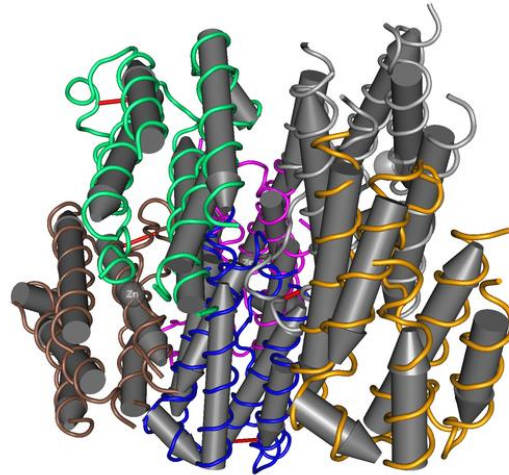
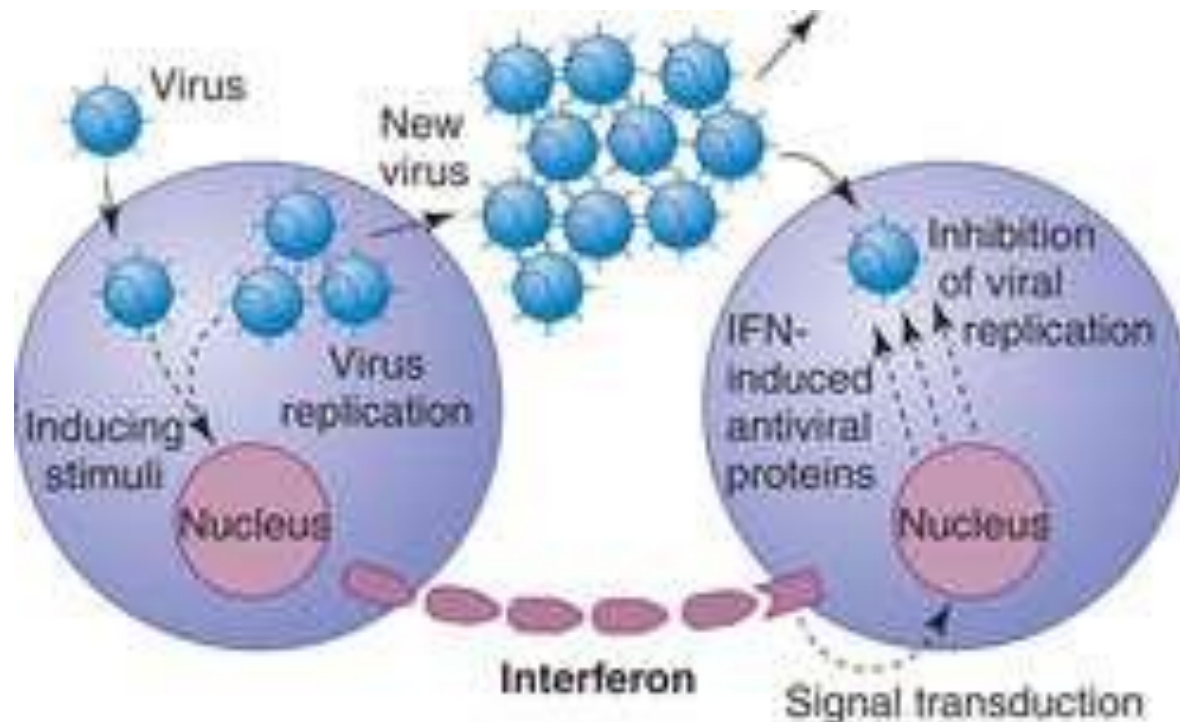




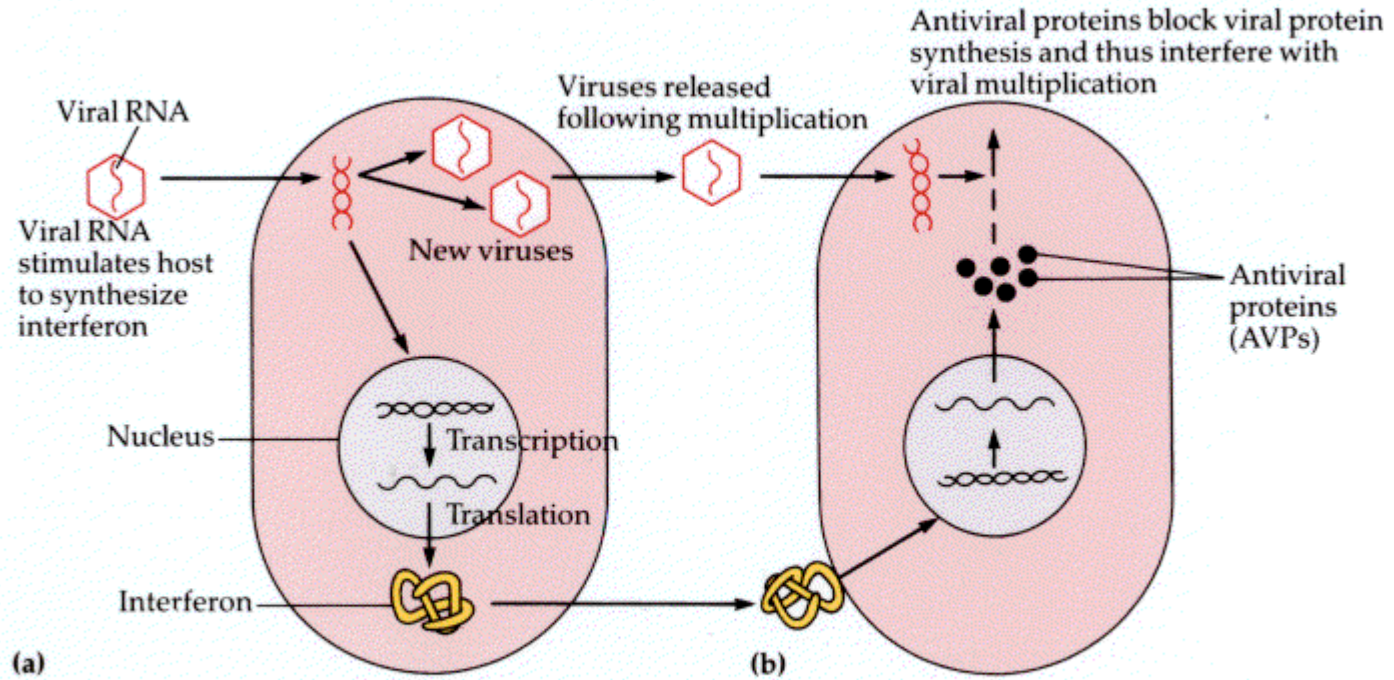
Sistema interferon

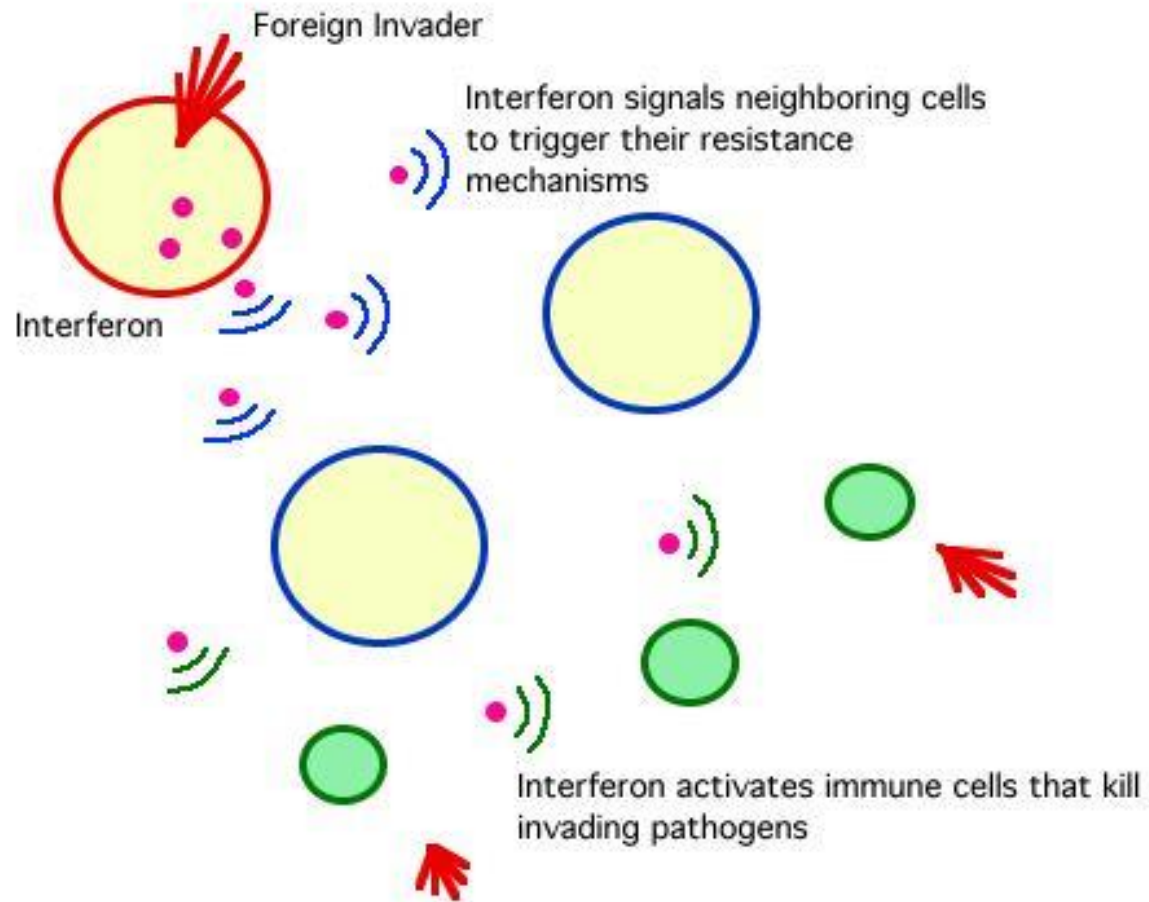


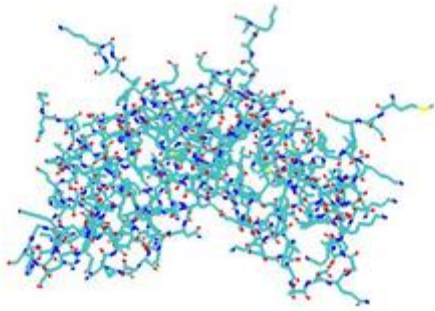
Il termine "interferone" si riferisce alla capacità di interferire con l'infezione da parte del virus, bloccandone la diffusione.



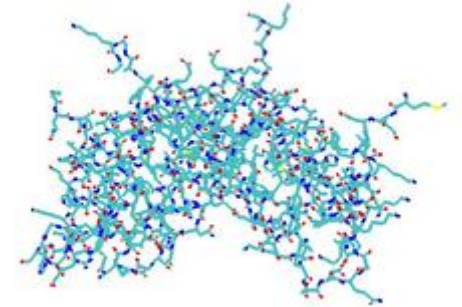
Antiviral action of interferon (Figure 16.15)

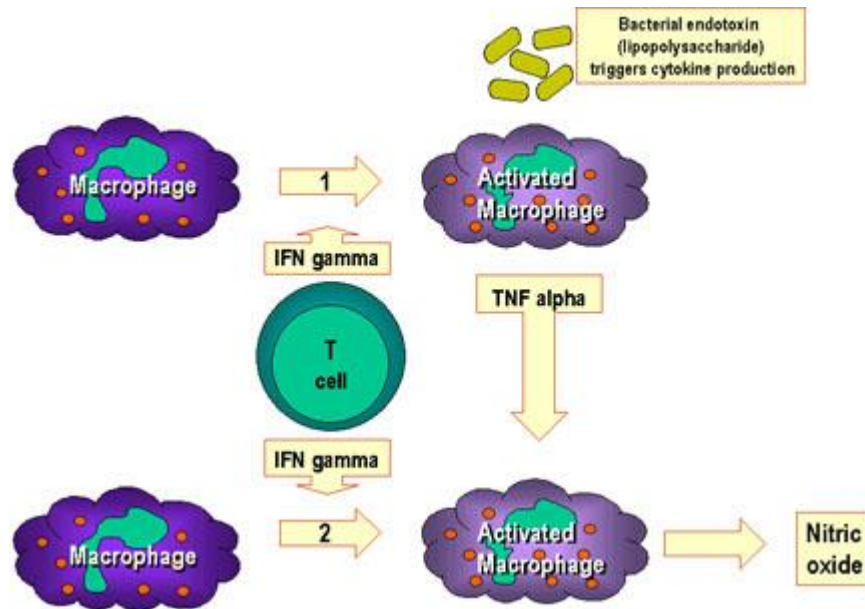




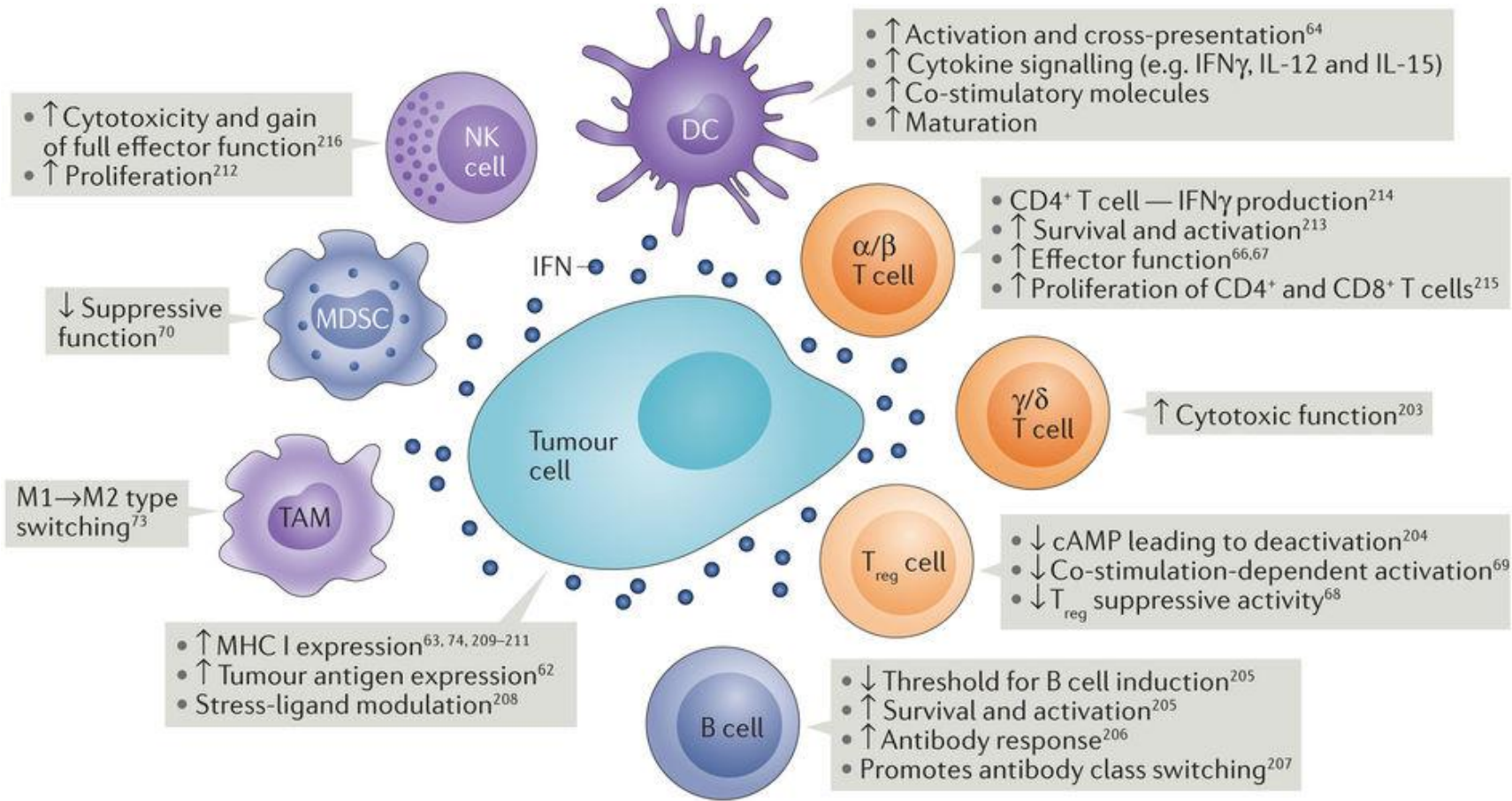


L'interferon fa parte delle cosiddette difese naturali dell'organismo nei confronti di invasioni di agenti esterni quali virus, microbi o anche cellule tumorali.

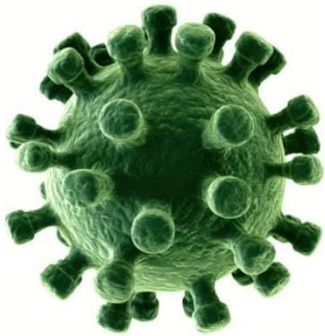




In the picture above, **macrophages** are a first line against infections. They see a germ, engulf it, then present pieces of the germ on its cell wall. **The macrophage** then uses cytokines such as IFN gamma, IL-1, and TNF to call in the other forces of the immune system to fight the germs.



Il concetto di **interferon** è strettamente correlato con quello di **interferenza virale**, un concetto che si esplica attraverso l'attività di alcune cellule di essere resistenti, una volta infettate da un virus, a successive infezioni dello stesso virus o di virus simili.



Cellule infettate da virus non possono essere ulteriormente infettate da ceppi omologhi (1935), né da ceppi virali antigenicamente diversi (1937)

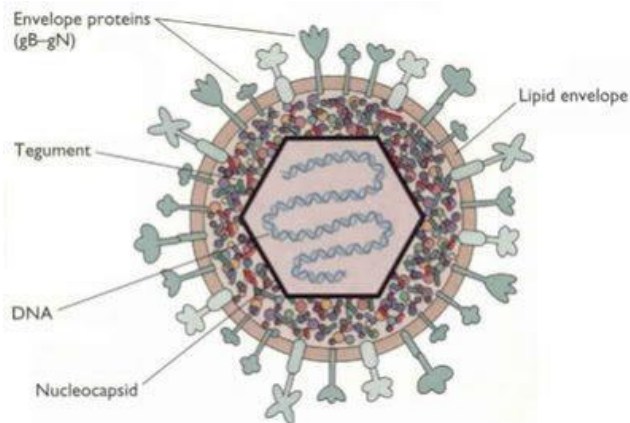
Il fattore che determina resistenza alla superinfezione (**INTERFERENZA**) è un fattore proteico solubile rilasciato nel mezzo di coltura (**INTERFERONE**) (1957)



Le prime osservazioni in tal senso furono fatte già a metà degli anni Trenta.

In particolare le osservazioni di Hoskins sul coniglio dimostrarono che questo animale, infettato dal virus dell'herpes simplex, era protetto dalle successive infezioni con lo stesso virus.

Pochi anni dopo, Findlay e Mac Callum dimostrarono questo stesso fenomeno, però con uno spettro d'azione più ampio, nel senso che questi animali erano resistenti anche alle infezioni con virus che non erano antigenicamente uguali.



Queste erano però osservazioni che non avevano alcun riscontro biologico; non era stata dimostrata ancora nessuna molecola in grado di mediare questa attività.

Solo nel '57, Isaacs e Lindenmann osservarono che surnatanti di cellule che erano di colture cellulari infettate da un virus producevano una proteina che poteva rendere altre cellule resistenti ad altri virus.



In particolare, essi utilizzarono frammenti di membrana corioallantoidea di embrioni di pollo, la infettarono con del virus dell'influenza termo-inattivato e videro come queste cellule riuscivano a produrre una proteina in grado di proteggere altri frammenti dello stesso tipo dalla successiva infezione col virus, questa volta non più inattivato ma vivo.

Quindi fu la prima osservazione che esisteva veramente un qualcosa che mediava questa protezione dall'infezione virale.

Così si può dire che il nome di interferon deriva proprio da questa osservazione, da questa capacità di avere una interferenza virale sulle cellule.

In particolare, oggi le conoscenze che si hanno sul sistema interferon sono naturalmente progredite notevolmente. In particolare, sappiamo che **l'interferon riesce a proteggere e costituisce una naturale barriera contro infezioni esterne da virus, batteri, mitogeni e cellule tumorali**

IFN - prima risposta dell'organismo ad una infezione virale

(entro 12-24 ore dall'acme della replicazione virale, segue una drastica riduzione della produzione di virus nei tessuti infetti, quando non sono ancora presenti gli anticorpi specifici)

interferone

(o interferon, abbreviato in **IFN**), glicoproteina solubile di origine naturale, appartenente alla famiglia delle citochine.

Viene prodotta da vari tipi di cellule nel corso di infezioni virali, come risposta fisiologica dell'organismo.

L'azione protettiva dell'interferone (ottenuta attraverso il **blocco dell'RNA-messaggero virale**) si estende anche alle cellule non infettate e la sua produzione è risultata essere **specie-specifica**, non virus-specifica (ciò significa che, una volta indotto, l'interferone è in grado di svolgere il suo effetto protettivo nei confronti di vari tipi di virus).

L'interferone viene prodotto dal nostro organismo anche in condizioni di normalità.

A svolgere questo importante ruolo sono le cellule dendritiche della milza, già note per essere coinvolte nel sistema immunitario

L'importante scoperta è stata fatta dall'**European Molecular Biology Laboratory (EMBL)** di Montorotondo nel Lazio ed è stata pubblicata sul **Journal of Experimental Medicine**.

Sino ad oggi era noto che l'interferone veniva prodotto dalle cellule infettate da virus, svolgendo un ruolo difensivo.

Al contrario i ricercatori italiani hanno scoperto che una notevole quantità di questa proteina è presente nei topi di laboratorio. E dopo numerose ricerche hanno accertato che a produrlo sono le cellule dendritiche della milza

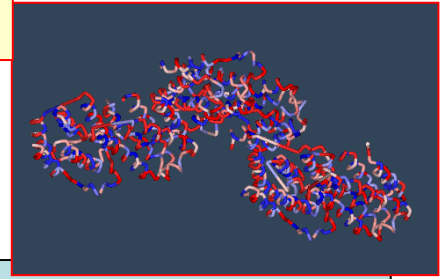
In particolare, esso agirebbe non direttamente sui **virus** ma su un **gene** delle cellule, localizzato sul *cromosoma 21*, in grado di sintetizzare proteine antivirali che inibiscono la replicazione del virus all'interno della cellula.

In relazione alle particolari condizioni in cui si trovano ad agire, queste molecole si trovano ad amplificare o sopprimere la risposta immunologica: possono regolare la produzione di **anticorpi**, la funzione di **linfociti T**, possono indurre modificazioni della superficie delle cellule ecc.

Gli interferoni sono stati sperimentati clinicamente alla fine degli anni 70 e hanno trovato la loro naturale applicazione nelle malattie virali e neoplastiche.

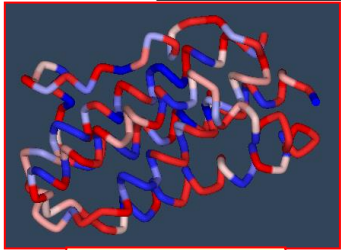
Tre sono gli interferoni attualmente utilizzati e sperimentati clinicamente: **l'alfa interferone**, **il beta interferone** ed in misura notevolmente inferiore il **gamma interferone**

IFN-alfa



Esistono in natura tipi diversi di interferone:

- (1) IFN-*alfa*, prodotto dai leucociti e dai linfoblasti;
- (2) IFN-*beta*, prodotto dai fibroblasti;
- (3) IFN-*gamma*, prodotto dai linfociti T (anche noto come IFN immune)



IFN-*beta*

- Ci sono 20 sottotipi di IFN-*alfa*, ma solo 1 sottotipo di IFN-*beta* e di IFN-*gamma*

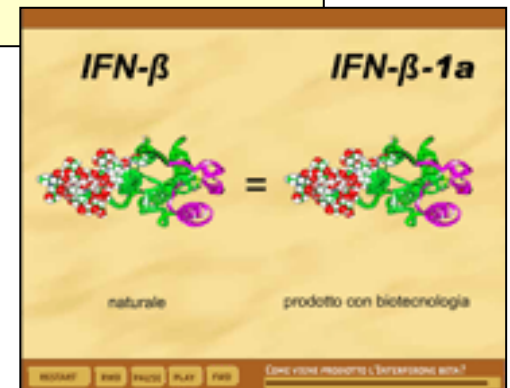
La tecnologia del DNA-ricombinante ha permesso la sintesi, in laboratorio, di numerose varietà altamente purificate di interferone alfa/beta/gamma, che sono utilizzate a scopo terapeutico.

Gli interferoni fanno parte del gruppo di proteine chiamate **citochine** prodotte da cellule correlate alla difesa dell'organismo, leucociti fibroblasti e linfociti in condizioni di offesa prevalentemente virale.

In tali situazioni le cellule rilasciano minute quantità di queste sostanze che attraverso mediatori nucleari modulano la risposta immunitaria:

inducendola, potenziandola e reprimendola.

Gli IFN-alfa e beta hanno un recettore cellulare comune e sono classificati come **IFN di tipo I**; i loro effetti sono prevalentemente immunoregolatori e antiproliferativi e, per questo, sono stati utilizzati come antivirali e come antitumorali (più precisamente, amplificano la citotossicità linfocitaria e l'attività dei linfociti natural killer).



Identificati:

14 sottotipi di IFN alfa

- 1 IFN beta
- 1 IFN delta
- 1 IFN epsilon
- 1 IFN kappa
- 1 IFN omega
- 1 IFN tau
- 1 IFN zeta

Prodotti da cellule umane,
murine, di bovino, ovino,
coniglio, gatto

L'**interferone gamma** è stato classificato come **IFN di tipo II**: esso ha proprietà immunomodulanti differenti, ed è tuttora in discussione la sua efficacia come antiproliferativo.

Prodotto dai linfociti T e dalle cellule NK

Gli IFN di tipo III - di recente identificazione:

IFN lambda 1 (IL29)

IFN lambda 2 (IL28A)

IFN lambda 3 (IL28B)

IFN lambda 4

Sono simili a
quelli di tipo I

È grazie agli interferoni di tipo III che il nostro sistema immunitario riesce a limitare i processi infiammatori che avvengono a livello dell'intestino e i danni tissutali che ne conseguono. Questo il risultato della ricerca coordinata da Ivan Zanoni e Francesca Granucci, presso il Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze dell'Università di Milano-Bicocca, in collaborazione con Achille Broggi, ricercatore dell'Harvard Medical School presso il Boston Children's Hospital,

Le malattie infiammatorie dell'intestino, come la colite ulcerosa o la malattia di Crohn, che in inglese prendono nome di Inflammatory Bowel Diseases (IBD), sono patologie che si sviluppano **quando il sistema immunitario si attiva in modo inappropriato nei confronti del microbiota** causando infiammazione e danno ai tessuti.

Per la prima volta, lo studio ha dimostrato che gli interferoni di classe III modificano direttamente l'attività dei **neutrofili**, importanti fagociti del sistema immunitario che, tra le numerose funzioni, svolgono un ruolo chiave durante lo sviluppo delle malattie infiammatorie dell'intestino.

Si è infatti notato che mentre l'assenza o il blocco degli interferoni di tipo III comporta un aumento del processo infiammatorio dell'intestino e del danno tissutale, la loro presenza riduce la produzione di radicali liberi da parte dei neutrofili stessi, riducendo di conseguenza i danni a livello dei tessuti.

Si pensa ad un possibile utilizzo degli interferoni di tipo III come potenziali agenti terapeutici per curare le malattie infiammatorie dell'intestino

INTERFERONI (IFN) α e β

Induzione rapida, transiente e poco specifica

INDOTTI da :

- dsRNA - endotossine - proteine virali - inibitori trascrizione e traduzione

- Non richiedono replicazione virale
- Agiscono solo su cellule che esprimono recettori specifici
- Non possiedono attività antivirale diretta
- La loro azione antivirale non è specifica per il virus inducente •

- Sono dotati di specie/specificità
 - Inducono uno STATO ANTIVIRALE preventivo in grado di inibire la replicazione di virus che potrebbero penetrare nella cellula

ATTIVAZIONE RAPIDA di IFN di tipo I

- Un solo minuto di contatto fra IFN di tipo I e recettore è sufficiente per indurre l'attivazione, che si completa in 30 minuti con la produzione di mRNA per le proteine effettrici
- Il massimo di protezione viene raggiunto dopo 3-5 ore
- **L'attivazione da IFN II richiede tempi più lunghi**

le indicazioni terapeutiche approvate ufficialmente per l'uso dell'interferone fanno riferimento soprattutto all'**IFN-alfa** per via sistemica nelle patologie immunoematologiche e/o neoplastiche (leucemia a cellule capellute, sarcoma di Kaposi, AIDS, leucemia mieloide cronica, linfoma di Hodgkin, linfomi non-Hodgkin a bassa malignità, mieloma multiplo, micosi fungoide, melanoma maligno) e nelle infezioni virali (epatite virale cronica B e C, infezioni da Herpes simplex genitale, condiloma acuminato, infezioni da virus di Epstein-Barr)

l'uso dell'**IFN-alfa** è stato tuttavia esteso anche ad altre patologie, pur con risultati non sempre uniformi (policitemia vera, trombocitosi, nefrocarcinoma, sclerosi multipla, malattie infettive parassitarie).

Sebbene gli interferoni siano stati identificati negli anni 50 come mediatori e regolatori della risposta immunitaria, solo l'utilizzo delle tecniche di ingegneria genetica ne hanno permesso la produzione per l'uso terapeutico.

L'**IFN-beta** (disponibile anche in gocce oculari), esso trova indicazione specifica nel trattamento topico, o iniettivo intralesionale, dei condilomi acuminati.

L'**IFN-gamma** è invece indicato nel trattamento della malattia granulomatosa cronica. I risultati degli studi hanno, inoltre, confermato l'efficacia della somministrazione di interferone per via intranasale nella profilassi delle infezioni sostenute da Rhinovirus.

I principali effetti collaterali riportati in corso di terapia con interferone comprendono:

sindromi similinfluenzali con febbre persistente, nausea, vomito, cefalea; sono stati segnalati anche: diarrea, alopecia, confusione mentale, delirio, allucinazioni, reazioni autoimmuni (tiroiditi, porpore, arteriti), sovrinfezioni batteriche, dolore in sede di inoculazione, aumento aspecifico del TSH, cardiotossicità, leucopenia e trombocitopenia reversibili.

Le **Citochine** sono una classe eterogenea di proteine secretorie prodotte da vari tipi di cellule, ed hanno la funzione di condizionare il comportamento di altre cellule-specifiche verso cui sono indirizzate.

Si comportano quindi da "mediatori" tra le diverse cellule, ed agiscono da segnali inter-cellulari. Sotto il nome collettivo di **citochine raggruppiamo molecole che si pensava fossero prodotte esclusivamente da linfociti (Linfochine) o da monociti (Monochine).**

Presentano collettivamente le seguenti caratteristiche generali:
Sono molecole prodotte essenzialmente durante la fase di attivazione e durante la fase effettrice sia dell'immunità naturale che di quella specifica.

La loro secrezione è in genere un fenomeno di breve durata ed autolimitato. In generale, infatti, le citochine sono sempre prodotte ex-novo dalla trascrizione dei loro geni, e non vengono mai accumulate nella cellula come molecole preformate.

Numerose citochine sono prodotte da tipi cellulari diversi, ed agiscono su tipi cellulari diversi (pleiotropismo). Inizialmente si pensava che alcune di esse potessero agire soltanto sui leucociti, da cui il nome **INTERLEUCINE** (cioè molecole prodotte da leucociti per leucociti), ma si è visto che ciò non è vero.

Possono avere effetti diversi sulla stessa cellula bersaglio, ovvero una citochina può antagonizzare l'effetto dell'altra, dirette entrambe sulla stessa cellula.

La loro attività è spesso ridondante,
ovvero citochine diverse possono avere la stessa azione biologica.

Le citochine influenzano spesso la sintesi di altre citochine e/o la loro attività.
Le Citochine possono operare in modo **SINERGICO e COOPERATIVO**
potenziandosi a vicenda.

Come accade per tutti gli ormoni polipeptidici, anche le citochine per svolgere il
loro ruolo, hanno bisogno di legarsi
a recettori specifici presenti sulle cellule bersaglio.

L'inibizione della crescita virale e/o della proliferazione cellulare da parte degli interferoni è associata a vari cambiamenti fisiologici, alcuni dei quali dipendono dall'attività di proteine specifiche che sono interferoninducibili

MEDIATORI E REGOLATORI DELL'IMMUNITA' INNATA

Ovvero quelle che sono anche considerate "**Citochine Infiammatorie**", prodotte principalmente da Fagociti Mononucleati per potenziare o inibire le reazioni infiammatorie. Esse sono:

TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, chemochine, **IFN- α** , **IFN- β**

MEDIATORI E REGOLATORI DELL'IMMUNITA' SPECIFICA

Ovvero le "**Citochine Immunitarie**", prodotte soprattutto da linfociti T in risposta ad un riconoscimento antigenico specifico, per stimolare e sfruttare al massimo le risposte infiammatorie. Esse sono:

IL-2, IL-4, TGF- β , **IFN- γ** , IL-5



Diagnosi in vita della tubercolosi bovina mediante g-interferon test

I metodi tuttora a disposizione per effettuare diagnosi di tubercolosi bovina sono suddivisibili in due grossi gruppi: **quelli utilizzati in vita** e quelli che costituiscono le cosiddette prove di **conferma post-mortem**.

Tra queste ultime assume particolare rilievo la "diagnosi microbiologica", ovvero l'isolamento e l'identificazione dell'agente eziologico nel cui ambito oggi si stanno perfezionando nuovi sistemi che consentono di abbattere i tempi lunghi e le difficoltà che tipicamente caratterizzano questo tipo di indagine come le varie tecniche di biologia molecolare (PCR, bioprobes per ibridazione DNA/RNA, ecc.).

La diagnosi formulata in vita, oltreché sull'esame clinico, si basa principalmente sul rilievo della immunità cellulomediata, in quanto la risposta immunitaria predominante nell'infezione tubercolare è di tipo cellulare, piuttosto che umorale.

I metodi sierologici, in considerazione dinamica della risposta anticorpale nel corso di infezione tubercolare, non forniscono risultati soddisfacenti e, alla luce degli ultimi studi condotti, neppure le tecniche EIA possono essere sostitutive dei saggi di immunità cellulo-mediata.

L'intradermoreazione con tuberculina PPD secondo le norme vigenti delle profilassi di Stato costituisce attualmente la prova ufficiale per la diagnosi in vita di tubercolosi nei bovini.

Essa presenta tuttavia alcuni limiti legati sia alla soggettività nell'interpretazione del risultato, sia a false reazioni generate da fenomeni di iporeattività e paraeteroallergie, che possono talvolta inficiarne l'esito.

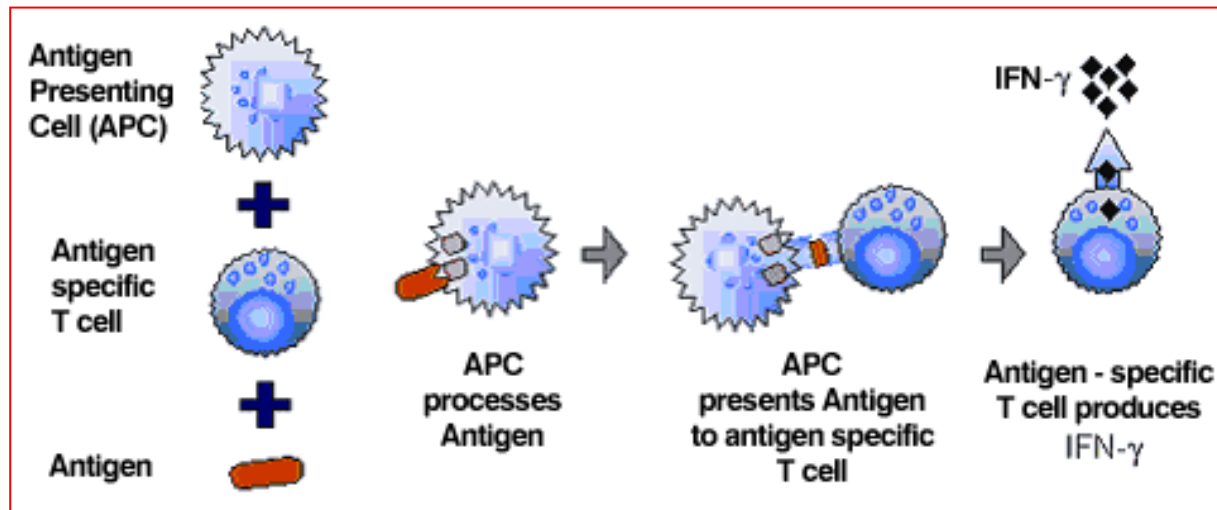
Diagnosi in vita



La prova ufficiale è il test di intradermoreazione alla tubercolina PPD bovina (Protein Purified Derivative). E' un test cutaneo di allergia che sfrutta la **reazione allergica ritardata** dell'animale provocata dall'iniezione intradermica della tubercolina. Nel caso in cui l'animale sia infetto, nel punto d'inoculo la tubercolina provoca ispessimento cutaneo, dolore, rigonfiamento e arrossamento. La lettura avviene tre giorni dopo l'inoculazione. Operativamente l'intradermoreazione tubercolinica deve essere eseguita nella regione del collo fra il terzo anteriore e il terzo mediano.

Come prova supplementare è possibile utilizzare il test al gamma interferon su campioni di sangue eparinizzato.

Il g-IFN test è un metodo relativamente recente elaborato nel tentativo di superare questi problemi che si colloca tra i metodi di diagnosi in vita. Infatti esso si **basa sullo stesso principio dell'intradermoreazione, ma viene eseguito *in vitro*.**



Interferon-Gamma Releasing Assay (IGRA)

I test denominati con l'acronimo di IGRA (*Interferon-Gamma Releasing Assay*) si basano **sul principio che i linfociti T di individui sensibilizzati con determinati antigeni producono interferone- γ (IFN- γ)** qualora vengano nuovamente in contatto con questi. La produzione di IFN- γ da parte di linfociti cimentati con antigeni del bacillo tubercolare è quindi considerata indicativa di infezione tubercolare.

Gli antigeni peptidici utilizzati sono ESAT-6 (*early secretory antigen target 6*) e CFP-10 (*culture filtrate protein 10*) codificati da geni localizzati all'interno della "[Region of Difference 1](#)" (RD-1) del genoma del *Mycobacterium tuberculosis*.

Questi antigeni sono più specifici rispetto al [PPD](#), in quanto la RD-1 è presente in tutte le specie del *Mycobacterium tuberculosis* complex ad eccezione del ceppo vaccinale (BCG), mentre manca nella maggior parte dei micobatteri non tubercolari (con l'eccezione di [Mycobacterium kansasii](#), [Mycobacterium marinum](#), *Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium gastri* e [Mycobacterium szulgai](#)).

Tali antigeni inducono una forte risposta immunitaria da parte dei linfociti T in modelli sperimentali. La maggior parte dei test oggi in uso, home made o commerciali, si avvale di antigeni codificati da geni facenti parte della RD-1.

Diagnosi post-mortem

al macello viene eseguita un'accurata ispezione della carcassa, dei linfonodi e degli organi per evidenziare eventuali lesioni tubercolari.

in laboratorio tra le prove previste dal Decreto Ministeriale n.592 del 1995 ricordiamo **l'esame anatomo-isto-patologico, la ricerca di batteri acido-resistenti mediante strisci o sezioni sottoposti a colorazione Ziehl-Nielsen,** l'evidenziazione di antigeni micobatterici in sezioni di tessuto, l'isolamento di *Mycobacterium bovis* da materiale patologico, resta il metodo di riferimento "**gold standard**" per la conferma d'infezione.

L'esame colturale viene eseguito secondo le metodiche tradizionali (D.M. 592/95) su terreni selettivi monitorando settimanalmente la crescita batterica per un periodo di almeno **due mesi.**



Lowenstein Jensen Medium -

Selective. Always in screw capped bottle. Bluish Green.
Contains - Egg protein - Solidifying agent
Mineral salts - Mg Sulphate, Mg citrate
Asparagine
Malachite Green - Selective agent
Sterilized by - Inspissation

Nuove tecniche diagnostiche molecolari basate sulla reazione PCR o altre tecniche di amplificazione, rapide e poco indaginose.

Braz J Microbiol. **2014**; 45(3): 841-843.

Multiplex-PCR for differentiation of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis* complex

F.L.E. Sposito, P.A.Z. Campanerut, L.D. Ghiraldi, C.Q.F. Leite, M.H. Hirata, R.D.C. Hirata, V.L.D. Siqueira, and R. Fressatti Cardoso

