master COPY COPISTERIA

Università di Pisa

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

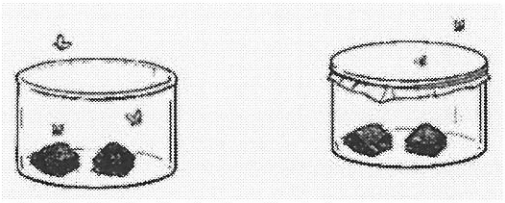
Anno 2020

Esame di <u>Virologia</u> – Prof.ssa Freer

master COPY COPISTERIA
master COPY COPISTERIA
master COPY COPISTERIA

Cenni di microbiologia

"Teoria della generazione spontanea della vita" dalla materia non vivente risale ad **Aristotele** (350 aC) e per piùdi 2000 anni rimase indiscutibile finchè nel 1600 **Francesco Redi** si chiede da dove vengono le mosche (che secondo Aristotele nascevano spontaneamente dalla carne marcia). Si vide però che nel vaso con carne scoperto c'erano le mosche, mentre nel vaso con carne sigillato non c'erano mosche.



Il primo che affrontò in maniera scientifica questa teoria nell'800 fu **Louis Pasteur.** Secondo la generazione spontanea, l'aria causa la fermentazione: egli osservò che mosto+ lieviti = vino "sano" (etanolo); mentre quando il mosto iniziava ad avere un cattivo odore, al microscopio si vedevano delle forme bastoncellari (batteri) che davano luogo al vino marcio o mosto "malato" (acido lattico).

Dimostrò poi che scaldando il mosto (*pastorizzazione*) e aggiungendo i lieviti otteneva sempre e comunque il vino, mettendo fino alla marcescenza del vino.

L'esperimento di Pasteur (con il brodo nella fiasca ?) dimostrava come risultato che le sostanze conservate in assenza di batteri non marciscono mai. (Dimostrazione che la generazione spontanea dei microbi fosse sbagliatissima).

Microbiologia moderna

Louis Pasteur (1822-1895): considerato il **padre della microbiologia**

- Dimostra definitivamente sbagliata la teoria della generazione spontanea
- Identifica gli agenti responsabili della fermentazione (lieviti, non processi solo chimici) e della decomposizione (batteri) dei cibi
- Sviluppa la tecnica della pastorizzazione
- Porta prove a sostegno dell'origine microbica delle malattie infettive (baco da seta, carbonchio)
- Sviluppa i vaccini contro la rabbia e altre malattie.
- *Teoria del germe* le malattie infettive si originano da germi (e non ad es. dall'aria inquinata o miasmi...)

Robert Koch (1843-1910):

- Fornisce prove definitive che la teoria del germe è giusta
- Identifica l'agente eziologico del *carbonchio* (zoonosi che può colpire l'uomo quando è a contatto con le pecore) e della *tubercolosi*. Koch, dal sangue di una pecora malata, riuscì ad isolare il batterio.
- Introduce tecniche di coltura pura

Postulati di Koch: erano 4 criteri che dovevano essere tutti rispettati per dimostrare che un determinato microrganismo (germe) è causa (agente eziologico) della malattia in questione:

1) Il germe deve essere presente nell'organismo nel corso della malattia: se una pecora ha il carbonchio, il germe del carboncho dev'essere presente nel suo corpo
2) Il germe deve essere isolato in forma pura, cioè cresciuto in vitro.
3) I germi isolati devono dare la stessa malattia se reinoculati in animali sensibili
4) Il germe deve essere reisolabile dalla nuova vittima.

Una volta accettata la teoria del germe, ci fu la più rilevante scoperta medica del 19 secolo: la *terapia antibatterica*

- 1910: **Ehrlich** sviluppa l'idea del ***proiettile magico*** secondo cui ciò che colora il batterio ma non il tessuto circostante può curare la malattia causata dal batterio stesso.

Dopo aver provato circa 650 colori diversi in 7 anni scopre il SALVARSAN per trattare la sifilide (fu il 1° trattamento contro la sifilide).

master COPY COPISTERIA

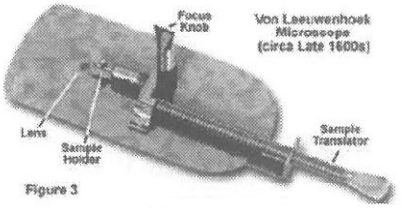
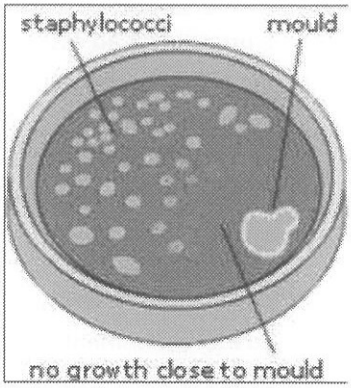


Figure 3

- Intorno al 1650 **Van Leeuwenhoek** (commerciante di stoffa olandese) osserva i batteri per la prima volta attraverso un dispositivo da lui creato, un "microscopio", con cui vide batteri, spermatozoi..
- Nel '600 circa **Robert Hooke** usò il microscopio vero e proprio. [Solo intorno al 1930 il microscopio elettronico permetterà di vedere i virus].

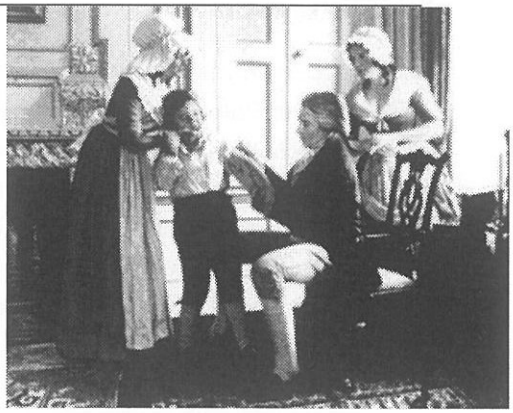


- 1928: **Alexander Fleming** scopre la **PENICILLINA,** il primo farmaco antibatterico specifico. Lui notò che sulla piastra in cui c'era una coltura di stafilcocco era cresciuta una muffa, intorno alla quale si creava un "alone di inibizione" che si opponeva alla crescita dei batteri. Questa muffa rilasciava una sostanza detta pennicillina, che era tra l'altro totalmente priva di attvità tossica!!

- 1932 **Gerhard Domagk** prova sulla figlia il Prontosil (sulfamidico)

- 1945 Viene scoperta la streptomicina, attiva contro M. tuberculosis. Nasce l'**era antibiotica**.

Vaccinazioni –'700



♦ Vaccinazione antivaiolosa: "Se vuoi una bella moglie sposa una mungitrice". **Edward Jenner** osservò che le donne che mungevano le vacche risultavano immuni dal vaiolo. Il 14 maggio 1796, con materiale contenente il virus del vaiolo vaccino (della vacca) ottenuto da una lesione sulla mano di una mungitrice inocula il figlio del suo fattore. Grazie a Dio il bambino sopravvive e non si ammala.
Il 1 luglio 1796 Jenner esegue anche il "challenge", cioè inocula il germe della malattia nel bimbo, per vedere se si sarebbe ammalato.

In questo caso il vaccino è un virus tipico di una specie diversa molto simile al vaiolo umano che infetta l'uomo conferendogli un'immunità crociata.

♦ Vaccinazione antirabbica. Joseph Meister era stato morso da un cane rabbioso. **Louis Pasteur** lo vaccina con midollo spinale infetto dessiccato preso dal cane, che lui credeva contenesse il germe attenuato della rabbia, perché aveva osservata che il cervello di un cane rabbioso essiccato conferiva l'immunità.
Pasteur credeva di aver "attenuato" il germe della rabbia, ma in realtà essiccando il cervello aveva ucciso il virus e ottenuto il primo vaccino con metodo sperimentale.

Altri vaccini importanti: 1798 Vaiolo, 1885 Rabbia, 1897 Peste, 1923 Difterite, 1926 Pertosse, 1927 Tubercolosi (BCG)..., 1927 Tetano, 1935 Febbre Gialla
Dopo la seconda guerra mondiale: 1955 Vaccino antipolio di Salk (IPV), 1962 Vaccino antipolio di Sabin (OPV), 1964 Morbillo, 1967 Parotite (Orecchion, 1970 Rosolia, 1981 Epatite B.
Ultimo vaccino introdotto nel 2006 è quello contro il Papilloma Virus.

master COPY
master COPY COPISTERIA

VIROLOGIA

Storia della virologia

1892: **Ivanowski** scopre il virus del **mosaico del tabacco**. Fu il 1° ad identificare un patogeno filtrabile.

Il primo virus ad essere identificato fu quello della **febbre gialla**. Durante la guerra fra Spagnoli e Americani a Cuba e la conseguente costruzione del canale di Panama migliaia di reclute americane morivano di febbre gialla. Ci furono anche qui più morti per la malattia che per la guerra. Dopo la guerra, durante la costruzione del canale di Panama (che per 77 km costo' circa 27000 morti), la febbre gialla fu un grande problema.
Si credeva che la febbre fosse trasmessa da vestiti sporchi.

L'equipe di **Walter Reed**, nei primi del '900, scoprì invece che veniva trasmessa dalla zanzara. Fece un esperimento su volontari : si dovevano fare pungere da zanzare che avevano precedentemente punto pazienti con febbre gialla. Fu il 1° esperimento con il *consenso informato*. I volontari sapevano che avrebbero potuto morire e uno degli studiosi morì. Come incentivo venivano dati 100 dollari all'inoculo e altri 100 se si ammalavano.
Con esperimenti sui topi, dimostra che la febbre gialla è causata da un virus trasmesso dalla zanzara.

Nel 1935 fu creato un Vaccino ottenuto tramite coltura di ceppo attenuato su embrioni di pollo.

Tappe successive per virus e storia dell'uomo:
- 1952: **Renato Dulbecco:** i virus animali possono dare placche come i batteriofagi (Nobel 1975)
- 1963: Baruch Blumberg scopre il virus dell'epatite B (nobel 1976)
- 1979: viene dichiarato eradicato il vaiolo
- 1983: viene per la 1° volta studiato il virus dell'AIDS.
- 2013-14 in Italia: creati i primi farmaci eradicanti infezione virale.
- Un nuovo ceppo di influenza (la **spagnola**) ha ucciso 20 milioni di persone nel 1918-1919.
- Dagli anni '80, un virus letale al 100%, **HIV**, si è diffuso in tutto il mondo.
- Anche i virus **ebola** e **SARS** sono saltati dal pipistrello all'uomo, facendo numerose vittime.

Origine dei VIRUS

I virus una volta erano ritenuti "brutte notizie in un involucro proteico". I virus sono parassiti intracellulari obbligati submicroscopici (= più piccolo del microscopio ottico). Perché? NB: Perché necessitano di alcuni enzimi per replicare il genoma e necessitano dell'apparato della sintesi delle proteine cellulari dell'ospite.

Oggi si parla anche di virus non per forza cattivi, cioè di *viroma*, virus che convivono con noi senza recare danno, e virus che "fanno bene" perchè hanno *azione probiotica*.

Ci sono 3 possibili origini dei virus:
1. C'è una ***teoria regressiva***, secondo cui i virus sono forme di vita procariotiche che hanno perso molte funzioni mantenendo solo i geni necessari al parassitismo.
2. Un'altra teoria (***escape theory***) ipotizza che i virus sono agglomerati di macromolecule (mRNA) cellular sfuggiti alla cellula.
3. La terza teoria (***teoria dell'entità indipendenti***) è che i virus si sono evoluti parallelamente alle cellula come molecule autoreplicanti

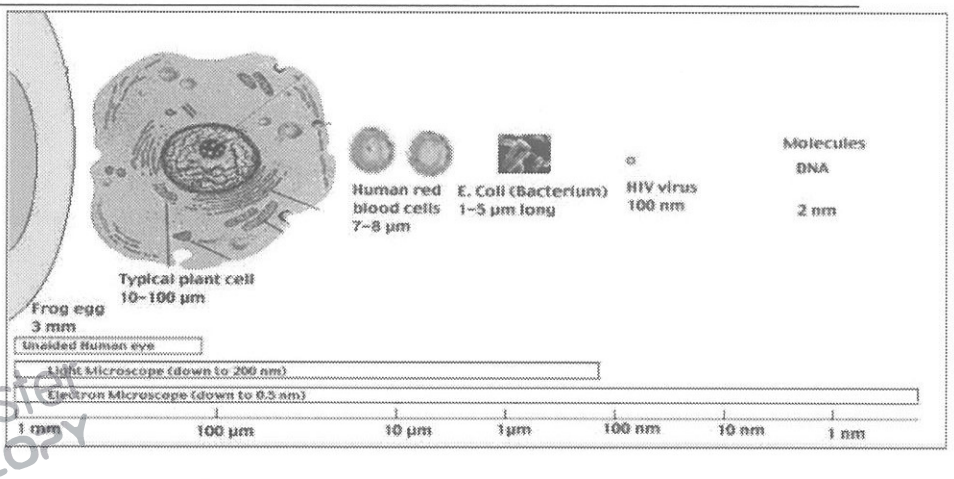


I virus sono sempre stati a contatto con l'uomo. Es. è stata trovata una stele del 1500 AC in cui è inciso un omino che sembra abbiamo la poliomielite.
Tanti altri virus invece sono di origine più recente (es. HIV).

Osservazione dei microbi

LIMITE DI RISOLUZIONE: è la distanza più piccola fra 2 oggetti che consente di vederli come separati.

- Per l'occhio umano il limite è 0,2 mm
- Per il **microscopio ottico** (usato per vedere i batteri): 0,2 mm max
- Per il **microscopio elettronico** (usato per vedere i virus): 0,5 nm circa



EUCARIOTI PROTOZOI FUNGHI	PROCARIOTI BATTERI	VIRUS
- DNA - Più cromosomi - Nel nucleo - Organuli	DNA un cromosoma come nucleoide niente organuli	DNA o RNA uno o due nel capside niente citoplasma (inerti fuori della cellula)
	Parete batterica	nudi o rivestiti
Movimento grazie a **citoscheletro**	Movimento per **flagelli**	immobili
dimensioni 10 a 30 µm	1 a 5 µm in lunghezza	30-150 nm

CLASSIFICAZIONEDEI PATOGENI:

- Eucarioti
- Procarioti
- Virus

Grande differenza tra eucarioti e procarioti è che gli eucarioti hanno un nucleo ben circoscritto e sono ricchi di organuli.
Gli unici organuli che hanno i procarioti sono i ribosomi.
I virus non hanno una struttura cellulare, non sono cellule, ma un ammasso di proteine/acidi nucleici, a volte rivestiti da una membrana che il virus ha sottratto all'ospite, chiamato involucro. Sono considerati vivi soltanto all'interno delle cellule. Quindi all'esterno delle cellule sono immobili. Al contrario gli eucarioti sono mobili grazie al citoscheletro mentre i procarioti grazie ai flagelli.

Struttura dei virus

I virus hanno forme molto varie, ma in generale sono entità rigide con forme geometriche rigidissime e sono tutti molto più piccoli di un semplice batterio come l'E.coli.

La morfologia virale si studia sia con la **Microscopia elettronica** (dagli anni '50), sia con **l'Immunoelettromicroscopia**. Essa si basa sulla colocalizzazione vista al ME di anticorpi marcati con oro e virus, quindi associa la microscopia elettronica alle colorazioni ad uso commerciale.
Ci sono altri modi più nuovi come la **Cristallografia a raggi X**, che si usa qualora si riesca a cristallizzare i virus.
Un'altra tecnica attuale è la **Risonanza magnetica nucleare** che si usa sui virus purificati in soluzione e serve per studiare singole proteine virali. Es. Influenza M2.

