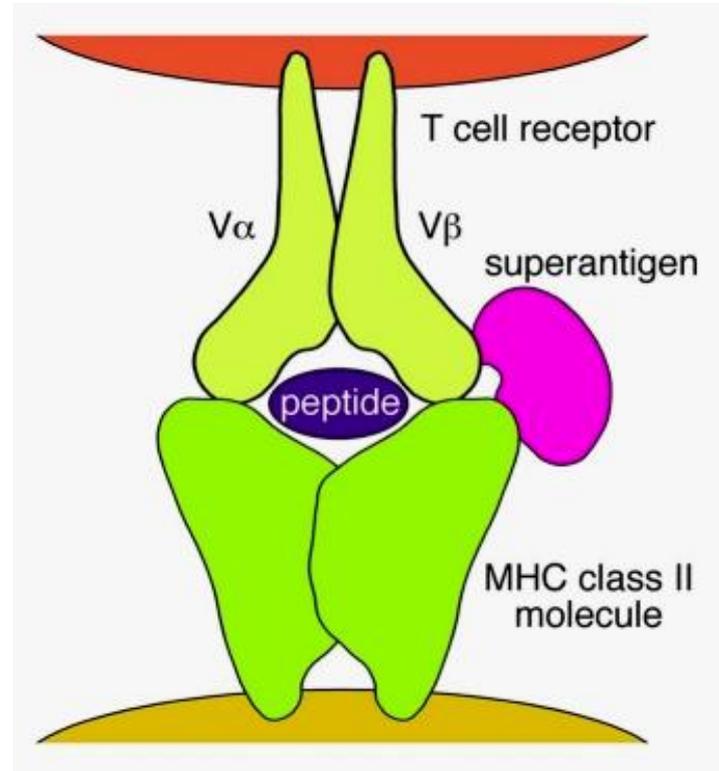


1c) Tossine che agiscono sulla membrana a livello di recettori di superficie: SUPERANTIGENI



Differentemente dagli altri antigeni, i superantigeni sono riconosciuti dai linfociti T senza essere processati in peptidi ed esposti con le MHC-II. La cascata delle chinasi intracellulare conseguente, innesca l'attivazione massiccia dei linfociti T, con produzione di citochine e talvolta connessa sintomatologia da shock.

Un superantigene può stimolare dal 2 al 20% di tutta la popolazione di linfociti T presenti.

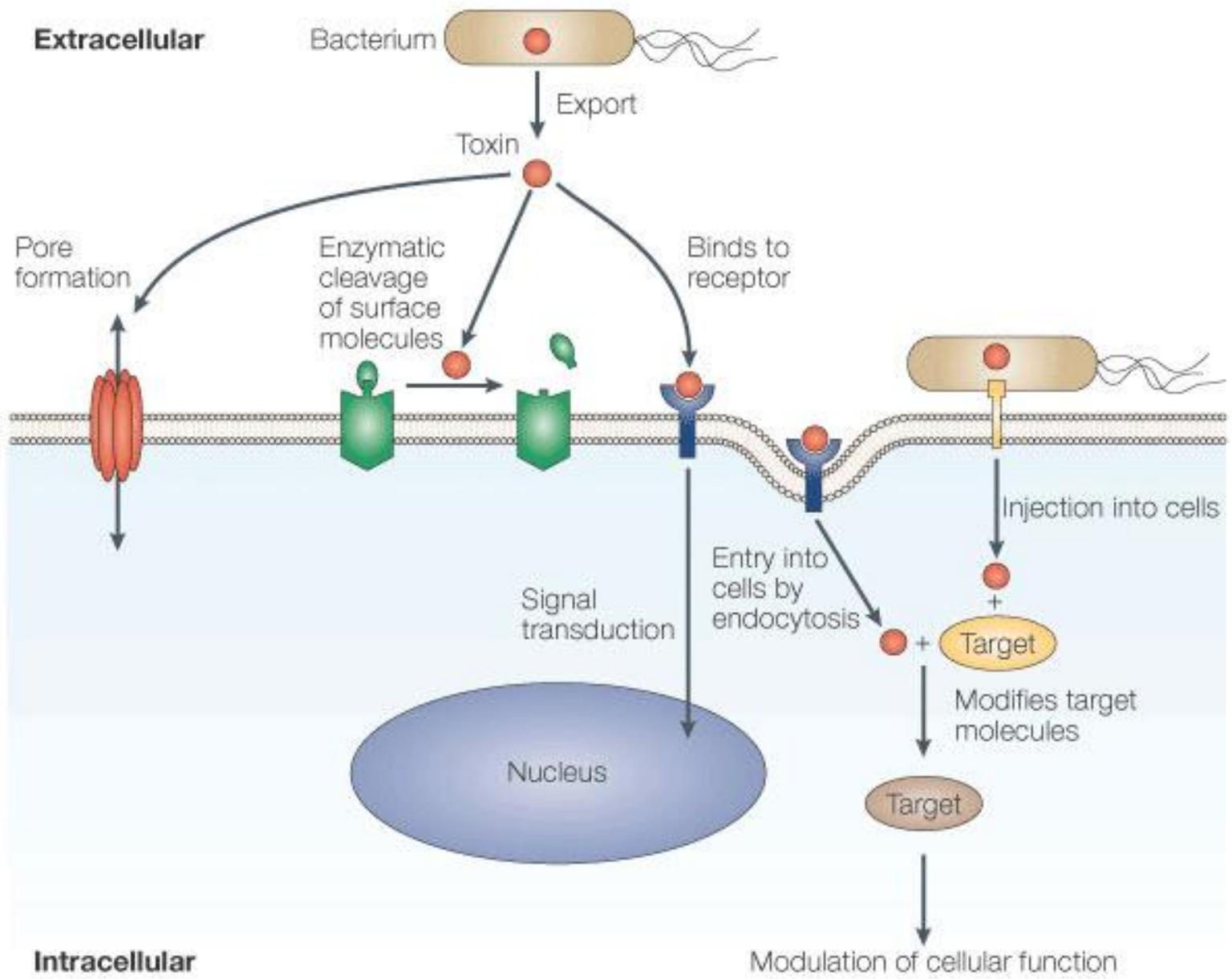
MALATTIE ASSOCIATE ALLA PRODUZIONE DI SUPERANTIGENE

Causate soprattutto da *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (tossine pirogeniche)

- Intossicazioni alimentari (*Staphylococcus e Streptococcus*)
- Scarlattina (*Streptococcus pyogenes*)
- Sindrome da shock tossico (TSST-1 di *Staphylococcus*)

La Sindrome da Shock Tossico

- Colonizzazione vaginale ad opera di alcuni ceppi di *S. aureus*, favorita dal flusso mestruale e dall'uso di particolari assorbenti interni.
- Produzione di una tossina TSST-1 in grado di funzionare come superantigene: capace di produrre una serie di citochine.
- Febbre improvvisa e molto alta, diarrea, vomito, esantemi simili a scottature, vertigini, confusione mentale, indolenzimento muscolare.



TOSSINE BATTERICHE CON BERSAGLI INTRACELLULARI

Le tossine batteriche a bersaglio intracellulare raggiungono il loro bersaglio:

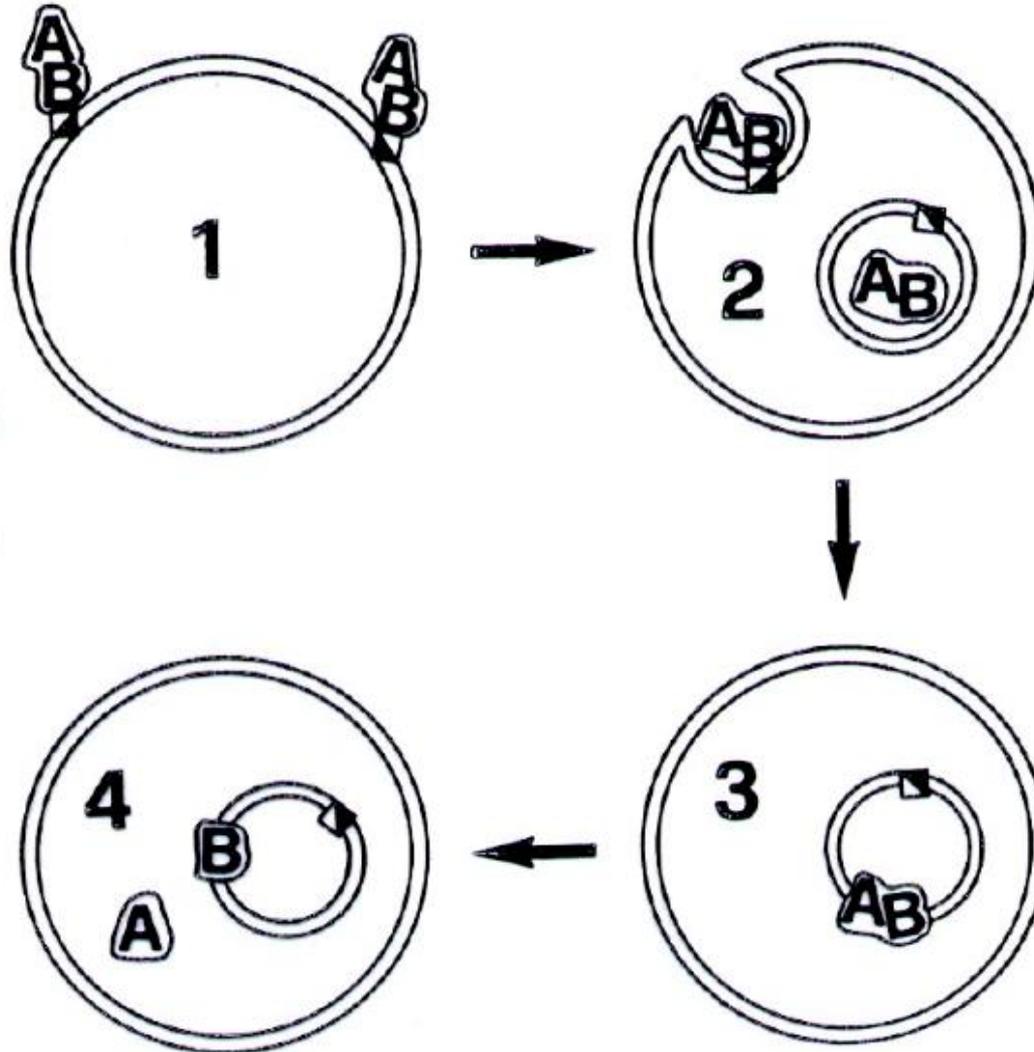
- Per iniezione diretta dal citosol del batterio al citosol della cellula ospite attraverso un sistema di secrezione di tipo III o tipo IV

- Dopo rilascio dal batterio si legano ad una/più cellula/e bersaglio mediante un recettore specifico e sono internalizzate mediante endocitosi

**Le tossine batteriche a bersaglio intracellulare hanno
tutte una struttura simile detta: A-B**

(A: active part)

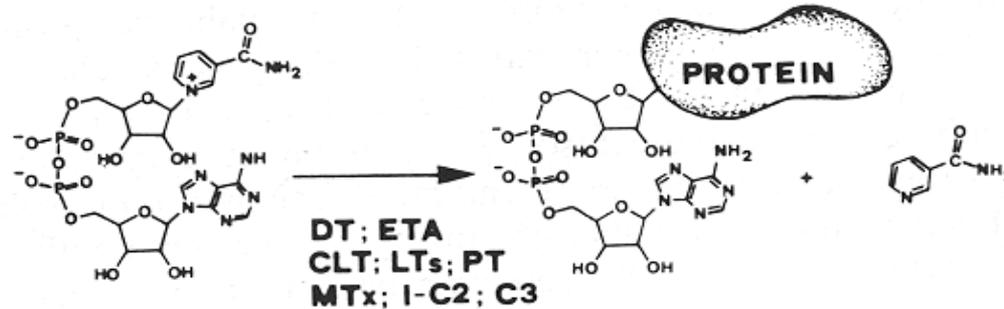
(B: binding part)



Esempi di Tossine AB

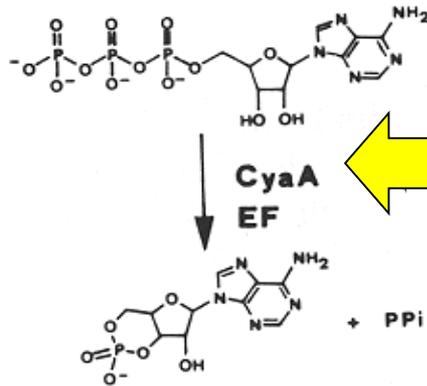
Toxin	Organization	Activity
Diphtheria toxin	AB	ADP ribosylation
Exotoxin A	AB	ADP ribosylation
Botulinum toxin	AB	Zn ⁺⁺ protease
Tetanus toxin	AB	Zn ⁺⁺ protease
Cholera toxin	AB ₅	ADP ribosylation
Shiga toxin	AB ₅	Cleaves 28S rRNA
Anthrax toxin LF	A-B	Zn ⁺⁺ protease
Anthrax toxin EF	A-B	Adenylate cyclase

CLASSIFICAZIONE DELLE TOSSINE BATTERICHE A BERSAGLIO INTRACELLULARE IN BASE ALLA LORO ATTIVITA' ENZIMATICA



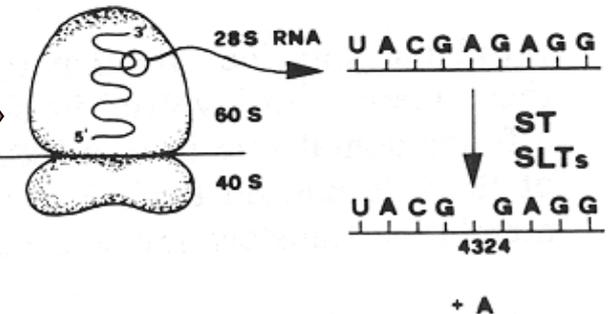
ADP-RIBOSYLTRANSFERASI

ADENILATO CICLASI

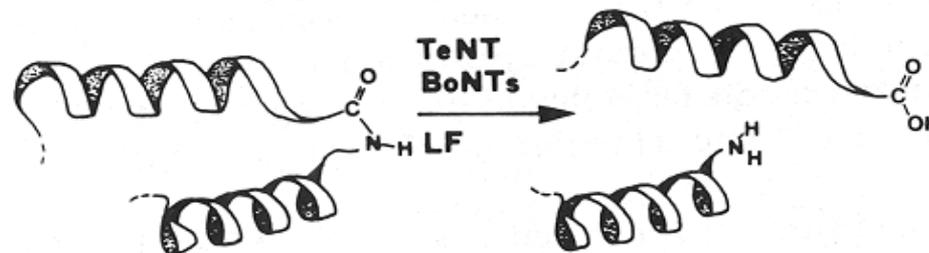


CATALYTIC ACTIVITIES
OF BACTERIAL PROTEIN
TOXINS WITH INTRACELLULAR
TARGETS

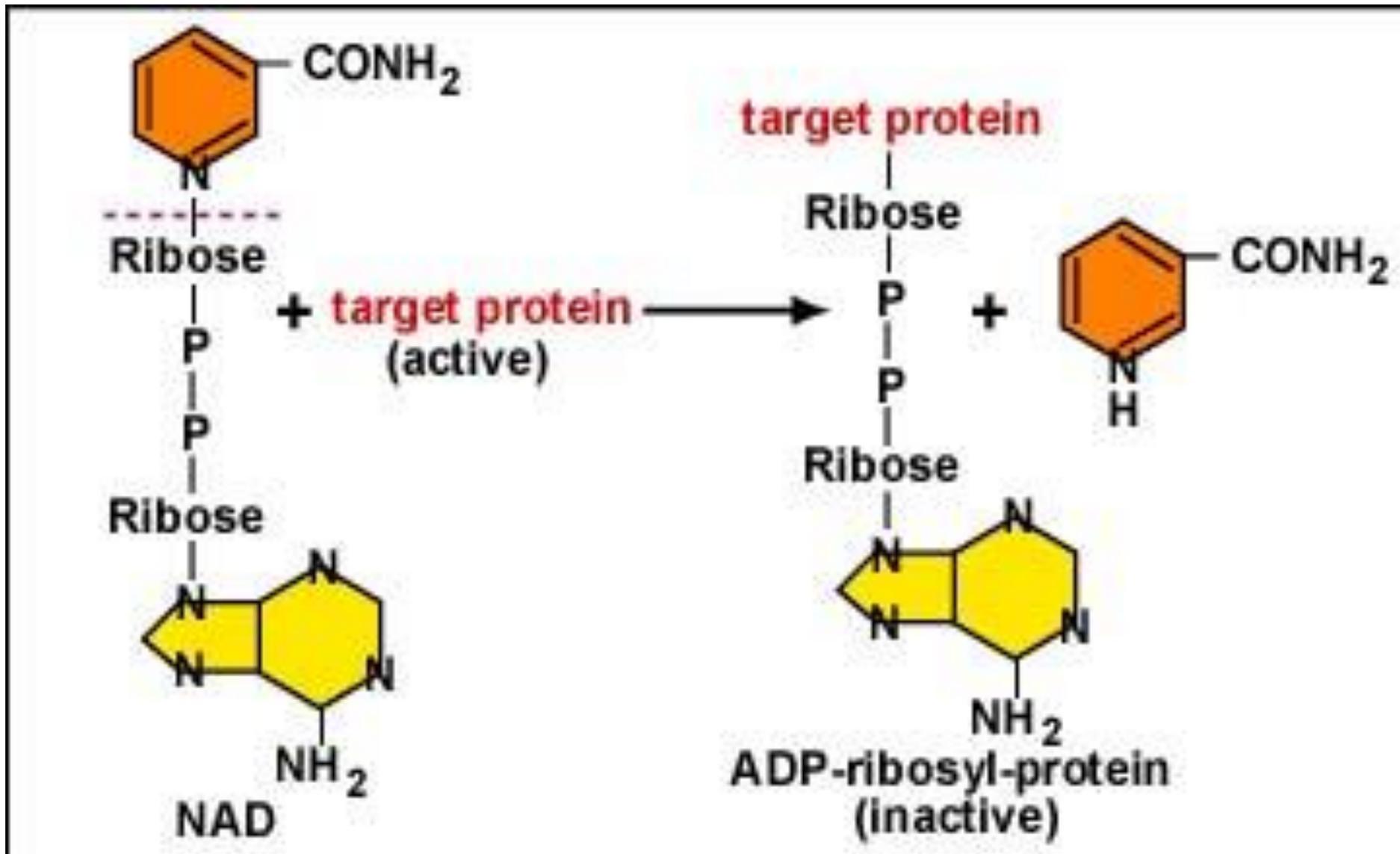
ADENINA-GLICOIDROLASI



ZINCO-ENDOPEPTIDASI



TOSSINE ADP-RIBOSIL TRANSFERASI



TOSSINA DIFTERICA

La Difterite: storia

-La difterite fu descritta da Ippocrate nel quarto secolo A.C. Questa malattia ha causato milioni di morti nella sola Europa per molti secoli fino alla sua scomparsa dovuta alla vaccinazione. La causa della difterite è l'infezione da parte di ceppi tossinogenici di *Corynebacterium diphtheriae*, un batterio identificato come agente eziologico della difterite da Klebs nel 1883, e coltivato per la prima volta nel 1884 da Loeffler, che dedusse che la vera causa della malattia era un veleno rilasciato dal batterio e che tale veleno agiva sia localmente che a distanza.

-Il veleno di Loeffler (tossina difterica) fu isolato nel 1888 da Roux e Yersin e nel 1890 ne venne fabbricato da Emil von Behring un antisiero. Per le sue scoperte ricevette il primo premio Nobel per la medicina della storia, nel 1901.



- Nel 1923 Gaston Ramon ottenne un tossoide difterico che è usato ancor oggi come vaccino anti-difterite.



Gaston Ramon(1886-1963)

Tossina Difterica (DT)

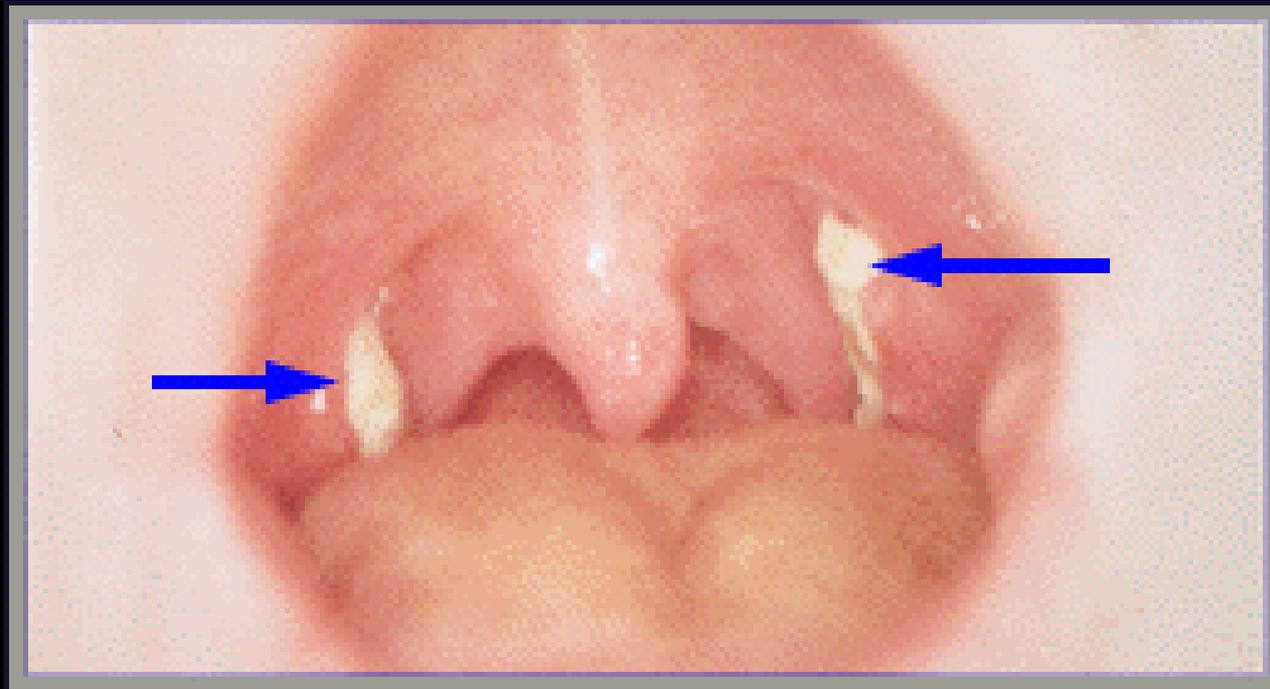
Prodotta da *Corynebacterium diphtheriae*, batterio G+, immobile, non capsulato, il quale si moltiplica nelle superficie delle cellule epiteliali del corpo (naso, gola, pelle) e non penetra nei tessuti circostanti.

Causa necrosi delle cellule della mucosa con formazione di essudato infiammatorio e pseudomembrane 

La DT diffonde sptt. al cuore e al SN

La DT è la sola responsabile dell'insorgenza della patologia

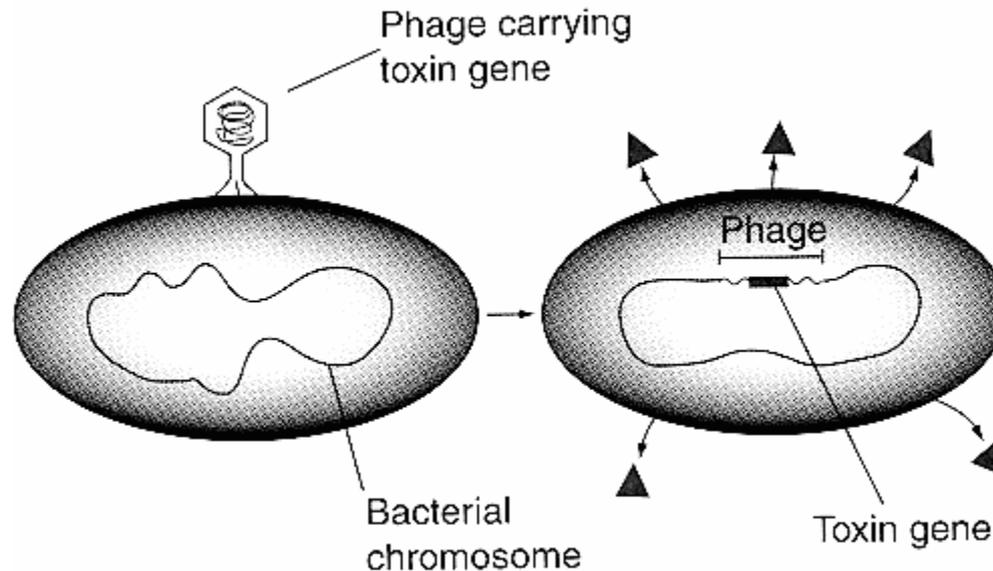
————> DT detossificata è utilizzata nella formulazione del vaccino



Diphtheria - notice the pseudomembrane in the posterior pharynx. It can become very large and may obstruct the airway.

Tossina difterica: *tox* gene

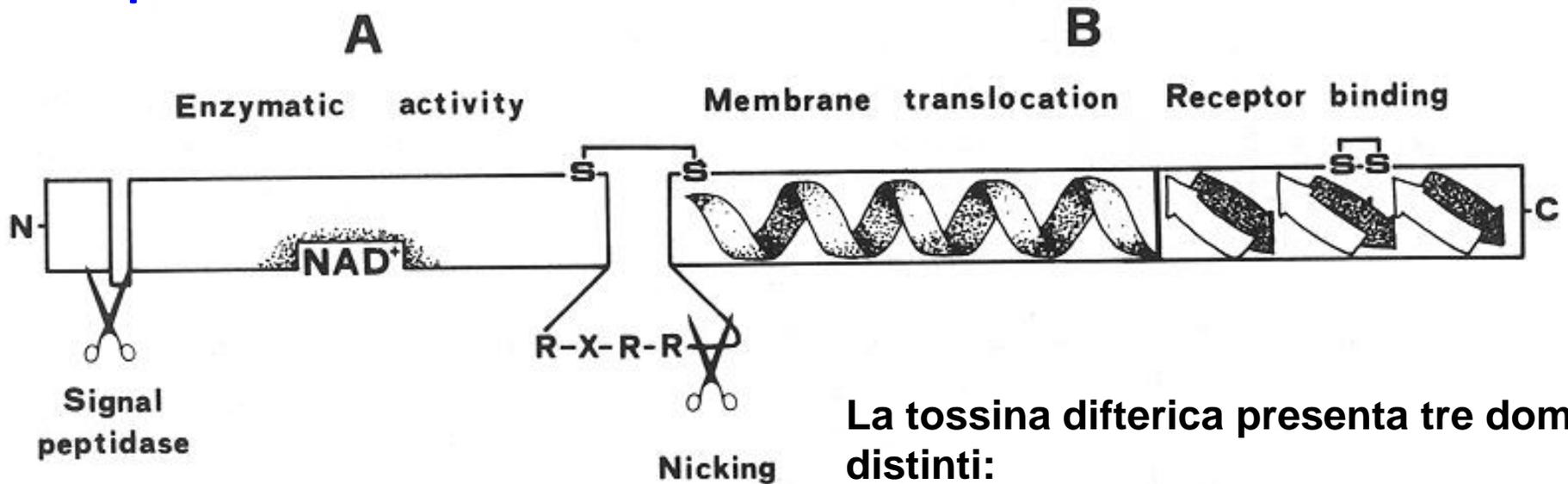
- Esistono ceppi tossigenici e non tossigenici di *C. diphtheriae*
- Il gene *tox* che codifica per DT è veicolato da una famiglia di corynebacteriophagi
- Ceppi tossigenici di *C. diphtheriae* sono lisogenizzati da questi fagi



La DT espressa in presenza di basse concentrazioni di ferro
(repressore genico dipendente da Fe)

Prodotta come pre-protossina inattiva di 535 aa nel citoplasma del
batterio

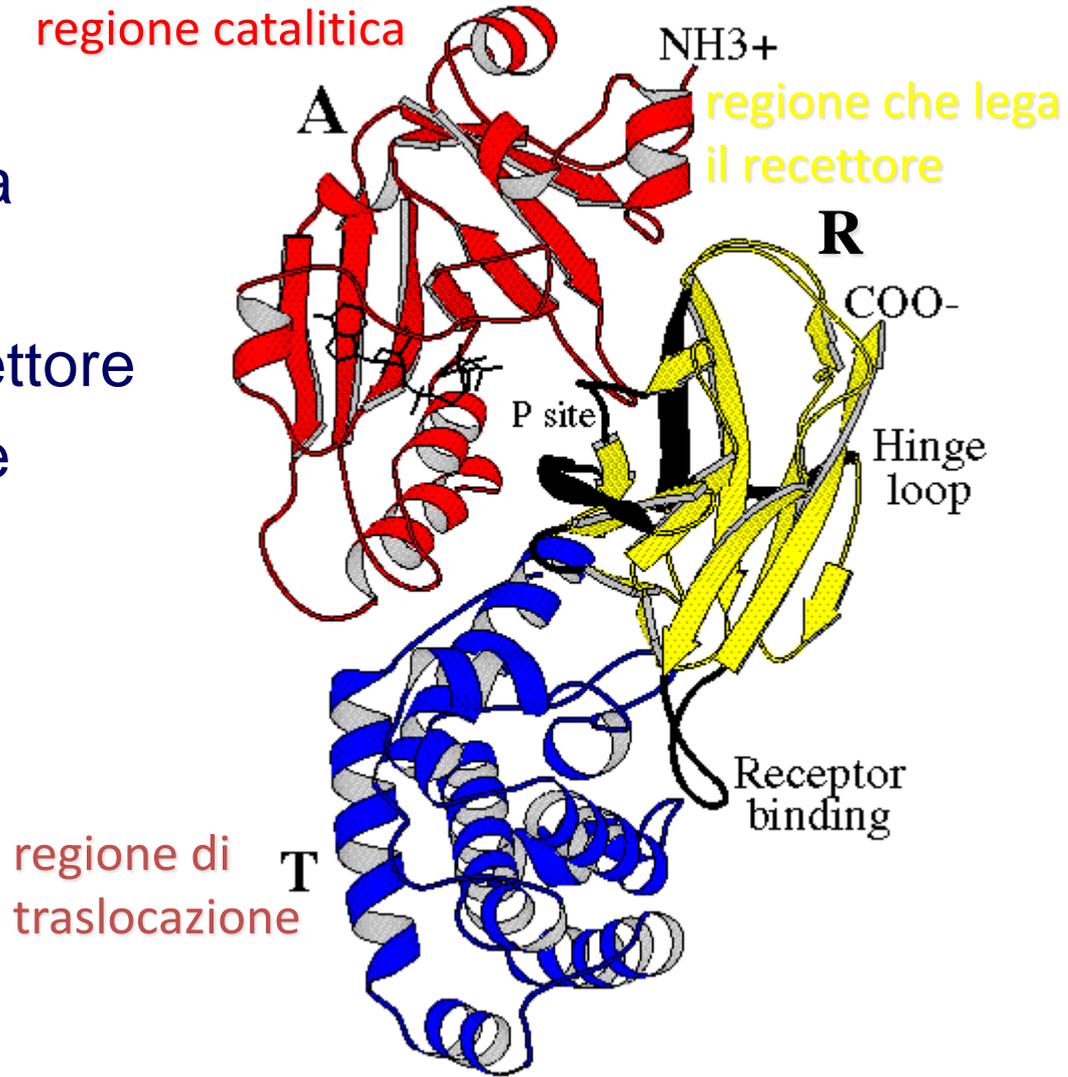
La pro-tossina è tagliata in due frammenti A e B di 21 e 37 kDa
rispettivamente



La tossina difterica presenta tre domini
distinti:

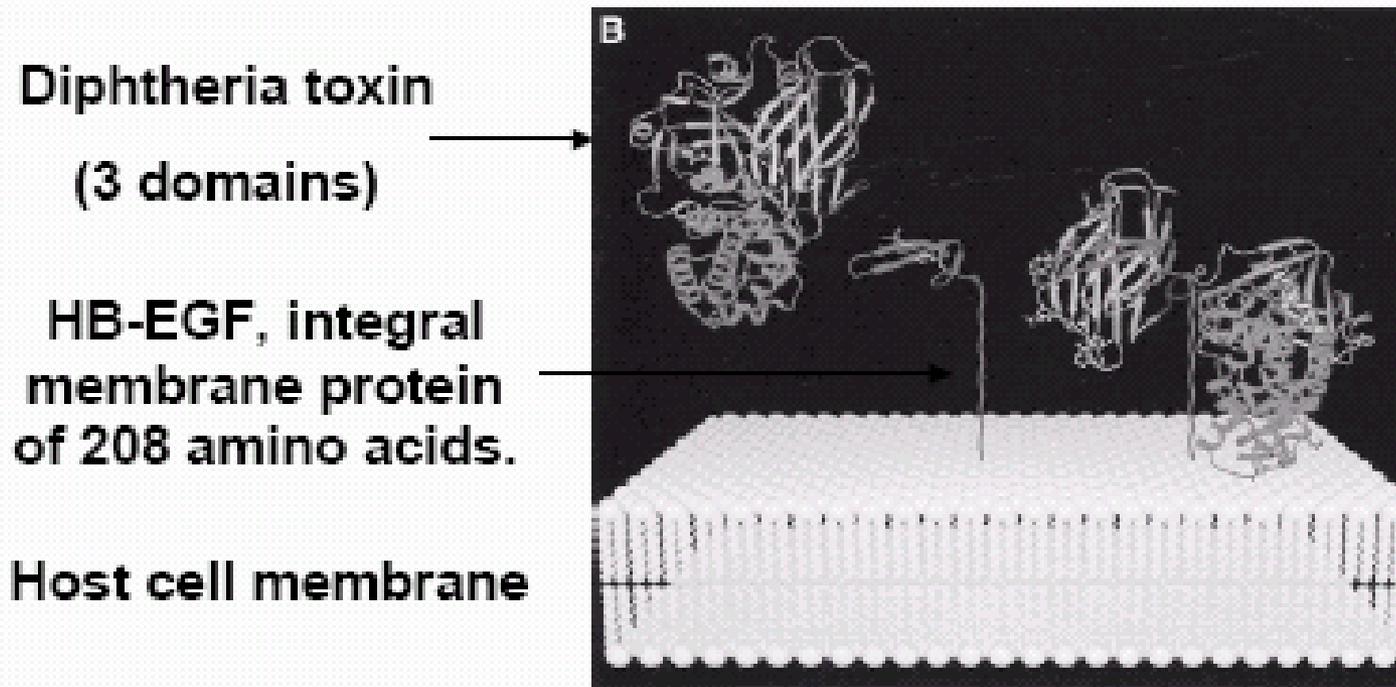
un dominio che lega il recettore
un dominio di traslocazione
un dominio catalitico

La tossina difterica presenta tre regioni distinte:
la regione R che lega il recettore
la regione T di traslocazione
la regione A catalitica



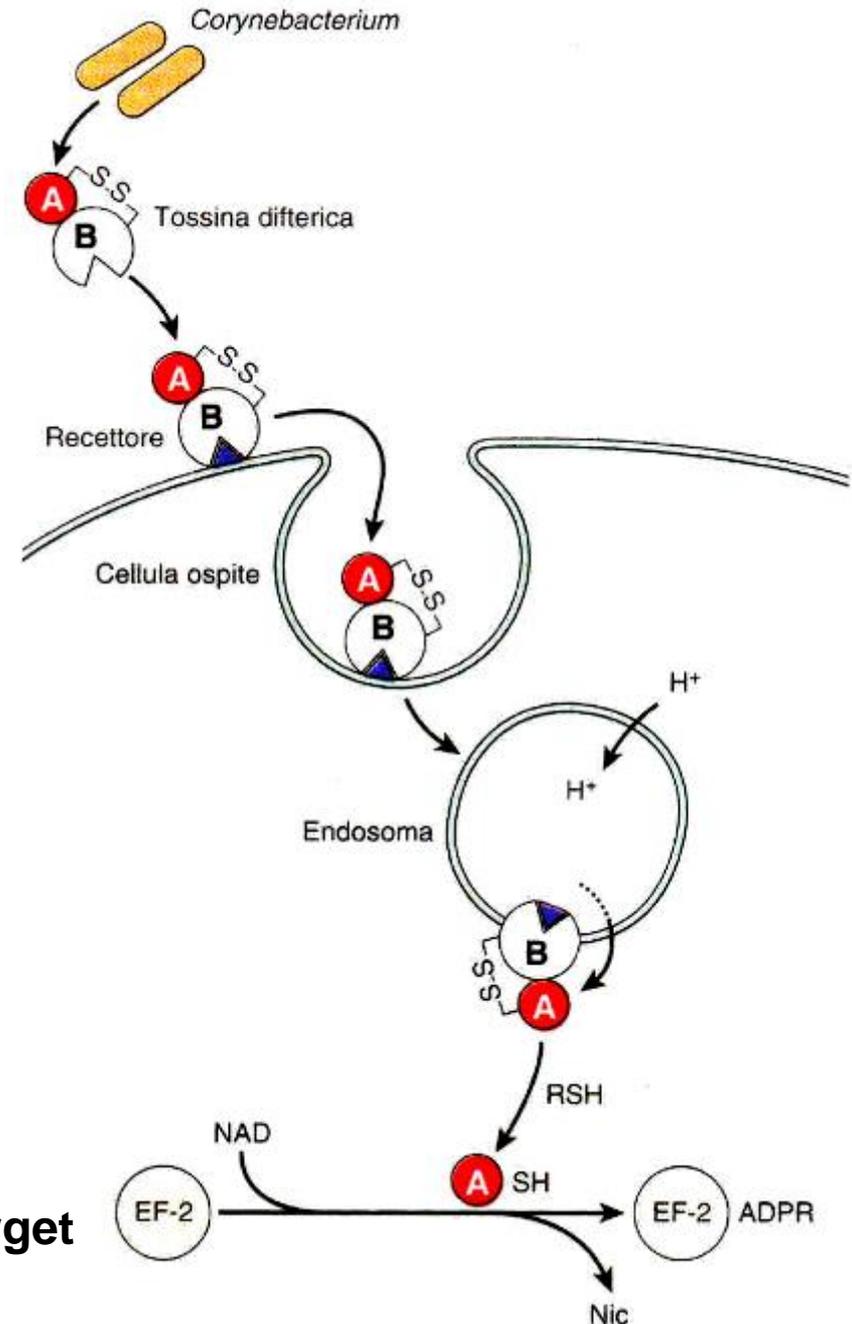
Tossina difterica: legame al recettore

- Il dominio R, che è parte della catena B, si lega al recettore specifico sulla cellula bersaglio.
- Questo recettore è il precursore del fattore di crescita epidermico legante l'eparina (HB-EGF).

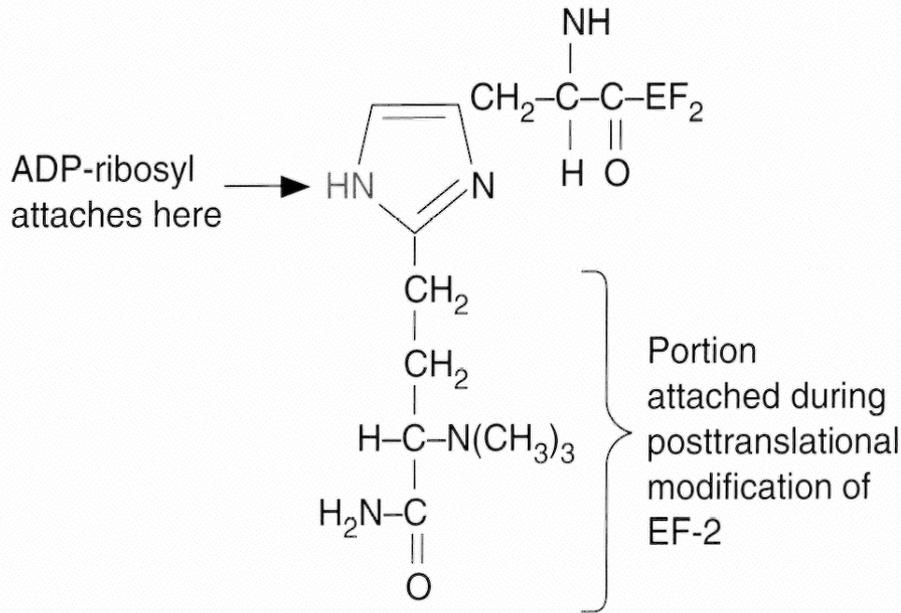
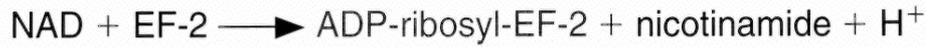


Meccanismo d'azione della tossina difterica

- Legame al recettore
- Endocitosi del complesso recettore-tossina.
- Il pH acido dell'endosoma promuove un cambio conformazionale (T-dominio) che inserisce la tossina nella membrana della vescicola.
- La catena A è traslocata nel citoplasma.
- La riduzione del ponte disolfuro rilascia la catena A nel citoplasma.
- ADP-ribosilazione di EF2

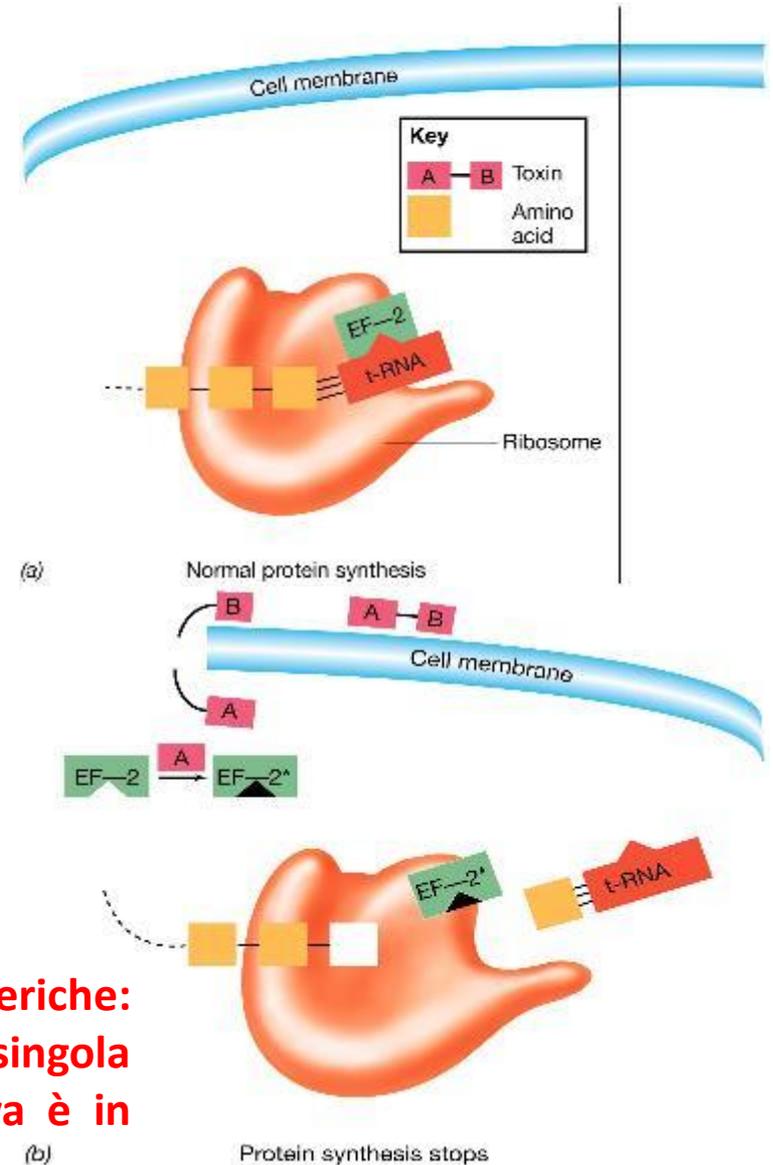


EF2 è stato identificato proprio perché target della DT



Diphthamide residue of EF-2

La DT è una delle più potenti tossine batteriche: esperimenti in vitro hanno dimostrato che una singola molecola di di subunità A enzimaticamente attiva è in grado di uccidere una cellula

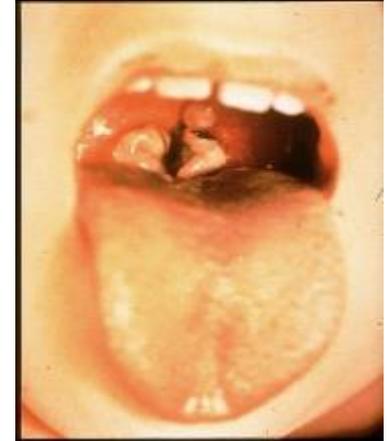


→ BLOCCO DELLA SINTESI PROTEICA → MORTE DELLA CELLULA

IL RISULTATO DELLA INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA A LIVELLO CLINICO

Tipicamente in 2-3 giorni

- faringite essudativa pseudomembranosa
- Febbre non elevata
- Linfadenomegalia
- Edema del collo



Complicanze

Le complicanze sono dovute all'azione sistemica della tossina prodotta dal batterio; esistono tre categorie di complicanze: cardiache, nervose e renali.

Complicanze cardiache

Miocardite difterica con steatosi del miocardio per diminuzione della sintesi di carnitina acil transferasi (che trasporta l'acil-CoA nel mitocondrio)

Compare in 3^a-7^a giornata;

Tachiaritmie, anomalie ECG

Complicanze nervose

Le complicanze nervose possono anch'esse essere precoci (entro la prima settimana) e tardive (oltre la quarta settimana). Tra le prime la paralisi del nervo glossofaringeo, con disturbi di fonazione, paralisi del velopendolo con difficoltà nella deglutizione.

Le manifestazioni tardive riguardano i nervi cranici, con paralisi dei nervi oculari, del nervo facciale, del nervo vago e del nervo accessorio del vago, e i nervi spinali, con polineuriti che riguardano tronco, arti e talora diaframma.

Complicanze renali

Le complicanze renali, meno frequenti, si manifestano con insufficienza renale, oliguria, proteinuria, ematuria e alterazioni idroelettrolitiche.

La letalità è di circa il 5-10% ma in molti casi, nei sopravvissuti, permangono danni permanenti a carico di cuore, reni, sistema nervoso.

In Italia, prima dell'avvento della vaccinazione di massa (al termine della seconda guerra mondiale) si registravano annualmente alcune decine di migliaia di casi di difterite con più di mille morti ogni anno.

ANTISIERO

Accertata la difterite, il primo presidio terapeutico necessario era la somministrazione di antisiero iperimmune equino (tossina ottenuta per filtrazione dalle colture inattivata con calore ed iniettata in cavalli a più riprese in modo da far sì che l'animale diventasse iper-immune. Il siero antidifterico veniva usato come antidoto nei pazienti affetti da difterite).

Terapia non sempre efficace perché gli anticorpi neutralizzanti la tossina (antitossina) non entrano dentro le cellule e molto pericolosa perché il siero di cavallo è di per sé immunogeno capace di indurre malattia da siero e reazioni allergiche.

VACCINO ANTIDIFTERICO

Il vaccino anti-difterite contiene tossina difterica inattivata con formaldeide (TOSSOIDE o ANATOSSINA).

DIPHTHERIA
STRIKES
UNPROTECTED CHILDREN



PROTECT YOUR CHILD WITH
TOXOID
TOXOID PREVENTS DIPHTHERIA
CHICAGO DEPARTMENT OF HEALTH

CAMPAGNA PUBBLICITARIA DEL
1941 PROMOSSA DAL
DIPARTIMENTO DELLA SALUTE DI
CHICAGO A FAVORE DELLA
VACCINAZIONE ANTI-DIFTERICA

CALENDARIO VACCINALE

OFFERTA ATTIVA e GRATUITA														
Vaccino	Nascita	3° mese ¹	5° mese	7° mese	9° mese	13° mese	14° mese	15° mese	5 - 6 anni	11 -12 anni	14-15 anni	≥ 50 anni	65 anni	>65 anni
Difterite Tetano														dT ²
Difterite Tetano Pertosse		DTaP	DTaP			DTaP			DTaP o dTap		dTap ⁹			
Poliomielite		IPV	IPV			IPV			IPV		IPV ⁹			
Epatite B	HBV ³	HBV	HBV			HBV								
Haemophilus influenzae b		Hib	Hib			Hib								
Morbillo Parotite Rosolia Varicella							MPRV ⁴ o MPR+V		MPRV ⁴					
Varicella ⁵											Var ⁶			
Pneumococco ⁶		PCV ⁸	PCV ⁸						PCV ⁸					PCV ⁸
Meningococco B ⁷				Men B ⁷	Men B ⁷				Men B ⁷					
Meningococco ACWY ⁸						Men ACWY ⁷					Men ACWY ⁸			
Papillomaviru s ¹¹										HPV ¹¹	HPV ¹¹			
Rotavirus ¹²		RV												
Herpes Zoster Virus ¹²												Vaccino antiHZV		
Influenza ¹⁰													Influenza	

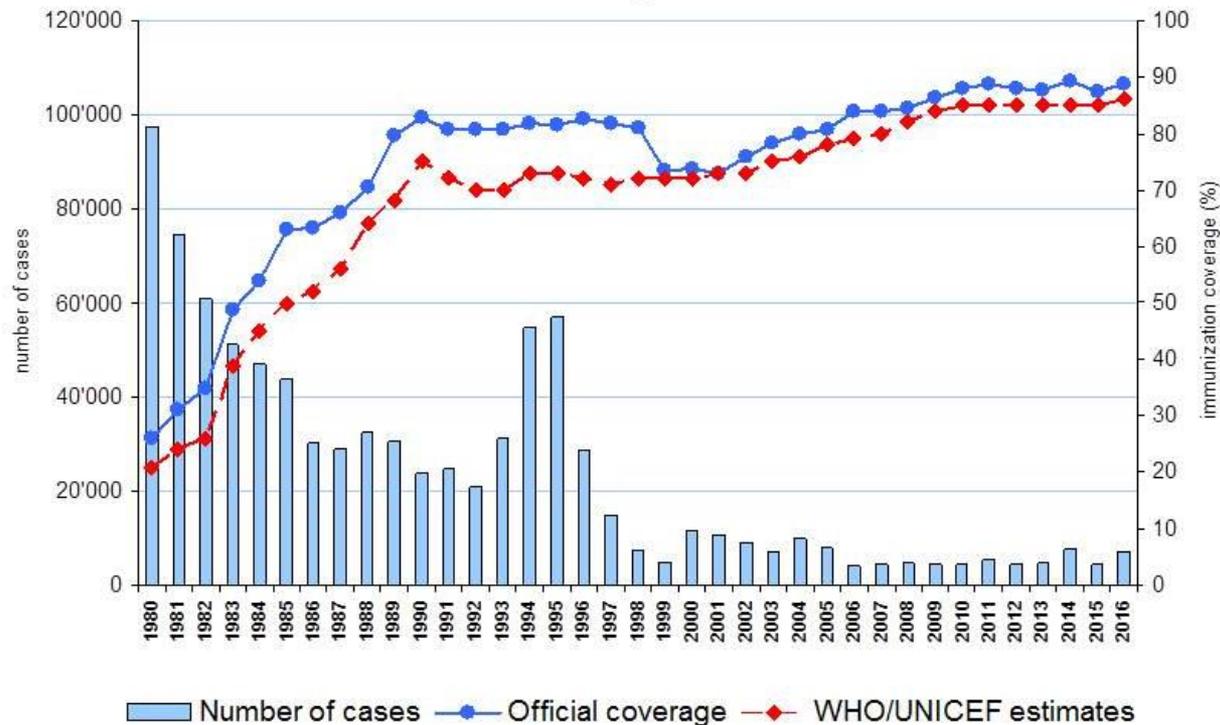
EPIDEMIOLOGIA

Dall'avvento della vaccinazione di massa, la malattia è diventata rara nei paesi industrializzati.

La malattia è endemica in molti paesi in via di sviluppo (Brasile, Filippine, India, Indonesia, Africa australe, Asia centrale).

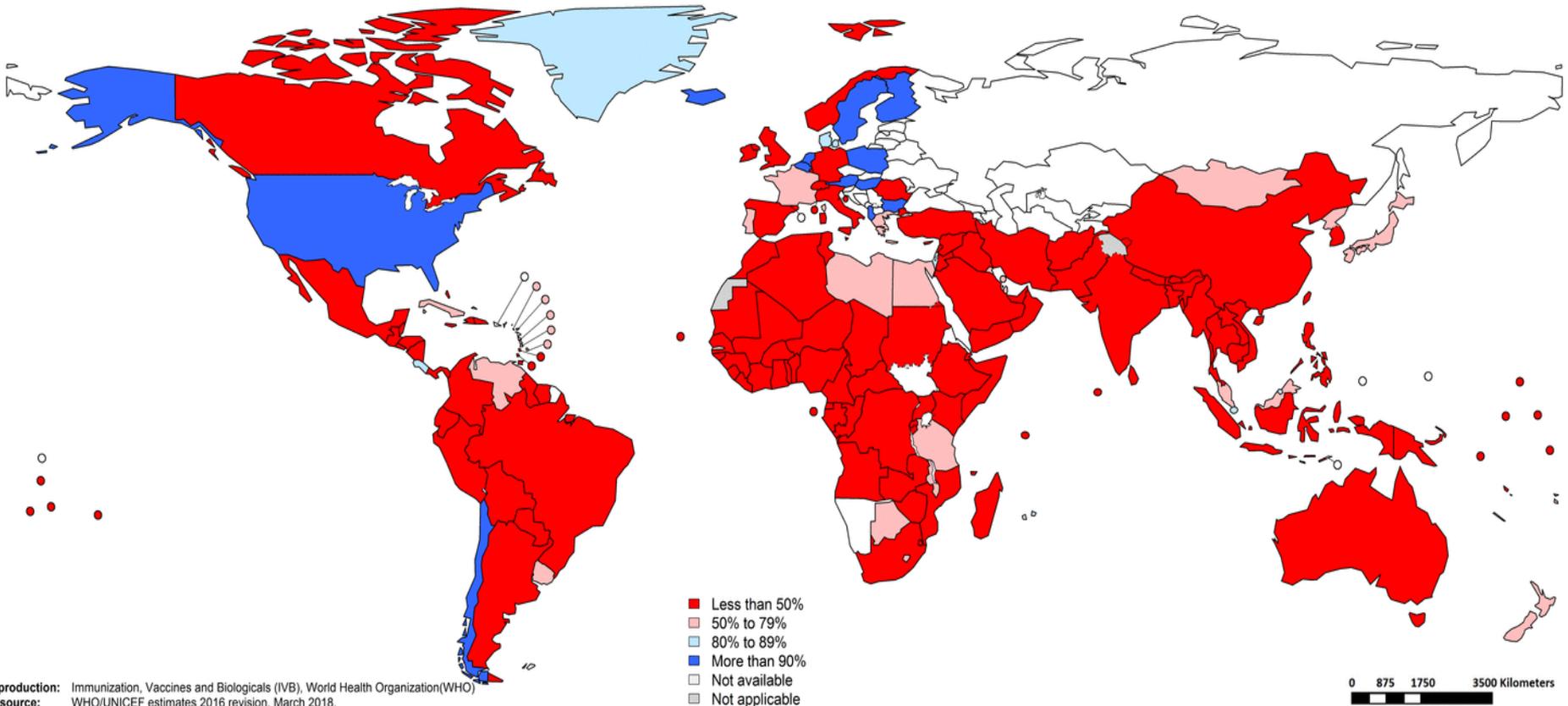
Dal 1990 è ricomparsa in forma epidemica nelle nazioni dell'ex-Unione Sovietica [nel 1995: 50.412 casi con circa 6.000 morti].

Diphtheria global annual reported cases and DTP3 coverage, 1980-2016



Immunization coverage with 3rd dose of diphteria and tetanus toxoid and pertussis containing vaccines

1980



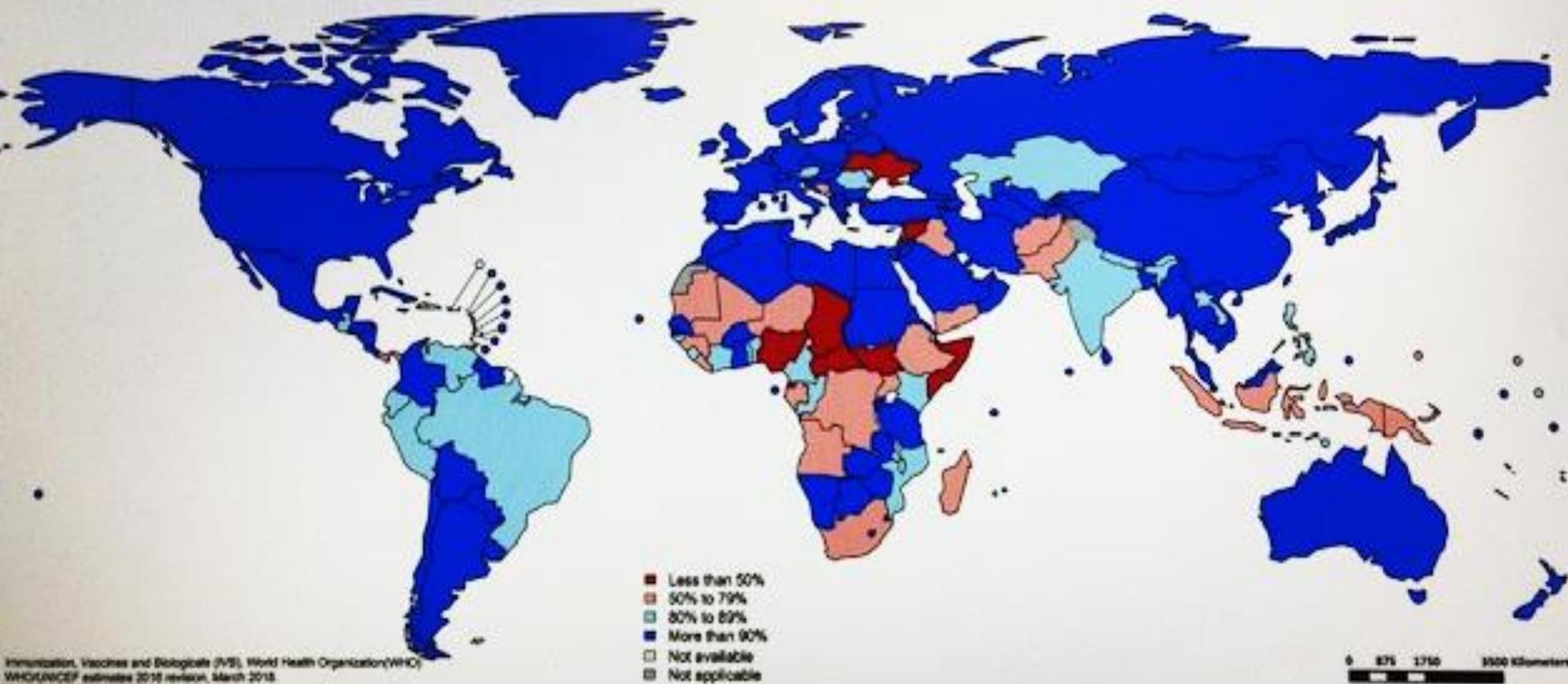
Map production: Immunization, Vaccines and Biologicals (IVB), World Health Organization (WHO)
Data source: WHO/UNICEF estimates 2016 revision, March 2018.
194 WHO Member states.

Disclaimer:
The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area nor of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.
World Health Organization, WHO, 2018. All rights reserved



Immunization coverage with 3rd dose of diphtheria and tetanus toxoid and pertussis containing vaccines

2016



Immunization, Vaccines and Biologicals (IVB), World Health Organization (WHO)
WHO/UNICEF estimates 2016 revision, March 2018
194 WHO Member states.

Names shown and the designations used on this map do not necessarily express any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization
regarding the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate
borderlines. WHO, 2018. All rights reserved.



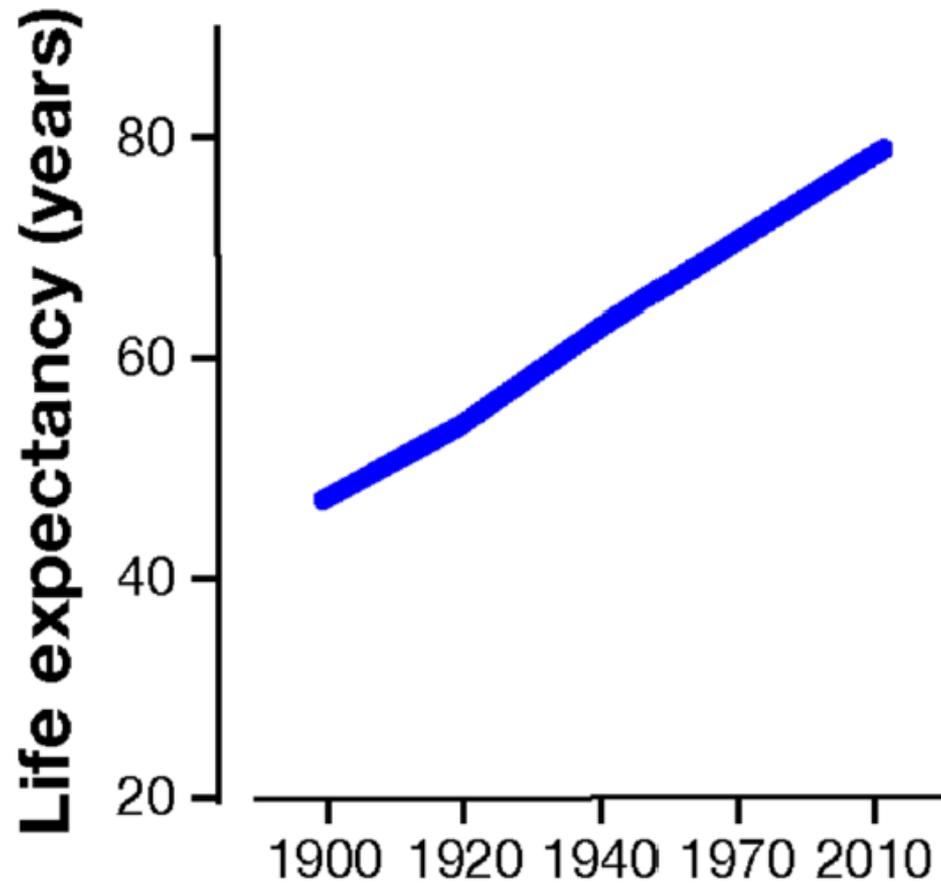
La copertura globale del DTP si attesta oggi intorno all'84%

L'effetto delle vaccinazioni!!

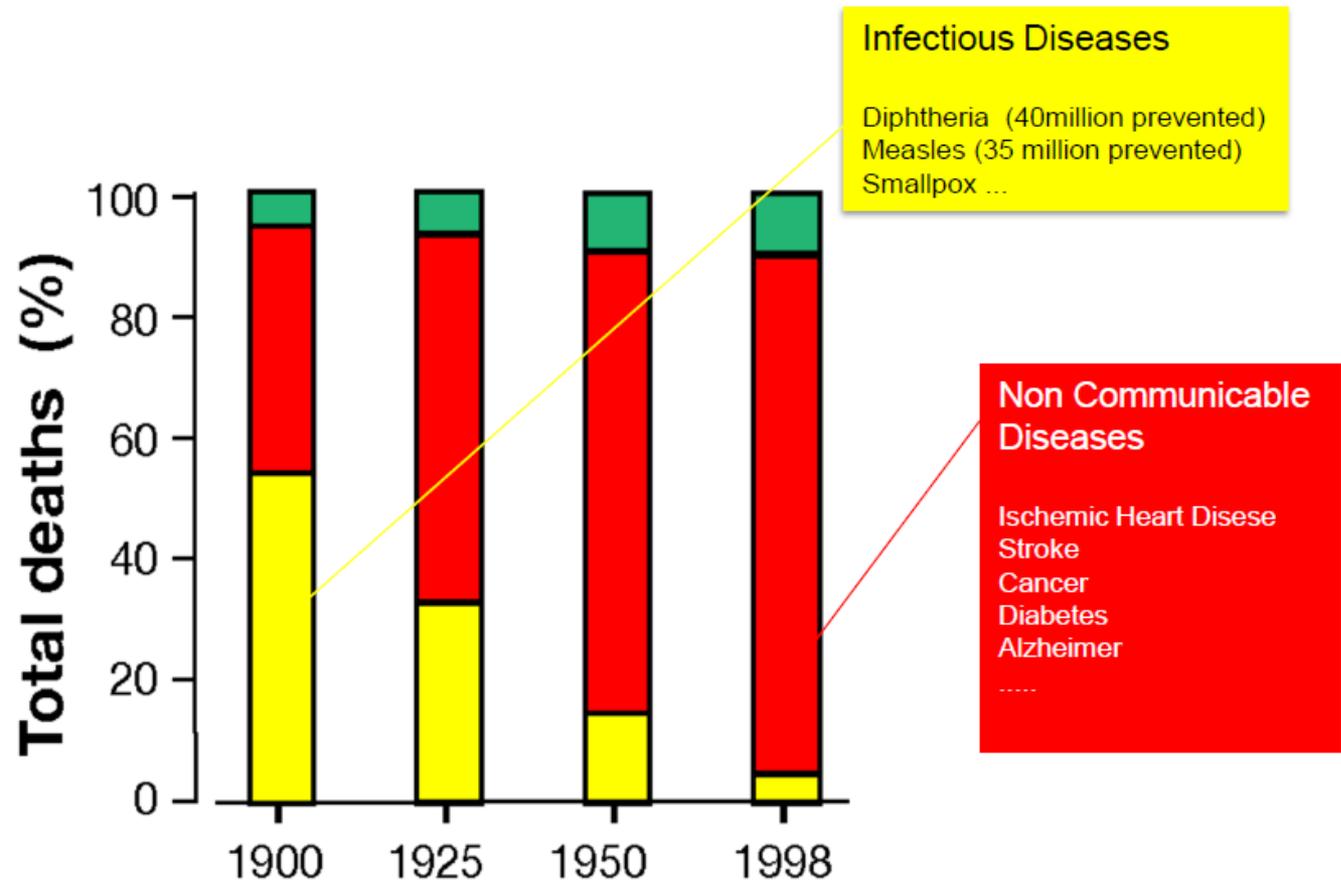
Variazione della morbilità annuale negli USA all'inizio e alla fine del XX secolo

Malattia	Casi inizio secolo XX	Casi nel 1998	Riduzione %
Vaiolo	48164	0	100
Difterite	175885	1	100
Pertosse	147271	6279	95.7
Tetano	1314	34	97.4
Poliomielite	16316	0	100
Morbillo	50382	89	99.8
Rosolia	47745	345	99.3
Rosolia congenita	823	5	99.4
Parotite	152209	606	99.6

In 1900 in the USA life was short



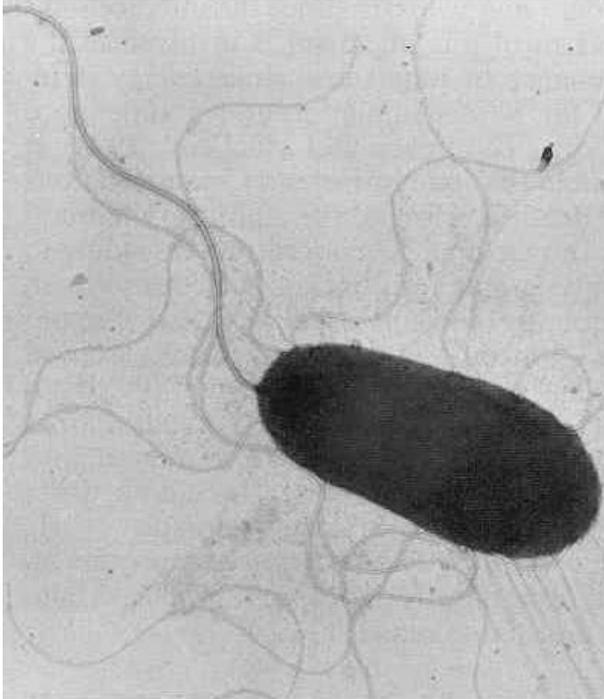
In 1900 in the USA people died of infectious diseases



«Con l'eccezione dell'acqua potabile nessun altro strumento, neppure gli antibiotici, ha avuto un maggiore effetto sulla riduzione della mortalità e la crescita della popolazione» (Stanley Plotkey, immunologo americano).

TOSSINA COLERICA

Prodotta da *Vibrio cholerae*, G- a virgola



V. cholerae è introdotto con liquidi e cibi contaminati e aderisce ai microvilli intestinali senza mai invadere l'epitelio dove produce la tossina e altri fattori di virulenza

La motilità e l'adesione dipendono dalle proteine flagellari che assicurano un'efficace colonizzazione batterica.

Una emagglutinina metalloproteinasi è importante per il distacco del batterio dalle cellule epiteliali.



Colera nel mondo. 5-7 milioni di casi/anno, 100,000 morti/anno.
Cholera gravis, la forma più grave della malattia causa una mortalità di circa il 10%.



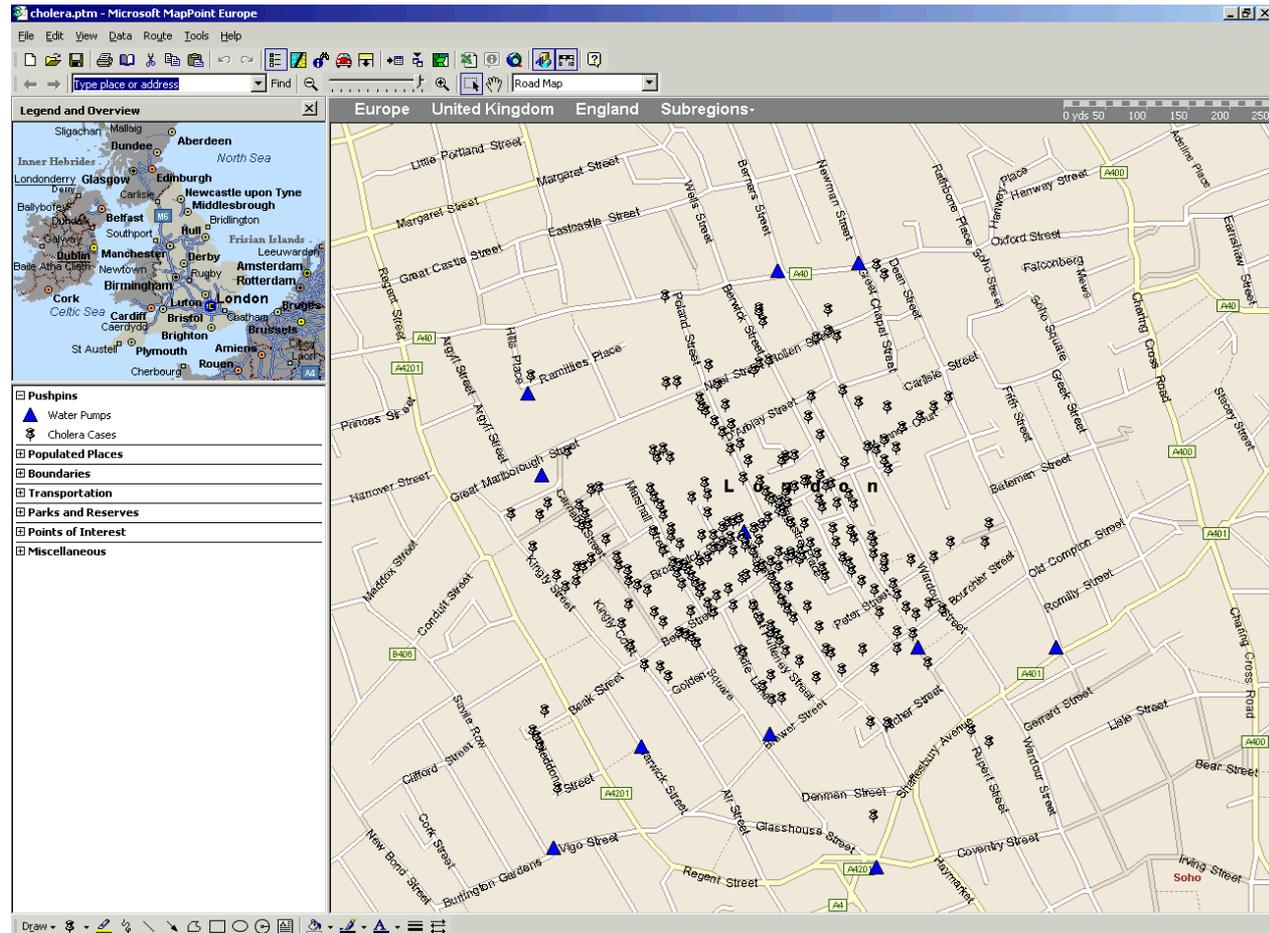
1846-1863: un'onda epidemica si sparge per l'Europa e raggiunge l'Italia e il Regno Unito. A Londra opera il Dr. John SNOW



Dr. John SNOW (1813-1858)



La pompa di Broad Street, 1854



Colera è una malattia epidemica caratterizzata da diarrea massiva per alterazione dei meccanismi fisiologici dell'assorbimento intestinale di H₂O e ioni

La perdita di molti litri di liquidi al giorno causa:

- perdita di coscienza per minor irrorazione sanguigna cerebrale**
- acidemia**
- ipoglicemia**
- ipocalemia per perdita di ioni K⁺ con le feci**
- se non trattato con soluzioni glucosate il soggetto muore per collasso cardiaco e shock ipovolemico**

Struttura della tossina colerica

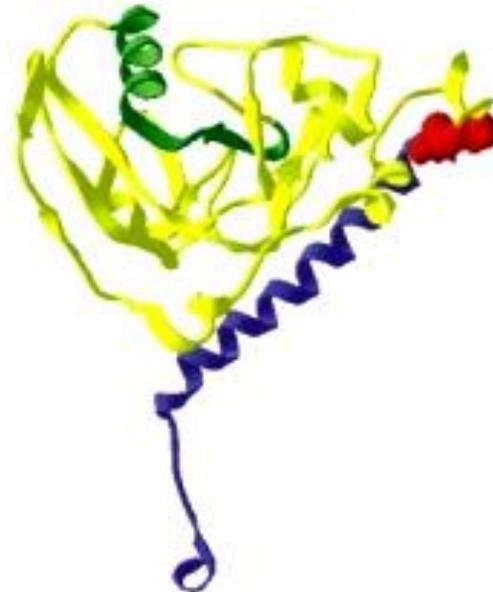
Tossina AB₅

B lega 5 gangliosidi GM1 (alta affinità) sulla membrana apicale delle cellule epiteliali

A agisce su un bersaglio della membrana basolaterale

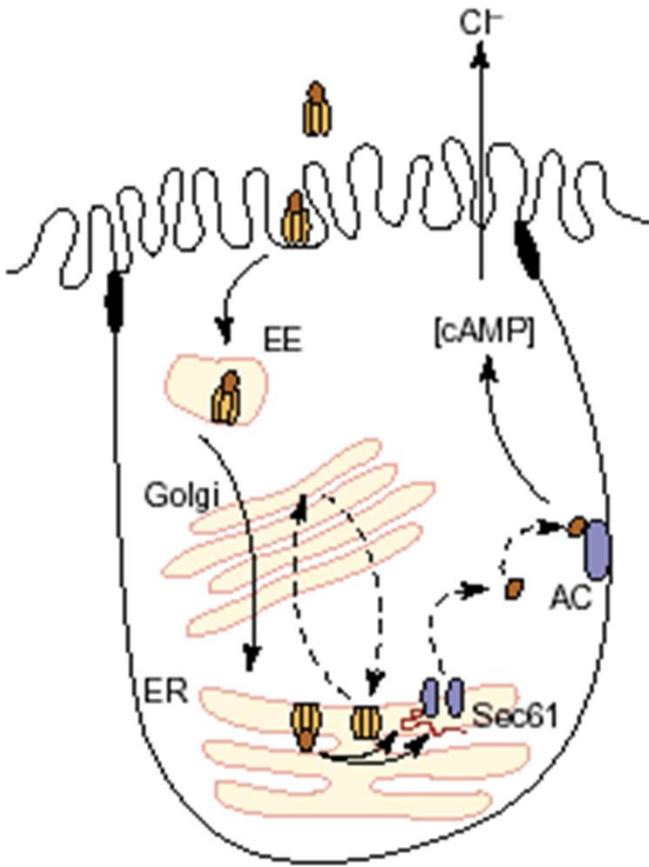


A SUBUNIT

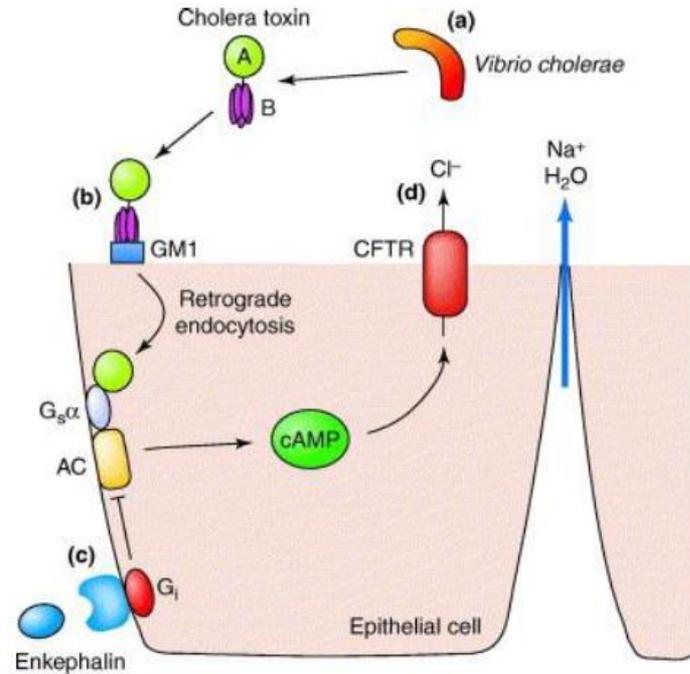


B SUBUNIT





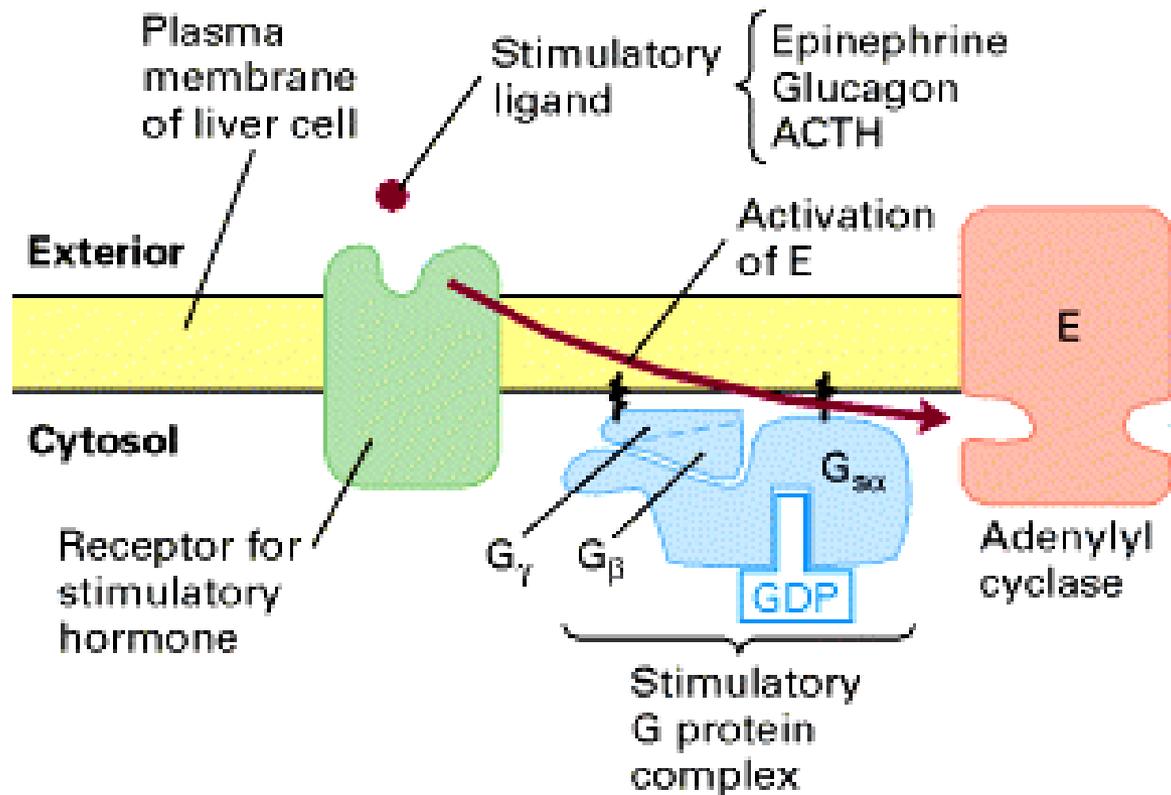
- key:
- CT
 - Folded A1-chain
 - Unfolded A1-chain
 - Tight junction



TRENDS in Pharmacological Sciences

Il bersaglio molecolare dell'azione catalitica della subunità A della tossina colerica è G_s

Il bersaglio molecolare dell' azione catalitica della subunità A1 della tossina colerica è Gs



La subunità A1 della tossina colerica ADP-ribosila la $G_{s\alpha}$ bloccandola nel suo stato attivo

