

B - Virus

B1 Batteriofagi

La virologia si è sostanzialmente consolidata come disciplina autonoma con il primo evidenziamento dei **virus batterici (batteriofagi)** fatto da **F.W. Twort** nel lontano **1915**. Lo studio dei batteriofagi infatti ha permesso di acquisire informazioni basilari sui rapporti che intercorrono fra virus e cellula parassitata. I fagi sono stati inoltre utilizzati dai genetisti per studiare il genoma virale e sono tuttora utilizzati in batteriologia applicata per l'identificazione di ceppi microbici (**tipizzazione fagica**); vengono inoltre impiegati come **vettori di clonazione** in campo biotecnologico.

Si definiscono batteriofagi, o più comunemente **fagi**, virus parassiti dei batteri, dai quali vengono replicati e di cui generalmente inducono la lisi (disgregazione cellulare). L'esistenza dei numerosissimi fagi fu rivelata dal ricercatore Twort, che osservò una singolare trasformazione in vitro di colonie di micrococchi: si formavano aloni o placche e la "malattia" poteva essere trasmessa mediante il semplice contatto da colonia a colonia. Quasi nello stesso periodo, nel **1917**, all'**Istituto Pasteur** di Parigi il ricercatore **D'Herelle** scoprì, nei convalescenti di dissenteria, un agente infettivo dello stesso tipo capace di distruggere specificamente le colture del batterio *Shigella dysenteriae*, agente causale della malattia. Il microrganismo responsabile di queste *lisi trasmissibili* fu denominato **batteriofago** (o **fago**).

Fin dalla loro iniziale individuazione lo studio della struttura e del ciclo riproduttivo dei batteriofagi (per esempio del T2) è risultato basilare per la Microbiologia e la Virologia in particolare. Infatti ha permesso di chiarire nei virus il **ciclo litico** e la **fase di eclissi**, e nei batteri il fenomeno della **trasduzione** (modalità di trasferimento di geni mediante fagi) che è alla base dell'insorgenza di molte **resistenze batteriche ai chemioantibiotici**. Occorre poi ricordare che anche la Genetica e la Biologia molecolare si sono avvantaggiate delle conoscenze sui fagi mediante lo studio della struttura del loro genoma semplice, che ha portato all'allestimento delle mappe genetiche del fago (per esempio del T4) (**fig. B1.1**).

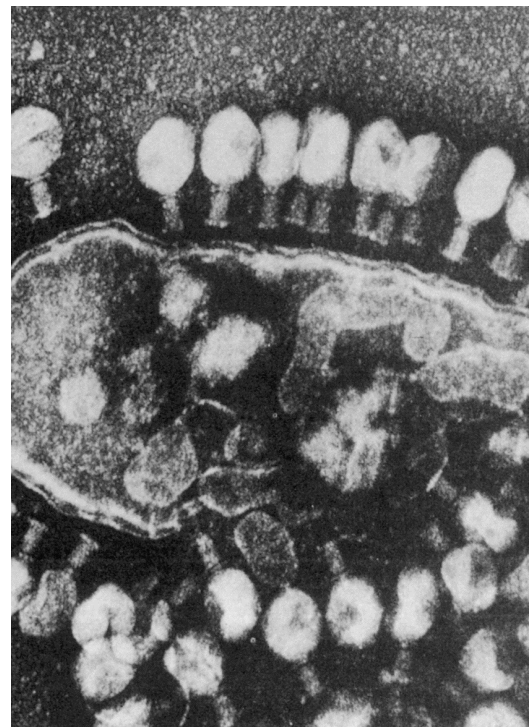


Figura B1.1 Batteriofago T4 adsorbito a *Escherichia coli*.

Struttura dei fagi

I batteriofagi si presentano come piccoli virus di circa 23-32 nm di diametro, con 6 diversi tipi morfologici fondamentali, la cui organizzazione più complessa presenta un **contenitore proteico isometrico** (testa), che racchiude l'**acido nucleico** (DNA o RNA), collegato con un'**appendice tubulare** (o coda) e **appendici caudali** con apparato contrattile in grado di iniettare il DNA o l'RNA fagico nel citoplasma del batterio.

L'acido nucleico è prevalentemente formato da **DNA a doppio filamento** o, meno frequentemente, a **singolo filamento**; meno frequenti sono anche i fagi provvisti di RNA a singolo o a doppio filamento (**figg. B1.2 e 3**).

I fagi vengono denominati con sigle costituite da lettere e/o numeri: nel caso dei fagi con il genoma a DNA vengono impiegate T (da T1 a T7), P, PM, MV, F(3), fd o le lettere greche lambda (λ) e fi (ϕ), mentre in quelli con genoma a RNA le principali sigle sono MS-1, MS-2, M12, F-2, R-17, Q.

Classificazione dei fagi

È sostanzialmente attraverso il tipo di morfologia e le caratteristiche e le proprietà dell'acido nucleico che i fagi sono stati classificati, sebbene anche altri fattori come il tipo di ospite parassitato e il rapporto che con esso si instaura possono venire

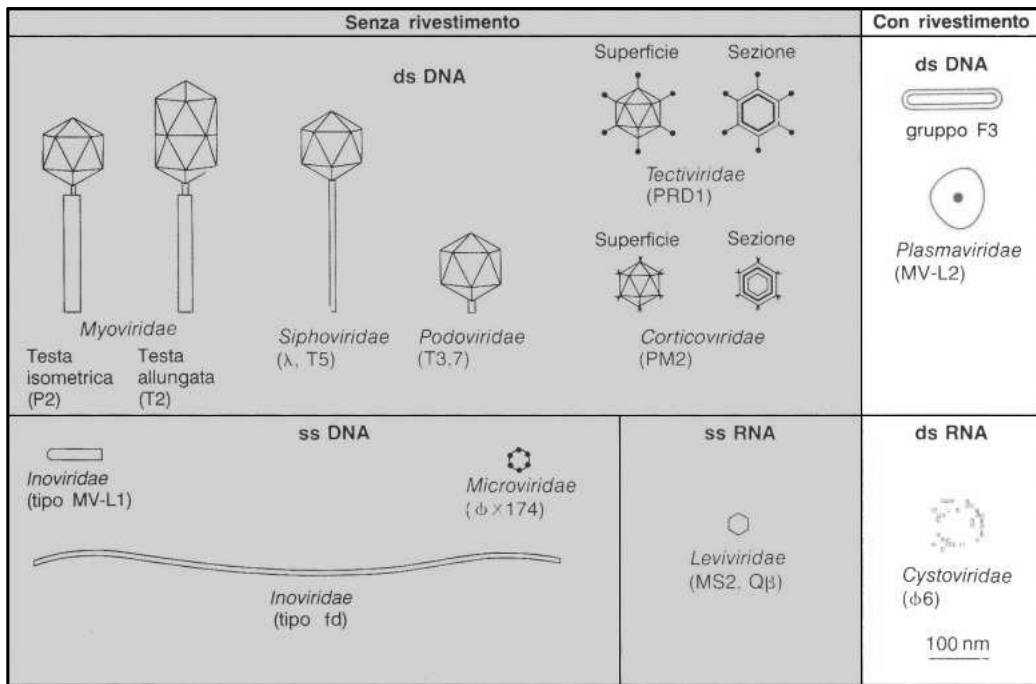


Figura B1.2 Le più importanti famiglie dei batteriofagi. ds: (*double stranded*) doppio filamento, ss: (*single stranded*) singolo filamento.

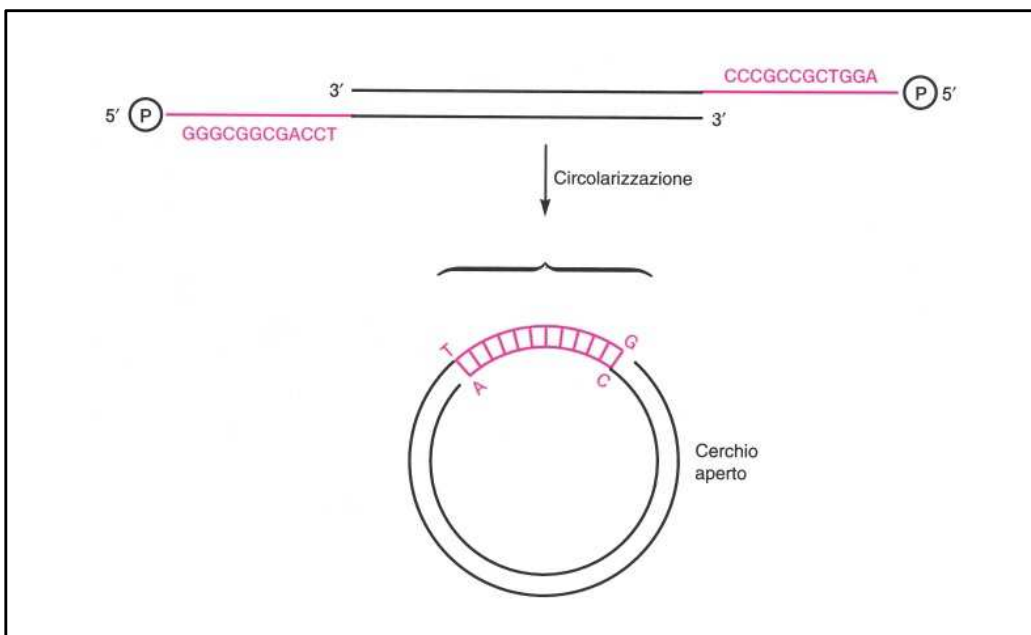


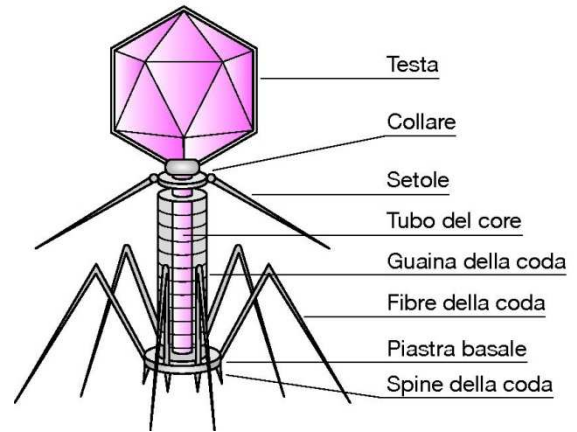
Figura B1.3 Rappresentazione schematica del DNA del fago lambda. Si notino le estremità coesive a singolo filamento lunghe 12 nucleotidi che, mediante le sequenze complementari, ne rendono possibile la circularizzazione.

utilmente impiegati. I batteriofagi sono per gran parte costituiti da DNA a doppio filamento, con strutture **icosaedriche** provviste o meno di coda contrattile. Pochi sono i fagi provvisti di rivestimento (envolope). I fagi T (**fig. B1.4**) sono quelli a struttura maggiormente complessa e provvisti di coda contrattile.

I batteriofagi possono essere distinti, sulla base del rapporto che si instaura fra batteriofago e cellula batterica ospite, in:

- **batteriofagi virulenti**, se in grado di attuare una **infezione litica** (o ciclo litico): sequenza di eventi che seguono l'internalizzazione di un virus da parte di una cellula suscettibile di infezione e che si conclude con la lisi della cellula e la liberazione dei virioni;
- **batteriofagi temperati**, se capaci di svolgere su certe cellule batteriche alternativamente **ciclo litico** oppure **lisogenia**, quest'ultima è una particolare relazione fra cellula ospite e virus nella quale l'acido nucleico del fago aderisce al cromosoma batterico comportandosi come un gene batterico e replicandosi in armonia con esso **senza determinare la lisi** del batterio.

Figura B1.4 Batteriofago T4.



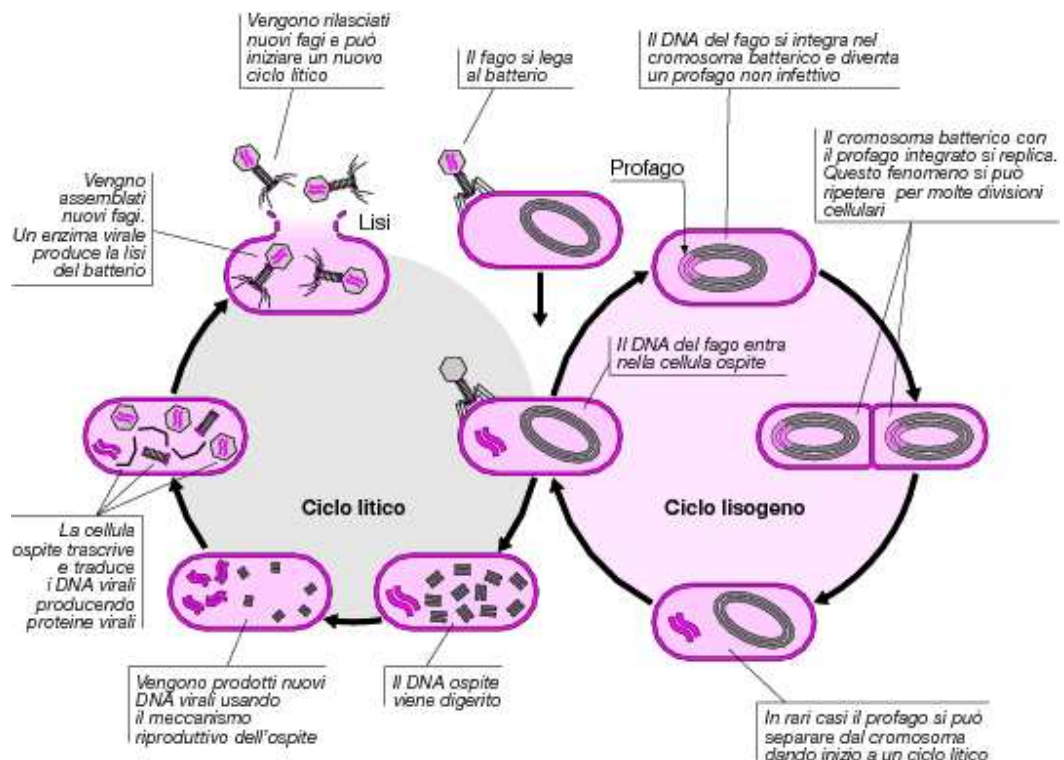
Riproduzione dei fagi

► **Ciclo litico e batteriofagi virulenti.** Il fenomeno per cui un batteriofago si riproduce a spese di un batterio ospite distruggendolo (lisi) viene indicato come **infezione litica** (o ciclo litico) e i fagi che causano la lisi di tutti i batteri infettati vengono detti **batteriofagi virulenti**.

Il ciclo litico di replicazione virale (fig. B1.5) e di infezione della cellula batterica, per esempio di un fago T2 o lambda, inizia con la fase di **adsorbimento** e **penetrazione**. Gli specifici recettori del batterio e del fago consentono a questi di “fissarsi” alla parete e poi, mediante l’azione di un enzima (lisozima) situato nella coda, di diminuire la rigidità e la resistenza della parete. Successivamente si ha la separazione dell’acido nucleico dall’involucro, con il genoma fagico che viene iniettato all’interno del batterio mediante contrazione della guaina virale e passaggio dal condotto interno. Il virione cessa a questo punto di esistere come particella indipendente (**fase di eclissi**), per riapparire numerosi nel citoplasma batterico dopo che questi ha effettuato la sintesi dei costituenti virali (proteine del capsido, acido nucleico). Seguono le fasi di **maturazione** (formazione delle particelle complete: virioni) e di **liberazione** dei virioni, grazie a una endolisina che porta allo scoppio della cellula batterica. Le fasi di eclissi, maturazione e liberazione vengono complessivamente indicate con il termine **fase vegetativa**.

Figura B1.5 Infezione e riproduzione fagica.

Rappresentazione grafica della moltiplicazione virale in un batterio ospite attraverso il ciclo litico e il ciclo lisogeno.



In laboratorio la presenza di fagi in una certa soluzione (o materiale) e la loro replicazione può essere messa facilmente e rapidamente in evidenza con il **metodo delle placche**: il campione con il fago (acqua, alimenti, materiale patologico stemperato in soluzione fisiologica ecc.) viene mescolato con alcuni millilitri di un agar molle e raffreddato a 44 °C; la miscela viene poi distribuita su una piastra di agar nutriente in cui si stanno già moltiplicando i batteri adatti, quelli cioè che si suppone siano sensibili al fago. Se i fagi sono assenti dalla soluzione, i batteri in rapida crescita formeranno una patina superficiale uniforme su tutta la piastra, mentre se è presente anche un solo fago questi determinerà la lisi (dissoluzione della parete) del batterio già circa 15-60 minuti dopo l’inizio dell’infezione, con la liberazione di nuove particelle virali parentali che attaccheranno altri batteri contigui. Dopo un giorno di incubazione e diversi cicli di replicazione e lisi, tutti

i batteri vicini alla sede dell'inoculo della soluzione risulteranno uccisi con formazione di aree lisate di batteri uccisi che appaiono come aloni circolari trasparenti, detti **placche**, fra lo strato di batteri vitali (**fig. B1.6**).

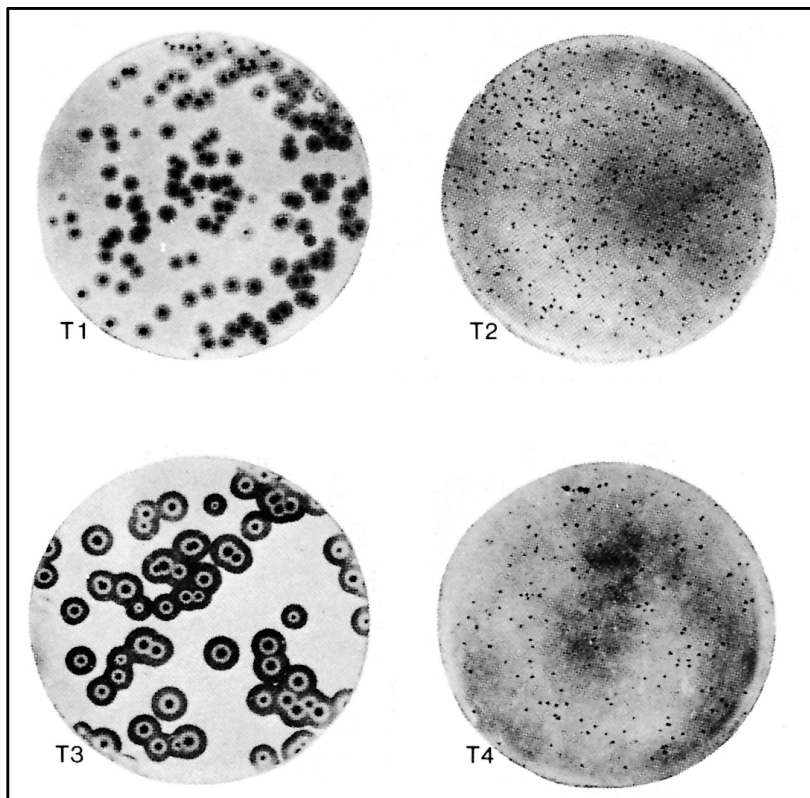


Figura B1.5 Placche prodotte da colifagi T su uno strato di *E. coli*.

Sono visibili differenze nell'aspetto delle placche. Le fotografie sono circa 1/3 delle dimensioni reali.

► **Ciclo lisogeno e fagi temperati.** Nel ciclo lisogeno i fagi sono parassiti a livello genetico: infatti certe cellule batteriche sensibili quando vengono infettate da particolari fagi, detti **batteriofagi temperati**, non vanno incontro alla consueta infezione litica ma, invece, a un'integrazione del genoma del fago nel cromosoma batterico. Ciò porta a due tipi di risposte cellulari:

- in alcune di queste cellule i fagi si comportano in modo consueto, distruggendole: si verifica infatti il ciclo riproduttivo vegetativo che porta alla lisi cellulare (ciclo litico);
- altre cellule invece non vengono distrutte e la relazione batteriofago-cellula ospite è un perfetto equilibrio tollerato, che può mantenersi indefinitamente. Questi batteri che sopravvivono all'infezione vengono detti **batteri lisogeni**, in quanto capaci in certe circostanze di lisare se stessi e di liberare i virioni.

Con il termine **lisogenia** si intende quindi la particolare interazione tra batteriofago temperato (fago che dopo aver infettato una cellula ospite può iniziare un ciclo lisogeno oppure litico) e cellula batterica ospite, in grado di conferire a quest'ultima la capacità teorica di produrre lo stesso fago, ma in realtà di resistere a una massiva infezione dello stesso (**immunità alla superinfezione**). Tale proprietà è trasmessa ai discendenti della cellula batterica resa lisogena ed è conseguente all'integrazione del DNA fagico nel cromosoma del batterio infettato.

Viene detto **profago** il genoma del fago integrato nel DNA cellulare, esso rappresenta lo stadio di *provirus* di un fago lisogeno. Nelle cellule lisogenizzate non si trovano né virioni maturi né DNA fagico libero. Sono capaci di lisogenia solo i fagi con DNA a doppio filamento. Si indica perciò come batterio lisogeno quel ceppo batterico che si sviluppa e si divide replicando il genoma di un batteriofago (profago) e che quindi vive in sostanziale equilibrio con esso. Ciò rende il ceppo batterico immune nei confronti di ulteriori infezioni da parte di particelle dello stesso virus, ma non nei confronti di particelle di altri batteriofagi. Il ciclo vitale di un batterio lisogeno viene indicato come **ciclo lisogeno**.

Applicazioni pratiche

I fagi temperati sono attualmente di grande interesse perché impiegati in campo biotecnologico come vettori di clonazione (in alternativa ai plasmidi) per la manipolazione genetica con i batteri (tecnologia del DNA ricombinante). Sono

poi impiegati come modello di studio della cancerogenesi di origine virale. Ma i settori di maggiore applicazione dei fagi sono la diagnostica batteriologica e l'epidemiologia delle malattie infettive. In campo diagnostico i batteriofagi possono essere impiegati sia per la ricerca diretta sia per quella indiretta.

Nell'**accertamento diretto** il riscontro nelle piastre Petri, con terreni di coltura nei quali si sia distribuito il materiale (per esempio acqua), delle tipiche placche indotte dai batteriofagi specifici dell'antigene Vi mescolati al materiale in esame sta a indicare la probabile contaminazione dell'acqua da parte di *Salmonella typhi*, che possiede l'antigene presente nella coltura.

Nell'**accertamento indiretto** si risconterà aumento del titolo dei fagi presenti in un certo materiale, per esempio alimenti, solo se esso contiene i batteri corrispondenti. I fagi, per la stretta specificità con gli stipiti batterici nei quali si sviluppano, si rivelano utili nella fase di **identificazione** dei batteri: consentono di differenziare specie con caratteristiche metaboliche simili. In campo epidemiologico poi l'impiego della **lisotipia** (o **tipizzazione fagica**) è ormai divenuto uno dei metodi classici per l'individuazione di germi patogeni responsabili di epidemie (colera, gastroenteriti infantili ecc.), quando risultano insufficienti i caratteri biochimici. Con la tipizzazione fagica si determina il tipo sierologico di un determinato batterio isolato: viene impiegato un fago che si adsorbe a una struttura di superficie del batterio riconosciuta da uno specifico anticorpo.

Pochi sono però ancora i fagi di stretto interesse medico, fra questi di particolare rilevanza sono quelli che recano geni che codificano per tossine batteriche (fenomeno della conversione fagica) e quelli che fungono da vettori di trasferimento di geni fra i batteri (trasduzione).

I fagi possono inoltre diventare di rilevante interesse economico in alcuni processi biotecnologici come la manifattura di antibiotici e alimenti (latticini ecc.).