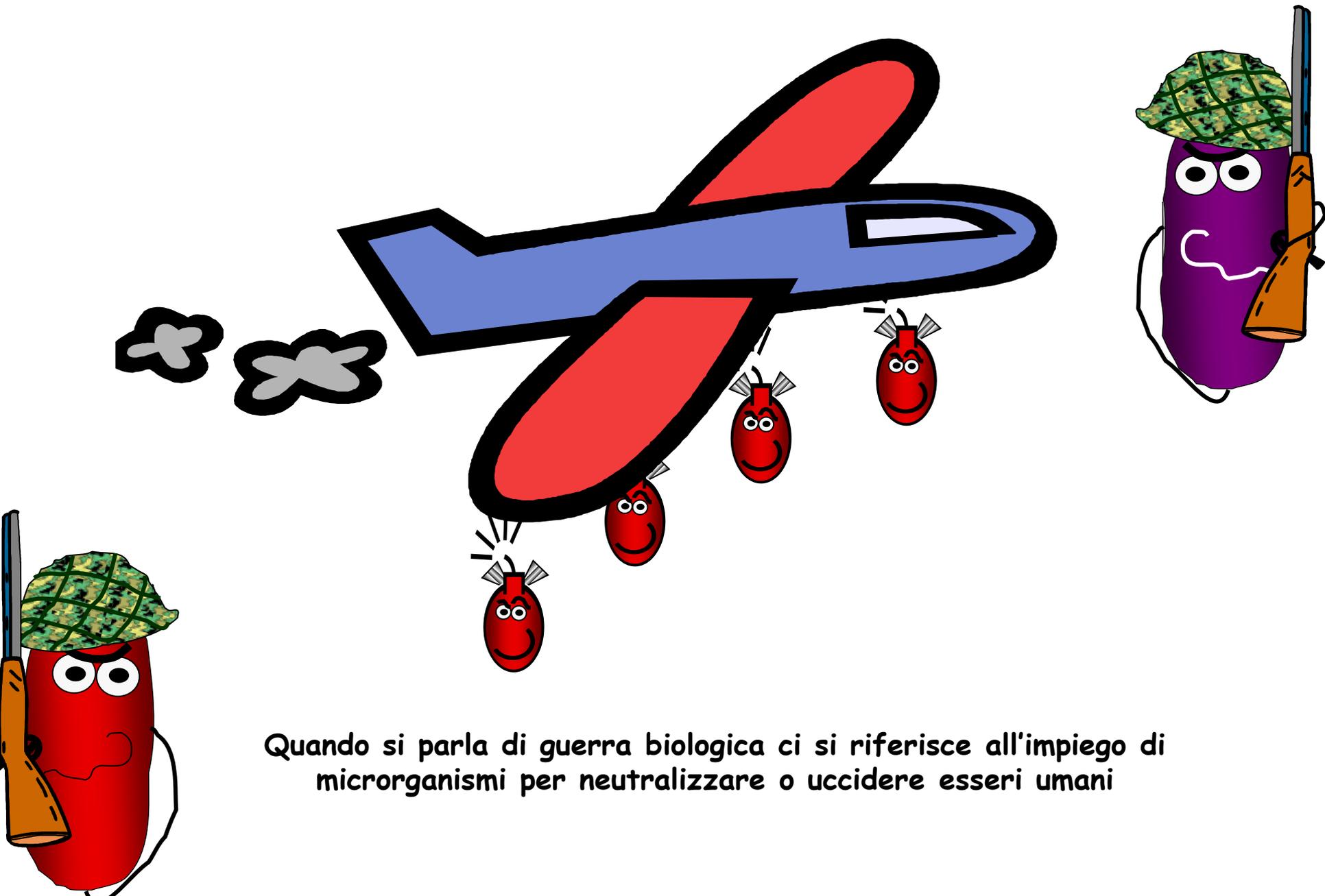


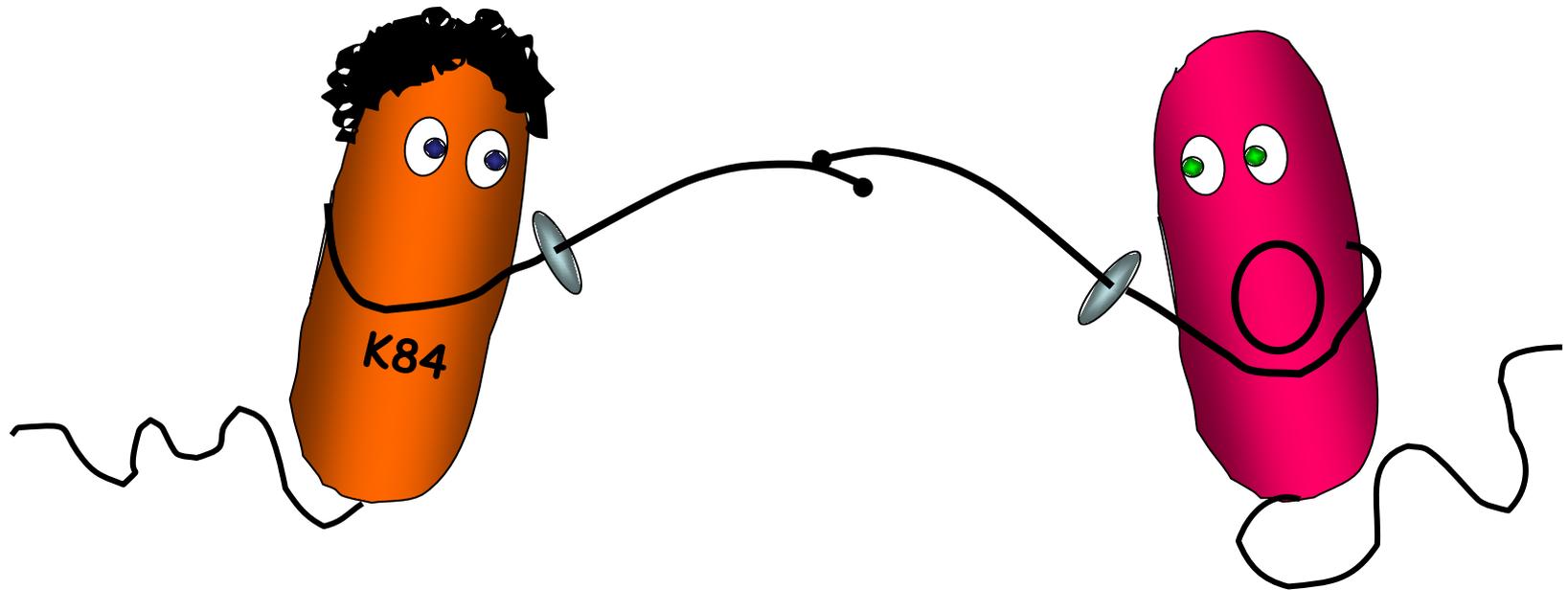
USO IMPROPRIO DEI MICRORGANISMI: LA GUERRA BIOLOGICA



Quando si parla di guerra biologica ci si riferisce all'impiego di microrganismi per neutralizzare o uccidere esseri umani

Questo tipo di strategia
non è solo umano

Lotte fratricide tra gli
Agrobacterium



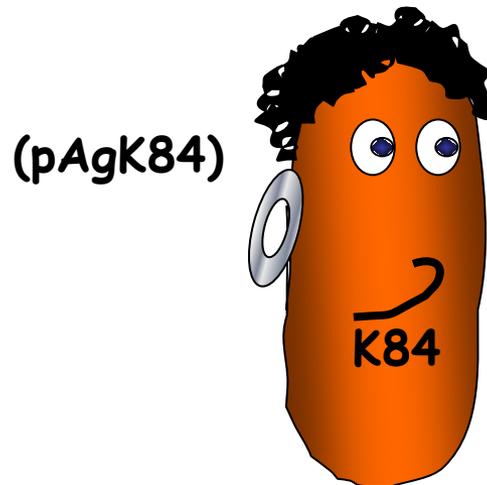
I ceppi di *A. tumefaciens* che producono nopaline, possono
essere controllati con... armi biologiche

un ceppo non patogeno (K84) previene l'infezione da parte dei ceppi patogeni

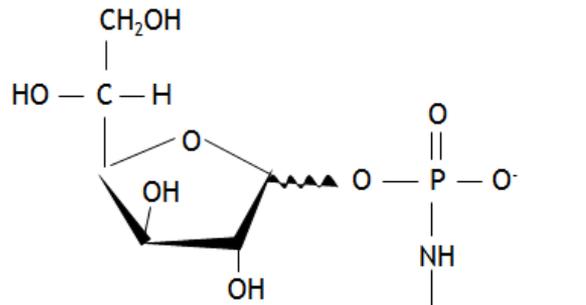
**K84 agisce contro i ceppi che producono nopalina
e agrocinopina-A (la maggioranza)**

**Ma non su quelli che producono octopina-
agropina, o su specie diverse**

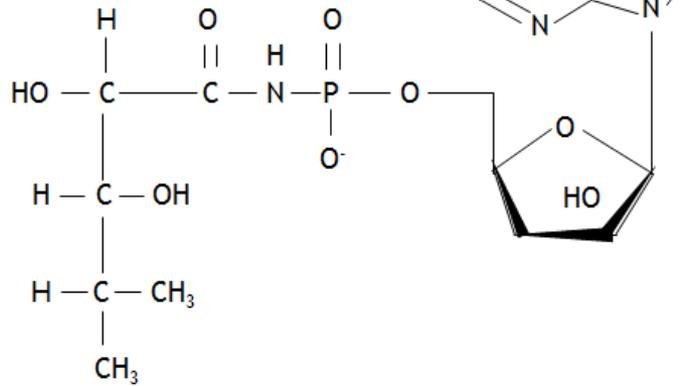
**I geni che conferiscono la capacità di sintetizzare l'inibitore
(agrocin 84) si trovano sul plasmide pAgK84**



**L'agrocin 84 viene riconosciuta dall'agrocinopina permeasi, prodotta dai ceppi
di *A. tumefaciens* che possiedono un plasmide del tipo "nopalina"**

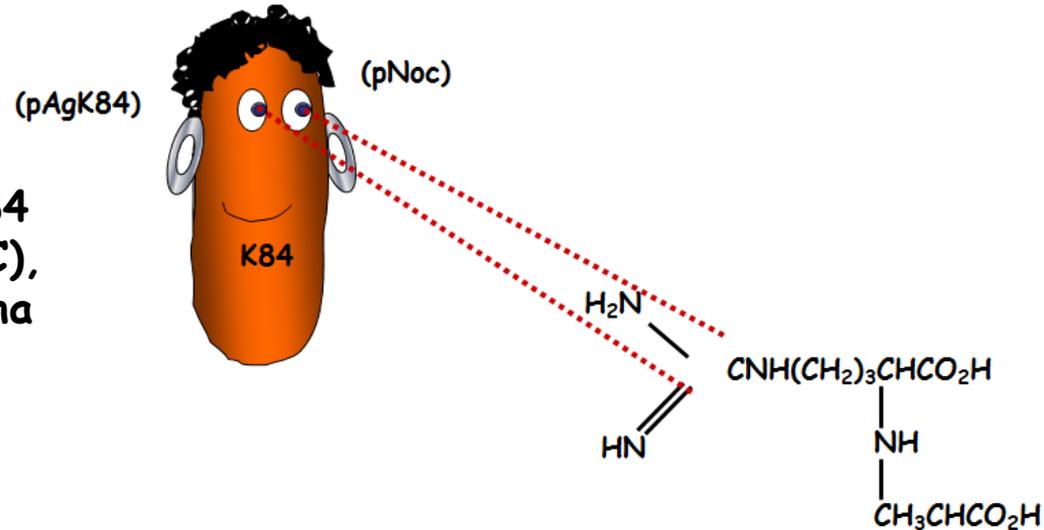


L'agrocina-pirasi riconosce il gruppo glucosidico fosfato dell' Agrocina 84 e la introduce nella cellula batterica

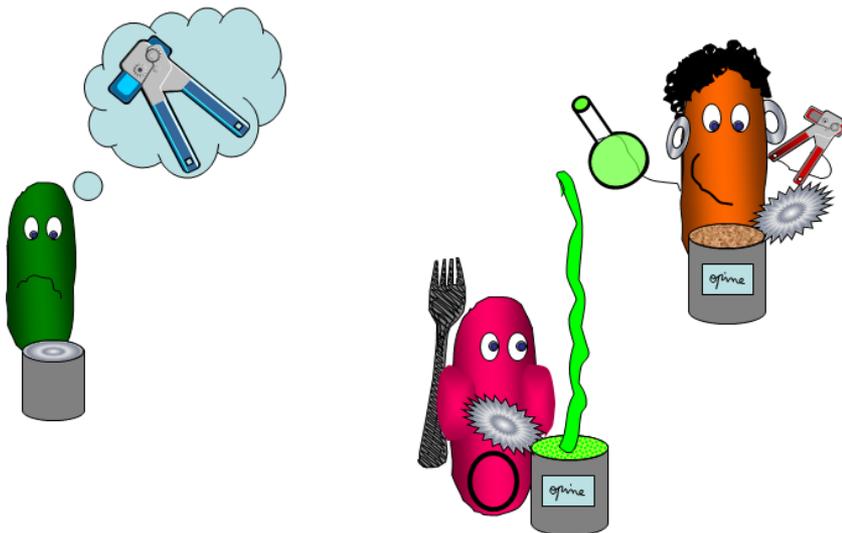


L'agrocina 84 è un analogo dell'adenina con due gruppi laterali: una volta nella cellula blocca la sintesi del DNA

Oltre al plasmide pAgK84), il ceppo K84 contiene anche un altro plasmide (pNOC), che gli permette di utilizzare la nopalina



In un sito infetto, in condizioni naturali, quindi il ceppo K84 prolifera approfittando della fonte di nutrienti dedicata del patogeno



e contemporaneamente producendo l'agrocina 84 che lo uccide

Ma anche per l'uomo non è una novità...

Ci sono descrizioni già in molti autori greci

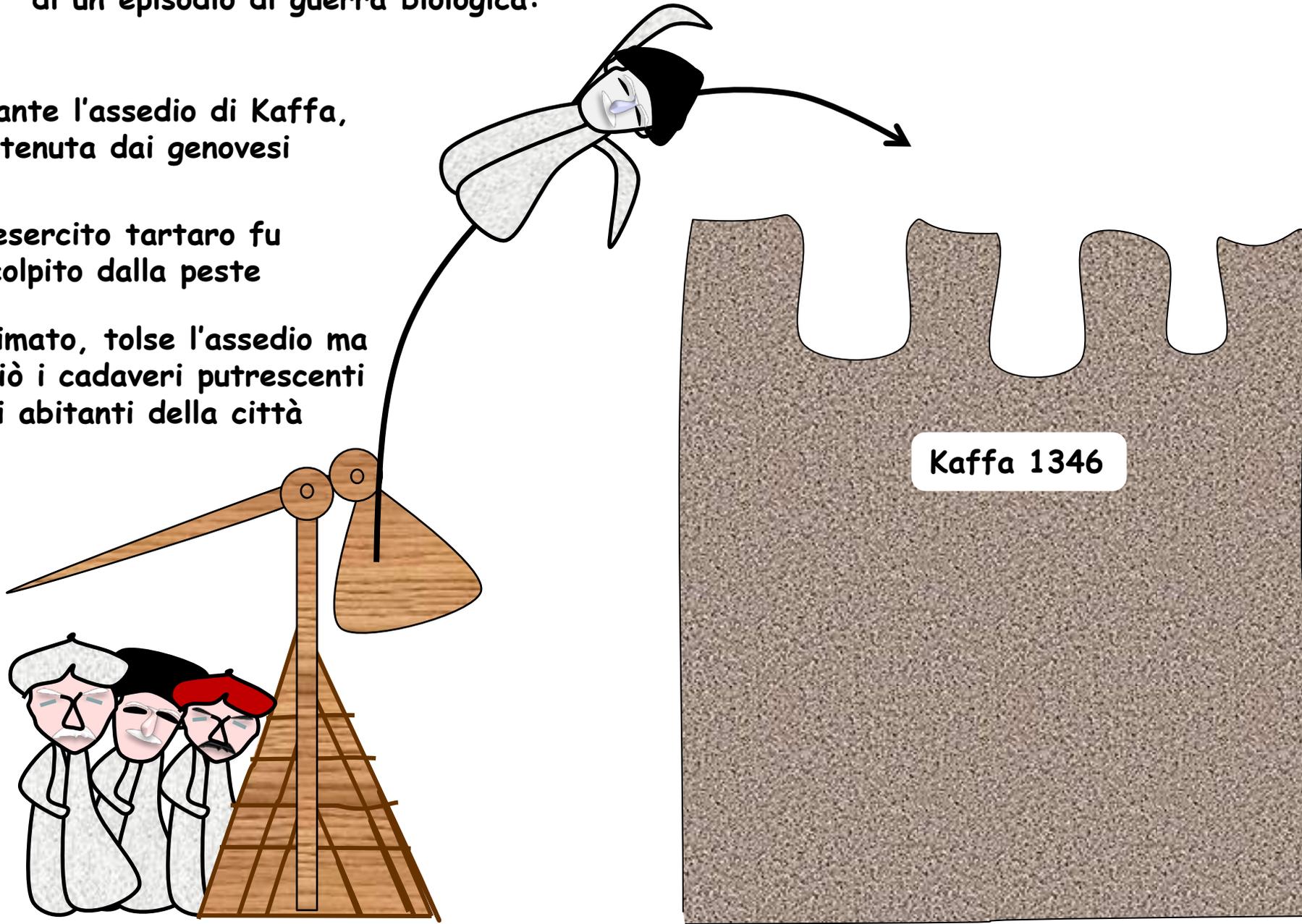


In uno scritto del 1348 del genovese Matteo Villani troviamo il primo resoconto dettagliato di un episodio di guerra biologica:

Durante l'assedio di Kaffa, tenuta dai genovesi

L'esercito tartaro fu colpito dalla peste

Decimato, tolse l'assedio ma lanciò i cadaveri putrescenti sugli abitanti della città



Il primo tentativo deliberato di cui si sia a conoscenza risale al 1763

**Durante la guerra franco-indiana
(guerra dei 7 anni in America)**



Lord Jeffrey Amherst

**Lord Amherst fece pervenire deliberatamente
coperte usate in un ricovero per affetti da
vaiolo, agli indiani Delaware alleati dei francesi**



**Il tentativo ebbe effetti marginali ma è considerato il
precedente storico di tutti quelli che seguirono**

**Negli anni precedenti la II guerra mondiale e
nel corso di questa**

**Una divisione ufficiale (731) dell'esercito imperiale
giapponese effettuò esperimenti, dall'infezione alla
vivisezione, su lotti di cinesi nella manciuria occupata**

Questi esperimenti uccisero circa 10.000 persone



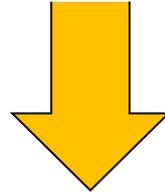
Shiro Ishii



**Nell'Ottobre del 1940 i giapponesi
lanciarono sacchetti di pulci
infette da peste su Ningbo and
Quzhou nella provincia di Zhejiang**

**Rilasciarono ratti infettati,
contaminarono pozzi e distribuirono
cibo intossicato**

Verso la fine della guerra i capi dell'unità 731 distrussero gli stabilimenti e i documenti, barattando le proprie conoscenze con l'immunità



Alla fine della II guerra mondiale USA e URSS erano ben avviati verso lo sviluppo di armi biologiche

Che proseguì nel clima di tensione del periodo della guerra fredda

Con lo studio di dozzine di batteri, virus e tossine

mezzi sofisticati per il rilascio

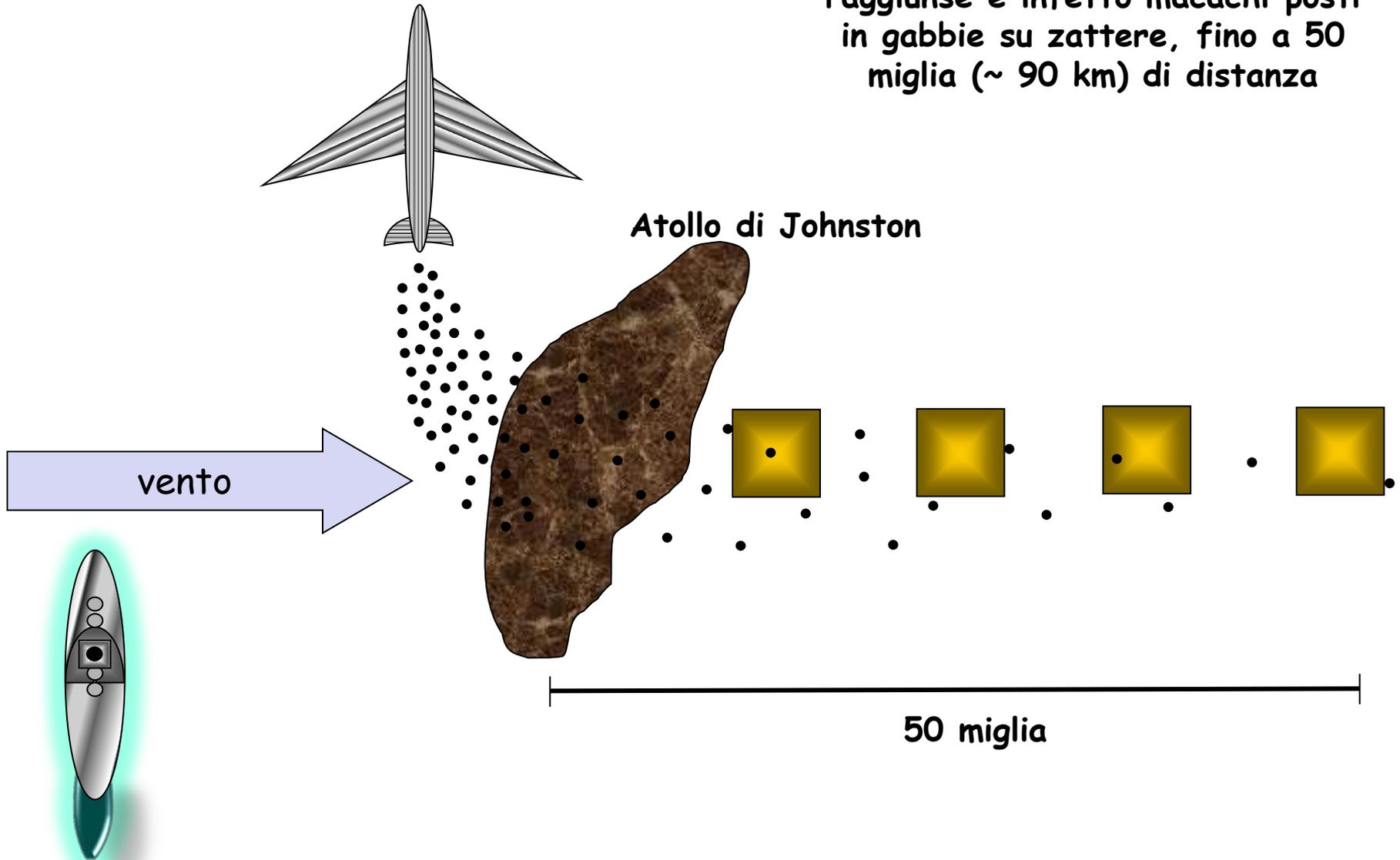
dispersione in aerosol

con bombe

testate per missili

Nel 1968 gli USA provarono l'efficacia della dispersione di un agente biologico (spore di antrace) nel Pacifico del Sud

L'agente, rilasciato da un jet, raggiunse e infettò macachi posti in gabbie su zattere, fino a 50 miglia (~ 90 km) di distanza



**Nel 1965 Nixon dichiarò la fine delle ricerche e decretò
che gli stock fossero distrutti**

**l'edificio 470 venne sigillato: che fare con un
edificio pieno di spore di antrace?**

Quarantena, 3 tentativi di decontaminazione

**edificio sigillato + gas di paraformaldeide e controllo su
1500 siti nell'edificio.**

**1971, dopo l'ultimo controllo, autorizzata rioccupazione,
ma non distruzione**

**Per via della possibilità che alcune spore potessero
trovarsi in crepe o fessure non campionate**

**L'edificio fu forzatamente demolito, perché ormai
cadente, nel 2003..**

edificio 470 "torre dell'Antrace", sette piani a Fort Detrick, nel Maryland.



1953-1965 colture di *Bacillus anthracis*, in due fermentatori, della capacità di 2500 galloni ciascuno e dell'altezza di tre piani

Un potente sistema di ventilazione manteneva una pressione negativa nell'edificio



Nel 1972 più di 100 nazioni tra cui USA e URSS firmarono il trattato sulle armi biologiche e tossiche, il primo a bandire un'intera categoria di armi

Il trattato vietava il possesso di agenti biologici mortali tranne che per ricerche destinate a scopi difensivi

Non erano previsti controlli sull'applicazione e, 7 anni più tardi..



1979: un incidente nello stabilimento per le armi biologiche a Sverdlovsk, provoca il rilascio di spore di antrace

Nonostante l'immediata messa in sicurezza della zona, 77 persone si ammalarono di carbonchio polmonare e 66 morirono

la causa dichiarata (avvelenamento da cibo), fu smentita da una successiva ispezione che rivelò tracce evidenti di inalazione di spore nei polmoni delle vittime



**1989 il microbiologo Vladimir Pasechnik
ottiene asilo in Inghilterra**

**Le sue testimonianze ("superpeste" geneticamente
modificata - antrace resistente agli antibiotici)**

**Furono successivamente confermate da
altri scienziati fuoriusciti dall'URSS**



Ken Alibek



Sergei Popov.

**Il programma sovietico coinvolgeva decine di migliaia di specialisti.
Negli anni 90 molti di loro sono diventati agenti liberi e non ci sono
notizie sul loro attuale impiego**

**Al momento, alcuni dei paesi che si pensa
probabile proseguano programmi per lo sviluppo di
armi biologiche sono:**

Iran **Iraq** **Laos**

Cina **Corea del Nord** **Vietnam**

Cuba **Bulgaria** **Egitto**

Israele **Bulgaria** **Siria**

India **Sud Africa** **Libia**

Etc...

Tentativi da parte di fanatici

1984 i seguaci del guru Bagwan Shree Rajneesh stanziati nelle campagne dell'Oregon

Avvelenarono 750 persone (45 ospedalizzate) contaminando insalate con *Salmonella*

Scopo: impedire l'affluenza al voto nelle imminenti elezioni

Questo primo atto di bioterrorismo passò quasi inosservato: non così quello che circa 10 anni più tardi colpì Tokio

1995: la setta religiosa apocalittica «Aum Shinrikyo» rilasciò gas nervino nella metropolitana, uccidendo 12 persone e danneggiandone migliaia

Tra il '93 e il '95 aveva effettuato altri tentativi con spray al botulino e all'antrace: l'insuccesso probabilmente legato a insufficiente purificazione degli agenti usati

2001: lettere all'antrace «Amerithrax»

09-11-01
YOU CAN NOT STOP US.
WE HAVE THIS ANTHRAX.
YOU DIE NOW.
ARE YOU AFRAID?
DEATH TO AMERICA.
DEATH TO ISRAEL.
ALLAH IS GREAT.

09-11-01
THIS IS NEXT
TAKE PENACILIN NOW
DEATH TO AMERICA
DEATH TO ISRAEL
ALLAH IS GREAT

L'intenzione era probabilmente quella di creare panico, piuttosto che di uccidere realmente

Si ritiene che il responsabile fosse qualcuno impiegato all'interno di laboratori militari,

Lettere sigillate

Espresso riferimento all'antrace

Invito ad assumere penicillina

Ceppo "wild"

Ma comunque...

22 persone infettate, 5 morte

Tra le vittime alcuni impiegati delle poste che avevano maneggiato le lettere in transito

Alcune spore vennero trovate sulle tastiere negli uffici dove erano state aperte le lettere.

Decontaminazioni: diossido di cloro gassoso negli edifici sigillati

**ufficio postale di Brentwood a Washington 130 M\$
ufficio postale di Hamilton, nel New Jersey 65 M\$.
uffici del Senato 27 M\$**

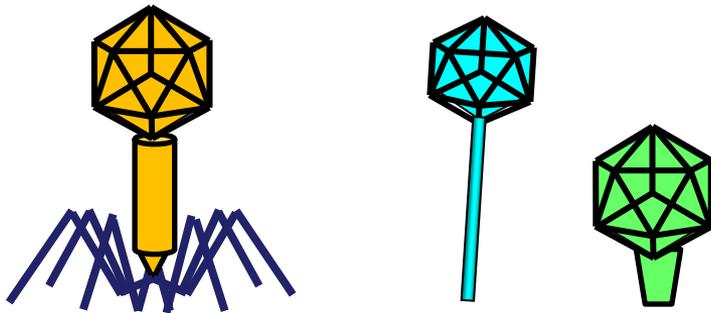
furono necessari più di due anni per dichiarare agibili alcuni degli edifici

La necessità aguzza l'ingegno alcune delle strategie proposte per la decontaminazione delle spore di antrace...

Raggi X penetrano nei materiali soffici (es. tappezzerie) e nelle fessure

+

UV-C 2-3h di esposizione e non lasciano residui o fumi tossici



Altri studi contempano la possibilità di usare Le endolisine di batteriofagi +

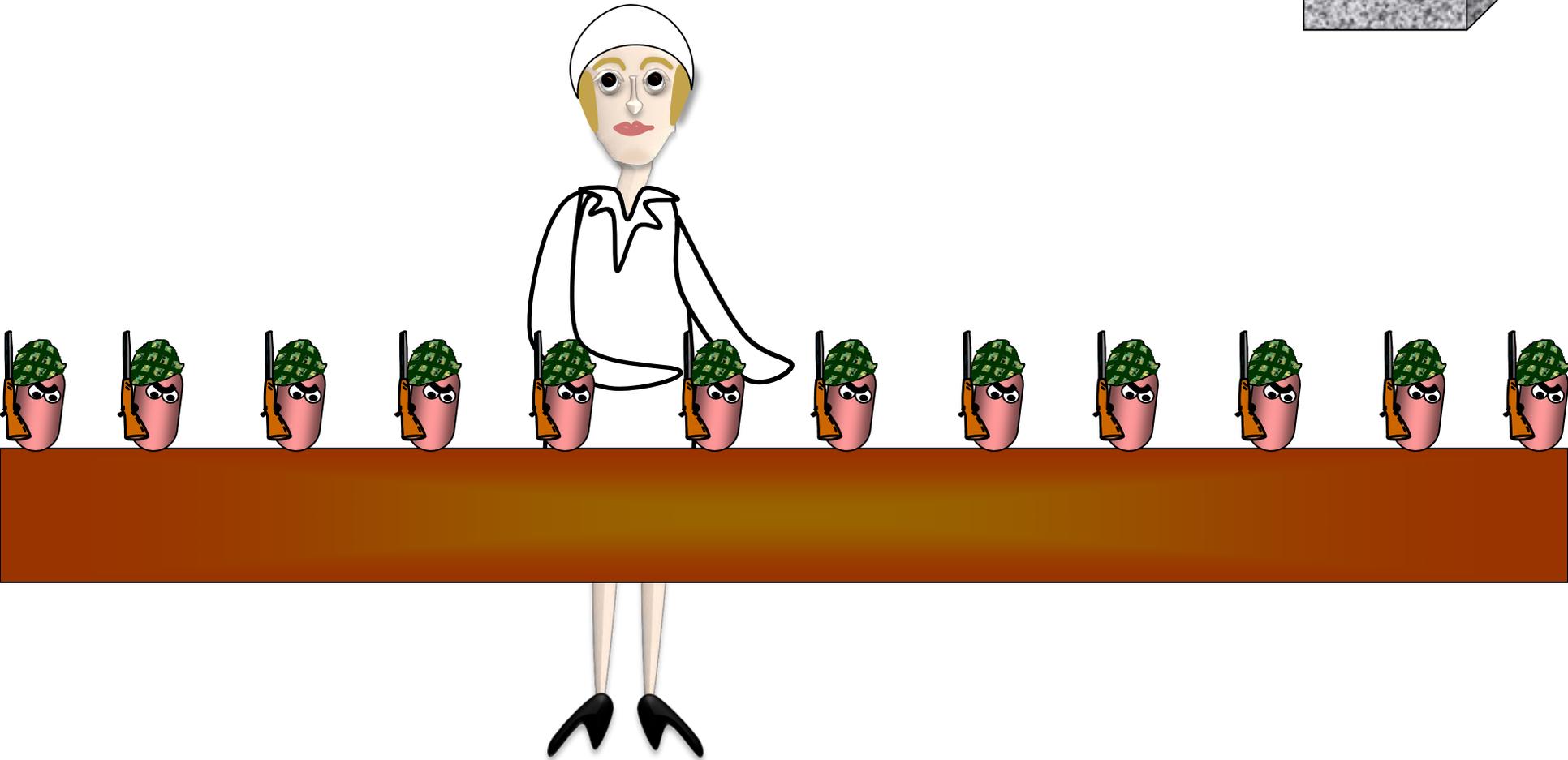
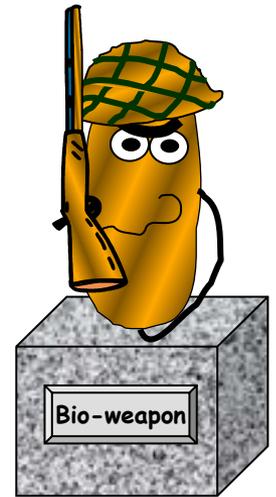


Un composto che induca le spore alla germinazione

caratteristiche "ideali" di un'arma biologica

facile da produrre

Un'arma biologica è necessaria in quantità notevoli (tonnellate) e deve quindi essere possibile produrne grosse quantità con costi ragionevoli



**EFFICIENTE
nel..**

NEUTRALIZZARE

Guerra biologica

ELIMINARE

bioterrorismo



Facili da liberare



sicura per chi intende usarla

NEUTRALIZZANTI

Scopo: debilitare quanto più possibile le truppe, disorganizzandole e distogliendo risorse



Francisella tularensis
(tularemia)



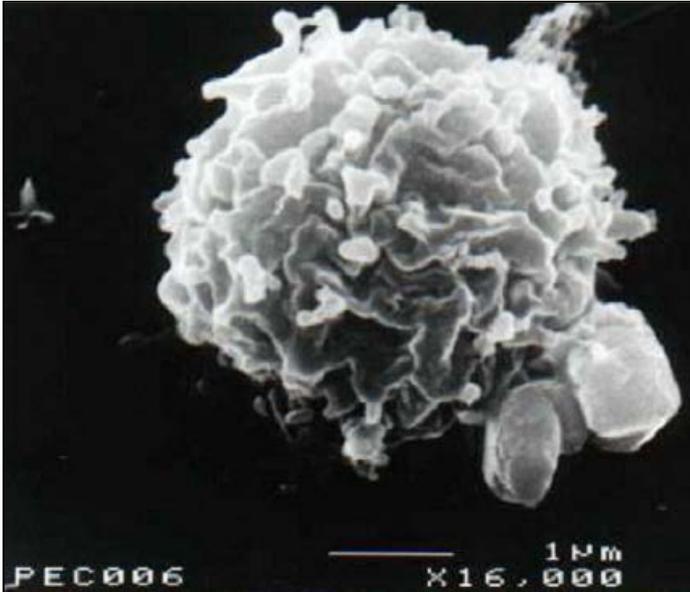
Enterotossina
stafilococcica

virus dell'encefalite equina
venezuelana

Coxiella burnetii
(agente della febbre Q)

**Tularemia: zoonosi endemica in molti paesi
(Nord America, Messico, Europa, Asia)**

**i portatori sono animali selvatici, in modo
speciale lepri e conigli, e alcuni insetti**



**La tularemia è fortemente invalidante
ma la mortalità non è elevatissima**

***F. tularensis* ha un alto potere infettante: la penetrazione nella cute o nelle
mucose o l'inalazione di 50 cellule è sufficiente a provocare l'infezione**

**IL LIMITE È IL TEMPO DI INCUBAZIONE,
VARIABILE E POCO PREVEDIBILE**

Ci sono molti tipi di tularemia

Forma Ulceroghiandolare/Ghiandolare (+ comune)
→ pelle e linfonodi → ulcerazioni cutanee
i linfonodi possono suppurare.

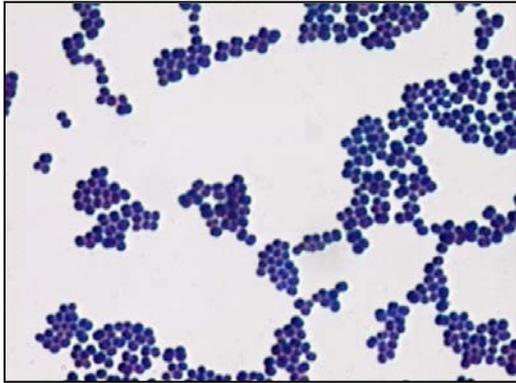


**Forma Polmonare: inalazione diretta di materiale infetto/
disseminazione ematica dei microrganismi**

**Forma Tifoidea: qualsiasi tipo di
esposizione**

**Forma Faringea: cibo, acqua o
goccioline infette**

**Forma Oculoghiandolare: congiuntiva (dita sporche, schizzi
o aerosol di materiale infetto)**



Enterotossina "B"
Staphylococcus aureus

Sintomi dopo 1-6h dall' ingestione

Provoca febbre elevata per
diversi giorni

Per tutto il tempo corrispondente all'incubazione della febbre
encefalica Venezuelana

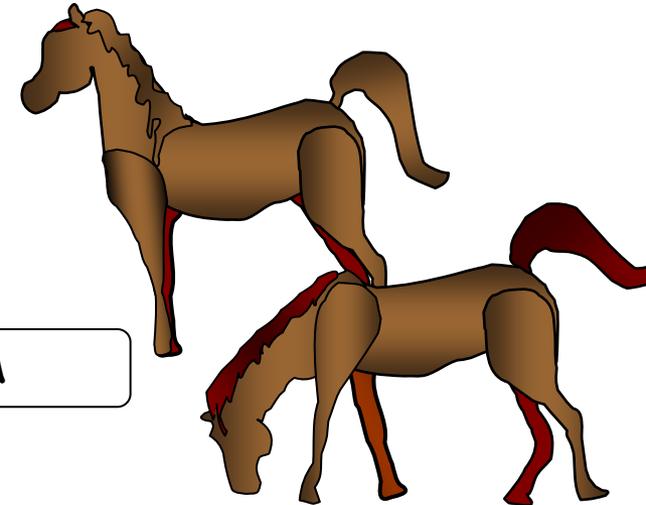
HANTAVIRUS

Malattia degli equini, può essere
trasmessa all'uomo dalle zanzare

Provoca febbre alta, vomito,
diarrea, tosse che dura diversi
giorni e sono seguiti da

LETARGIA

DEBOLEZZA



COXIELLA BURNETII

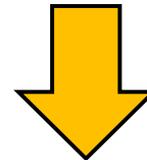
parassita intracellulare, si moltiplica
all'interno del fagolisosoma

Provoca la Febbre Q (queer= strana) con sintomi variabili,
insorgenza dopo 10-12 giorni

L'infezione avviene per inalazione di aerosol
(resiste anche un anno nel pulviscolo)
occasionalmente è trasmessa da zecche



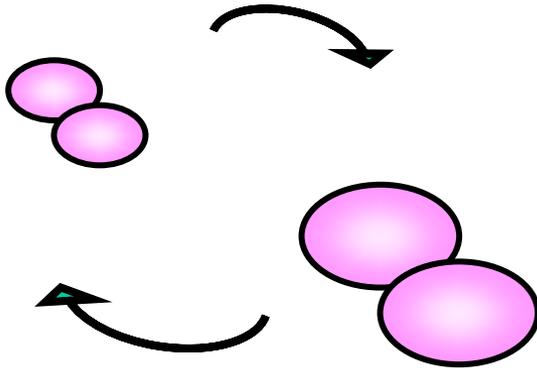
RESERVOIR NATURALE: BESTIAME



RILASCIO (SOPRATTUTTO
PLACENTE)

Il particolare ciclo replicativo di *Coxiella* rende facile immagazzinarla e conservarla

forme piccole non replicative, di resistenza e trasmissione



forme grandi intracellulari replicative

Le caratteristiche della replicazione spiegano l'interesse da parte di

Chi possa disporre di laboratori sofisticati

Chi si trovi in zone in cui la pastorizia è ben rappresentata e *Coxiella* sia endemica tra gli animali

COME ARMA BIOLOGICA PROVOCA FEBBRE ELEVATA, MAL DI TESTA, SINTOMI RESPIRATORI ACUTI, PER CIRCA TRE SETTIMANE

LETALI

```
graph TD; A[LETALI] --> B[NON INFETTIVI]; A --> C[INFETTIVI]; B --> D[SCOPO: UCCISIONI MULTIPLE  
ASSENZA DI RISCHIO DI EPIDEMIA]; D --> E[Clostridium botulinum (o la sua tossina)]; D --> F[Bacillus anthracis (carbonchio)]; C --> G[SCOPO: UCCISIONI DI MASSA]; G --> H[virus Ebola]; G --> I[Poxvirus (vaiolo)]; G --> J[Yersinia pestis (peste)];
```

NON INFETTIVI

INFETTIVI

**SCOPO:
UCCISIONI MULTIPLE
ASSENZA DI RISCHIO DI EPIDEMIA**

Clostridium botulinum (o
la sua tossina)

Bacillus anthracis
(carbonchio)

**SCOPO:
UCCISIONI DI MASSA**

virus Ebola

Poxvirus
(vaiolo)

Yersinia pestis
(peste)

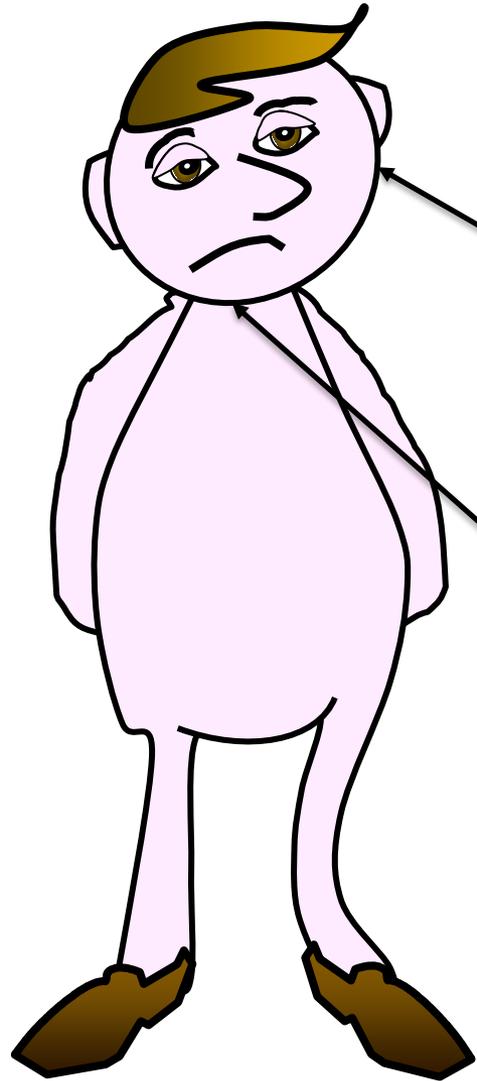
I sintomi compaiono in genere dopo 12-36 ore dall'ingestione. La gravità è inversamente proporzionale al tempo di incubazione (dose-dipendente)

I primi segni neurologici sono:

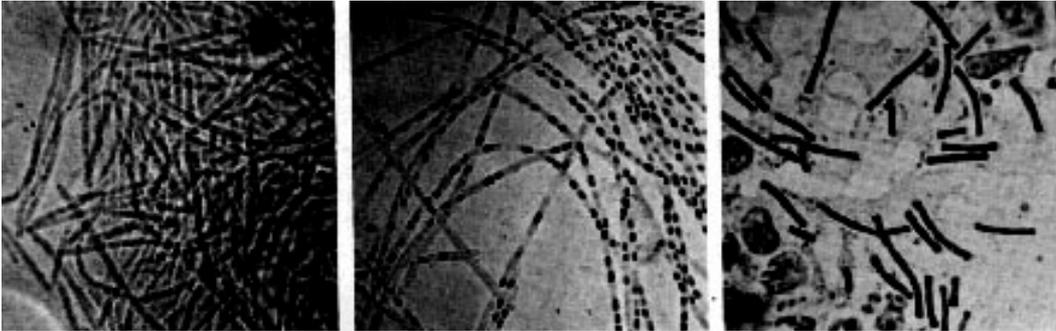
ptosi palpebrale, diplopia,

disfonia,
perdita del riflesso della deglutizione

Nei pazienti non trattati la mortalità è del 70-80%
(insufficienza respiratoria acuta)



carbonchio (*B.anthraxis*)



Robert Koch's original photomicrographs of *Bacillus anthracis*.

La forma polmonare (inalazione di spore) ha una mortalità molto elevata

Le spore, fagocitate dai macrofagi alveolari, germinano

Le forme vegetative si moltiplicano rapidamente → sangue

La forma più comune è quella cutanea, con una pustola nera da cui deriva il nome della malattia.



Nel sangue la CO_2 induce il regolatore AtxA da cui dipende la produzione della tossina tripartita (A+B) codificata da geni plasmidici (pX01)

II) antigene protettivo (PA) si lega ai recettori sulle cellule e lega

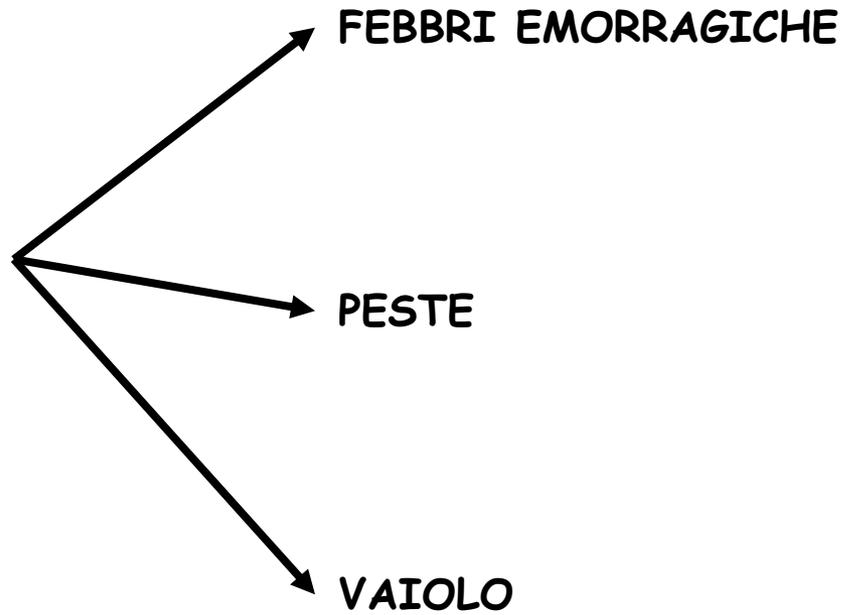


I) fattore dell'edema (EF) causa il gonfiore delle lesioni, disorganizza il signaling cellulare, impedendo al sistema immunitario di riconoscere e eliminare i macrofagi infetti

III) Fattore Letale (LF) essenziale per gli effetti letali della tossina
Provoca la iperproduzione di mediatori come TNF o IL-1 → morte cellulare

LETALI CONTAGIOSI

SCOPO:
DISTRUZIONE DI MASSA



FEBBRI EMORRAGICHE Ebola, Marburg..

Mortalità circa 95%

Epidemia in genere
autolimitante

Reservoir naturale
sconosciuto

PESTE

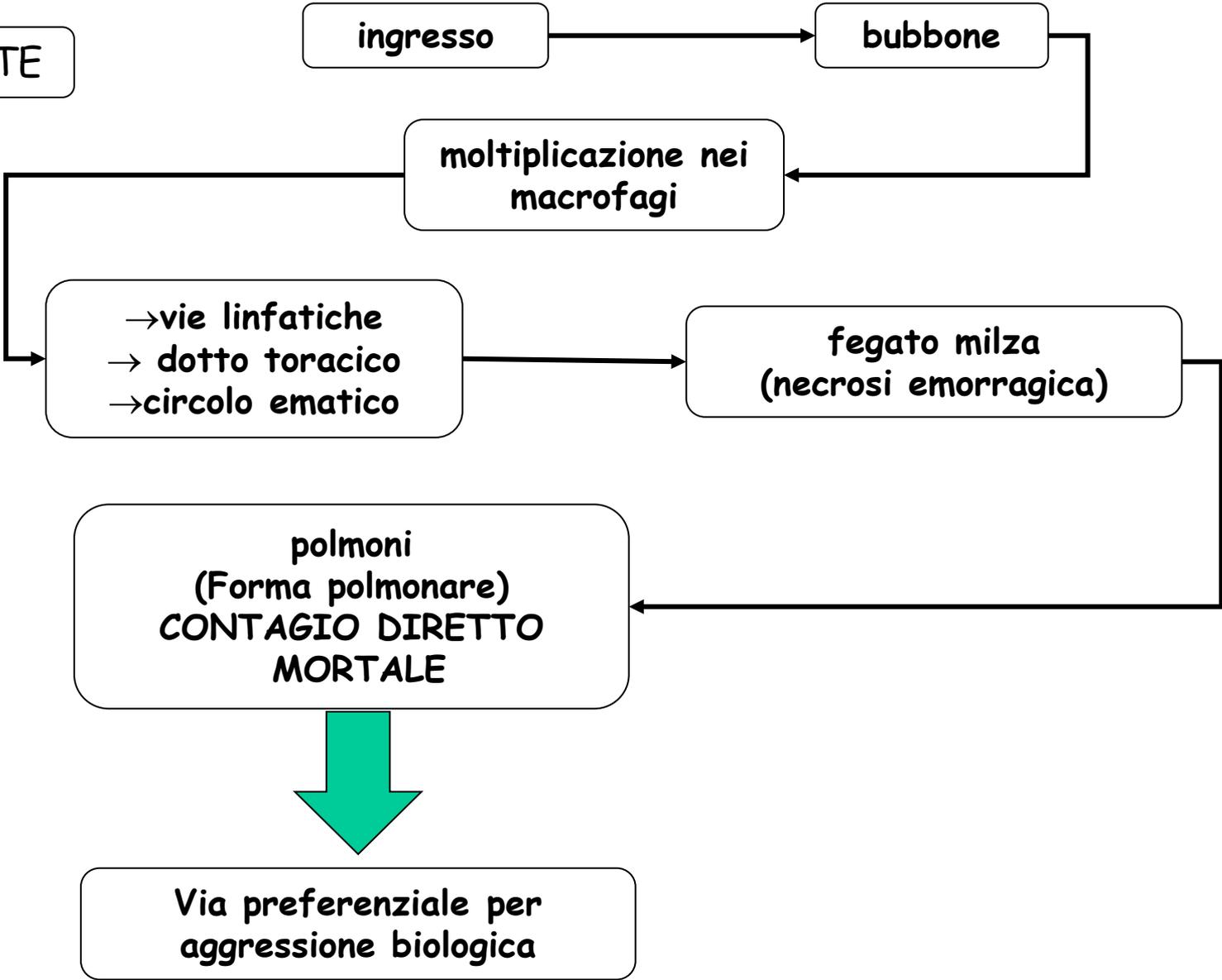
Trasmissione uomo-uomo
relativamente difficile, tranne che
per la forma polmonare

Mortalità circa 92%

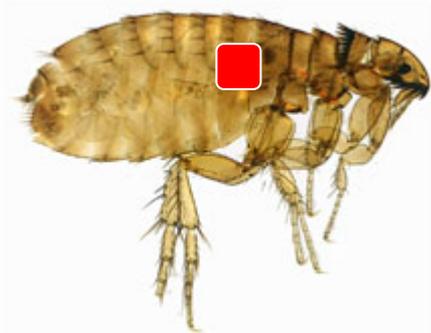
Ciclo selvatico: (trasmissione accidentale
da roditori selvatici all'uomo)

**Ciclo urbano, pandemico (ratto- pulce-uomo): malattia
pandemica esplosiva con alta mortalità che ha ucciso 100 milioni
di persone nel VI secolo e 25 milioni nel XIV**

LA PESTE

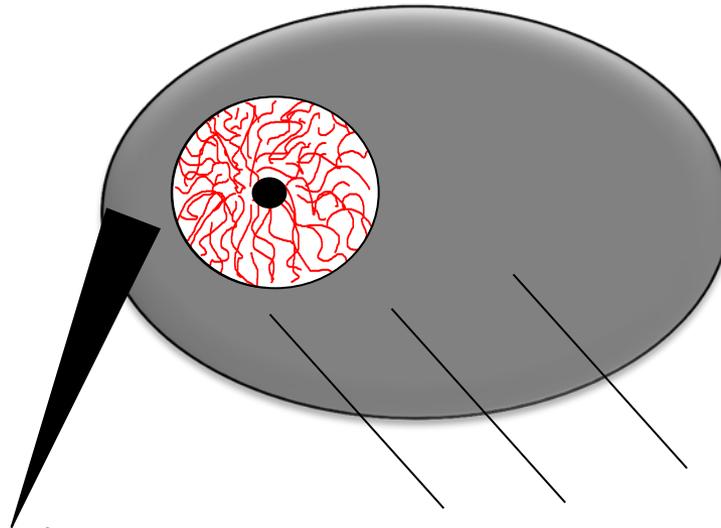


***Y.pestis* è un patogeno dei roditori e viene trasmessa dalle pulci che si infettano durante il pasto**



I batteri si moltiplicano nel tratto intestinale dell'insetto e lo bloccano provocando la coagulazione del sangue ingerito

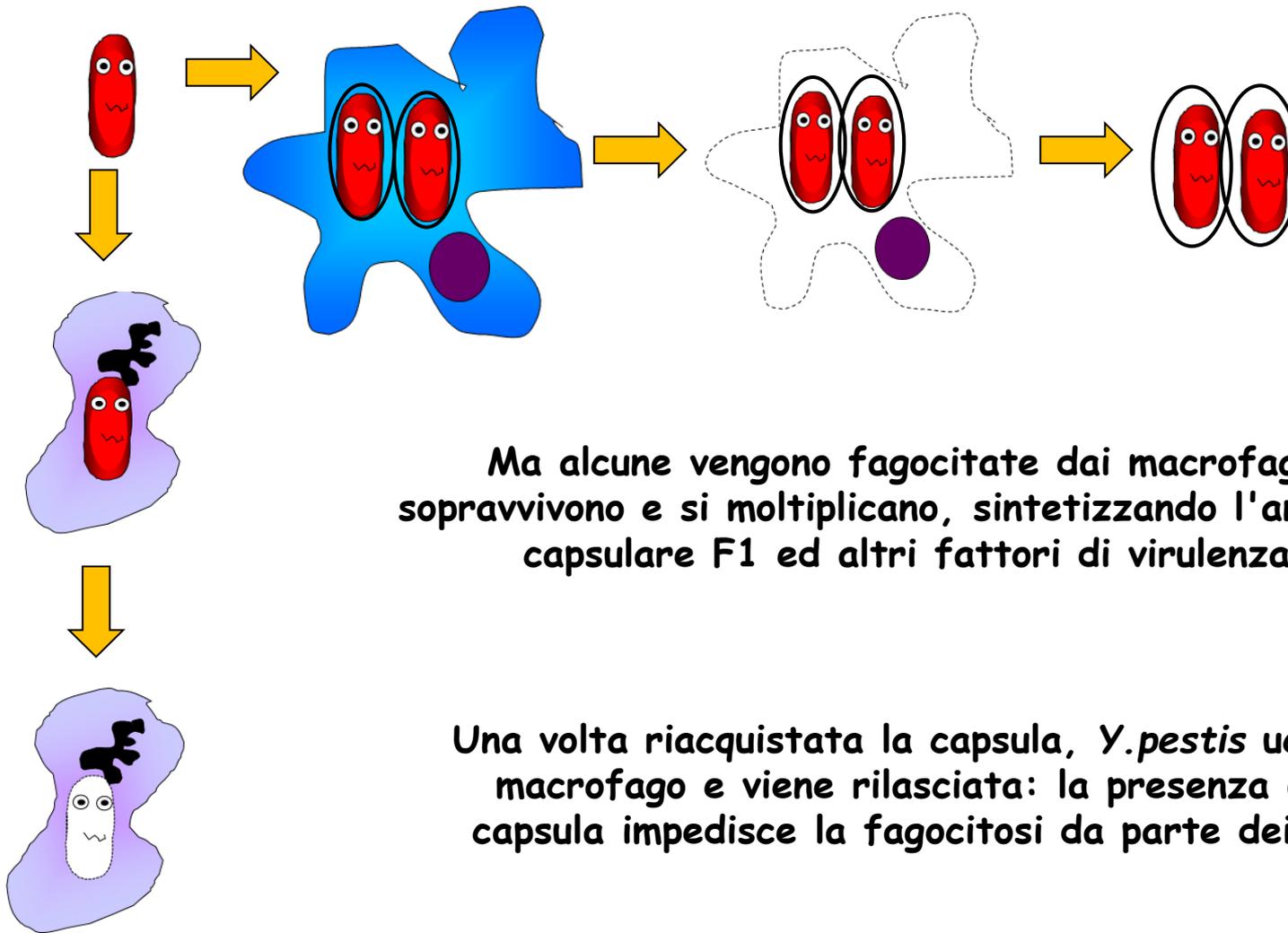
La prima conseguenza è che la pulce ha fame: cerca di nutrirsi ma non può saziarsi



Diventa quindi molto aggressiva e morde più spesso

Mentre punge, rigurgita il sangue che non può ingoiare, trasferendo i batteri al nuovo ospite

Moltiplicandosi nell'insetto, le cellule batteriche perdono la capsula e, una volta nell'ospite umano, sono fagocitate e distrutte dai PMN



Ma alcune vengono fagocitate dai macrofagi; sopravvivono e si moltiplicano, sintetizzando l'antigene capsulare F1 ed altri fattori di virulenza

Una volta riacquistata la capsula, *Y. pestis* uccide il macrofago e viene rilasciata: la presenza della capsula impedisce la fagocitosi da parte dei PMN

Entro poche ore l'infezione raggiunge il torrente ematico, coinvolgendo fegato, milza e polmoni

Piccoli coaguli nei capillari provocano aree di necrosi che hanno motivato l'appellativo di "Peste Nera" o "Morte Nera"



VAIOLO

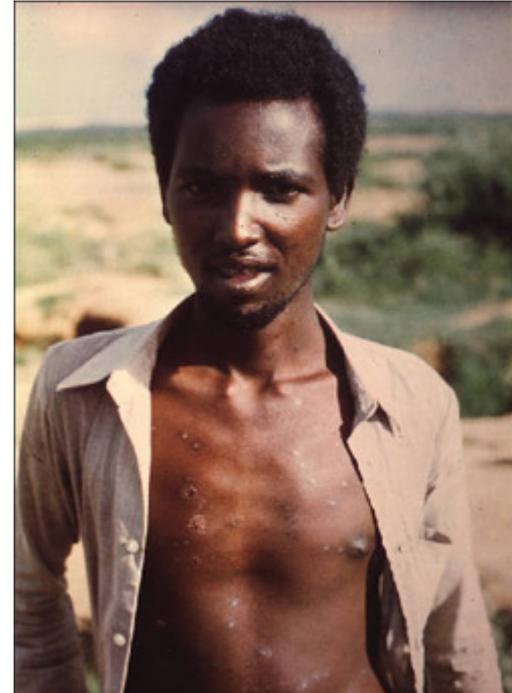
**Il + efficiente anche se con
la mortalità + bassa (30%)**

**Messico e America
centrale (dopo Cortez)**

**Circa 12 milioni di morti
in circa 100 anni (90%
della popolazione)**

**New England (1600 → 1647)
Nativi americani 72.000 → 8600**

**Uroni: 2/3 della popolazione
morti in 8 anni**



**Questo ragazzo somalo è stata
l'ultima persona colpita dal vaiolo di
cui si sia a conoscenza (1977)**

"MIGLIORIE BIOTECNOLOGICHE"

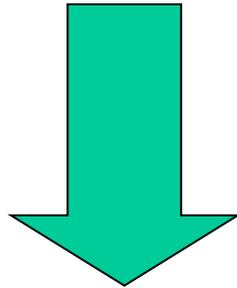
**In genere: Resistenza agli
antibiotici**

**Antrace: preparazione di spore
con dimensioni uniformi e tali da
poter essere facilmente inalate
(circa 5 micron)**

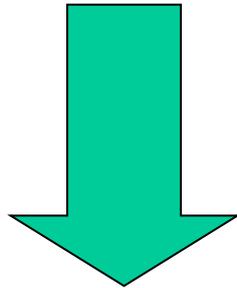
**Antrace: trattamento delle spore
per evitarne l'ammassamento,
neutralizzando le cariche
superficiali**

Creazione di nuovi patogeni "Sclerosi multipla istantanea"

Geni per peptidi di mielina di topo,
inseriti in *Legionella pneumoniae*

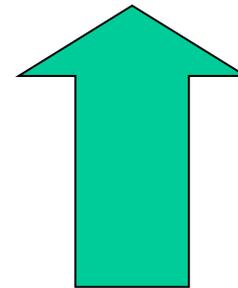


Infezione, produzione dei peptidi da
parte del batterio



Guarigione dalla forma respiratoria

Dopo qualche giorno: sintomi di
danno cerebrale, paralisi, morte
(quasi 100%)

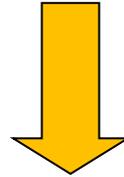


Australia: scopo della ricerca limitare la fertilità dei topi per contenerli

Hanno ingegnerizzato il virus del vaiolo murino



Inserendovi il gene per ZP3 proteina della zona pellucida dell'ocita murino

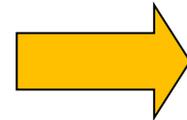


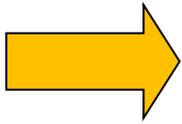
blanda infezione → guarigione → anticorpi anti-virus e anti-ocita



Femmine sterili ma disponibili all'accoppiamento

Primi risultati buoni su una linea di topi ma non su altre

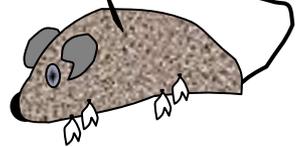




per allargare lo spettro di
efficacia

Aggiunto il gene per IL-4 (> Ab; <Tk)

+ZP3+IL4



Topi sensibili

"sorpresa"



Topi di controllo, vaccinati

L'interleuchina 4 aveva disattivato tutte le difese,
annullando anche l'effetto della vaccinazione

L'inserzione di un singolo gene potrebbe trasformare
un virus innocuo in un agente mortale