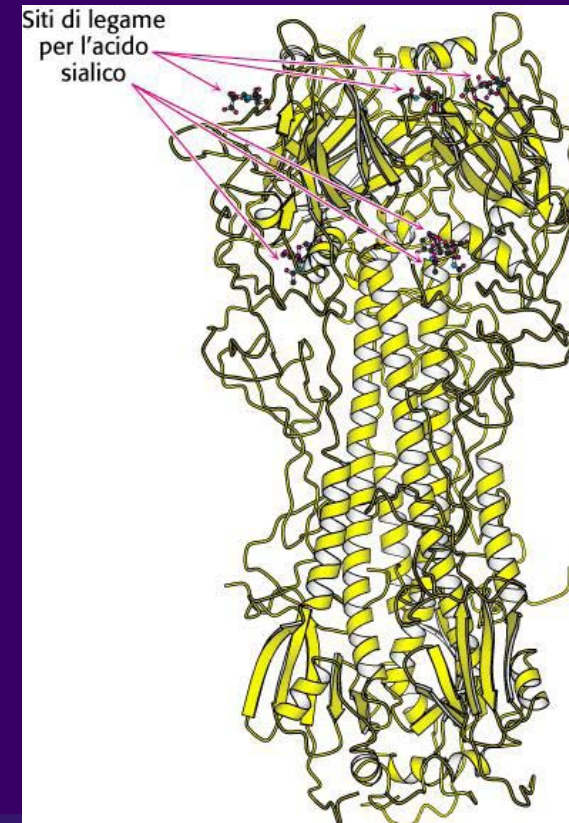
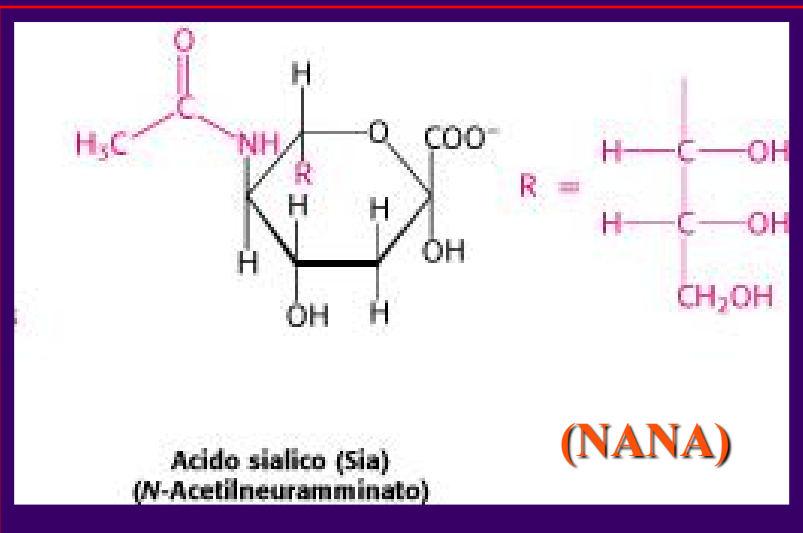
NA: scinde l'acido sialico (acido neuraminico)
interviene nella penetrazione

↓
proteina glicosilata, PM = 58 Kd
si complessa in tetrameri → PM = 240 Kd
aspetto di fungo a cappello

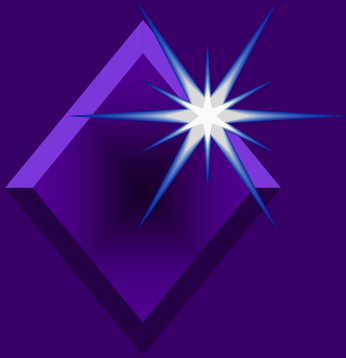


Virus e recettori

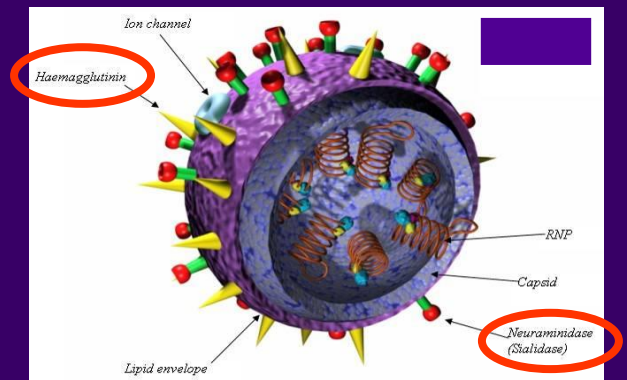
Tutti i virus influenzali si legano, attraverso l'emoagglutinina, all'acido sialico (acido 5-N-acetilneuraminico) terminale degli oligosaccaridi delle glicoproteine e dei glicolipidi presenti sulla superficie cellulare.



Struttura della Emoagglutinina



Virus e recettori



i virus influenzali ormai adattati alla circolazione **interumana**, possiedono un'emoagglutinina che riconosce preferibilmente residui di acido sialico con un **legame $\alpha 2,6$ -galattoso**, largamente presenti alla superficie delle mucose respiratorie umane

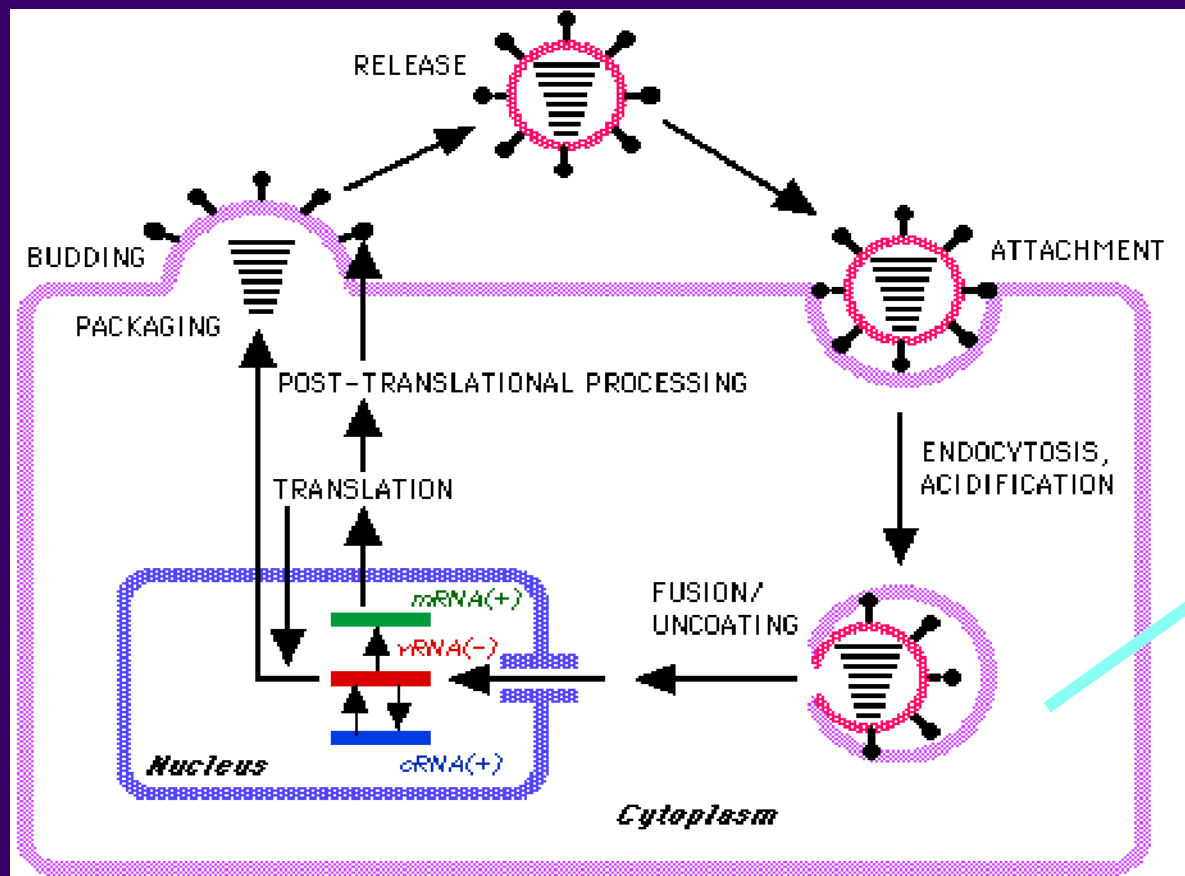
i virus influenzali **aviari** si legano preferibilmente ai residui di acido sialico con un legame **$\alpha 2,3$ -galattoso**, presenti in abbondanza alla superficie delle cellule delle mucose respiratorie ed enteriche degli animali (uccelli, soprattutto) ma scarsamente rappresentati nella mucosa respiratoria umana dove, oltre che essere presenti in numero ridotto, sembrano confinati alle cellule ciliate.

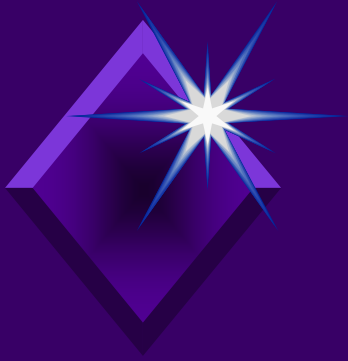


Perché il virus influenzale infetti una cellula, devono verificarsi i seguenti eventi:

1. **Legame a residui di acido sialico** presenti nelle glicoproteine della superficie della cellula bersaglio,
2. **Endocitosi**, le particelle virali vengono inglobate in invaginazioni rivestite e in vescicole. Negli endosomi il pH acido attiva la funzione fondente dell'emoagglutinina che consente al nucleocapside di entrare nel citoplasma
3. **Replicazione nel nucleo** della cellula ospite
4. **Assemblaggio citoplasmatico**
5. **Liberazione per gemmazione**

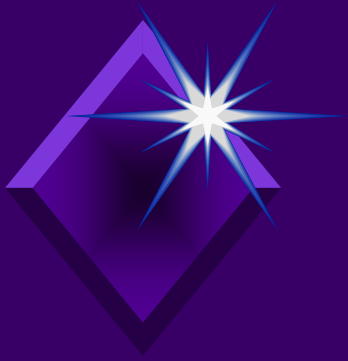
Ciclo replicativo





I virus influenzali e....

- ◆ I virus influenzali A sono presenti, oltre che nella **specie umana**, anche in numerose altre specie animali come **uccelli** selvatici e domestici (anatre, polli, tacchini), **cavalli, suini, balene, foche**.
 - ◆ Tra i virus **influenzali A** si distinguono diversi **sottotipi** sulla base di sostanziali differenze nei caratteri antigenici **dell'emoagglutinina (H) e della neuraminidasi (N)**.
 - ◆ **16** distinte varietà antigeniche di emoagglutinina (indicate con le sigle da **H1** ad **H16**)
 - ◆ **9** varietà di neuraminidasi (indicate con le sigle da **N1** a **N9**)
- che possono essere presenti in diverse combinazioni nei differenti sottotipi di virus



Il reservoir dell'infezione

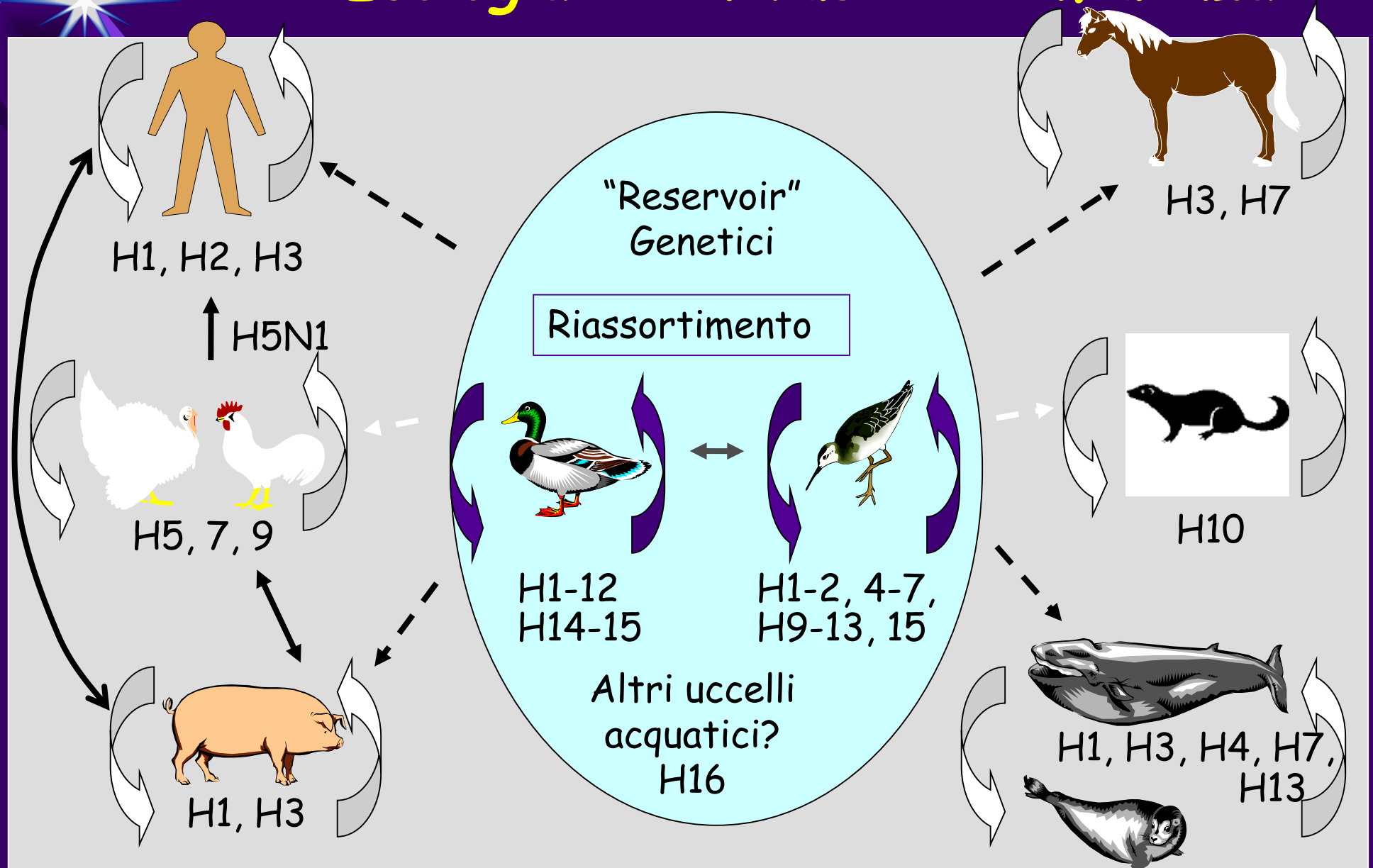
- **Uccelli: reservoir naturale** di tutti i sottotipi di virus influenzali A (considerati la sorgente originaria delle infezioni da virus influenzali A dell'uomo e di tutti gli altri animali).

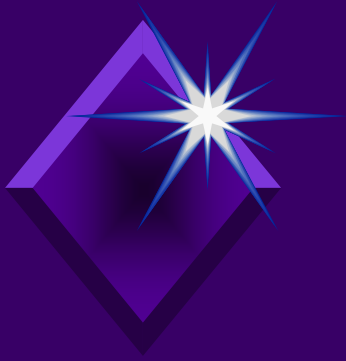
Normalmente l'infezione da virus influenzali A negli uccelli decorre in modo asintomatico



ad eccezione dei virus con emoagglutinina di sottotipo 5 o 7 (**H5, H7**) che possono causare diffuse epizootie con elevata mortalità soprattutto tra i volatili domestici (polli, tacchini) in allevamento intensivo (la cosiddetta *fowl plague* o **peste aviaria**, descritta come una grave malattia del pollame per la prima volta in Italia, nel 1878).

Ecologia del Virus dell'Influenza A

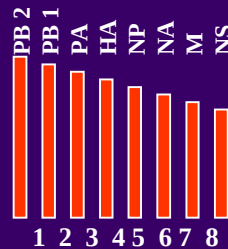




Variabilità del virus influenzale

La presenza di un **genoma segmentato** conferisce ai virus influenzali:

- ◆ variabilità dovuta alla comparsa di mutazioni nei singoli segmenti genomici.
- ◆ capacità di presentare variazioni notevoli ed improvvise, nell'assetto delle diverse proteine strutturali e quindi nella composizione antigenica.





Andamento epidemiologico

- ◆ **Influenzato dalla comparsa di virus che differiscono nella struttura delle proteine virus specifiche (neuroaminidasi ed emoagglutunina), anche in modo modesto ma sufficiente da rendere meno efficace l'azione degli anticorpi neutralizzanti.**
- ◆ **La diffusione dell'infezione e la presenza di anticorpi costituiscono una pressione forte in grado di favorire la proliferazione di nuovi virus**
- ◆ **I vari sottotipi dei virus influenzali vengono di norma identificati con la sigla che porta indicazioni del luogo di isolamento, dell'anno e dei caratteri antigenici**

A/Hong Kong/1/68 (H3N2); A/Singapore/1/57 (H2N2)

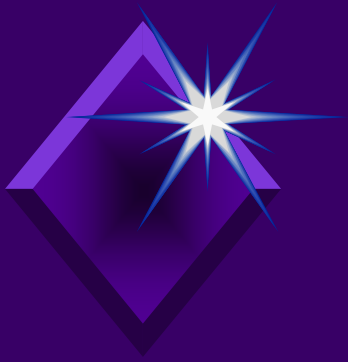
A/Italy2007/H1N2



Variabilità del virus influenzale

- ◆ Cosa succede in presenza di una infezione ad opera di due diversi virus influenzali?

è possibile che durante l'assemblaggio delle rispettive progenie virali, si verifichi una sorta di riassortimento genomico con lo scambio dei segmenti genomici che codificano HA o NA con la conseguente comparsa di virus consistentemente differenti nell'assetto delle glicoproteine del peplos (*antigenic shift*)



Antigenic shift

Major antigenic shift (cambiamento antigenico maggiore): rappresenta la sostituzione totale dei caratteri antigenici della emoagglutinina o della neuraminidasi.

Si osserva ad intervalli lunghi (raramente) ed è responsabile della diffusione pandemica di nuovi sottotipi virali, soprattutto se *l'antigenic shift* riguarda il cambio dell'emoagglutinina, dato che gli anticorpi anti emoagglutinina sono i più efficaci nel neutralizzare l'effetto del virus.



Antigenic shift

**Il cambiamento deriva da una ricombinazione
(riassortimento genetico)**

che si verifica tra un virus influenzale A umano ed un virus influenzale A animale (in genere di origine aviaria) che si trovano ad infettare contemporaneamente lo stesso organismo.

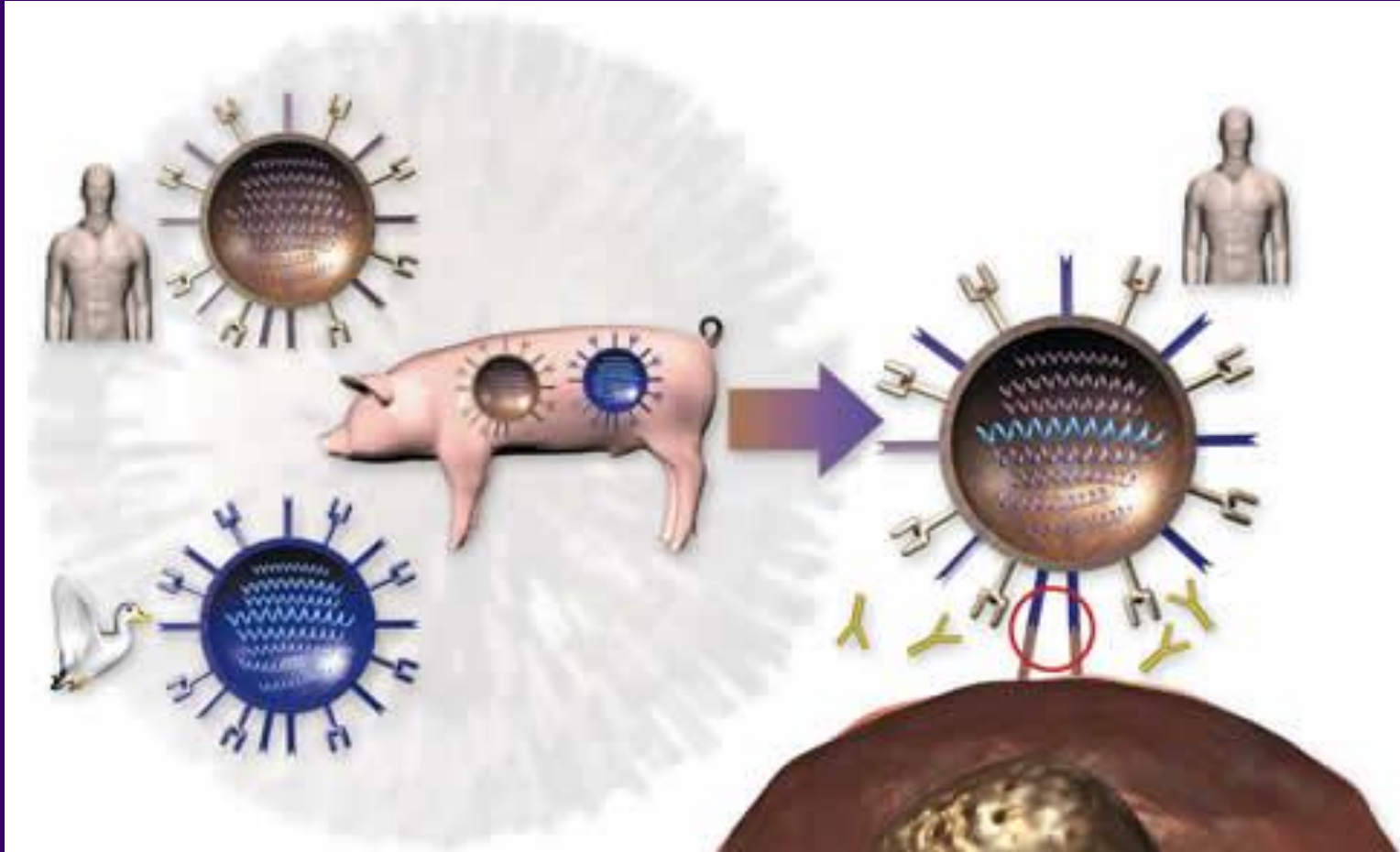


Antigenic shift

La specie animale che si ritiene essere il terreno più idoneo per il verificarsi di questo fenomeno è rappresentata dal **suino** che possiede alla superficie delle cellule degli epiteli mucosi respiratori residui terminali di acido sialico sia con legame **$\alpha 2,6$** che **$\alpha 2,3$** e può, quindi, essere infettato da virus influenzali A umani ed aviari.

E' stato anche dimostrato che i virus influenzali A che si replicano nell'organismo del **suino** sembrano andare incontro ad una selezione che favorisce una maggiore presenza di virioni con emoagglutinina che si lega preferenzialmente ai residui di acido sialico con legame **$\alpha 2,6$** .

Antigenic shift



Tutte le epidemie di influenza umana sono scaturite
dalla ricombinazione di virus aviari ed umani
all'interno del maiale



Antigenic shift

Se.....

A causa di riassortimento genomico



Virus influenzale U sostituisce il gene H e/o N con il gene di Virus influenzale Av



Infezione di una cellula di suino



Virus risultante riassortito



Vantaggio selettivo: Elusione della risposta anticorpale

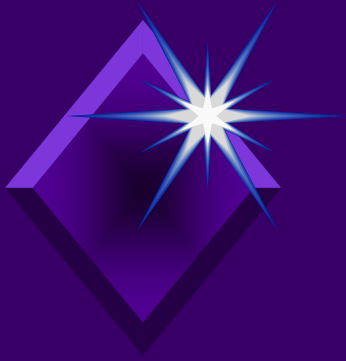


PANDEMIA



Antigenic drift

- ◆ Ad intervalli più brevi, invece, si possono osservare *piccole* modifiche, sia a livello della neuroaminidasi sia a livello dell'emoagglutinina (*antigenic drift* = **deriva antigenica**).
- ◆ Questo è la conseguenza di mutazioni che incidono nella composizione di *uno o pochi* aminoacidi a livello della Neuroaminidasi o della Emoagglutinina.
- ◆ Questo processo avviene in tutti i virus, a differenti livelli, ma è più frequente nei virus a RNA rispetto ai DNA virus.
- ◆ Il nostro sistema immunitario si adatta costantemente mediante il riconoscimento e la risposta a questi “*novel antigenic structures*”



Studi di sieroarcheologia indagini sierologiche retrospettive

Virus	Periodo di circolazione	
H3N2	1874-1889	
H2N2	1889-1901	
H3N8	1901-1918	
H1N1	1918-1957	Passaggio diretto dall'uccello all'uomo
H2N2	1957-1968	Riassortimento tra ceppo aviario e ceppo umano
H3N2	1968 ad oggi	Riassortimento tra ceppo aviario e ceppo umano (altro cambiamento antigenico maggiore)
H1N1	1977 ad oggi	
H5N1	1997	
H1N2	2001-2003 virus, di origine sconosciuta (riassortimento genomico verificatosi nell'uomo tra i virus A H3N2 ed H1N1 attualmente in circolazione):	no fenomeni epidemici no tendenza alla diffusione, contenuto con ogni probabilità dall'immunità preesistente (da infezione e/o da vaccinazione)

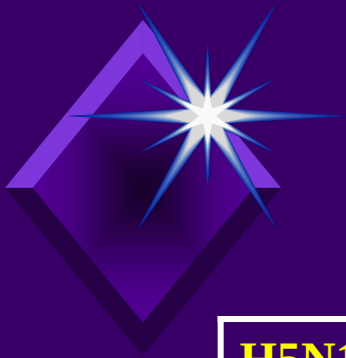


Le pandemie del XX secolo

- ◆ 1918 “Spagnola” H1N1 20-50 milioni di morti
- ◆ 1957 “Asiatica” H2N2 2 milioni di morti
- ◆ 1968 “HongKong” H3N2 1 milione di morti

XXI secolo:

- ◆ “Aviaria” “peste suina” ???



Virus influenzale aviario



H5N1 Virus influenzale aviario	Hong Kong 1997	18 persone infettate, 6 morti
H5N1 Virus influenzale aviario	2003 Sud est asiatico	a) epizootie tra i volatili domestici b) oltre un centinaio di casi umani e con un elevato numero di decessi (più del 50% dei casi)

L'analisi del genoma dei virus aviari H5N1 isolati da casi umani verificatisi di recente nel Sud Est asiatico, avrebbero dimostrato nel **gene pb2**, che codifica una parte essenziale dell'apparato trascrittivo del virus, la presenza di mutazioni che potrebbero conferire al virus un'aumentata efficienza replicativa in cellule umane

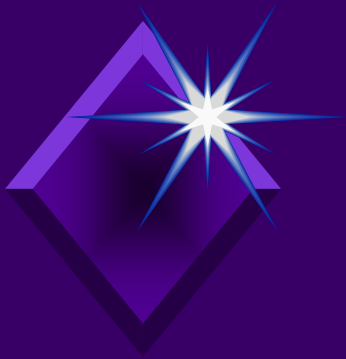


Episodi.....

◆ **H1N1** **1977 ad oggi** **Poche differenze antigeniche**

Nel 1976 un focolaio epidemico da virus influenzale A (H1N1) di probabile origine **suina** si è verificato tra i soldati di Fort Dix nel New Jersey (USA) e gli esperti temettero l'inizio di una nuova pandemia. Il focolaio, però, si è esaurito spontaneamente anche se, nel frattempo, 40 milioni di persone sono state vaccinate (soprattutto negli USA) con lo specifico vaccino allestito a tempo di record

Nel 2009 un focolaio epidemico di virus influenzale A (H1N1), che sta alimentando timori per il rischio di una pandemia globale e che probabilmente è un ibrido di due forme comuni di febbre suina, si è verificato in Messico



Episodi.....

◆ **H5N1** **1997 (Hong Kong)**

Nel **1997** un piccolo focolaio epidemico, caratterizzato da un'elevata mortalità è stato provocato ad Hong Kong da un virus A (H5N1) precedentemente repertato solo negli uccelli. Per contenere la possibile diffusione dell'infezione le autorità sanitarie locali hanno ordinato l'uccisione e la distruzione delle carcasse di tutti (centinaia di migliaia) i polli presenti negli allevamenti della zona, tra i quali l'infezione era risultata particolarmente diffusa.

Il successivo monitoraggio nella popolazione umana non ha più mostrato casi di infezione ad opera di questo sottotipo di virus, fino al **2003** quando il virus influenzale A (H5N1) è stato isolato nuovamente in due soggetti della stessa famiglia ad Hong Kong. Oltre un centinaio di casi umani e con un elevato numero di decessi (più del 50% dei casi)



Episodi.....

◆ **H9N2 1999 (Hong Kong)**

Nel 1999 un virus A (H9N2) precedentemente noto per la sua presenza esclusiva negli uccelli è stato isolato, sempre ad Hong Kong, da due bambini che sono guariti spontaneamente. Pochi altri casi di infezione sostenuta da virus influenzale A (H9N2) sono stati segnalati in Cina. A partire dall'aprile 1999 l'infezione non si è più rappresentata in altri soggetti.



Episodi.....

◆ **H7N7 2003 (Olanda, Belgio e Germania)**

Nel 2003 gravi epizootie da virus influenzale aviario A (H7N7) si sono verificate in allevamenti di polli (e suini) in Olanda, Belgio e Germania. In questa circostanza sono state osservate quasi un centinaio di infezioni umane tra gli addetti agli allevamenti o tra il personale veterinario. Nella maggior parte dei casi si è trattato di **infezioni congiuntivali** risoltesi spontaneamente. **In un certo numero di soggetti, però, si sono avute anche patologie respiratorie che hanno provocato decessi.**

La Clinica



- ◆ Il virus influenzale si contrae per via inalatoria.
- ◆ **Periodo di incubazione:** 1-2 giorni
- ◆ Si moltiplica nell' epitelio dove distrugge le ciglia, poi viremia transitoria e sintomatologia con risoluzione in circa 5-7 giorni a meno di insorgenza di sovra infezioni batteriche (favorite dalla distruzione delle ciglia)
- ◆ Le **manifestazioni cliniche nell'adulto**: Febbre (prime fasi e dura in media 2-4 gg), brividi, cefalea, dolori muscolari generalizzati, segni di infezioni delle prime vie aeree superiori, e spesso prostrazione e fotofobia. Una tosse non produttiva è presente dopo i primi giorni.
- ◆ Le **manifestazioni cliniche nel bambino** sono simili a quello dell'adulto, anche se il paziente pediatrico può avere febbre elevata, con sintomi gastrointestinali, otite, tosse e miosite. Il miglioramento delle forme senza complicazioni inizia dopo 3-4 gg sebbene stanchezza, affaticamento e tosse possono persistere per una settimana ed oltre.

Immunità

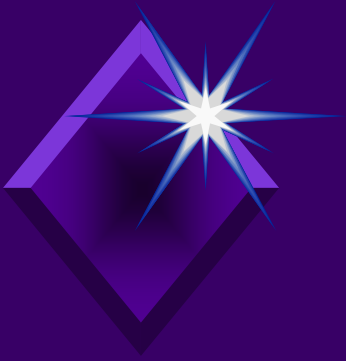
L'immunità è dovuta principalmente alla produzione di IgA, che vengono secrete alla superficie di numerose mucose respiratorie. Le IgA prodotte nei confronti degli antigeni superficiali, ovviamente, hanno valore protettivo.

Ma nonostante ciò, si possono verificare:

Piccole epidemie dovute a virus influenzale A ogni due o tre anni o forme pandemiche ad intervalli maggiori

Episodi epidemici (a carattere sporadico) sostenute da virus influenzali B

L'immunità umorale è altamente tipo-specifica, e generalmente sottotipo-specifica



Dottrina del peccato originale antigenico

Nel caso di esposizioni ripetute a virus influenzali, sia per infezione che vaccinazione,

la risposta anticorpale è diretta prevalentemente verso gli antigeni del ceppo virale che ha causato la prima infezione

Il numero di sottotipi è limitato come sembra confermato dalla comparsa e ricomparsa di virus dall' H1N1 all' H3N2 dal 1889 ad oggi

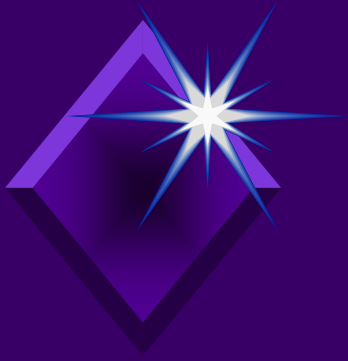
Diagnosi di infezione



Isolamento in embrione di pollo o in colture cellulari
(dimostrazione della presenza virale mediante la ricerca di potere emoagglutinante nel liquido amniotico o di proprietà emoadsorbenti).

L'identificazione si attua mediante prove sierologiche:

- ◆ **Inibizione dell'emoagglutinazione**
- ◆ **FC**
- ◆ **IF**
- ◆ **ELISA**



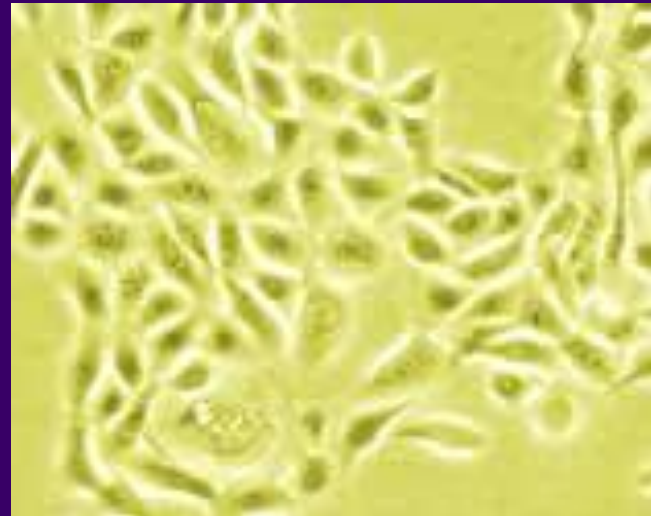
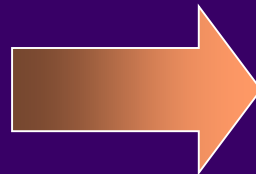
Isolamento e propagazione *in vitro* dei virus influenzali

Coltura in monostrati
di linee cellulari continue

MDCK (rene di cane)

Vero (rene di scimmia)

Visualizzazione dell'effetto citopatico

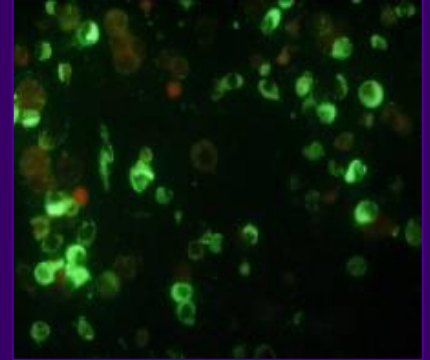




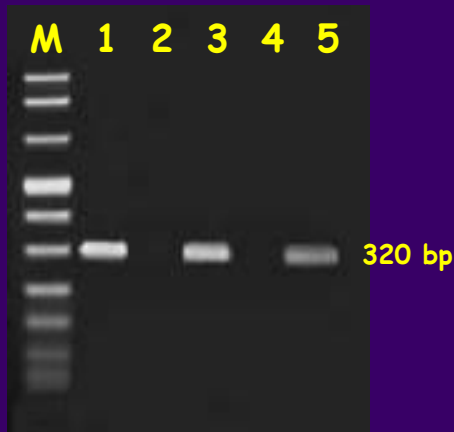
Ricerca diretta sul campione clinico

Ricerca di antigeni virali

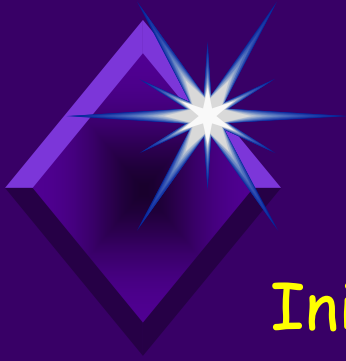
Immunofluorescenza indiretta
con anticorpi specifici marcati
(es. fluoresceina)



Ricerca del genoma virale



Amplificazione di sequenze geniche
virus-specifiche mediante reazione
polimerasica a catena previa
retrotrascrizione (**RT-PCR**)



Terapia

Inibitori della spolazione del virus nella cellula ospite
mediante interferenza con la proteina M2 virale
(canale del calcio)

AMANTADINA e RIMANTADINA

Inibitori della neuroaminidasi impediscono il rilascio
della nuova progenie virale

ZANAMIVIR (RELENZA)

OSELTAMIVIR (TAMIFLU)

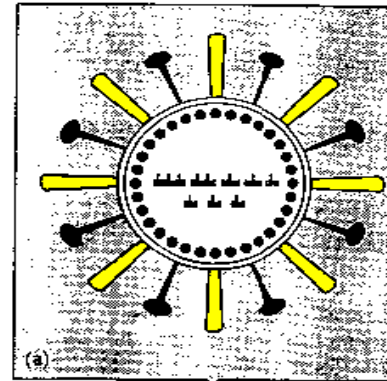
IMPORTANZA DELLA IDENTIFICAZIONE DI CEPPI
RESISTENTI ALLA TERAPIA FARMACOLOGICA SPECIFICA

Vaccini

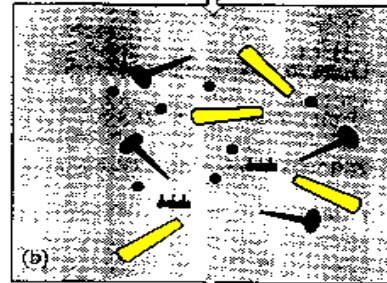
◆ virus coltivati in embrione di pollo e **inattivati** mediante formalina e successivamente purificati. (disuso)

◆ vaccini costituiti dai soli antigeni protettivi (H e N: **vaccino a subunità**) che sono necessari a stimolare la risposta anticorpale. (+ utilizzato)

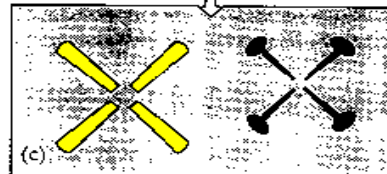
L'OMS ha istituito in 50 paesi del mondo una serie di laboratori con il compito di isolare il virus



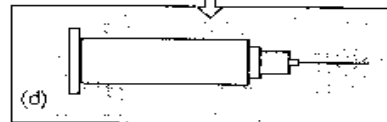
coltivato in uova
purificato e concentrato



disciolto in un detergente



purificato
HA e NA



inoculato