

## Batteriologia

Classi di microorganismi:

- Batteri
- Virus
- Funghi
- Protozoi (non sono oggetto di studio della microbiologia).

Batteri: procarioti.

La maggior parte delle specie viventi sono procarioti. All'interno della classe dei procarioti si trova molta più variabilità rispetto a qualsiasi altra classe di organismi.

Si stima il numero di specie batteriche in circa  $10^{12}$ , il loro numero si stima in circa  $10^{31}$ .

Nel corpo umano si trovano tantissimi batteri che svolgono anche funzioni benefiche, come competere con le infezioni esogene proteggendoci da esse.

La cellula batterica può contenere corpi inclusi, probabilmente riserve energetiche. È circondata da una membrana citoplasmatica che può presentare invaginazioni dette mesosomi. La membrana citoplasmatica è circondata da una parete. Oltre la parete si può trovare una capsula, che non è sempre presente, si riconoscono batteri capsulati e batteri non capsulati. Altro elemento non sempre presente è il flagello, che rende il batterio capace di locomozione.

Criteri di classificazione:

- **Proprietà tintoriali:** Colorazioni di Gram e Ziehl-Neelsen.
- **Morfologia.**
- **Careatteri metabolici.**

### Colorazione Gram:

Prevede 4 step:

1. 1° colorante: **cristalvioletto**.
2. Mordenzante: soluzione a base di iodio.
3. Decolorazione con miscela di alcol e acetone.
4. 2° Colorante: quasi sempre **safranina**, per colorare anche i batteri Gram-.

Nei batteri Gram+ la parete cellulare è molto spessa e ciò permette di ritenere la colorazione al cristalvioletto.

I batteri Gram- hanno una parete più sottile che contiene una membrana esterna.

Al primo step il cristalvioletto penetra in entrambe le tipologie di batteri, con il trattamento mordenzante lo iodio forma grandi complessi con il cristalvioletto, questi complessi non possono più attraversare la parete spessa dei Gram+ e rimangono intrappolati. I Gram- invece con il trattamento decolorante perdono il cristalvioletto. Alla fine si applica una colorazione di contrasto, di solito safranina (rossa) per colorare anche i Gram-.

### Colorazione Ziehl-Neelsen:

I micobatteri contengono nella loro parete cere e lipidi che non li rendono colorabili con il metodo di Gram (appaiono come Gram+) (NdA appaiono come Gram+ perché la parete è impermeabile al decolorante a base alcolica della colorazione Gram). Nella colorazione Ziehl-Neelsen si usa un metodo di decolorazione più forte contenente acido cloridrico che decolora tutto tranne i micobatteri.

1° colorante fucsina fenicata (rosso).

2° colorante blu di metilene.

### Morfologia:

- **Cocchi:** forma sferica. Quando si dividono possono rimanere aggregate, quando si osservano cocci disposti a catenella si parla di **streptococchi**, coppie di cocci si dicono **diplococchi**, cocci aggregati in ammassi o grappoli irregolari si chiamano **stafilococchi**. La forma di questi aggregati dipende dall'orientamento del piano di divisione mitotica.
- **Bacilli:** forma bastoncellare. Anche i bacilli possono rimanere aggregati, si parla quindi di **streptobacilli**. Un batterio che ha forma intermedia tra un cocco ed un bacillo si chiama **coccobacillo**.
- **Spirilli(Vibrio, Spirillum, Spirochete):** A spirale, il **vibrio** è molto corto, “a virgola”. Lo **spirillum** è una spirale più lunga Gam+, lo **spirochete** è una spirale più lunga Gram-.

**Treponemi:** Sono a spirale ma non sono classificati come Gram+ o Gram- perché sono molto sottili e non sono visibili al microscopio ottico, sono visibili al microscopio a contrasto di fase.

### Batteri sporigeni:

Hanno la capacità di formare spore, è importante ricordare che le spore batteriche sono una strategia del batterio per resistere in ambienti avversi, a differenza delle spore fungine che sono una strategia riproduttiva. Di interesse medico sono fondamentalmente 2 generi: il genere **bacillus** ed il genere **clostridium**. Producono una spora quando si trovano in condizioni molto sfavorevoli, soprattutto carenza di nutrienti. Le spore sono molto resistenti anche ai disinfettanti. Si possono osservare anche le spore con la colorazione Gram: si osserva una zona all'interno della cellula resistente alla colorazione (la spora che si sta formando).

### Caratteri metabolici:

1. **Batteri aerobi stretti:** Necessitano di ossigeno per svilupparsi e replicarsi.
2. **Anaerobi obbligati:** Non crescono in presenza di ossigeno.
3. **Aerobi/anaerobi facoltativi:** Possono crescere sia in assenza che in presenza di ossigeno.

## Citologia Batterica

Tra le componenti della cellula batterica descriviamo:

### Fimbrie o pili

Filamenti che sporgono dal batterio.

### Capsula

Strato lasso generalmente di natura polisaccaridica, in alcuni casi di natura proteica. I carboidrati sono sostanze idrofiliche quindi la capsula protegge il batterio dall'essiccamento. Si trova indifferentemente su batteri Gram+ o Gram-, non si trova in tutti i batteri (non è indispensabile) si dividono i batteri in capsulati e non. Può essere presente in forma molto sottile, in questo caso prende il nome di **microcapsula**, quando invece non è compatta ma ha margini sfrangiati si dice **strato mucoso** o **glicocalice**. Le capsule di batteri vicini possono fondersi, formando aggregazioni di cellule batteriche in un'unica matrice capsulare (biofilm).

Di solito i batteri patogeni sono capsulati in vivo.

Metodi di visualizzazione della capsula: inchiostro di china, reazione di rigonfiamento capsulare di Neufeld.

### Funzioni della capsula:

- Accumulo di materiale energetico.
- Maggiore resistenza all'essiccamento.
- Modifica l'aspetto delle colonie (colonie lisce con capsula presente o colonie ruvide senza capsula).
- Fattore di virulenza (impedisce l'opsonizzazione?).
- Impedisce la penetrazione di farmaci.

- Protegge dalla fagocitosi (maschera i siti di legame per i recettori dei macrofagi).
- Adesione a superfici.
- Antigene (anticorpi anti-capsulari).

All'interno della stessa specie nella capsula si osserva una variabilità di composizione.

Il biofilm consente di colonizzare superfici inerti, come ad esempio la cannula di un accesso venoso oppure una protesi impiantata.

### Parete

Se privati della parete i batteri muoiono. Gli unici batteri privi di parete sono i micoplasmi.

Costituita da catene di carboidrati concentriche a cui sono legati aminoacidi (peptidoglicano). È una struttura rigida. Si trovano fino a 40 strati di peptidoglicano nei batteri Gram+. Nei batteri Gram- invece si trovano solo 2-3 strati di peptidoglicano, tutti gli altri componenti sono organizzati a formare la membrana esterna (che contiene i lipopolisaccaridi, anche noti come endotossine). In entrambi i casi la funzione della parete è la stessa: proteggere i batteri dalla lisi per shock osmotico. Conferisce la forma ai batteri e ne determina le proprietà tintoriali, può contenere fattori di patogenicità batterica.

L'unità strutturale del peptidoglicano batterico è costituito da due carboidrati azotati: **N-acetilglucosamina (NAG)** e **acido N-acetilmuramico (NAM)** (specifico dei batteri). Legame beta-1,4.

Al NAM è legato un tetrapeptide, il legame tra polipeptidi avviene tra il 3° residuo di una catena e il 4° della successiva. L'ultimo aminoacido è una D-Alanina.

Esempi: in *E. coli* la sequenza peptidica è: L-Alanina, D-Glutammato, acido meso-diaminopimelico, D-Alanina.

In *S. aureus* la sequenza è: L-Alanina, D-Glutammato, L-Lisina, D-Alanina. Nei Gram+ si può trovare un ponte di pentaglicina che lega le catene polipeptidiche, ad esempio questo succede in *S. aureus*.

Nei batteri Gram- in terza posizione è presente acido meso-diammino-pimelico, nei Gram+ abbiamo invece L-lisina.

La differenza tra Gram+ e Gram- sta anche nel numero di legami crociati, più basso nei Gram- (minore compattezza).

**Sintesi del peptidoglicano:** Si parte dalla sintesi del NAM a cui sono aggiunti gli aminoacidi, la D-Alanina deve essere sintetizzata perché non è normalmente presente, viene aggiunta anche in posizione 5 (pentapeptide), viene poi aggiunta l'N-acetilglucosamina. Il monomero così formato viene trasportato all'esterno dal **bactoprenolo**. Una volta all'esterno si formano prima i legami tra glucidi e poi tra aminoacidi, una transpeptidasi rimuove la 5° D-alanina e lega il 3° residuo di una catena al 4° di quella vicina, si riduce così la catena peptidica ad un tetrapeptide.

Tra gli antibiotici che interferiscono con la sintesi di parete abbiamo: la **bacitracina** che inibisce il recupero del bactoprenolo.

La **cicloserina** inibisce la trasformazione di L-Alanina in D-Alanina.

La **penicillina** inibisce la transpeptidasi che crea i legami crociati tra catene peptidiche.

Tra i componenti inseriti nello strato di peptidoglicano dei batteri Gram+ si trovano:

- Acidi teicoici.
- Acidi lipoteicoici, che includono parti lipofile (costituite da un acido grasso) inserite nella membrana citoplasmatica.
- Carboidrati (es carboidrato C negli streptococchi).
- Proteine varie con varie funzioni.

### Parete dei Gram-:

Fuori dalla membrana citoplasmatica si hanno pochi strati di peptidoglicano ed una membrana esterna con struttura molto diversa dalla membrana citoplasmatica, in particolare lo strato interno del doppio strato fosfolipidico è formato da fosfolipidi come la membrana interna, lo strato esterno invece è formato da **lipopolisaccaride** (elemento fondamentale). Nella membrana esterna si trovano varie proteine, tra cui porine (proteine canale con struttura trimerica) che permettono l'entrata di nutrienti (altrimenti la membrana esterna sarebbe molto impermeabile) e lipoproteine che la ancorano alla membrana citoplasmatica.

I lipopolisaccaridi sono anche chiamati **endotossina** perché ha effetti tossici e facendo parte della cellula batterica viene rilasciata solo quando essa va incontro a lisi (in realtà anche se i termini sono usati come sinonimi esistono molecole che si comportano come endotossine ma non sono correlate ai lipopolisaccaridi), distinte dalle **esotossine** perché queste ultime non sono componenti fondamentali della cellula batterica ma vengono sintetizzate nel citoplasma e rilasciate successivamente.

La membrana esterna è una struttura impermeabile ed altamente selettiva per quanto riguarda le molecole che possono passare grazie alle porine.

**Porine:** Proteine aggregate a formare pori dedicati al passaggio di sostanze idrofiliche. Si ritrovano porine **aspecifiche** che permettono il passaggio di ampie classi di molecole affiancate da porine altamente **specifiche**.

Gli antibiotici o i farmaci antibatterici penetrano nella cellula tramite le porine, uno dei meccanismi di antibiotico-resistenza è la modificazione delle porine che smettono di legare e trasportare la molecola antibiotica.

Le porine hanno importanza anche nell'adesione alle cellule dell'ospite, nell'invasività delle cellule dell'ospite e nell'attività citotossica.

**Lipopolisaccaride:** Costituito da tre porzioni, il **lipide A**, porzione lipidica che sostituisce i fosfolipidi sulla membrana esterna, una parte centrale detta **core** di natura polisaccaridica (divisa in core interno e core esterno), ed una lunga catena di zuccheri chiamata **antigene O**.

- Lipide A: glicofosfolipide, componente endotossica, interagisce tramite gruppi fosfato con lipopolisaccaridi adiacenti.
- Core: Polisaccaride ramificato, 9-12 zuccheri, contiene acido cheto-desossi-otconico ([KDO?](#)) ed un eptoso. Spesso contengono anche componenti non glucidiche come fosfato, aminoacidi ed etanolamina.
- Antigene O: 50-100 ripetizioni di una unità da 4-7 zuccheri.

Il lipopolisaccaride ha forte capacità di interagire con il sistema immunitario, inducendo spesso febbre, nei casi più gravi può portare a shock settico.

Un caso particolare è la **meningite da meningococco**: Il batterio libera vescicole (dette blebs) ricche di lipopolisaccaride (si ha quindi rilascio massiccio di endotossina anche senza la lisi dei batteri), si può avere morte da infezione con meningococco senza neanche avere meningite, il rilascio di endotossina è sufficiente ad uccidere il paziente prima ancora che il patogeno raggiunga le meningi (shock endotossico o shock settico).

Siamo continuamente esposti a bassi livelli di endotossina (flora batterica) che però a dosaggi così bassi ha funzione immunomodulatrice.

### Effetti dell'endotossina:

1. Effetto pirogeno.
2. Attiva cellule che producono interleuchine (macrofagi, linfociti B, cellule endoteliali, piastrine, granulociti).
3. Infiammazione.
4. Vasodilatazione → ipotensione → shock.
5. Attivazione del complemento.
6. Stimola la coagulazione: coagulazione intravasale disseminata, segno caratteristico di infezione da Gram- (ad esempio discriminazione della meningite da meningococco da altri agenti che possono causare meningite, importante perché la terapia è diversa e deve essere applicata tempestivamente): **petecchie** (sintomo tipico).

Si hanno questi effetti per tutte le infezioni da Gram- perché il lipide A è una struttura altamente conservata, anche se varia tra le specie di batteri Gram-.

Esiste una classe di batteri privi di parete: i **micoplasmi**, da tenere presente perché sui micoplasmi non sono attivi tutti gli antibiotici che agiscono sulla sintesi del peptidoglicano.

I **micobatteri** hanno invece una parete con struttura peculiare in cui il peptidoglicano è legato covalentemente con un polimero di arabinogalattano e

circondato da uno strato di lipidi complessati con cere.

(Nonostante il nome micobatteri e micoplasmi sono organismi molto differenti, da non confondere!)

### Struttura della parete dei Micobatteri:

[Parete ricca di lipidi e cere, esternamente alla membrana strato di peptidoglicano è presente lo strato di peptidoglicano con polisaccaridi a lunga catena come arabinogalattani, lipoarabinomannani e lipomannani che agiscono da ponte tra peptidoglicano e micomembrana. Strato interno composto da acidi micolici e strato esterno costituito da glicolipidi e lipidi fenolici.]

Hanno una parete molto particolare ricca di lipidi e cere.

All'esterno della membrana citoplasmatica presentano un sottile strato di peptidoglicano e più all'esterno uno strato (sempre parte della parete) formato da polisaccaridi a lunga catena come arabinogalattani, lipoarabinomannani e lipomannani che agiscono da ponte tra peptidoglicano e micomembrana, ancora più esternamente si ha la micomembrana formata da glicolipidi fenolici.

Si replicano molto lentamente (probabilmente a causa della difficoltà nel sintetizzare una parete così complessa). La parete risulta praticamente impermeabile a molte molecole usate nella pratica clinica, rendendo i micobatteri invulnerabili ad un'ampia gamma di antibiotici.

Es. tubercolosi, lebbra.

## Membrana citoplasmatica

Composta da proteine, lipidi e carboidrati. Permeabilità altamente selettiva. Non sono presenti steroli (es. colesterolo) che sono sostituiti da **terpenoidi** con la stessa funzione di stabilizzazione.

Rispetto alle cellule eucariotiche abbiamo le seguenti funzioni aggiuntive:

- Sito di ancoraggio per proteine coinvolte anche in reazioni bioenergetiche.
- Sito di conservazione energetica (forza motrice protonica, nelle cellule eucariotiche avviene a livello della membrana mitocondriale interna).
- Segrega i cromosomi.
- Sede di proteine coinvolte nella sintesi del peptidoglicano e nella trasduzione del segnale.

(NdA alcune di queste funzioni sono comuni alle membrane eucariotiche).

## Mesosomi

Invaginazioni pluristratificate della membrana, possono sembrare organelli ma non formano compartimenti chiusi, hanno funzioni varie nella divisione cellulare (legame di materiale genetico, mesosomi settali). Respirazione cellulare (mesosomi respiratori). Biosintesi di componenti della parete (mesosomi biosintetici).

## Nucleoide

È una zona di forma irregolare non separata dal resto del citoplasma (ricorda il nucleo eucariotico ma è molto diverso) la cui struttura non è nota con precisione. Contiene: il genoma batterico addensato (il genoma batterico è generalmente circolare e la sua dimensione varia ampiamente ma supera di molto le dimensioni della cellula. È quindi necessario uno stretto ripiegamento), enzimi necessari a duplicazione e trascrizione, occasionalmente corpi inclusi (che ricordiamo avere probabilmente funzione di riserva energetica).

## Citoplasma

Contiene:

- Cromosoma: Singolo, circolare, doppio filamento.
- Eventuale materiale genetico extra-cromosomico (plasmidi).
- Ribosomi: Fanno la sintesi proteica (stessa funzione di quelli eucariotici ma struttura diversa).
- Granuli: Riserva energetica.

## Ribosomi batterici

Differenti da quelli eucariotici, differenze importanti che rendono possibile sviluppare farmaci selettivi per inibire quelli batterici lasciando indisturbati quelli dell'ospite.

## Cromosoma batterico

Circolare, si può trovare aperto in caso di rottura oppure superavvolto. A seconda della specie è grande da 1000 a 5000 kbp. Non è diploide. Presenti sequenze codificanti su entrambi i filamenti. In genere geni che codificano per proteine con funzioni correlate sono vicini e raggruppati in unità trascrizionali (**operoni**). Non ci sono introni.

Si possono avere frammenti di DNA extracromosomiali detti **plasmidi**, sono generalmente molto più piccoli, dotati di replicazione autonoma e non hanno generalmente analogie di sequenza con il DNA genomico. Alcuni plasmidi presentano regioni di omologia e possono quindi integrarsi nel genoma (**episomi**). Alcuni plasmidi possono essere trasferiti tra batteri tramite una struttura che prende il nome di **pilo sessuale** aumentando la variabilità genetica dei batteri (in questo caso il plasmide codifica per tutte le proteine necessarie alla costruzione del pilo sessuale).

Sul plasmide si possono avere geni che codificano per tossine, fattori di resistenza agli antibiotici, o altro.

## Flagello

Non sempre presente, responsabile della locomozione. Permette di distinguere i batteri mobili dai batteri immobili. È costituito da tre componenti:

- **Filamento:** elicoidale, all'esterno, formato dalla proteina flagellina. Composizione specie-specifica.
- **Uncino:** Membrana ricurva (guaina). Collega il filamento al corpo basale.
- **Corpo basale:** Fissa il flagello alla membrana e fornisce energia per il movimento. Costituito da una serie di anelli, 4 nei Gram- (corrispondenti agli strati che attraversa: LPS, peptidoglicano, parete, membrana), 2 nei Gram+ (parete, membrana).

I flagelli possono essere in numero variabile, permettendo di distinguere i batteri mobili in:

- **Monotrichi:** 1 flagello.
- **Lofotrichi:** Più flagelli in posizione terminale.
- **Peritrichi:** Flagelli distribuiti su tutta la superficie.

### Come fanno i batteri a muoversi e cambiare direzione?

Consideriamo i batteri peritrichi: quando devono andare in una certa direzione si spostano tutti i flagelli dalla parte opposta e ruotano in senso antiorario, quando deve cambiare direzione i flagelli si riorganizzano dall'altra parte e di nuovo per rotazione antioraria fanno spostare il bacillo nella direzione opposta.

I batteri con flagelli polari (monotrichi e lofotrichi) non possono spostare il/i flagello/i ma invertono il suo senso di rotazione.

La presenza di un flagello è un fattore importante, spesso la mobilità è un importante fattore della patogenicità (es. *Helicobacter Pylori*).

Il movimento non avviene a caso ma seguendo uno stimolo chimico o luminoso esterno (**chemotassi** o **fototassi**).

Lo stimolo può essere positivo (attrae il batterio) oppure negativo (repelle il batterio). In assenza di stimoli il movimento è casuale.

La presenza di flagelli, come già detto, influenza la patogenicità in molti modi:

- *H. Pylori* ha la capacità di attraversare il muco gastrico.
- *E. Coli* può migrare verso le vie urinarie.
- Altri batteri possono migrare verso il circolo ematico oppure essere facilitati nell'invasione cellulare e nell'adesione a superfici.

Oltre ai flagelli si trovano ulteriori appendici: **fimbrie** o **pili**

Costituite da proteine chiamate piline, non hanno ruolo nel movimento ma sono coinvolte nell'adesione e nell'ancoraggio (anch'esse importanti nella

patogenicità). es. gonococco che lega le cellule della mucosa genitale, i gonococchi privati delle fimbrie non sono più in grado di dare malattia.  
FINE DELLA CITOLOGIA BATTERICA (ARGOMENTO FONDAMENTALE DELLA PROVA IN ITINERE).

## Riproduzione e crescita dei batteri

Avviene per scissione binaria (asessuata): una cellula madre si divide in due cellule figlie identiche alla madre.

Prima della divisione il cromosoma è legato al mesosoma settale ed inizia a duplicarsi, nel frattempo in posizione centrale si forma un setto, le due copie del cromosoma si spostano in direzioni opposte, il setto si va a chiudere e le cellule figlie si separano.

**Tempo di generazione:** tempo necessario ad una cellula per replicarsi. es. germi comuni come *E. Coli*: circa 20 minuti. Batteri a lenta crescita come i micobatteri: circa 20 ore (per questo sono necessarie procedure speciali e soprattutto tempi più lunghi per coltivare e realizzare la diagnosi di micobatteri e altre specie a lenta crescita).

Il cromosoma di *E. coli* però si duplica in 40 min, come è possibile? Il cromosoma già mentre è ancora parzialmente replicato, prima della divisione, inizia un'altra replicazione.

(omissis: basi di genetica, la replicazione del DNA è semiconservativa, ecc...)

Le forcelle replicative si formano lungo tutto il genoma (multiple origini di replicazione) ed operano contemporaneamente.

La crescita dei batteri non è solo esponenziale, si divide in varie fasi.

1. **Fase di Latenza:** Assenza di crescita rilevabile.
2. **Fase Esponenziale:** Massima attività replicativa.
3. **Fase Stazionaria:** Il numero di cellule batteriche rimane costante, è stato raggiunto il limite di popolazione che può sostenere l'ambiente in cui si trova la colonia.
4. **Fase di Morte:** Le cellule vanno incontro a morte a causa della fine delle risorse o dell'accumulo delle sostanze di scarto.

### Fase di Latenza

Una volta inoculati i batteri in un terreno fresco non iniziano subito a crescere, devono adattarsi al terreno ed esprimere gli enzimi necessari ad utilizzare i nutrienti del terreno. Per non avere latenza bisognerebbe usare per la coltura lo stesso terreno in cui stava crescendo il campione di provenienza e prelevare i batteri da una coltura in fase esponenziale.

### Fase Esponenziale

Il numero di batteri raddoppia ogni tempo di generazione, la velocità può essere condizionata dalle caratteristiche del terreno ed ambientali.

### Fase Stazionaria

In un sistema chiuso la crescita esponenziale non può continuare indefinitamente, esiste un limite determinato dalla disponibilità delle risorse o dall'accumulo di sostanze di scarto.

### Fase di Morte

Se si lascia incubare la coltura dopo la fase stazionaria i batteri muoiono, in alcuni casi vanno incontro a lisi, in altri rimangono cellule intere ma non più vitali (importante ricordare questo, se si misura la concentrazioni di batteri presenti con un densimetro ottico o al microscopio anche le cellule morte ma ancora intere contribuiscono alla misurazione).

I batteri **sporigeni** quando finiscono i nutrienti invece di andare incontro a morte **si trasformano in spore**.

Per mantenere le colture in fase esponenziale si usa un apparato chiamato **chemostato** con un contenitore in cui proliferano i batteri nel quale viene continuamente aggiunto terreno mentre altro terreno viene scaricato (insieme ai batteri ed alle sostanze di scarto in esso contenuti).

### Conta Batterica:

Si usano vetrini speciali con “camere di conta”. Non è possibile distinguere i batteri vivi da quelli morti.

Per contare i batteri vivi (**unità formanti colonia**) si prende un campione e si diluisce a vari livelli. Si seminano le preparazioni diluite su piastre solide e si contano le colonie formate. Le colonie devono essere distanziate in modo da essere sicuri che ogni colonia sia dovuta ad un singolo batterio, ecco perché la diluizione. Sapendo il numero di colonie formate, la quantità di campione inoculato e la diluizione si calcola la concentrazione batterica nel preparato iniziale.

Un terzo metodo è contare la massa cellulare misurando la torbidità (spettrofotometro) (NdA: probabilmente basta un densimetro ottico, non sono lo stesso macchinario, il densimetro non è sensibile al colore).

(Si potrebbe anche misurare il peso secco facendo asciugare la massa ottenuta per centrifugazione.)

Si tratta ancora una volta di conta totale perché le cellule morte se non si lisano contribuiscono alla torbidità e le componenti cellulari contribuiscono comunque al peso.

### Di cosa ha bisogno un batterio per crescere?

Sostanze nutritive che servono al metabolismo energetico (produzione di ATP) ed al metabolismo biosintetico (sintesi dei componenti della cellula batterica).

### Vie metaboliche usate dai batteri per produrre energia:

**Fermentazione:** avviene in assenza di ossigeno, i substrati possono essere carboidrati, proteine o acidi organici. Processo veloce ma poco efficiente (lo stesso substrato metabolizzato in presenza di ossigeno genera molto più ATP).

**Respirazione:** Richiede ossigeno, più efficiente (rende disponibile più energia per ogni molecola combustibile utilizzata).

**Fotosintesi:** Non è di interesse medico.

**Acqua:** Solvente fondamentale, alcuni batteri possono sopravvivere in mancanza di acqua, sono i batteri sporigeni (non vengono uccisi ma non sono capaci di rimanere in fase proliferativa).

### Macroelementi

**Fonte di Carbonio:** I batteri si dividono in autotrofi se possono utilizzare carbonio inorganico (es. organismi fotosintetici) o eterotrofi se devono necessariamente usare carbonio di origine organica.

**Fonte di Azoto:** possono usarne varie forme, sia organico che inorganico, alcuni addirittura atmosferico (batteri azotofissatori).

**Ossigeno:** esigenza variabile a seconda delle specie di batteri, alcuni ne hanno bisogno, per alcuni è tossico, altri possono vivere con o senza.

**Fosforo:** componente degli acidi nucleici e dei fosfolipidi.

**Zolfo:** componente di alcuni aminoacidi.

**Altri elementi:** K, Mg, Ca, Na.

**Fattori organici di crescita:** fattori indispensabili alla crescita del batterio ma che il batterio non può sintetizzare.

Oltre alle sostanze presenti i batteri dipendono dalle caratteristiche ambientali come la temperatura o il pH.

### Batteri anaerobi:

Non sono dotati di catena di trasporto degli elettroni quindi non possono utilizzare l'ossigeno come accettore finale di elettroni. Si dividono in

- **Anaerobi tolleranti (facoltativi):** tollerano la presenza di ossigeno perché riescono a detossificare i suoi prodotti dannosi, non lo possono tuttavia utilizzare per il metabolismo.
- **Anaerobi obbligati o stretti:** Non sono capaci di detossificare le specie reattive prodotte dall'ossigeno e ne vengono uccisi. La resistenza all'ossigeno varia in base alla specie ma i più resistenti non sopravvivono oltre ad una concentrazione atmosferica di ossigeno pari ad 8% (ricordiamo che la concentrazione atmosferica normale è pari a 20.95%).

### Batteri aerobi:

Hanno catena respiratoria, usano l'ossigeno come accettore finale di elettroni.

- **Aerobi stretti:** L'ossigeno è indispensabile per la loro crescita.
- **Aerobi facoltativi:** In presenza di ossigeno usano la respirazione, in sua assenza proliferano comunque ma usano la fermentazione.
- **Microaerofili:** Usano l'ossigeno ma hanno bisogno di una concentrazione più bassa rispetto a quella atmosferica.

Sulla base del range di **pH** a cui crescono i batteri si classificano:

- **Acidofili**
- **Neutrofili**
- **Alcalofili**

La maggior parte dei batteri di interesse medico sono neutrofili, ma si incontrano anche alcalofili come *Vibrio cholerae*.

In base alla **temperatura** si classificano:

- **Ipertermofili** (> 80°C)
- **Termofili** (45-70°C)
- **Mesofili** (vicino a 37°C)
- **Psicrotrofi** (10-15°C)
- **Psicrofili** (intorno a 0°C)

**Attività dell'acqua (concentrazione di NaCl)**

- **Alofili** (concentrazioni saline 1-30%, in realtà non "amano" il sale ma non ne vengono uccisi a differenza di altre specie).
- **Alotolleranti** (tollerano basse concentrazioni).

**Come si coltivano i batteri:**

Si cerca di ottenere la riproduzione dei microorganismi in un ambiente artificiale, fornendo loro le sostanze nutritive necessarie e le condizioni ambientali adatte.

Il terreno di coltura ovviamente deve essere sterile.

I terreni di coltura si classificano in base a:

Composizione chimica:

- **Organici complessi** (naturali). Es. estratto di lievito, infuso di cervello, ecc... Usati per l'isolamento di germi esigenti.
- **Sintetici** (composizione nota).

Stato fisico:

- **Liquido:** Limpidi quando sono sterili, evidenziano la crescita batterica tramite intorbidimento. Es. infuso di cuore e cervello.
- **Solido** (contiene agar): Consistenza ottenuta tramite aggiunta di agar. es. agar-sangue, agar-cioccolato (agar-sangue trattato ad 80°C\* per indurre la lisi dei globuli rossi, è più nutriente e permette la crescita di germi più esigenti). Permettono isolamento in coltura pura e osservare morfologia delle colonie.

\*I terreni sono solitamente sterilizzati in autoclave, le eventuali sostanze non termoresistenti (es. sangue o antibiotici) sono aggiunte dopo il trattamento termico.

Prestazioni:

- **Nutrizionali**
- **Selettivi.** Sono terreni che selezionano e permettono la crescita solo di alcune specie batteriche, nel terreno è stato aggiunto un agente inibitorio per i batteri che non voglio isolare (selezione negativa).

Esempi:

- Agar sale-mannite (7.5% NaCl, solo gli stafilococchi possono crescere a queste concentrazioni).
- Agar MacConkey, contiene sali biliari che inibiscono la crescita della maggior parte dei batteri Gram+ (selettivo per isolare Gram-).
- Agar Thayer Martin (agar cioccolato con aggiunta di antibiotici, gli unici a crescere sono neisserie).

Gli esempi sono tutti solidi ma i terreni selettivi possono anche essere liquidi.

- **Differenziali.** Permettono alle colonie di un dato batterio di essere riconosciute a prima vista.

Esempi:

- Agar sale-mannite: contiene un indicatore di pH, crescono solo stafilococchi. Il terreno cambia colore solo attorno alle colonie di *S. aureus* che fermenta la mannite ed acidifica la zona di terreno in cui si trova.
- Agar MacConkey: seleziona enterobatteri, contiene lattosio ed un indicatore di pH, discrimina chi fermenta il lattosio (acidificazione) e chi non lo fa.

- **Arricchimento.** Ha lo scopo di arricchire il numero di batteri che si vogliono isolare. Il terreno di arricchimento è sempre liquido. es. se voglio indagare una sospetta salmonellosi devo analizzare un campione di feci (non sono commensali, sono presenti solo in caso di malattia). Sono troppo pochi per essere visti nella coltura su piastra (verrebbero sovrastati dalle colonie di batteri commensali), si usa allora il terreno al selenito che allunga la fase di latenza dei batteri commensali, dopo un'incubazione di 6-8h si può seminare su terreno solido perché la coltura si è arricchita della specie di interesse. Rimangono comunque altre colonie. Se si aspetta troppo anche i batteri commensali vanno in fase esponenziale e non si vede nulla comunque.

Nella semina su piastra solida si usa una tecnica particolare (vedi slide) per ottenere concentrazioni di batteri via via decrescenti sui vari settori della superficie della piastra e poter isolare le singole colonie nelle zone a concentrazione più bassa.

In laboratorio più che di singola cellula batterica si parla di unità formante colonia.

Le piastre si incubano sotto-sopra per evitare la formazione di condensa.

**Coltivazione degli anaerobi obbligati** bisogna utilizzare contenitori o buste chiusi in cui si immettono sostanze riducenti che riducono l'ossigeno presente. La manipolazione avviene in camere specializzate con atmosfera priva di ossigeno.

## La spora batterica

Da non confondere con le spore fungine, che sono elementi replicativi. Nei batteri la spora non ha ruolo nella replicazione ma rappresenta una forma particolare della cellula in cui si trasformano alcuni batteri (sporigeni) in condizioni avverse, è quindi una struttura che permette al batterio di sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli. Dal punto di vista metabolico è una struttura quiescente e intatta. I generi di batteri sporigeni che ci possono infettare sono *Bacillus* e *Clostridium* (esistono altri batteri sporigeni ma non sono di interesse medico). I bacilli sono Gram+ aerobi, i clostridi sono Gram- sempre a forma bacillare, anaerobi stretti. es. *Clostridium tetani* prolifera spesso nelle ferite lacerate contuse con compressione dei vasi quindi si genera un ambiente anaerobico. Può anche proliferare anche in ferite minori, il fatto che non siano stati distrutti i vasi non è automaticamente sinonimo di buona diffusione di ossigeno, soprattutto se consideriamo le piccole dimensioni delle cellule batteriche è facile che si formino "sacche" in cui la concentrazione locale di ossigeno è molto bassa. In queste condizioni le spore di tetano possono proliferare e tornare alla fase metabolicamente attiva che produce tossina dannosa per il sistema nervoso centrale. La tossina tetanica blocca il rilascio di GABA e glicina da parte degli interneuroni inibitori, i motoneuroni risultano così eccitati in modo anomalo con conseguente paralisi spastica. *Clostridium botulinum* a differenza di *C. tetani* non prolifera nel corpo ma uccide per ingestione della tossina preformata, prolifera nel cibo in condizioni anaerobiche, ad esempio nei sottoli. La tossina botulinica penetra nel terminale presinaptico dei neuroni che rilasciano acetilcolina (come i motoneuroni) tramite vescicole endocitotiche, con l'acidificazione della vescicola si attiva una parte della tossina che rompe la vescicola stessa e fa

rilasciare la tossina nel citoplasma. Una volta nel citoplasma la tossina botulinica agisce tagliando le proteine SNARE, ciò rende impossibile il rilascio di acetilcolina e l'attivazione della fibra muscolare.

La paralisi causata dalla tossina botulinica è flaccida, a differenza del tetano. In entrambi i casi la morte sopraggiunge quando la paralisi interessa i muscoli respiratori.

Al microscopio durante la formazione della spora si osserva spesso la caratteristica forma a “bacchetta di tamburo” quando il diametro della spora supera lo spessore del bacillo e ne induce il rigonfiamento ad una estremità.

In realtà la **posizione in cui si forma la spora** varia tra le specie e risulta utile nella loro identificazione, si riconoscono endospore in sede **centrale**, **subterminale** o **terminale**.

Nella spora si hanno vari strati di protezione. È la forma microbica più resistente in assoluto, resiste a raggi ultravioletti, essiccazione, temperature alte o basse e disinfettanti chimici.

La spora si forma dentro la cellula vegetativa (per questo prende il nome di **endospora**). Non essendo metabolicamente attiva non contiene RNA.

La conversione da batterio a spora si chiama **sporificazione** o **sporulazione**.

La conversione da spora a forma metabolicamente attiva si compone di tre fasi: **attivazione**, **germinazione** ed **esocrescita**,

**Struttura della spora:**

- **Core:** Anche detto protoplasto, contiene una copia del genoma, ribosomi, materiali di riserva energetica. Privo di acqua, l'acqua è sostituita nel suo ruolo di stabilizzazione delle macromolecole dall'acido dipicolinico complessato con ioni calcio (**dipicolinato di calcio**). L'acido dipicolinico in natura è stato osservato solo nelle spore. E SASP (Small Acid Soluble Proteins) che avvolgono il DNA a scopo protettivo, nelle prime fasi di crescita vengono degradate e funzionano da sorgenti di aminoacidi.
- **Membrana interna**
- **Parete della spora:** peptidoglicano uguale alla parete batterica, fa da primer per la ricostruzione della parete.
- **Corteccia:** Peptidoglicano un po' più lasso di quello cellulare, può rimuovere acqua dal protoplasto (l'interno della spora) tramite osmosi, fornisce protezione dai danni da calore e irradiazione.
- **Membrana esterna**
- **Rivestimento proteico** (tuniche sporali): Spessa struttura composta da strati proteici, dal 30 al 60% del peso secco della spora. Forte presenza di cisteina che forma numerosi ponti disolfuro aumentando la rigidità della struttura. Contiene molti aminoacidi idrofobici.
- **Esosporio:** Strato lasso che circonda la spora, ruolo non chiaro.

La spora alla colorazione di Gram rimane incolore.

La spora per germinare deve essere attivata, in natura l'attivazione è ottenuta con l'invecchiamento, la spora che invecchia perde compattezza negli strati esterni. In laboratorio la spora può essere attivata con trattamento ad alta temperatura, è un principio usato anche nella pastorizzazione: sebbene la spora non possa venir uccisa dalla temperatura con successivi cicli di riscaldamento si inducono le spore ad attivarsi e proliferare ed i batteri in fase vegetativa vengono uccisi nei cicli di riscaldamento successivi.

**Fasi della sporificazione:**

Viene attivata quando il batterio rileva condizioni di carenza di sorgenti di N, C o P oppure quando si trova in condizioni di alta densità cellulare.

Richiede circa 8 ore ed avviene in più fasi:

1. Si forma un filamento assiale costituito da materiale genetico.
2. Si inizia a formare il setto come nella replicazione batterica. Nel caso della produzione della spora il setto è asimmetrico e separa la zona dove si formerà la spora dal resto della cellula.
3. Il setto continua a crescere ed ingloba in una seconda membrana la spora immatura. Il processo diventa irreversibile.
4. Si forma la corteccia, si ha la disidratazione del protoblasto, inizia l'accumulo di calcio e acido dipicolinico.
5. Intorno alla corteccia si accumulano strati proteici (tunica).
6. Spora matura, diventa rifrangente e resistente al calore.
7. Enzimi litici distruggono lo sporangio e liberano la spora all'esterno.

**In cosa il peptidoglicano della corteccia è diverso dal peptidoglicano della parete?**

È molto simile in specie diverse, anche quando la composizione della parete è molto diversa. Contiene molti meno legami crociati rispetto alla parete. Il tetrapeptide non è presente in tutti i residui, in molti casi si ha solo l'L-alanina oppure un gruppo lattamico. Anche quando è presente il tetrapeptide non sempre forma legami crociati.

**Acido dipicolinico** contribuisce alla termoresistenza della spora, sostituisce l'acqua nella stabilizzazione delle macromolecole, costituisce il 15% del peso secco della spora. È un prodotto intermedio del metabolismo della lisina. È costituito da un anello amminico che lega in posizione 2-6 due gruppi carbossilici.

Le spore sono estremamente resistenti, quelle di botulino (le più resistenti) resistono a 100°C per 330 minuti, (per confronto una cellula batterica resiste ad 80°C al massimo per 10 minuti).

La spora per germinare deve essere **attivata** cioè deve diventare permeabile ai fattori stimolanti la germinazione (es. aminoacidi, glicosidi, ioni inorganici), in natura succede per invecchiamento, in laboratorio per trattamento a 65-80°C per qualche minuto o per lunghi periodi a 5°C.

**Germinazione:** Rigonfiamento della spora, riassorbimento di acqua, perdita della rifrangenza e della resistenza al calore. Attivazione di un enzima che digerisce la cortex.

**Esocrescita:** il batterio sintetizza nuovi componenti, rompe i resti della tunica sporale e si sviluppa in un batterio attivo.

Il metodo più sicuro per eliminare le spore è l'autoclave che utilizza vapore a 121°C per 15 minuti, per raggiungere queste temperature è necessario usare un contenitore sotto pressione (appunto l'autoclave).

La pastorizzazione invece comporta ciclici riscaldamenti a 70 °C che uccidono le cellule in fase germinativa ed attivano le spore facendole passare in fase germinativa.

## Genetica batterica

I batteri presentano un unico cromosoma costituito da una molecola di DNA circolare a doppio filamento. È privo di istoni che sono sostituiti da proteine dette NAP (Nucleoid-Associated Proteins). Spesso si trovano geni di diversa provenienza.

Le dimensioni sono variabili a seconda del livello di interazione del microorganismo con l'ambiente (es. enzimi necessari ad utilizzare differenti zuccheri).

La replicazione avviene in modo bidirezionale e semiconservativo. La forcella di replicazione è aperta dall'enzima **elicasi** mentre l'enzima **girasi** facilita lo svolgimento (denaturazione) della doppia elica rendendo possibile l'apertura. Il punto di origine della replicazione è detto oriC, procede in entrambe le direzioni fino all'incontro delle due forcelle.

I geni batterici non sono duplicati (corredo aploide).

In genere i geni che svolgono funzioni correlate sono raggruppati in unità trascrizionali dette **operoni**, non sono presenti introni.

Oltre al cromosoma può essere presente materiale genetico extracromosomiale: i plasmidi.

Sono presenti elementi trasponibili (**trasposoni**).

**Materiale genetico presente nel batterio:**

- Cromosoma.

- Plasmidi.
- Elementi genetici trasponibili.
- DNA fagico.

**Plasmidi:** elementi genetici extracromosomiali circolari a doppio filamento, dimensione variabile tra 1 e 2000 kbp. Hanno replicazione autonoma e possono essere presenti in molteplice copia, possono essere presenti anche più copie di plasmidi diversi. Alcuni possono essere trasferiti da cellula a cellula (detti **coniugativi**) oppure integrarsi nel genoma (prendendo il nome di plasmide in forma episomiale o **episoma**).

Tra i plasmidi coniugativi il più noto è il fattore F di E. coli. Sono capaci di attivare e regolare il proprio trasferimento da una cellula donatrice (F+) ad una ricevente (F-) attraverso il pilo sessuale.

È importante il trasferimento del plasmide quando esso contiene anche geni che codificano per fattori di resistenza ad antibiotici, in questo caso la trasmissione in via orizzontale è molto veloce e può velocizzare l'instaurazione di farmacoresistenza.

Alcuni plasmidi codificano la sintesi di **batteriocine** che sono sostanze ad azione antibatterica a spettro di azione più ristretto e più potenti degli antibiotici. Li producono quando entrano in competizione con altre specie.

I plasmidi possono codificare anche per fattori di virulenza, ad esempio *Bacillus anthracis* codifica entrambi i fattori di virulenza (la tossina carbonchiosa e le proteine della capsula) nei plasmidi.

*Escherichia coli* enteropatogeno presenta un plasmide che codifica per un fattore di colonizzazione e due tossine che causano intensa diarrea.

*Staphylococcus aureus* codifica numerosi fattori di virulenza in plasmidi.

I plasmidi possono coesistere quando sono **compatibili** ovvero hanno diversi meccanismi di controllo e replicano indipendentemente.

I plasmidi **incompatibili** hanno lo stesso sistema di controllo, quando si trovano nella stessa cellula entrano in “competizione” ed uno viene progressivamente perso per differenze ad esempio nella velocità di replicazione.

**Elementi genetici trasponibili:**

**Sequenze di inserzione:** contengono solo i geni che codificano per enzimi utili alla loro trasposizione. La trasposizione ha effetto mutageno perché può interrompere sequenze geniche. I **trasposoni** sono strutture trasponibili più grandi delle sequenze di inserzione, alle estremità hanno due sequenze di inserzione, possono contenere geni e “saltare” da un punto all'altro del genoma e dei plasmidi, possono essere quindi trasferiti tra cellule. Si può avere **trasposizione conservativa** se il trasposone è escisso dal punto di provenienza ed inserito da un'altra parte oppure **trasposizione replicativa** se viene anche replicato.

Durante la trasposizione si può avere **inversione**, cioè rotazione di 180°, è coinvolta ad esempio nella transizione di fase della salmonella.

Nella salmonella è normalmente espressa la flagellina H1, il promotore per il gene che codifica la flagellina H2 (caratteristica della forma virulenta) insieme al gene per l'inibitore del gene H1 si trovano su una sequenza invertibile disposti in modo da non poter essere trascritti. Quando si ha la transizione l'elemento invertibile viene ruotato e vengono espressi sia H2 che il repressore di H1.

**Variabilità genetica dei batteri:**

Dipende da due elementi:

- **Mutazione genetica:** Variazione della sequenza ereditabile di basi. Possono determinare resistenza a farmaci se interessano la proteina target del farmaco.
- **Ricombinazione:** Avviene tra il genoma batterico e DNA esogeno, avviene in vari modi:
  - **Ricombinazione omologa:** richiede la presenza di regioni di omologia tra DNA ricevente ed esogeno.
  - **Ricombinazione sito-specifica:** Avviene in corrispondenza di siti specifici riconosciuti da trasposasi e ricombinasi.
  - **Ricombinazione illegittima:** avviene senza controllo tra regioni senza omologia di sequenza, poco frequente.

**Meccanismi di trasferimento del materiale genetico:**

- **Trasformazione:** La cellula acquisisce materiale esogeno libero nell'ambiente.
- **Coniugazione:** Trasferimento da una cellula all'altra mediato da plasmidi (e pili sessuali).
- **Trasduzione:** Trasferimento da una cellula all'altra mediato da virus batteriofagi.

**La Trasformazione:**

Il materiale genetico viene rilasciato nell'ambiente quando il batterio va incontro a lisi. I frammenti di DNA vengono legati dal batterio ricevente tramite proteine (DNA binding protein) ed importato. Una volta nel citoplasma il materiale genetico esogeno deve essere integrato nel genoma.

Per acquisire DNA dall'esterno i batteri riceventi devono essere “**competenti**” non tutte le specie lo sono e spesso quelle competenti lo sono solo per alcune fasi del ciclo vitale. Ad esempio la trasformazione è alla base dell'esperimento di Griffith. Alcuni batteri possono essere resi competenti in laboratorio.

**La Trasduzione:**

Il materiale genetico è trasportato da batteriofagi, esiste in due modalità: **generalizzata** che può trasportare qualunque gene, o **specializzata** quando trasporta geni specifici.

I batteriofagi si dividono in **virulenti** che instaurano un ciclo litico in cui uccidono la cellula ospite moltiplicandosi e rilasciando progenie virale e **temperati** che instaurano un ciclo lisogeno integrandosi con il genoma batterico fino ad un eventuale stimolo che induce un passaggio al ciclo litico.

La trasduzione **generalizzata** si ha dal ciclo litico: quando si assemblano i virus può succedere che una particella fagica inglobi un frammento di DNA batterico (che era stato degradato per ottenere nucleotidi da usare nella replicazione virale), si forma così una particella virale trasducente, capace di trasferire in una cellula infettata un frammento di DNA proveniente dalla cellula in cui si è formato.

La trasduzione **specializzata** si ha nel ciclo lisogeno, vengono trasferiti i geni “fiancheggiati” il sito di inserzione del profago quando il distacco del genoma fagico da quello batterico avviene in modo impreciso, il genoma fagico viene poi duplicato includendo le inserzioni di genoma batterico, quindi tutte le particelle virali che si formano contengono il materiale genetico batterico (sono trasformanti).

**La Coniugazione:**

Il trasferimento di materiale genetico avviene tramite un contatto fisico ed un ponte citoplasmatico tra la cellula donatrice e la cellula ricevente.

**Esempio: Il plasmide F**

Il ponte citoplasmatico prende anche il nome di **pilo sessuale**, le proteine che sono coinvolte nella costruzione del pilo sono codificate dal plasmide F.

Il pilo è prodotto dalla cellula F+ e la collega con una cellula F-.

Un caso particolare si verifica quando il plasmide F è in forma **episomiale** ovvero integrato nel genoma batterico, in questi casi la cellula prende il nome di Hfr (High frequency recombination) perché trasferisce parti del cromosoma batterico.

Il trasferimento completo del cromosoma è un evento molto raro perché richiede circa 100 minuti, il pilo quasi sempre si rompe prima, non è così stabile.

Quasi sempre il trasferimento è parziale, la cellula ricevente rimane F- perché non ha ricevuto tutte le componenti del plasmide F però può fare ricombinazione con i geni che ha importato.

Può inoltre capitare che l'episoma torni allo stato di plasmide per scissione dal cromosoma batterico, questo processo di scissione può avvenire con errori ed includere nel plasmide una parte di genoma batterico che una volta trasferito può ricombinarsi con il genoma della cellula ricevente.

## Farmaci antibatterici

Impropriamente chiamati **antibiotici**, il capostipite fu la penicillina scoperta da A. Fleming nel 1928.

I requisiti sono:

- Attività biocida.
- Attività a basse concentrazioni.
- Ampio spettro d'azione.
- Lunga emivita plasmatica.
- Alta concentrazione tissutale.
- Basso legame con proteine plasmatiche.
- Possibilità di formulazione orale e parenterale.
- Non interazione con altri farmaci.
- Non deve essere distrutto, modificato o escreto prima che abbia svolto la propria funzione.
- Non deve agire sulle cellule eucariotiche.

La tossicità selettiva dipende dalla differenza tra le vie metaboliche batteriche, con le quali deve interferire, e le vie metaboliche eucariotiche oppure dalla differenza tra le membrane che sono più o meno permeabili al farmaco.

Molti farmaci però sono anche tossici, l'**indice terapeutico** rappresenta il rapporto tra concentrazione tossica e concentrazione terapeutica.

Teoricamente in base all'origine si classificano in 3 categorie:

- **Antibiotici:** prodotti da organismi.
- **Chemioterapici:** sintetizzati in laboratorio.
- **Chemioantibiotici:** modificati in laboratorio.

In base alla modalità d'azione si classificano in:

- **Batteriostatici:** inibiscono la replicazione cellulare senza uccidere le cellule, permettono al sistema immunitario di risolvere l'infezione.
- **Battericidi:** Causano morte e lisi dei batteri. Svolgono di solito la loro azione sui batteri in attiva replicazione.

**Meccanismi d'azione:**

- **Interazione con processi metabolici:** ad esempio dell'acido folico.
- **Interazione con sintesi della parete**
- **Interazione con manipolazione di DNA ed RNA**
- **Interazione con sintesi proteica**
- **Azioni sulla membrana citoplasmatica**

**Interferenza con la sintesi del folato:** Si tratta di una molecola utile anche negli eucarioti, ma gli eucarioti lo assorbono dall'esterno (???), i batteri lo sintetizzano. Es. farmaci **sulfamidici**. Sono farmaci di sintesi (chemioterapici) e vanno ad inibire l'enzima diidropteroato sintetasi perché sono analoghi del suo substrato, l'acido para-amminobenzoico. Agiscono come antimetaboliti. Questo enzima nelle cellule eucariotiche non è presente.

Il **trimethoprim** agisce sulla stessa via metabolica ma sull'enzima diidrofolato reduttasi, è un enzima presente anche negli eucarioti ma il farmaco ha affinità maggiore per la forma batterica.

**Inibitori della sintesi di parete:** Svolge un ruolo chiave il bactoprenolo che funge da supporto per la sintesi e trasporta all'esterno i monomeri di membrana formati di NAG-NAM-pentapeptide, sintetizzato all'interno. Una volta all'esterno vengono prima legati tra loro gli zuccheri e poi le catene peptidiche.

In base alla fase su cui agiscono si hanno varie categorie di farmaco:

- Sintesi di precursori nel citoplasma: D-cicloserina, Fosfomicina.
- Trasporto di precursori attraverso la membrana: Bacitracina.
- Inserimento nella parete: beta-lattamici.

**Inibitori della sintesi della parete:** agiscono all'interno della cellula nella sintesi dei monomeri, es. la **D-cicloserina** che è un analogo strutturale della D-alanina. Inibisce in maniera competitiva gli enzimi coinvolti nella formazione del peptide D-alanil-D-alanina: la racemasi e la sintetasi che catalizzano la conversione della forma L nella forma D e il legame tra le forme D. Quasi mai usato in clinica perché è neurotossico.

Altro farmaco della famiglia è la **fosfomicina** inibisce la sintesi di acido N-acetil-muramico (NAM) poco usato in clinica perché la resistenza insorge in modo rapido.

**Bacitracina:** inibisce la defosforilazione del trasportatore (bactoprenolo difosfato) che quindi non può più essere rigenerato nella forma attiva monofosfato.

**Glicopeptidi** es. **vancomicina** che si lega al dimero di D-alanina nei pentapeptidi che produce ingombro sterico impedendo il legame tra le subunità a formare la parete. La vancomicina ha spettro abbastanza ristretto, solo sui batteri Gram+ perché non è capace di attraversare la membrana esterna dei Gram-. Usato ad esempio contro gli streptococchi resistenti ai beta-lattamici.

**Beta-lattamici:** hanno un anello beta-lattamico nella loro struttura, troviamo in questa famiglia le penicilline, le cefalosporine, i monobattamici e i carbapenemici, questi ultimi due importanti per la loro azione su batteri resistenti ad altri beta-lattamici. In concomitanza con il trattamento si possono usare inibitori della beta-lattamasi (un enzima che degrada alcuni beta-lattamici, presente in un plasmide, può indurre rapidamente resistenza). Tra gli inibitori delle beta-lattamasi abbiamo l'acido clavulanico.

I beta-lattamici agiscono sulla formazione del legame peptidico crociato tra le catene laterali tetrapeptidiche.

**Classi di beta-lattamici:**

- **Penicilline:** Le penicilline naturali sono prodotte da muffe, esiste un grande numero di batteri resistenti naturalmente, per questo sono state modificate in laboratorio per mascherare l'anello beta-lattamico e aggirare la resistenza. Le penicilline sono attive sui Gram+ non resistenti e su alcuni Gram-.
- **Cefalosporine:** Spettro esteso anche ai Gram-, maggiore resistenza alle beta-lattamasi e maggiore penetrazione della membrana.

Penicilline e cefalosporine non sono attivi contro batteri endocellulari, impermeabili (micobatteri) o privi di parete (micoplasmi).

- **Monobattamici:** no anello eterociclico, molto attivi sui Gram-, resistenti alle beta-lattamasi.
- **Carbapenemici:** Esteso spettro d'azione, molto attivi e molto stabili. Purtroppo sta insorgendo resistenza anche contro questi. È un problema molto serio, un esempio di questi batteri è il NDM ("New Delhi").

**Farmaci che alterano la membrana citoplasmatica:**

Problematici perché la membrana è presente anche nelle cellule eucariotiche.

es. **polimixine**, risultano tossiche quindi sono usate solo in modo locale. Hanno un peptide ciclico legato a un peptide lineare che termina in un lipide il quale si inserisce nella membrana.

**Inibitori della sintesi di DNA:**

**Chinoloni:** sintetici, esistono di varie generazioni, agiscono sulla DNA girasi e sulla topoisomerasi, prevengono la despiralizzazione del cromosoma batterico. Sono specifici grazie alla differenza tra enzimi omologhi nella cellula batterica ed eucariotica.

**Inibitori della sintesi di RNA:**

**Rifampicina:** inibisce la RNA polimerasi legandosi alla subunità beta. Può attraversare la barriera emato-encefalica anche in assenza di stato infiammatorio, per questo è usato nella profilassi dei contatti con malati di meningite. Attivi anche contro batteri "difficili" come micobatteri e neisserie.



## Inibitori della sintesi proteica:

Agiscono sulle subunità ribosomiali. La tossicità selettiva si basa sulle differenze tra ribosomi eucariotici e batterici.

Sulla subunità 30S agiscono gli aminoglicosidi e le tetracicline, sulla 50S macrolidi e cloramfenicolo.

**Aminoglicosidi:** alcuni sono naturali, altri semisintetici. Costituiti da amminozuccheri uniti con legame glicosidico ad un nucleo aminociclitolo.

Attivi ad ampio spettro.

**Tetracicline:** legano la subunità 30S in una fase molto precoce inibendo la sintesi. Ampio spettro anche sui patogeni intracellulari. Un problema è la sua attività anche contro la flora batterica intestinale (può indurre enteriti post-antibiotiche).

**Macrolidi:** Molecole di grandi dimensioni, lega nello specifico la subunità 23S (parte della 50S) impedendo lo scorrimento dei ribosomi sull'mRNA. Hanno attività batteriostatica, non battericida.

**Cloramfenicolo:** lega la subunità 50S ed inibisce la formazione di legami tra aminoacidi, è leggermente tossico perché agisce anche sui ribosomi eucariotici (spettro d'azione molto ampio).

### Meccanismi di farmaco-resistenza

Si definisce resistente un microorganismo capace di proliferare a concentrazioni di antibiotico pari a quelle raggiunte al massimo durante la terapia.

È una capacità geneticamente trasmissibile e può determinare il fallimento della terapia.

Può essere intrinseca, ad esempio i micoplasmi sono resistenti a tutti gli antibiotici che agiscono sulla parete perché non hanno parete. Oppure acquisita, ad esempio mutando il target dell'antibiotico che quindi non è più capace di agire.

La resistenza acquisita si divide in **cromosomica** quando dipende da mutazioni a carico del genoma batterico oppure **extracromosomica** quando dipende da plasmidi o trasposoni.

### Meccanismi di resistenza acquisita:

#### Produzione di enzimi inattivanti il farmaco:

Es. beta-lattamasi: rompono l'anello beta-lattamico ed inattivano il farmaco (molto importanti dato che gli antibiotici beta-lattamici sono i più diffusi).

**Beta-lattamasi a serina:** Le prime ad essersi diffuse, sono sensibili ad inibitori come l'acido clavulanico che infatti viene quasi sempre somministrato in concomitanza con amoxicillina.

**Metallo-beta-lattamasi:** Più rare, ampio spettro, non sono sensibili ad inibitori (espressi ad esempio da NDM) conferiscono resistenza anche contro i carbapenemi.

Esistono altri tipi di enzimi inattivanti il farmaco: es acetiltrasferasi, fosfotrasferasi, ecc ...

#### Modificazione del bersaglio sul quale agisce il farmaco:

Es. mutazione dei geni che codificano per topoisomerasi o girasi (bersagli dei fluorochinoloni), RNA-polimerasi DNA-dipendente, ecc...

Nelle resistenze alla **vancomicina** una serie di mutazioni sostituisce il dipeptide terminale D-alanina D-alanina con D-alanina D-lattato.

Nelle resistenze alla penicillina possono mutare le penicillin binding protein. (Es. resistenza alla meticillina, il ceppo di *S. aureus* resistente a meticillina prende il nome di MRSA).

#### Diminuita permeabilità al farmaco o aumentata eliminazione:

Il ridotto ingresso può essere dovuto a diminuita o aumentata espressione di porine capaci di trasportare la molecola antibatterica, influisce anche la presenza di membrana esterna nei Gram-: infatti alcuni farmaci non sono attivi contro i Gram- appunto per l'impermeabilità della membrana esterna. L'aumentata espulsione può essere dovuta alla presenza di pompe di efflusso che espellono il farmaco prima che esso possa agire.

#### Resistenza ai carbapenemi:

La resistenza ai carbapenemi sopraggiunge in due modi:

**Perdita di porine:** basso livello di resistenza, non trasferibile e riscontrata in casi sporadici o epidemie di piccole dimensioni.

**Produzione di carbapenemasi:** Alto livello di resistenza, trasferibile tramite plasmidi. Ne sono stati identificati vari tipi che si sono sviluppati nel tempo. Per quanto riguarda l'Italia siamo al livello di diffusione endemica di batteri produttori di carbapenemasi. Si stanno diffondendo enterobatteri produttori di carbapenemasi.

La scelta del farmaco antibiotico va fatta in base alle prove batteriologiche di identificazione dell'agente eziologico e di farmaco-sensibilità in vitro (**antibiogramma**).

Si può scegliere la terapia senza avere ancora in mano l'antibatterigramma se:

- Il batterio in questione è noto per non aver mai mostrato resistenza (es. sifilide, lebbra).
- L'infezione peggiora troppo rapidamente per avere tempo per i risultati (es. meningite).
- Il batterio impiega molto a crescere, i risultati di laboratorio impiegano troppo tempo (es. tubercolosi).

## Meccanismi di patogenicità batterici:

Come fa il microorganismo a causare patologia?

Il microorganismo patogeno deve essere in grado di invadere, moltiplicarsi e danneggiare l'organismo ospite. La sua capacità di portare a termine queste operazioni dipende da:

- Fattori di virulenza.
- Carica batterica (numero iniziale di batteri che realizzano l'infezione).
- Caratteristiche dell'ospite.

Fasi del processo infettivo:

1. **Esposizione.**
2. **Adesione** del batterio alle cellule epiteliali della mucosa.
3. **Invasione e moltiplicazione** nel sito di ingresso.
4. A questo punto si hanno due strade: **produzione di tossine** (es. tetano: il microorganismo rimane localizzato nella ferita ma la tossina raggiunge il sistema nervoso centrale) oppure **invasione del tessuto**. (Esistono patogeni a patogenicità multifattoriale, ad esempio *S. aureus*).

### Invasività:

Capacità di attraversare le barriere naturali e moltiplicarsi nei tessuti con conseguente danno patologico.

### Produzione di tossine:

Capacità di produrre sostanze con attività tossica nei confronti di cellule e tessuti.

## Invasività

Innanzitutto dobbiamo avere la **capacità di aderire** alle cellule dell'ospite. Dopo l'adesione si ha l'attraversamento dell'epitelio e l'invasione della sottomucosa.

Dell'adesione si occupano i pili o altre strutture di superficie del batterio.

Altro fattore che favorisce la colonizzazione è la capacità di formare biofilm, molto dipendente dalla presenza di capsula.

**Produzione di enzimi extracellulari:** ad esempio lo *Streptococcus pyogenes* produce un enzima detto ialuronidasi, distruggendo il tessuto connettivo dell'ospite e facilitando l'invasione da parte del patogeno. Un altro esempio è la coagulasi prodotta da *Staphylococcus aureus* che induce la formazione di coaguli di fibrina tramite i quali il patogeno può raggiungere sedi lontane.

**Capsula:** principale struttura che protegge contro la fagocitosi, fondendosi con quella dei batteri vicini forma il biofilm.

## Produzione di Tossine

Si distinguono **endotossine** ed **esotossine**: le **endotossine** sono rappresentate dai lipopolisaccaridi presenti in tutti i batteri Gram-, svolge la stessa attività biologica in tutti i batteri Gram-. Si tratta di molecole che fanno parte della struttura del batterio che vengono liberate quando la cellula batterica subisce lisi. Un’eccezione è rappresentata dal meningococco che rilascia vescicole dette “blebs” ricche di lipopolisaccaride senza morire. In realtà esistono anche endotossine non correlate ai lipopolisaccaridi ma i termini lipopolisaccaride ed endotossina sono comunemente usati come sinonimi.

Le **esotossine** invece sono molecole prodotte dal batterio e rilasciate all’esterno, sono prodotte sia dai Gram- che dai Gram+, rispetto alle endotossine hanno struttura diversa (sono proteine), sono molto più tossiche e sviluppano immunogenicità.

### Esotossine:

Si classificano in:

- **Citolitiche:** uccidono le cellule.
- **Enterotossine:** agiscono sulle cellule intestinali (es. colera).
- **Neurotossine:** agiscono sul tessuto nervoso (es. tetano e botulino).
- **Pantrope:** effetto tossico su molti tipi cellulari (es. difterite).
- **Superantigeni:** si legano alla catena variabile del TCR stimolando in maniera aspecifica molti cloni di linfociti T.

**Tossine citolitiche:** Es. *S. aureus* produce una tossina detta citotossina-alfa che polimerizza sulla superficie delle cellule bersaglio aprendo pori e causandone la morte. Oppure *Clostridium perfringens* produce una fosfolipasi C che degrada la membrana cellulare.

La maggior parte delle esotossine agisce all’interno della cellula.

Sono generalmente composte da due subunità: A e B, la subunità B lega il recettore (binding), la cellula a questo punto ingloba la porzione A che ha attività tossica all’interno del citoplasma. La porzione B ha attività antigenica. Es. tossina difterica la cui porzione A blocca il fattore di allungamento 2 (EF-2) tramite ADP-ribosilazione causando il blocco della sintesi proteica e la morte cellulare.

**Enterotossine:** Es. tossina colerica, unico fattore di virulenza che porta a tale malattia. La tossina colerica è costituita da 5 subunità, il meccanismo è lo stesso: il legame della subunità B fa entrare le subunità A1 e A2. A1 fa aumentare cAMP inducendo la fuoriuscita di elettroliti verso l’esterno con richiamo di acqua per osmosi e diarrea, i pazienti possono morire a causa della disidratazione.

**Neurotossine:** Es. tetano che causa paralisi spastica o tossina botulinica che causa paralisi flaccida.

**Tossina botulinica:** agisce sulle sinapsi tra motoneurone e fibra muscolare, la tossina inibisce il rilascio di acetilcolina impedendo la contrazione del muscolo. In condizioni normali il meccanismo di contrazione è controllato da interneuroni inibitori che fanno interrompere la contrazione. A questo livello (sistema nervoso centrale, nel midollo) agisce la **tossina tetanica** che blocca queste sinapsi inibitoria GABA-ergiche e glicinerghiche, non si ha inibizione dei motoneuroni con conseguente paralisi spastica. L’individuo va incontro a morte quando la paralisi interessa i muscoli respiratori (diaframma).

**Superantigeni:** detti anche tossine pirogeniche, attivano in maniera aspecifica più cloni di linfociti T, si attivano fino al 20% dei linfociti, si attivano i macrofagi con massiccio rilascio di citochine tra cui pirogeni endogeni e fattori che aumentano la permeabilità vascolare da cui deriva calo di pressione con conseguente insufficienza multi-organo e shock.

**Endotossine:** Solo nei Gram-, conservata in tutti i Gram-, i segni clinici si riscontrano in tutte le infezioni da Gram-. Si tratta dell’ LPS (LipoPoliSaccaride) della parete esterna.

Costituito da varie porzioni:

- Lipide A, parte tossica, verso l’interno.
- Core polisaccaridico centrale.
- Antigene O, sempre polisaccaridico, all’esterno, molto variabile anche all’interno della stessa specie.

Essendo componente della cellula l’endotossina viene rilasciata solo quando il batterio va incontro a lisi, c’è un’eccezione rappresentata dal **meningococco** che rilascia “blebs” di membrana esterna e causa imponente rilascio di endotossina in circolo anche senza lisarsi.

In circolo LPS è legata da LPB (Lipopolysaccharide Binding Protein), sintetizzata dal fegato. Il complesso LPS-LBP interagisce con CD-14 e TLR-4 causando l’attivazione di diversi pathway intracellulari.

I bersagli cellulari sono principalmente macrofagi ma anche linfociti, granulociti, piastrine ed endotelio. L’effetto sui macrofagi porta a forte aumento della velocità di fagocitosi e imponente rilascio di citochine (principalmente IL-1 e TNF-alfa) con effetto pirogeno e aumento della permeabilità endoteliale (effetto già visto con i superantigeni). Inoltre si ha effetto pro-infiammatorio (TNF-alfa stimola la produzione di prostaglandine).

I linfociti B sono attivati in maniera aspecifica policlonale.

Tra i **bersagli solubili** si hanno il sistema del complemento con induzione di reazione infiammatoria e danno tissutale e la cascata coagulativa, fino alla coagulazione intravasale disseminata, comparsa di petecchie cutanee e morte del paziente. Possono causare danno ischemico a tutti gli organi.

Una molecola dei Gram+ che può produrre effetti simili all’endotossina, si tratta dell’**acido lipoteicoico**.