

## I Funghi:

Rilevanza in ambito medico trascurata fino a tempi recenti. Negli ultimi 30 anni hanno acquisito importanza in seguito all'aumento di pazienti immunocompromessi dovuti all'epidemia di HIV e all'aumento dei trapianti.

L'infezione fungina per eccellenza che indica lo stato di immunocompromissione è l'infezione da **candida albicans**, lievito che si trova normalmente su cute e mucose che può dare patologia se prolifera eccessivamente e si rompe l'equilibrio con la flora normale.

Il punto cruciale del medico non è la terapia ma fare diagnosi.

Se nel soggetto adulto si presenta il mugugno nel cavo orale (che di solito si presenta nel neonato, soprattutto prematuro) esso è indice di immunocompromissione, potrebbe essere AIDS, ovvero la patologia che deriva dall'infezione da HIV dopo che il numero di linfociti CD4+ scende sotto i 200 mm<sup>3</sup>.

I miceti in passato causavano tutt'al più infezioni cutanee e superficiali, con la comparsa delle categorie di pazienti immunocompromessi si è iniziato ad osservare anche infezioni sistemiche.

I miceti sono sempre stati parte della vita di tutti i giorni, ad esempio **S. Cerevisiae** consente la lievitazione del pane e la produzione di alcolici.

**P. Infestans** causò una carestia in Irlanda nel 1845 che causò la morte di milioni di persone.

Fleming nella ricerca sugli **S. aureus** osservò che sulle piastre contaminate da muffa rimaneva un alone attorno alla muffa nel quale non era cresciuto il batterio. Da lì isolò la penicillina.

Il mugugno fu descritto da Ippocrate, il kerion da Celso.

I miceti sono organismi eucarioti, chemiosintetici, eterotrofi che si distinguono in due categorie:

- Lieviti (unicellulari).
- Ifomiceti (pluricellulari).

Tutti si replicano per via asessuata, in alcuni è stata descritta anche la vita sessuata. Non è detto che non esista anche nelle specie in cui non è stata ancora osservata.

Esistono più di 100.000 specie di funghi, circa 100 rilevanti per le patologie nell'uomo.

Non si studiano qui le intossicazioni ma il parassitismo diretto o la introduzione di metaboliti tossici da parte di miceti unicellulari.

Il lievito è una cellula ovoidale molto più grande di un batterio, eucariotica, che ha la caratteristica di replicarsi per gemmazione.

Gli ifomiceti sono costituiti dall'ifa, una struttura pluricellulare costituita da molte cellule ma collegate tra loro con organizzazione a "canna di bambù". Esistono setti che separano le cellule in modo incompleto, in alcuni casi il nucleo può passare da una cellula alla successiva.

In due circostanze gli ifomiceti formano un setto completo:

- Quando una parte va in necrosi.
- Prima del ciclo di vita sessuato.

Si osservano vari tipi di micelio:

- Il micelio vegetativo che assorbe nutrimenti.
- Il micesio aereo che partecipa al ciclo di vita asessuato e sessuato.

Gli ifomiceti nei quali è stato osservato un ciclo sessuato assumono un nome di genere differente rispetto allo stesso fungo che ha ciclo di vita asessuato. (Molto simpatici i biologi).

Zigomiceti: aspetto morfologico nel ciclo di vita sessuato o asessuato è identico.

Sulla base della presenza o meno del ciclo di vita sessuato sia lieviti che ifomiceti si classificano i funghi in deuteromiceti quando non è stato descritto il ciclo sessuato. Quando è stato descritto si distinguono in ascomiceti, basidiomiceti e zigomiceti in base all'aspetto morfologico del ciclo sessuato.

**Ascomiceti:** La cellula maschile si chiama anteridio, la cellula femminile ascogonio, la cellula femminile riceve il nucleo maschile. Da essa si origina l'ifa ascogena che da luogo agli aschi. L'ifa ascogena viene circondata dall'ascocarpo, a scopo di difesa della progenie. Es. Aspergillus, che nel ciclo sessuato si chiama Emericella.

**Basidiomiceti:** danno luogo a basidiospore che si chiamano anche ballistospore, la singola basidiospora viene lanciata molto lontano, anche 6 cm. Es. Cryptococcus neoformans.

**Zigomiceti:** sporogioforo e sporangiospora. Hanno ife cenocitiche, ovvero con pochi setti o addirittura nessuno.

I lieviti si replicano per gemmazione, talvolta la gemma non si stacca dalla cellula madre, nel complesso sembra quasi un'ifa ma i setti sono comunque completi (pseudoifa).

Candida albicans in talune circostanze, (a 37°C in terreno inducente, ad esempio in presenza di sieralbumina bovina) è stato osservato che dà origine ad un tubo germinativo ovvero una vera e propria ifa, quando cresce in forma ifale candida produce una citotossina, abbiamo un'infezione patologica.

**Fungo dimorfo.**

Generalmente i funghi dimorfi sono patogeni, C.albicans invece in condizioni normali è presente in equilibrio con la flora locale dei vari distretti corporei. Diventa patogeno quando forma il tubo germinativo.

Tipi di micosi:

- Superficiali
- Cutanee
- Subcutanee
- Profonde

**Micosi superficiale:** Interessano gli strati cornei della cute. Es. Malassezia furfur, si nutre di acidi grassi a catena lunga, la zona di cute infetta non si pigmenta quindi appaiono come chiazze bianche a seguito dell'abbronzatura. È stato identificato un caso di infezione sistemica in un neonato prematuro. Non è facile da trattare (chi ce l'ha se lo tiene).

**Micosi cutanee:** Es. C.albicans, di solito non danno importanti risposte immunitarie. Causate da funghi **dermatofiti**.

**Micosi sottocutanee:** Sostenute da funghi che possono anche sostenere micosi cutanee e micosi profonde, ialoifomiceti e feoifomiceti (tallo trasparente e tallo pigmentato). Praticamente mai visti in clinica.

**Infezioni sistemiche/profonde:** funghi dimorfi classici, C.albicans, no dermatofiti, criptococco (unico lievito capsulato di interesse medico).

Cryptococcus neoformans nei pazienti immunocompromessi può dare infezione.

**Infezioni endogene:** Infezioni opportunistiche, normalmente presenti ma possono dare infezioni sistemiche quando le condizioni sono favorevoli, ad esempio in terapia antibiotica i funghi già presenti trovano meno competizione da parte dei batteri (uccisi o rallentati dall'antibiotico) sia per quanto riguarda i nutrienti sia per il legame ai recettori cellulari.

**Infezioni esogene:** Infezioni indotte da microorganismi ambientali. Ad esempio a Cisanello ci sono tantissimi gonidi di aspergillus perché sono sollevati dai lavori del cantiere, i primi 5 trapiantati di fegato a Pisa sono morti di infezione da aspergillus, le contromisure prese sono:

- Finestre chiuse.
- Filtri nel sistema di areazione.
- Muri in superficie lavabile.
- Isolamento con l'esterno (niente visite).
- Il personale medico si deve cambiarsi e lavarsi le mani.
- Filtro pulito con flusso d'aria laminare.
- Tampone al paziente prima che sia indotta l'immunosoppressione.

Un altro microorganismo ambientale è il criptococco, sta nell'intestino dei volatili. È l'unico lievito capsulato di interesse medico. Se inalato viene fagocitato dai macrofagi alveolari e lì si replica, sviluppa infezione solo in caso di immunocompromissione importante. Il macrofago può essere riserva per l'infezione secondaria.

Le lesioni da funghi sono tonde perché la colonia si sviluppa in modo centrifugo dal punto di inizio della colonia.

Plot twist: i funghi disposti in cerchio nei boschi non sono un segno della presenza delle streghe.

Si usa il termine conidio per parlare del ciclo di vita asessuato, spora invece si riferisce al ciclo di vita sessuato. Negli zigomiceti si parla sempre di spore perché la morfologia non è distinguibile dal ciclo di vita sessuato a quello asessuato.

### La membrana citoplasmatica dei miceti

Doppio strato fosfolipidico, le sostanze idrofile non passano, quelle lipofile sì. La membrana è costituita da **ergosterolo** importante perché le uniche due categorie di farmaci antimicotici (azoli e polieni) disponibili 30 anni fa (all'epoca dell'epidemia di AIDS) avevano l'ergosterolo come bersaglio, o si legano all'ergosterolo ed aprono pori nella membrana (polieni), oppure interferiscono con la sintesi dell'ergosterolo (azoli).

Gli steroli interferiscono anche con le proteine di membrana, come la chitina sintetasi.

C'è un limite di concentrazione dell'ergosterolo sotto al quale non è più possibile la replicazione. Inibendo la sintesi di ergosterolo con azoli si accumula lanosterolo, instabile, che si può convertire in metil-3,6-diolo. Si sviluppò una mutazione di un enzima che convertiva il lanosterolo in 14alfa-metilfecosterolo che sostituendo l'ergosterolo consente la replicazione, in un colpo solo si sviluppano funghi resistenti ad entrambe le classi di farmaci.

I polieni potrebbero interferire anche con le cellule dell'ospite (legandosi al colesterolo invece che all'ergosterolo) però ciò richiede dosaggi 250 volte superiore ai livelli terapeutici.

### La parete

Conferisce rigidità, è la struttura, normalmente più esterna, che conferisce la forma e consente la sopravvivenza in ambienti ad osmolarità diversa.

In ambiente naturale non possono sopravvivere senza parete, in condizioni sperimentali sì, si chiamano sferoplasti per via della loro forma.

Nella parete si distingue una parte rigida ed una parte plastica.

La parte rigida può essere costituita da cellulosa, glucano, chitina.

La parte plastica è costituita da glucano o mannano. Il mannano forma complessi con le proteine (formando le mannanoproteine).

Il glucano non è sempre presente in tutti i funghi ma è molto diffuso, tanto che la ricerca di beta-D-glucano si usa per sapere se il paziente presenta un'infezione fungina.

Le mannanoproteine hanno peso molecolare diverso tra i lieviti e gli ifomiceti, anche nelle due forme della stessa specie (ad esempio in *C. albicans*) ciò comporta proprietà adesive diverse.

Ad esempio *C. albicans* in forma ifale esprime una proteina di legame per C3d ed una proteina iC3d, omologa alla proteina CR3 che può legare la porzione cristallizzabile dell'anticorpo, può quindi bloccare la risposta indotta da anticorpo. La proteina CR3-simile si lega alla sequenza RGD (arginina, glicina, aspartato) presente in molte proteine di mammifero. Dato che la proteina iC3b è espressa solo nella forma ifale è necessaria la transizione per causare patologie.

L'**adesività** è un fattore essenziale per instaurare un processo infettivo, elimina o riduce la capacità di eliminare il patogeno. Quando *C. albicans* fa la transizione a forma ifale acquisisce la capacità di produrre una tossina, la **candidalisina**. La candidalisina sintetizzata viene tagliata in 8 frammenti e rilasciata, la candidalisina induce la formazione di pori nella membrana delle cellule ospiti che inducono l'ingresso di calcio il quale attiva metalloproteasi ed il rilascio di ligandi per EGFR, la candidalisina ed Als3 attivano EGFR ed impedisce la degradazione del complesso EGFR-EphA2, l'attivazione di EGFR induce una risposta di tipo infiammatorio.

Altro fattore di virulenza di *C. albicans* è **Als3**, che consente al microorganismo di aderire ed invadere la cellula ospite.

Per discriminare grossolanamente una infezione fungina da una batterica si usa la ricerca di beta-d-glucano, non è presente in tutti i funghi ma in tanti sì, la sua assenza permette quindi di escludere la maggior parte delle infezioni fungine.

Als3 induce la cellula ospite a fagocitare l'ifa, si forma quindi un vacuolo in cui si accumula candidalisina.

In condizioni normali *C. albicans* è un microorganismo commensale, in caso di aumento della proliferazione di *C. albicans* l'accumulo di candidalisina può danneggiare le cellule ospiti e dare patologia. L'aumento dei livelli di candidalisina portano all'attivazione dei neutrofili (attivazione tipo 17).

*C. albicans* è caratterizzata da idrofobicità della superficie, che aumenta durante la germinazione.

Altri fattori prodotti da *C. albicans* sono le aspartil proteasi che svolgono attività proteolitica importante per l'invasione tissutale e colonizzazione.

Antimicotici che agiscono sulla parete: **Echinocandine**: inibiscono la sintesi di beta-D-glucano, evidentemente non agisce su quei funghi che non presentano beta-D-glucano nella parete.

**Switching fenotipico**: è un diverso aspetto morfologico della colonia in condizioni di crescita differenti, ad esempio con l'esposizione a raggi UV.

**Produzione di biofilm**: comunità di microorganismi adesi ad una superficie solida, i microorganismi crescono in più strati di cui il più superficiale protegge quelli sottostanti dall'azione dei farmaci. Le cellule alla base sono dette **persistenti** e sono quiescenti. Prima si pensava che lo facesse solo *C. albicans*, adesso si pensa che lo facciano praticamente tutti. Il biofilm può aderire sia a superfici biotiche che a superfici abiotiche. Le cellule quiescenti alla base sono immuni ai farmaci perché non sintetizzando membrana e non essendo metabolicamente attivi non risentono degli antagonisti dei processi metabolici.

Si possono avere biofilm misti costituiti da più specie di microorganismi.

Le cellule del biofilm sono immerse in una matrice costituita da proteine sintetizzate da loro e proteine dell'ospite.

Le cellule del biofilm mostrano un fenotipo differente dalle stesse cellule in forma planctonica.

In realtà il biofilm non è una lamina compatta ma "a fungo" quindi alcune parti si possono staccare ed invadere altre sedi.

### Enzimi:

- **Fosfolipasi**: idrolizzano i fosfolipidi di membrana dell'ospite.
- **Aspartil proteinasi extracellulari**

**Mughetto**: infezione tipica del neonato prematuro sostenuta da *C. albicans*. Nell'adulto immunodepresso forma infezioni orali, è uno dei primi segni di AIDS, quindi è il caso di fare un test per HIV.

### Candida Auris

[nota di servizio: *C. auris* è stata inserita nel programma di esame].

È un microorganismo emergente, scoperta in Giappone, isolata dal condotto uditivo di un soggetto nel 2019, casi in Corea, India, Kuwait, Kenya, Sudafrica, Norvegia, Regno Unito, Germania, Italia, ecc...

CDC e WHO hanno inserito *C. auris* nella categoria "gravi minacce in ambiente ospedaliero".

*C. auris* è stata trovata in ceppoteche già del 1996, solo che i metodi discriminatori del 1996 si basavano su caratteristiche fenotipiche che portavano a classificarlo erroneamente. *C. auris* vive sulla cute dei portatori, ha una grandissima capacità di diffondersi e una buona resistenza ai disinfettanti.

Sono molto resistenti ai farmaci, es. il 93% sono resistenti al fluconazolo.

Disinfettanti a base di cloro e perossido di idrogeno hanno una buona efficacia.

L'infezione nosocomiale si manifesta tra 10 e 50 giorni dopo l'infezione sistemica ha mortalità tra il 30 e il 60%.

*Candida auris* rimane vitale a 42°C, incubando a 40°C si isola rispetto agli altri microorganismi. È tollerante a NaCl, si aggrega in cluster cellulari difficili da disperdere.

### Cryptococcus neoformans

(per convenzione i miceti che hanno entrambi i cicli riproduttivi si indicano con il nome del ciclo asessuato, però da ora in avanti si parla del ciclo sessuato. Non ci hai capito niente? Neanche noi).

È un microorganismo che vive nell'intestino, si trasmette per essiccazione delle feci nell'ambiente e dispersione delle particelle. È capsulato (unico fungo capsulato di interesse medico) quindi resiste all'essiccazione meglio degli altri microorganismi, inoltre essiccandosi si riduce di dimensioni e scende sotto ai 6 microni, a questo livello il sistema di protezione muco-ciliare delle vie respiratorie non è più efficace. I macrofagi li fagocitano ma non riescono a degradarli. I macrofagi sono quindi la riserva di infezione in attesa che le condizioni diventino favorevoli all'infezione sistemica (immunodepressione).

Il cryptococco ha un particolare tropismo per il sistema nervoso centrale, induce quindi meningoencefalite, letale nella maggior parte dei casi.

Essendo capsulato per avere la fagocitosi servirebbero anticorpi anti-capsula ma essi non esistono, quindi per fagocitare servono fattori complementari. Nel sistema nervoso centrale ci sono meno fattori complementari, inoltre probabilmente la presenza di creatinina ed asparagina sono fattori di crescita.

In presenza di composti fenolici cryptococcus produce pigmenti (che rappresentano anche fattori di virulenza) tramite un enzima di membrana, nel tessuto nervoso trova substrati fenolici rappresentati dalle catecolamine.

Si distinguono 5 fenotipi:

A: grubii

B e C: gattii

D: neoformans

AD: lieviti derivati dalla fusione dei ceppi A e D

Il principale fattore di rischio è la linfocitopenia CD4+ (es. AIDS). È molto diffusa in africa per la diffusione dell'HIV e per la mancanza di cure che invece sono disponibili in occidente.

Vettori di infezione sono ad esempio le feci di piccione, si può avere infezione anche tramite cibi non lavati.

Ci può essere una fase in cui l'infezione è cutanea, si può quindi fare una diagnosi precoce ed iniziare una terapia prima che l'infezione raggiunga il sistema nervoso centrale.

La riserva sono i macrofagi polmonari all'interno dei quali non può essere raggiunto da farmaci e cellule dell'immunità, viene rilasciato tramite esocitosi o lisi.

Il lievito produce melanina che lo protegge dai raggi UV.

In ambiente arido la capsula essicca e collassa proteggendo il lievito dalla disidratazione e riducendone le dimensioni in modo da rendere possibile l'infezione tramite inalazione.

**Struttura della capsula di C. neoformans:** glucoronozil-mannano, polimero formato da una struttura di mannosio sostituita con acido glucuronico e xilosio, il rapporto xilosio, glucuronato, mannosio varia da 1:1:3 a 4:1:3 nei vari sierotipi.

La principale opsonina che agisce contro C. neoformans è la proteina complementare C3, in caso di sepsi si ha notevole deplezione di quest'ultima, il che fa diminuire ulteriormente la sua concentrazione a livello del SNC.

La capsula permette al lievito di non essere ucciso una volta fagocitato dal macrofago respiratorio, inibisce le citochine, inibisce il recruitment dei leucociti, induce le cellule T soppressorie, inibisce la presenza dell'antigene ed inibisce la proliferazione linfocitaria.

Sono in studio vaccini in cui si prova a stimolare risposta immunitaria contro componenti capsulari coniugando questi ultimi con componenti proteiche.

È un microorganismo non esigente, cresce bene in un ampio range di condizioni, lega molto bene il ferro (importante fattore di crescita ma nell'ospite è legato a proteine).

### Aspergillus

Microorganismo ubiquitario, presente in suolo, vegetazione, detriti organici, polvere delle costruzioni, medicazioni aperte, borse da dialisi rotte, sistemi di ventilazione.

Le patologie causate possono essere dovute a:

- Intossicazione (aflatossina prodotta dal lievito).
- Allergia.
- Aspergillosi disseminata.

### Asma estrinseca.

**Alveolite allergica estrinseca:** es. fenomeno di Arthus: formazione di complessi solubili, induce danno tissutale che può portare a fibrosi polmonare irreversibile.

**Aspergillosi broncopolmonare allergica:** fibrosi polmonare irreversibile, IgG, IgE.

**Aspergillosi colonizzante (aspergilloma):** secondario ad aspergillosi allergica cronica, sarcoidosi, TBC, istoplasmosi. De novo in paziente con malattia invasiva ed immunocompromesso. Il nome che ricorda un tumore deriva dall'aspetto sferoidale della colonia dovuta alla crescita centrifuga.

La diagnosi di aspergillo si fa facendo crescere il microorganismo nel suo ciclo di vita asessuato ed osservando i corpi di fruttificazione. C'è una finestra temporale per osservarli, se si aspetta troppo il preparato si riempie di conidi e non si vede più niente.

La presenza dell'aspergillus può significare che il paziente è colonizzato, è infetto oppure il tampone è stato contaminato. La distinzione tra paziente colonizzato e paziente infetto si fa in base alla condizione clinica del paziente.

Il tempo di incubazione varia in base al tipo di microorganismo, gli ifomiceti sono molto più lenti dei lieviti, in alcuni casi per i dermatofiti sono necessari anche 15-21 giorni.

### Dermatofiti

Infezioni cutanee, normalmente si contraggono dagli animali (zoofili). Ne esistono però anche di antropofili e di geofili.

Hanno necessità di nutrirsi di cheratina, possono quindi colonizzare tutto ciò che contiene cheratina (cute, capelli, unghie, ecc...). Rompono i ponti disolfuro tra le molecole di cheratina.

Si può avere parassitismo di vario tipo:

**Ectothrix:** invade l'interno del capello, gli artroconidi formano una guaina all'esterno.

**Endothrix:** Sia le ife che gli artroconidi sono localizzati all'interno.

**Favoso:** All'interno del capello si trovano un miscuglio di filamenti miceliali e globuli di grasso.

Nei dermatofiti si possono avere **microconidi** (singoli conidi unicellulari) o **macroconidi** (multicellulari = cocomero).

## Diagnosi Microbiologica

ha lo scopo di identificare l'agente eziologico che sostiene la malattia infettiva.

Si può realizzare tramite strumenti di diagnosi diretta oppure indiretta.

Diagnosi diretta: Isolamento dell'agente patogeno in coltura.

Diagnosi indiretta: identificazione della risposta immunitaria dell'ospite

Cosa si intende per germi comuni? Germi la cui coltura si realizza sui comuni terreni di coltura (elencati nel corso di batteriologia).

**Agar-sabaurot** specifico per i lieviti perché contiene antibiotici che inibiscono i batteri.

Il terreno **agar MacConkey** è selettivo per i Gram- e permette di discriminare i microorganismi che fermentano il lattosio grazie ai pigmenti pH-sensibili.

**Agar sale-mannite:** Selettivo per gli stafilococchi, alla concentrazione di sale, è discriminativo grazie alla presenza del mannitolo, permettendo di identificare *S. aureus*.

La ricerca di germi comuni comprende anche i lieviti, per la ricerca di ifomiceti servono tecniche specifiche, anche a causa della loro lenta crescita. A seconda del quadro clinico si sceglie la tipologia di campione da inviare in laboratorio.

L'identificazione si fa in coltura pura, ad esempio una subcoltura prendendo una singola colonia.

**Diluizione limite:**

Prima dei terreni solidi per isolare una coltura pura si faceva una diluizione progressiva fino a che solo una parte delle provette si intorbidiva, non si aveva la certezza che l'intorbidimento fosse dovuto ad una singola specie.

Una colonia è (teoricamente, in realtà esistono le mutazioni) prodotta da una singola cellula che ha proliferato generando un insieme macroscopicamente visibile di cellule uguali a se stessa.

La forma del rilievo formato dalla colonia dipende dalla specie microbica. Es. la colonia vecchia di *S. pneumoniae* assume aspetto ombelicato.

Il margine è un'altra caratteristica distintiva.

Nel terreno liquido si inclina la provetta per liberare una parte di vetro prima coperto dal terreno, poi si depositano i microorganismi e si riporta la provetta in verticale sommergendo i microorganismi.

Esistono i terreni **a becco di clarino**, terreni solidi fatti solidificare in una provetta in posizione obliqua. Viene seminato con un ago da infissione, mentre si estrae l'ago si semina anche in superficie. Nel corpo del tessuto non si ha presenza di ossigeno in superficie sì, si evidenziano le differenti vie metaboliche (eventualmente) messe in atto dal batterio a seconda dell'esposizione all'ossigeno.

**Agar sangue:** Permette di far crescere microorganismi catalasi-negativi: se il microorganismo produce perossido di idrogeno e non esprime catalasi (perossidasi) il microorganismo uccide se stesso. Per far crescere questi microorganismi è necessario fornire catalasi. Nel terreno agar sangue (ma anche agar cioccolato) ciò avviene grazie al fatto che nella membrana dei globuli rossi è presente catalasi. Agar sangue permette di distinguere gli stafilococchi in base alle proprietà emolitiche.

**Alfa-emolitici:** fanno virare il terreno dal rosso al verde a causa della produzione di biliverdina (viridanti).

**Beta-emolitici:** emolisi completa.

**Gamma-emolitici:** attorno alla colonia non è osservabile un alone di emolisi.

Ad esempio per identificare *S. pyogenes* (colonie piccolissime, beta-emolitico) si osserva la piastra in controluce alla ricerca dell'alone di emolisi.

**Agar sale-mannite:** Permette di selezionare organismi alofili (grazie al sale) e di discriminare quelli che acidificano il terreno.

**Agar MacConkey:** Contiene sali biliari che impediscono la crescita dei Gram- e lattosio che permette di discriminare gli organismi lattosio-fermentanti.

**Agar Salmonella-Shigella:** Contiene sali biliari a concentrazioni molto più elevate, seleziona gli enterobatteri che proliferano nella colecisti.

Arricchito anche da una sorgente di zolfo e ferro ferrico perché *Salmonella* producendo H<sub>2</sub>S (partendo dallo zolfo) e questo reagendo con il ferro precipita al centro della colonia sottoforma di FeS formando un "puntino" visibile.

Oltre alle esigenze **organiche** (nutrienti) si devono soddisfare le esigenze **inorganiche** della specie batterica (es. presenza di ossigeno, condizioni di microaerofilia condizioni di bassa concentrazione di ossigeno). (Per realizzare la microaerofilia si usano bustine che rilasciano agenti riducenti che consumano l'ossigeno oppure accendendo una candela nella giara ermetica in cui si trovano le piastre).

Per lavorare con microorganismi anaerobi stretti (sono distrutti dalle specie reattive che si formano in presenza di ossigeno perché non hanno meccanismi di difesa oppure l'ossigeno danneggia particolari specie chimiche necessarie alla vita del batterio) si deve usare una cappa specifica, completamente sigillata (glovebox) riempita con gas inerte (es. azoto).

Alcuni microorganismi necessitano di ioni particolari (fosfato, potassio, magnesio, rame, ecc...).

**Condizioni fisiche:** Temperatura, pH, osmolarità del terreno. Da considerare anche in caso di risultato negativo: il patogeno che sostiene l'infezione potrebbe non essersi riprodotto perché l'esame per germi comuni non soddisfaceva le condizioni adatte alla proliferazione (es. colera).

**S. pyogenes** esprime due emolisine: una ossigeno-stabile ed una ossigeno-labile deve quindi essere coltivato sia in condizioni normali che in atmosfera microaerofila per osservare l'azione di entrambe.

## Test Primari

Permettono di distinguere le specie batteriche anche in base alle proprietà tintoriali.

Es. colorazione di Gram, acido-resistenza, forma, spore, mobilità (semina per infissione in terreno semisolido a bassa concentrazione di agar, si osserva se il germe è cresciuto solo nel sito di infissione oppure si è diffuso), crescita in aria (permette di determinare se il microorganismo è aerobio oppure anaerobio facoltativo o obbligato), catalasi (si deposita sopra la colonia una goccia di perossido di idrogeno, se il microorganismo contiene catalasi si osserva la formazione di bolle. I germi che non presentano catalasi sono uccisi velocemente dal perossido di idrogeno prodotto da loro stessi a meno che non sia presente catalasi nel terreno, esempio sangue o cioccolato), ossidasi, glucosio, test O/F (ossidazione/fermentazione, test metabolico complesso e ormai superato).

Dopo aver seminato il campione sui terreni comuni si incuba per 48, con osservazione intermedia a 24 ore. Per procedere all'identificazione delle colonie eventualmente presenti si eseguono i test primari.

Prima si usavano le "tabelle di diagnosi". Adesso sono usate le "gallerie" in cui si inserisce la sospensione microbica a concentrazione specificata dalla casa produttrice (la concentrazione della sospensione si misura al densitometro ottico). La galleria contiene substrati liofilizzati che vanno in soluzione nella sospensione realizzando in differenti pozzetti test che prima richiedevano provette separate. Dal profilo risultante si realizza l'identificazione microbica. Nel frattempo i pozzetti sono passati da circa una decina a 64, che vengono lavorati tramite uno strumento apposito che provvede a riempire i pozzetti con la sospensione microbica e a sigillare la cannuccia di riempimento, a cui segue l'incubazione ed il confronto tra i dati rilevati ed il database. Occasionalmente si riscontrano identificazione incerte tra più specie, molto spesso in questi casi il problema è che la sospensione iniziale non deriva da una coltura pura.

Un setup simile si usa per l'antibiogramma con pozzetti contenenti antibiotici diversi.

## Antibiogramma

Valutazione della suscettibilità microbica verso un certo numero di composti (farmaci) ad azione antimicrobica.

**MIC:** Concentrazione minima inibente.

**MBC:** Concentrazione minima battericida. Riduce di almeno 3 unità logaritmiche la concentrazione batterica rispetto all'inoculo iniziale.

**Metodi in terreno solido:**

- **Kirby-Bauer:** Usa dischetti di carta che contengono concentrazione nota di un antibiotico (scritto sul dischetto). Si fa una sospensione microbica alla concentrazione specificata. Si preleva tramite un tampone la sospensione e si semina su una piastra (con terreno Mueller-Hinton)(prima si sprema per evitare che sgoccioli). Si semina a tutto campo in modo uniforme ruotandola due volte di 60°. Si mette il dischetto sulla piastra (con la scritta verso l'alto! Non si sposta il dischetto dopo che ha toccato il terreno!) si mette la piastra in termostato e si incuba per 18 ore. Il composto antibiotico si sparge in modo centrifugo. A partire da una certa distanza fino al dischetto non si ha crescita batterica (**alone di inibizione della crescita**), nell'anello esterno si osserva crescita confluyente in cui le colonie seminate in modo uniforme coprono il terreno. Viene valutata l'efficacia del composto in base al diametro dell'alone di inibizione di crescita. Si confrontano questi valori con quelli standard

per determinare se il microorganismo è suscettibile o meno. Si determina la **MIC approssimata**.

Anche in questo caso non sono attendibili i dati ottenuti da una coltura mista.

- **Tecnica delle diluizioni scalari:** Stesso terreno (Mueller-Hinton) ma senza agar (terreno liquido). Si realizza una diluizione scalare dell'antibiotico (umerose provette con concentrazione sempre minore di antibiotico). Ad esempio si preleva metà contenuto della soluzione precedente e si diluisce al volume doppio ottenendo così concentrazione dimezzata. Si inocula poi un volume costante di sospensione microbica a concentrazione sempre uguale e, dopo l'incubazione (di nuovo per 18 ore), si valuta la crescita tramite la densità ottica. La concentrazione inibente è l'ultima provetta in cui non si osserva crescita ovvero **la più bassa concentrazione di antibiotico capace di sopprimere la crescita batterica**.

Il batterio non è cresciuto perché è morto o perché è inibito? Si fa il test della battericidia: si preleva un volume noto di sospensione da una provetta senza crescita evidente e si semina su un terreno solido osservando l'eventuale formazione di colonie. Si determina la **MBC** misurando **la minima concentrazione di antibiotico che impedisce la formazione di colonie**. Correntemente questo test si fa in maniera automatizzata, le piastre usate in questo caso (dette piastre di microtitolazione) hanno già l'antibiotico liofilizzato sul fondo dei pozzetti (è importante non toccare il fondo quando si aggiunge l'acqua!).

Permette di identificare condizioni di tolleranza, che si dichiara presente quando la MBC è almeno 32 volte più elevata della MIC.

In caso di discrepanza tra i risultati ottenuti con il test in terreno solido o in terreno liquido si considera come più attendibile quello in terreno liquido.

- **E-Test:** Si usano strisce di materiale proprietario (brevettato) in cui sono presenti concentrazioni scalari di antibiotico. Sulla striscia è riportata una scala che permette di determinare, osservando il punto di intersezione tra la striscia stessa e l'alone di inibizione. Metodo molto rapido che richiede poca manualità. Su piastre grandi si possono usare più strisce contemporaneamente disponendole "a raggiera" oppure "testa-coda" (tecnicamente antiparallelo) in modo da distanziare il più possibile le teste, che sono a concentrazione più elevata quindi generano un alone più ampio.

Il valore di MIC da solo non è sufficiente a scegliere l'antibiotico, indica solo la sensibilità in vitro. Spesso la decisione tra antibiotici per cui il microorganismo è sensibile si effettua in base al costo. L'unico caso che indica certamente l'efficacia è quando prima del valore di MIC è riportato un segno "minore" (<), ciò sta a significare che la concentrazione inibente è minore del minimo valore a cui è stato fatto il test. È da considerare anche il quadro clinico del paziente, ad esempio la funzionalità epatica e renale.

## Speciale

### Cocchi

Colorazione Gram.

Conformazione (streptococchi o stafilococchi). Gli streptococchi sono catalasi negativi, gli stafilococchi sono catalasi positivi.

**Stafilococchi:** si fa il test della coagulazione, *S. aureus* è coagulasi positivo, tutti gli altri sono catalasi negativi (chiamati in gruppo stafilococchi catalasi-negativi). Attenzione: il principale stafilococco patogeno è *S. aureus*, ma anche alcuni catalasi-negativi sono patogeni.

Gli stafilococchi si coltivano in agar sale-mannite perché sono alofili. Il mannitolo è fermentato da *aureus* che produce acidificazione e viraggio dell'indicatore presente nel terreno.

Stafilococchi:

- Gram+.
- Immobili.
- Asporigeni.
- Anaerobi facoltativi.
- Catalasi-positivi.
- Fermentano glucosio.
- Alofili.
- *Aureus* generalmente è emolitico su agar-sangue.

Talvolta *aureus* da luogo alla produzione di pigmenti carotenoidi che colorano la colonia di giallo-oro.

Un tempo si classificavano in 3 specie in base al colore.

Possono essere dotati di capsula (generalmente non lo sono) che li rendono capaci di produrre biofilm.

Si conoscono circa 40 specie, di cui 14-18 si trovano spesso nell'uomo.

Le specie si dividono in due gruppi in base alla coagulasi (*aureus* è coagulasi+).

Di solito la coagulasi+ indica *aureus* ma va confermato perché anche altre specie possono esprimere coagulasi.

Questi microorganismi (anche *aureus*) sono normalmente presenti sulla cute, un tampone cutaneo positivo a *S. aureus* può essere flora microbica normale, viene comunque riportato nel referto, a differenza di altri microorganismi normalmente presenti sulla cute (come *epidermidis*) che danno virulenza più raramente.

Spesso *aureus* si trova anche nel vestibolo nasale anteriore.

La tipica lesione da *S. aureus* sono infezioni suppurative (ascessi, foruncoli). Può produrre infezioni suppurative in qualsiasi altra sede, è anche in grado di produrre esotossine che possono indurre quadri patologici. Può in teoria dare shock settico (anche se non è un Gram-) a causa della produzione di tossine come acido lipoteicoico ma i dosaggi richiesti sono altissimi. L'acido lipoteicoico possono complessarsi con frammenti di peptidoglicano che facilita enormemente lo shock settico.

Può dare anche shock tossico (da esotossine). La via finale è comune, cambia solo la causa.

**Staphylococcus aureus: caratteristiche strutturali**

Può presentare **capsula o microcapsula** che rappresenta un importante fattore di virulenza impedendo l'opsonizzazione. Tra le catene di peptidoglicano i legami tra tetrapeptidi non sono diretti ma sono mediati da una pentaciclina o una esaciclina.

Altri fattori di virulenza:

Il **polisaccaride A** (acido teicoico) si lega alla fibronectina.

La **proteina A** è capace di legare il frammento cristallizzabile degli anticorpi (impedendo ulteriormente l'opsonizzazione).

**Coagulasi:** converte fibrinogeno in fibrina aggregando i batteri in un granulo all'interno del quale non è vulnerabile a farmaci o cellule immunitarie.

Altre proteine che fungono da recettori per componenti della matrice.

**Coagulasi libera:** simile alla trombina, induce la formazione di coaguli nel plasma.

**Stafilocinasi:** attiva la plasmina e degrada il coagulo per uscirne.

**Ialuronidasi:** depolimerizza l'acido ialuronico del connettivo, facilita l'invasione.

**Lipasi:** Neutralizza l'attività antibatterica del siero, facilita la colonizzazione della pelle.

**Nucleasi:** significato ignoto.

Produce 4 tipi di **esotossine** (alcuni ceppi):

#### 1. Tossine citolitiche.

1. Alfa: responsabile dell'emolisi. È letale e dermonecrotica negli animali da esperimento, citolitica verso vari citotipi, tra cui i leucociti.
2. Beta: sfingomielinasi, agisce su numerosi citotipi.

3. Delta: emolisina, agisce su eritrociti, macrofagi, linfociti, PMN.
4. Gamma: emolisina, composta da due parti che agiscono sinergicamente.
5. Leucocitina di Panton-Valentine: due componenti, induce la formazione di pori sui leucociti: leucotossica, antifagocitaria, necrotizzante. In bassa concentrazione induce apoptosi. In alte concentrazioni necrosi, per rilascio di ROS o del contenuto dei polimorfonucleati (PMN).
2. **Enterotossine:** inducono vomito incoercibile (non si risolve mediante farmaci). Il recettore sta sul centro emetico: ecco perché è incoercibile. Se ne riconoscono 8 tipi antigenici (la più associata a manifestazione clinica è la A). È termostabile e insensibile all'acido gastrico. Possono agire da superantigeni che inducono massiccia produzione di TNF-alfa e IL-1 (shock tossico). Riconosce una sola porzione del TCR, non tutto, quindi è in grado di attivarne una frazione considerevole (molti cloni diversi), a differenza del funzionamento normale del TCR stesso.
3. **Tossine pirogeniche:** Non si pensava fosse prodotta da aureus finché non vennero immessi in commercio gli assorbenti interni. Può dare shock tossico perché agisce da superantigene, induce la produzione di TNF-alfa e IL-1 i quali aumentano la permeabilità vascolare con conseguente ipotensione e shock.
4. **Tossine epidermolitiche:** Due forme (ETA, ETB), diffondono per via ematica ma il microorganismo si trova sulla cute. Agiscono sui desmosomi determinando il distacco delle cellule e la formazione di bolle. (tipica lesione da scottatura). Le bolle si rompono facilmente lasciando lesioni che, soprattutto nel neonato possono essere via di ingresso per infezioni, causare disidratazione e problemi di termoregolazione. In genere i più esposti sono i neonati, i bambini fino a 4 anni (potrebbero non avere anticorpi contro la tossina) ed i soggetti con insufficienza renale (difficoltà nell'eliminare la tossina).

Le infezioni stafilococciche sono generalmente localizzate con forte infiammazione, essudato e necrosi tissutale. Si possono verificare sulla cute o in qualsiasi altro distretto.

Gli stafilococchi si distinguono dagli streptococchi grazie alla catalasi.

L'infezione tipica da *S. aureus* è l'infezione suppurativa. Le caratteristiche di virulenza sono:

- Capsula
- Peptidoglicano: i filamenti di peptidoglicano possono contribuire allo shock settico.
- Polisaccaride A: media l'adesione alle superfici mucose.
- Proteina A: blocca l'opsonizzazione legandosi alle IgG.
- Coagulasi: forma coagulo protettivo per il batterio.
- Stafilochinasi: rompe il coagulo liberando il batterio.

#### Malattie da *S. aureus*

- **Infezioni cutanee:** Follicolite quando interessa un follicolo pilifero. Quando interessa le palpebre si parla di **orzaiolo**.
- **Batteriemia**
- **Endocardite:** Da disseminazione ematica, può interessare trapianti valvolari, altamente letale.
- **Osteomielite:** Disseminazione ematogena.
- **Artrite settica:** Materiale purulento nel liquido sinoviale.
- **Altre localizzazioni metastatiche**
- **Polmonite**
- **Sindrome della cute scottata:** Particolarmente pericolosa nel neonato. Ceppi produttori di tossine epidermolitiche.
- **Tossinfezione alimentare stafilococcica:** Da ceppi produttori di enterotossine. Comune in caso di cibi preparati in anticipo e conservati impropriamente.
- **Sindrome da shock tossico:** Inizialmente descritta in caso di uso di tamponi mestruali iperassorbenti. Può essere dovuto anche a proliferazione di *S. aureus* in una ferita. Rilascio di tossine nel torrente ematico.

#### Farmaco-resistenza:

Viene acquisita facilmente, ceppi resistenti si sviluppano principalmente in ambiente ospedaliero dove risente della pressione selettiva data dagli antibiotici. Costituisce una delle principali cause di gravi infezioni nosocomiali. È buona norma tamponare nel vestibolo nasale almeno i chirurghi. Si ritiene che il 90% dei ceppi in ambiente nosocomiale ed il 20-30% del totale siano resistenti ai beta-lattamici. La resistenza è fornita dalla mutazione della proteina nota come **PBP (Penicillin Binding Protein)** con produzione di forme a ridotta affinità. La maggior parte dei ceppi meticillino-resistenti sono però sensibili ad altri farmaci.

#### Diagnosi:

Prelievo di campione appropriato.

Colorazione Gram.

Coltivazione su agar sangue, agar cioccolato ed agar sale-mannite.

Antibiogramma.

#### Streptococchi

Cocchi Gram+, catenelle più o meno lunghe, a volte in forma di diplococchi. Catalasi- quindi esigenti (hanno bisogno di una sorgente di catalasi). Immobili, asporigeni, anaerobi facoltativi. Metabolismo fermentativo omolattico. Incapaci di sintetizzare alcuni aminoacidi e vitamine. Crescono meglio in microaerofilia.

Secondo la **classificazione di Brown** sono divisibili in alfa, beta e gamma emolitici in base alla capacità di indurre emolisi:

- Alfa: Emolisi incompleta (viraggio al verde per accumulo di biliverdina. Detti **viridanti**, possono dare endocardite).
- Beta: Emolisi completa.
- Gamma: Emolisi assente.

#### Classificazione di Lancefield:

In base al carboidrato C (estratto a caldo con HCl, precipitazione con anticorpi). 20 gruppi. Nel gruppo A si ha solo *S. pyogenes*, nel gruppo B si ha solo *S. agalactiae*. Gli altri gruppi sono composti da più specie.

*S. agalactiae* può indurre meningite ed essere causa di morte nella prima settimana di vita, può dare sepsi post-parto, infezione cutanea, endocardite, artrite settica.

Molti microorganismi di questo genere provocano endocardite. Sono i viridanti (presenti nel cavo orale), quando si provocano lesioni durante ad esempio estrazione dentaria possono raggiungere il circolo.

*S. pneumoniae*: può causare meningite ma anche otite.

*S. pyogenes*: può causare faringite, tonsillite, infezioni di ferite, setticemia, polmonite, glomerulonefrite.

**Malattia post-streptococcica:** Insorge dopo l'eliminazione dell'agente infettivo.

#### *Streptococcus pyogenes*

Presenta una capsula di acido ialuronico, importante azione antifagocitaria perché normalmente non sono presenti anticorpi specifici.

Infetta esclusivamente l'uomo: l'infezione si contrae da un portatore umano.

La virulenza è data dalla capacità di aderire alla superficie, invadere le cellule epiteliali, eludere l'opsonizzazione e produrre enzimi e tossine. Produce ialuronidasi che degrada sia il connettivo che la sua capsula.

Quasi sicuramente ha la capacità di formare biofilm, quindi la ialuronidasi potrebbe avere una funzione nel rilascio di microorganismi dal biofilm.

**Peptidoglicano:** Proprietà pirogena.

**Acido lipoteicoico:** ruolo di adesina.

**Carboidrato C:** cross-reattivo con una proteina sulle valvole cardiache: se si sviluppano anticorpi contro di esso questi possono attaccare anche il cuore (base della malattia post-streptococcica).

**Proteina F:** adesione alla fibronectina.

**Proteina M:** Principale fattore di virulenza, determina la specificità antigenica dei 100 sierotipi.

Può essere capace di legarsi al fibrinogeno: legando il fibrinogeno impedisce il legame di anticorpi ed evitare l'attivazione del complemento. Degrada velocemente la C3b inibendo la fagocitosi.

Può legare la proteina H regolatrice del complemento interferendo con la deposizione di fattori complementari sulla superficie del microorganismo.

Può presentare (a seconda del ceppo) epitopi reumatogeni o nefritogeni.

Si dividono in classe I (febbre reumatica) e classe II, entrambi possono indurre glomerulonefrite.

La proteina M induce la produzione di anticorpi protettivi (specifici per il sierotipo).

Può secernere **esoenzimi**:

**Streptolisina O:** ossigeno-labile (si coltiva in microaerofilia per non perderla). degrada emazie, neutrofili, macrofagi. Si lega alle molecole di colesterolo per indurre la lisi delle cellule. Componente immunogeno (importante dosare il titolo anticorpale per determinare la possibilità di sviluppo di malattie post-streptococciche). Gli anticorpi contro Streptolisina O non si formano in seguito alle infezioni cutanee, .

**Streptolisina S:** non ossigeno-labile. Responsabile della beta-emolisi, degrada emazie, PMN, macrofagi, piastrine, granuli citoplasmatici. Altera i fosfolipidi di membrana.

**Streptochinasi:** degrada coaguli attivando il plasminogeno in plasmina .

**Desossiribonucleasi.**

**Esotossine pirogeniche streptococciche o Tossine eritrogeniche:** Prodotte da ceppi lisogeni per un fago, si comportano come superantigene. Quattro tipi sierologici (A, B, C, F), solo SpeA può dare scarlattina. Se un soggetto si infetta per la prima volta con un ceppo produttore di A non succede niente, è necessario che la persona si sia sensibilizzata contro altre Spe, si devono avere infezioni multiple da ceppi che non producano SpeA in modo che si abbia ipersensibilità alla parte comune delle Spe ma non anticorpi specifici contro SpeA.

In caso di infezione locale si può andare incontro a scarlattina, in alcuni casi si può avere batteriemia che se non sono presenti anticorpi anti SpeA può evolvere in shock tossico (eventualità più rara se sono presenti gli anticorpi).

**Test di Dick**

Permette di valutare la suscettibilità alla SPE.

Si inoculano 0.1 ml di tossina, nel caso in cui entro 6-8 ore si presenti reazione eritemato-indurativa significa che non sono presenti anticorpi.

**Malattie:**

Si dividono in localizzate e sistemiche, le localizzate possono interessare mucose o cute. Quelle sistemiche possono essere batteriemie, infezioni invasive con focolaio riconosciuto, shock tossico streptococcico, scarlattina.

Si possono avere malattie post-streptococciche: es. glomerulonefrite.

Infezioni localizzate: faringo-tonsillite, otite media, sinusite, mastoidite, vaginite.

Nell'epoca pre-antibiotica erano frequenti complicanze suppurative.

**Impetigine:** Infezione cutanea superficiale, grappolo di vescicole. (DOPO AVER TOCCATO LA MANO È INFETTA).

**Erisiplea:** Interessa tessuti cutanei e sottocutanei.

**Fascite necrotizzante:** In seguito ad infezioni cutanee. Lesioni necrotiche che si estendono rapidamente nel sottocutaneo.

**Febbre puerperale:** Il patogeno entra tramite la ferita lasciata nell'endometrio dal distacco della placenta.

**Scarlattina:** Si sviluppa in individui che hanno subito infezione da altri ceppi produttori di SPE diverse che hanno sviluppato ipersensibilità verso il componente comune delle SPE senza acquisire immunità verso la parte tossica specifica della SPE prodotta dal ceppo che ha infettato in quel momento.

Eruzione cutanea con eritema diffuso e micropapule che dal volto si espandono verso il tronco e le estremità.

La febbre dura 5-10 giorni, successivamente si ha desquamazione cutanea.

**Malattie post-streptococciche:**

**Febbre reumatica:** Colpisce articolazione, cuore, vasi, sottocutaneo. Poliartrite, pancardite, corea, eritema marginato e/o noduli sottocutanei, artralgie, artrite deformante.

Si parte da una faringo-tonsillite che innesca un processo su base autoimmune dovuti ad anticorpi contro le proteine M o il carboidrato C che attaccano componenti self. Particolarmente reumatogeni sono i ceppi produttori di M5 ed M6.

La malattia si presenta dopo 2-3 settimane dall'infezione nel 5% circa delle persone infettate. Lesione caratteristica della **cardite reumatica: corpi di Aschoff** costituiti da linfociti e macrofagi aggregati attorno a depositi di fibrina. Tipicamente si trovano ai margini delle valvole. Prodotte dall'inflammazione permanente a livello valvolare che si traduce in danno.

A livello cutaneo si forma l'**eritema marginato** oppure l'**eritema nodoso** non si formano solo in caso di febbre reumatica, non sono diagnostici.

La **corea** si verifica in caso di cross-reattività con epitopi a livello cerebrale. Si manifesta con movimenti involontari, tic, disturbi della parola, del portamento, manifestazione di comportamenti infantili, disordine ossessivo-compulsivo, labilità emotiva, iperattività, irritabilità.

**Glomerulonefrite:** può insorgere in seguito ad infezione cutanea o a faringo-tonsillite. Solo i ceppi M12 (faringo-tonsillite) e M49 (impetigine) sono nefritogeni.

Gli anticorpi nefritogeni formano complessi con eccesso di antigene che si depositano sulla superficie glomerulare. Il complesso immune attiva il complemento con degranulazione dei basofili, liberazione di istamina e fattori chemiotattici per cellule pro-infiammatorie (C3a, C5a) ed infine fagocitosi ed enzimi lisosomiali.

La reazione infiammatoria induce l'esposizione di antigeni criptici sulla membrana basale del glomerulo che cross-reagiscono con gli anticorpi anti-proteina M. Sintomi: edema, ipertensione, ematuria, proteinuria. Si risolve spontaneamente in settimane o mesi. Non si ritiene che la profilassi antibiotica prevenga la glomerulonefrite perché generalmente gli antibiotici vengono somministrati dopo 10 giorni.

È buona norma fare tampone e coltura in caso di mal di gola che non si risolve entro 3 giorni (con antinfiammatori ed antipiretici al bisogno) oppure se si osservano "placche". Oppure si inizia la terapia antibiotica (dopo il tampone!) ma va modulata a seconda dell'identificazione del patogeno.

Si stanno osservando i primi streptococchi beta-emolitici resistenti alle penicilline, sta iniziando a rendersi necessario anche antibiogramma, con allungamento dei tempi.

**Terapia**

Anche senza resistenza il trattamento con penicilline non sempre eradica pyogenes a causa della concentrazione più bassa che si raggiunge in sede o alla produzione di beta-lattamasi da parte di commensali.

Si può instaurare resistenza ad eritromicina, più frequente in Italia probabilmente a causa dell'abuso di macrolidi.

**Titolazione di anticorpo anti-Streptolisina O:**

Si fa tramite diluizioni successive del siero a cui viene aggiunta SLO, segue incubazione e aggiunta di sangue con ulteriore incubazione. Si indica il risultato in unità Todd (ultima diluizione massima di siero a cui non si ha emolisi). Un titolo maggiore di 160 unità Todd è considerato positivo.

Gli streptococchi sono catalasi negativi quindi devono essere coltivati su terreno contenente catalasi, ad esempio agar-sangue. Nel caso di pyogenes si

coltiva preferibilmente in condizioni di microaerofilia per avere entrambe le streptolisine (sia ossigeno-labile che stabile). Se si coltivasse in condizioni aerobiche perderemmo la lisina labile, se contemporaneamente risulta mutata quella stabile si perde la capacità di identificare la colonia.

#### **Pneumococco (*Streptococcus pneumoniae*):**

Streptococco Gram+, catalasi-, immobile, asporigeno, anaerobio facoltativo (fermentazione lattica), spesso in forma di diplococco. Le due cellule si toccano per il corpo ed alle estremità hanno una forma a “fiamma di candela” o “punta di lancia”. Capsulato. La patogenicità è legata alla presenza di capsula. Colonie vecchie tendono a perdere la capsula (colonie a forma di “pedina di dama”, “a cratere”, o “colonie fantasma” tipico dello pneumococco). Alfa-emolitico.

Viridante (alfa-emolitico) + capsulato = pneumococco.

Si coltiva su agar-sangue.

#### **Identificazione:**

- Sensibilità all’optochina (così come il pyogenes è sensibile alla bacitracina).
- Fermentazione di inulina.
- Solubilità in bile (che attiva una autolisina).
- Reazione di rigonfiamento capsulare (di Neufeld).

Nella forma capsulata 10 batteri in cavità peritoneale uccidono un topo, nella forma non capsulate ne servono oltre 10000.

La capsula è di natura polisaccaridica.

La capsula ha attività antifagocitaria, è stata recentemente identificata una proteina capace di legare la proteina H del complemento.

Ne sono stati identificati molti ceppi, alcuni sono stati più frequentemente associati ad infezioni polmonari invasive, otiti o meningiti.

È generalmente un’infezione di tipo endogeno.

#### **Fattori di virulenza:**

**Pneumolisina:** citotossina simile a streptolisina O. Lega colesterolo di membrana creando pori. Distrugge epitelio e induce la produzione di TNF-alfa ed IL-1.

**Neuraminidasi:** riduce la viscosità del muco e favorisce l’esposizione delle cellule epiteliali.

**PavA:** adesina ed invasina.

#### **Psp.**

È un membro transitorio della flora delle vie respiratorie.

#### **Patologie:**

**Polmonite globale franca:** Finché non si interessa la pleura non si ha dolore.

**Otite media acuta:** soprattutto nel lattante e nel bambino. Molto comune, alcuni hanno otite ricorrente. Può complicarsi in mastoidite e meningite.

**Infezione dei seni paranasali.**

**Meningite acuta purulenta.**

**Batteriemia.**

**Endocardite pneumococcica.**

**Peritonite.**

(Alcune somigliano a pyogenesi perché anche pneumococcus è un piogeno).

#### **Polmonite pneumococcica:**

Si verifica in caso di alterazione dell’difese naturali del tratto respiratorio:

- **Rallentamento del riflesso epiglottale:** anestesia, morfina, intossicazione alcolica, morbo di Parkinson, somministrazione di farmaci che agiscono sul sistema nervoso.
- **Alterazione dell’apparato mucociliare:** infezioni, fumo di sigaretta, perfrigerazione (raffreddamento improvviso che comporta ipersecrezione di liquidi a livello alveolare il quale impedisce la normale azione dei macrofagi alveolari, non si ha più la **fagocitosi di superficie**).
- **Alterazione della fagocitosi alveolare:** Accumulo di fluidi negli alveoli: insufficienza cardiaca, inalazione di gas irritanti, stasi polmonare da decubito, ecco perché è importante far muovere le persone anziane.

Lo pneumococco è normalmente presente, la sorgente di malattia è endogena. Può comportarsi da patogeno opportunisto.

Per distinguere *S. pneumoniae* dagli altri streptococchi si può usare optochina: lo pneumococco è sensibile, gli altri streptococchi no.

I sali biliari attivano una autolisina dello pneumococco.

#### **Malattie:**

- **Polmonite:** Il microorganismo può portarsi nelle vie aeree profonde per rallentamento del riflesso epiglottale, alterazione del sistema mucociliare o alterazione del sistema fagocitario alveolare.

Lo pneumococco si localizza a livello dei bronchioli, dà origine ad un processo infiammatorio e si nutre dell’essudato, l’accumulo di fluido favorisce la diffusione ad alveoli vicini (polmonite lobare).

Lo stato successivo viene detto **epatizzazione rossa** gli alveoli si riempiono di polimorfonucleati, compare congestione vascolare e l’extravasazione di globuli rossi.

Lo stato ancora successivo prende il nome di **epatizzazione grigia** in cui si accumula fibrina, globuli rossi e bianchi si ritrovano in vari stadi di degradazione.

Infine si ha **risoluzione** con riassorbimento dell’essudato. La risoluzione avviene quando vengono prodotti anticorpi anti-capsulari (a meno di trattamento con antibiotici).

#### **Complicanze:**

- **Infiammazione pleurica.**
- **Batteriemia.**
- **Meningite.**
- **Endocardite o pericardite.**

Con trattamento si ha mortalità del 5%, senza del 30%.

Esiste un vaccino polisaccaridico coniugato contenente elementi capsulari dei 13 sierotipi più diffusi coniugati ad una tossina difterica. I tentativi precedenti usavano solo elementi polisaccaridici con scarsi risultati.

Il vaccino è consigliato in seguito a polmonite anche se non si ha la certezza che la polmonite sia stata sostenuta da *S. pneumoniae*.

**Diagnosi di laboratorio:** Si parte da un campione di escreto, essudati, liquor o sangue. Si coltiva in microaerofilia con agar-sangue. Per l’identificazione di *pneumoniae* si può usare optochina.

**Resistenza:** La resistenza alle penicilline è in aumento, simultaneamente si sta sviluppando resistenza contro altre classi di farmaci.

- **Otite media acuta.**
- **Infezione dei seni paranasali.**
- **Meningite acuta purulenta.**
- **Batteriemia.**
- **Endocardite pneumococcica** (come altri streptococchi)
- **Artrite pneumococcica.**



- **Peritonite pneumococcica.**

## Neisseria

Dicocco Gram-. Si riconosce specie patogene (*N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*) e mole specie commensali.

Crescono solo su agar-sangue o agar-cioccolato. Si può usare agar-Thayer-Martin che su una base di agar-cioccolato aggiunge antimicotici e antibatterici selezionando solo le neisserie patogene.

In caso di campione di liquor con sospetta meningite si coltiva su agar cioccolato (la maggior parte delle meningiti sono dovute a *S. pneumoniae*). Si usa il ThayerMartin in caso di specifica ricerca di neisserie.

La *N. meningitidis* si ritrova comunemente in soggetti sani, però ha caratteristiche completamente diverse da quella patogena.

Si ritrovano in forma di diplococchi, diversi da pneumococco per la conformazione a “chicco di caffè”. Catalasi e ossidasi positive, aerobio stretto, preferisce microaerofilia. Privi di flagelli. Molto labili nell’ambiente esterno, sensibili agli acidi grassi (non si può usare tampone di cotone).

Sono esigenti, si coltivano su terreni con aggiunta di sangue. Presentano pili che hanno importante funzione adesiva.

Rapida ricombinazione genica e trasferimento orizzontale di geni.

*N. meningitidis* (meningococco) ha la metà dei geni di un normale *E. coli*, però ha grande capacità di mutare ed acquisire materiale genetico da altri batteri.

Molecole superficiali del meningococco mimano molecole dell’ospite. Ha la capacità di formare capsula con attività antifagocitaria, sono state riconosciute 13 strutture capsulari in base alle quali sono stati distinti 13 sierotipi (danno più frequentemente malattia A, B, C, W135 ed Y). Spesso la capsula è formata da acido sialico, che mima l’acido sialico dell’ospite e degrada C3b ed inibisce la risposta complemento-mediata. La struttura tra B e C varia minimamente ma il vaccino contro C non dà protezione contro B (Perché? Boh).

L’acido sialico inibisce la funzione di adesine diverse dal pilo.

Un possibile meccanismo per disseminare l’infezione prevede l’espressione intermittente della capsula: deve esprimerla quando passa dall’ambiente esterno o dal circolo e perderla quando fa il suo ingresso nelle cellule della mucosa.

La colonizzazione è sostenuta da un fenotipo non capsulato e non sialilato. L’espressione della capsula può essere modulata per variazione di fase spontanea o per contatto con fattori ambientali o cellule dell’ospite.

**Variazione di fase:** Un alto indice di mutazione porta a generazione rapida di varianti. Più di 100 geni di meningococco vanno incontro a variazione di fase (espressione/non espressione) determinando variazione della virulenza e capacità di eludere i processi immunitari.

La **variazione antigenica** è un meccanismo di evasione immunitaria che utilizza l’espressione di motivi funzionalmente conservati ed antigenicamente distinti.

**Trasformazione:** Prevede il legame ed integrazione di DNA esogeno da parte della cellula. Le specie patogene differiscono dalle altre presentandosi competenti per tutto il ciclo vitale.

**Pili:** proteina per eccellenza che va incontro a variazione antigenica, la ricombinazione può portare all’espressione di 10<sup>7</sup> varianti diverse.

**Membrana esterna:** Porine (3 classi), Rmp (classe 4), Opa ed Opc (classe 5). Le proteine Opa ed Opc sono proteine trans-membrana che favoriscono l’endocitosi dei meningococchi. I recettori sono proteoglicani eparan-solfato e proteine CD66-correlate. La variazione antigenica può originare dalla variazione di fase di enzimi coinvolti nella sintesi di Opa.

**LOS (LipoOligoSaccaride):** Come LPS ma manca antigene O. Viene rilasciato sotto forma di blebs. Elevata tossicità, coinvolta ad esempio nella meningococcemia fulminante. Soggetto a variazione antigenica.

**IgA-proteasi:** tagliano le immunoglobuline A, vengono prodotte soprattutto da batteri che interagiscono con le mucose, in cui le IgA svolgono un ruolo fondamentale nella prima linea di difesa.

**Proteine leganti la transferrina:** il Fe è un elemento fondamentale per la crescita dei batteri.

**Neisseria meningitidis:** Nell’infezione il batterio raggiunge lo spazio sub-aracnoideo. Un importante fattore di virulenza è la capsula polisaccaridica, si distinguono 13 sierotipi in base alla capsula. I ceppi più pericolosi (oltre 90% delle infezioni meningee) sono A, B, C, W135 ed Y. Tutte le forme tranne la B sono immunogene per cui sono stati sviluppati vaccini. Il vaccino contro il ceppo B è di invenzione più recente e richiede tecniche più avanzate.

Esistono altre classificazioni in base ad altre componenti.

Normale commensale non patogeno nel 5-30% degli individui sani, spiccato incremento negli ambienti chiusi. Durante le fasi epidemiche oltre il 70% dei soggetti risulta colonizzato.

La trasmissione è inter-umana diretta per via aerea. La possibilità di sviluppare malattia dipende dal livello di immunità verso il ceppo infettante.

L’immunizzazione può essere dovuta a vaccino oppure naturalmente da infezione precedente da parte di un ceppo a bassa virulenza o da ceppi non patogeni o altri microorganismi (cross-reattività).

Una volta inalato il microorganismo interagisce con le cellule non ciliate delle vie aeree superiori. Può entrare ed uscire subito per trasmettersi ad un altro ospite. Può penetrare attraverso una rottura nella mucosa o all’interno di un fagocita (cavallo di Troia).

Negli individui suscettibili può raggiungere il circolo dove può moltiplicarsi e disseminarsi al SNC.

Dà infezione nello spazio sub-aracnoideo con accumulo di liquido che comprime le meningi. Si drena il liquor per alleviare la pressione, ovviamente con le precauzioni dovute all’elevata pericolosità del microorganismo. Il paziente assume naturalmente la posizione cosiddetta “a cane di fucile” per alleviare il più possibile la pressione intratecale.

Nella colorazione delle neisserie spesso si usa il blu di metilene.

Per proliferare in maniera endocellulare deve essere privo di capsula, per trasmettersi deve essere capsulato: c’è una selezione per cui i microorganismi virulenti sono quelli che riescono a portare a termine lo switch in tempo utile.

**Pili:** vanno incontro a variazione antigenica per conversione genica.

### Diagnosi

**Terapia:** Penicillina, cloramfenicolo, cefalosporine. (soggetta ad aggiornamenti).

**Profilassi:** Rifampicina, ceftriazone o ciprofloxacina. Si effettua in caso di contatto con ammalato.

**Vaccini:** Polisaccaridici oppure polisaccaridici coniugati. Tramite reverse vaccinology è stato sviluppato anche il vaccino contro il sierotipo B, non è mirato contro la capsula ma contro componenti proteiche che inducono la produzione di anticorpi che risultano protettivi contro il microorganismo.

## Neisseria gonorrhoeae

Cocco Gram-, a chicco di caffè, non capsulato, non dà generalmente infezione sistemica. L’infezione è generalmente in sede genitale, trasmessa per contatto diretto perché non essendo capsulato non ha capacità di sopravvivere all’esterno.

62 milioni di casi all’anno, in aumento.

**Fattori di virulenza:** Porine, pili, ...

**Come avviene l’infezione:** il microorganismo aderisce alle cellule non ciliate, il punto di ingresso è il terzo terminale dell’uretra nell’uomo oppure la cervice uterina nella donna. Il patogeno dà infezione locale e si espande per transcoelosi. Si moltiplica nello spazio subepiteliale. Il rilascio di LOS induce TNF-alfa e richiama neutrofili, responsabili dell’emissione purulenta.

L’infezione è prevalentemente genitale ma anche orofaringea o anale.

Nell’uomo l’infezione generalmente dà uretrite, epididimite, prostatite, ascessi periuretrali,

Nella donna l’infezione è asintomatica nel 20-80% dei casi. Inizia come cervicite raramente acuta e con scarso essudato. Può dare salpingite, ascessi

tubo-ovarici e PID (malattia infiammatoria pelvica). La salpingite può determinare una cicatrice da cui deriva sterilità, in questo caso si possono avere gravidanze extrauterine.

Al momento del parto l'infezione può essere trasmessa al bambino e può dare congiuntivite e cecità.

**Farmaco resistenza:** Circa il 50% è resistente alla penicillina (beta-lattamasi). In alcuni casi si ha resistenza alla tetraciclina. Sono presenti ceppi con doppia resistenza.

**Diagnosi di laboratorio:** Materiale: essudato uretrale, tampone uretrale, rettale, cervicale, faringeo, sangue, biopsia, tampone da lesione cutanea.

L'esame si fa con colorazione gram o blu di metilene.

È importante usare un mezzo di trasporto che non consenta la replicazione ma lo preservi dalla disidratazione perché il microorganismo è molto labile.

Isolamento colturale: terreno Thayer Martin e Martin Lewis in microaerofilia.

Identificazione: test di ossidazione carboidrati (acidificazione con glucosio).

La flora batterica locale è principalmente sostituita dalla neisseria.

## **Enterobatteri: Bacilli Gram-**

Comprendono moltissime specie batteriche che hanno come habitat naturale l'intestino di umani ed animali. Si trovano nell'ambiente e nelle acque. Si misura E. coli nell'acqua per valutarne la potabilità. Possono essere mobili o immobili, se sono mobili sono dotati di flagelli peritrichi, momentaneamente possono presentarsi privi di flagelli. Sono tutti in grado di fermentare glucosio producendo acido e gas. Sono catalasi positivi ed ossidasi negativi. Aerobi-anaerobi facoltativi. Anche specie che sono normalmente presenti come commensali possono avere ceppi patogeni, ad esempio *Klebsiella pneumoniae* produttore di carbapenemasi.

Tutti sono in grado di fermentare lattosio tranne *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus*.

Sono tutti negativi al test della citocromo ossidasi, il risultato si legge entro 30 secondi perché se si aspetta più tempo anche altre molecole ossidano il citocromo facendo risultare il test sempre positivo.

**Elementi antigenici:** flagellari H e capsulari K.

**Fattori di virulenza:** Capsula, pili, enterotossine (prodotte da alcuni generi), endotossine, variabilità antigenica. Sono capaci di resistere al killing endocellulare.

Se si spostano di sede possono dare malattie: es. uretrite, meningite nel neonato, enterite.

Per identificare in un campione un batterio di ceppo patogeno si possono usare anticorpi contro ceppi patogeni oppure PCR per evidenziare sequenze genetiche associate a ceppi patogeni.

I principali ceppi patogeni appartengono ai generi *Salmonella* e *Shigella*.