

BASI FISIOPATOLOGICHE DELLE MALATTIE

MICROBIOLOGIA

- **OBIETTIVI FORMATIVI:**
- conoscere il mondo microbico nei suoi componenti (batteri, virus, miceti, protozoi, elminti) in relazione all'ospite uomo;
- acquisire le nozioni essenziali sui più comuni patogeni microbici;
- fondamenti di diagnostica microbiologica e terapia antimicrobica.

Definizione

- La Microbiologia è la scienza che studia i microrganismi
- Ha per oggetto la forma, la struttura, la riproduzione, la fisiologia, il metabolismo, l'azione patogena e i metodi di identificazione dei microrganismi.
- Comprende lo studio della loro distribuzione in natura, delle relazioni tra loro e con gli altri esseri viventi, degli effetti benefici e dannosi che hanno sugli esseri umani, delle modificazioni fisiche e chimiche che provocano nel loro ambiente.

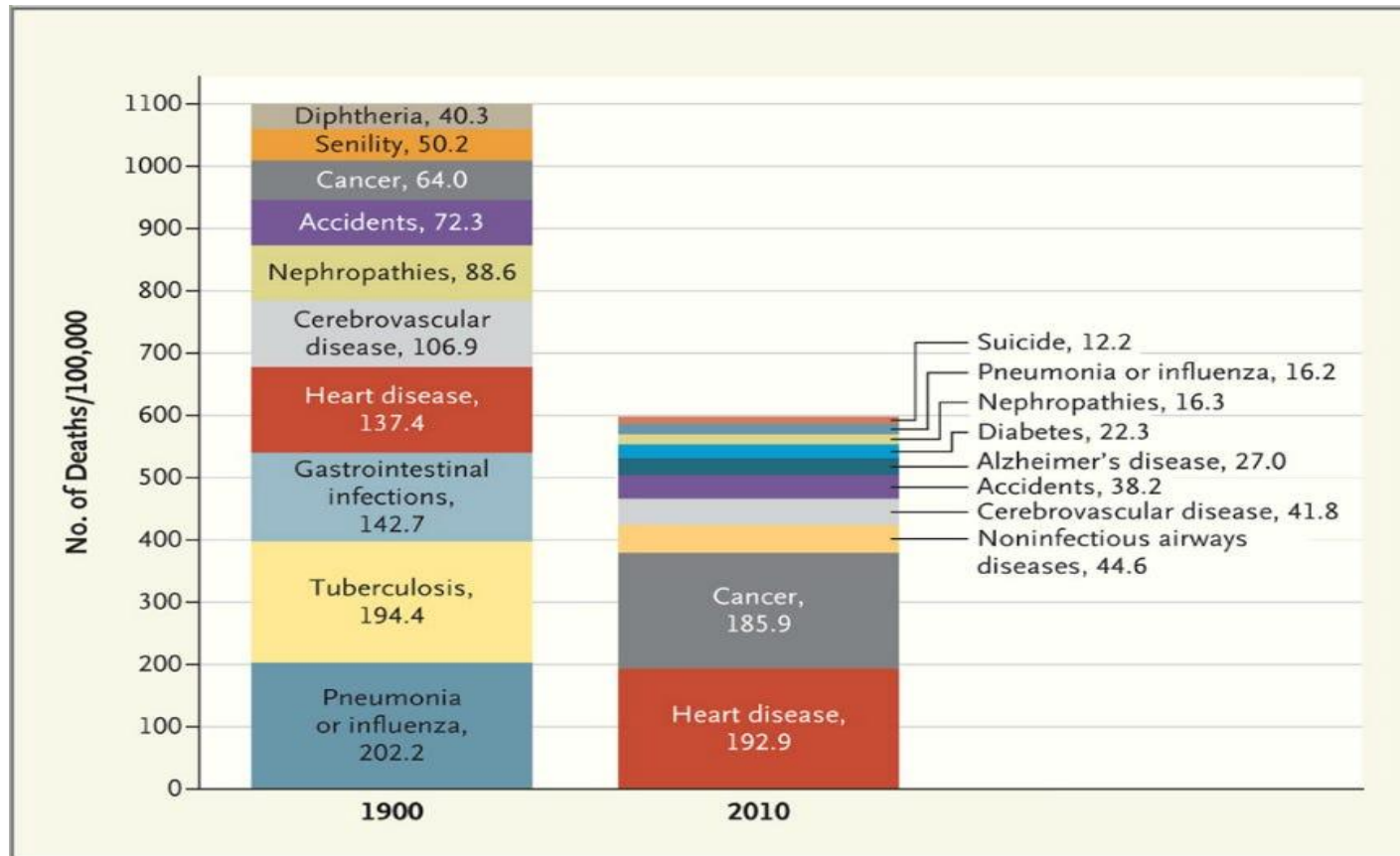
Settori della Microbiologia Applicata

1. **Microbiologia medica.**
2. **Microbiologia dell'acqua.**
3. **Microbiologia dell'aria.**
4. **Microbiologia industriale.**
5. **Microbiologia degli alimenti.**
6. **Microbiologia del suolo.**

Microbiologia medica

- **BATTERIOLOGIA**
 - **VIROLOGIA**
- **PARASSITOLOGIA**
 - **MICOLOGIA**

The leading causes of death in US in 1900 and 2010

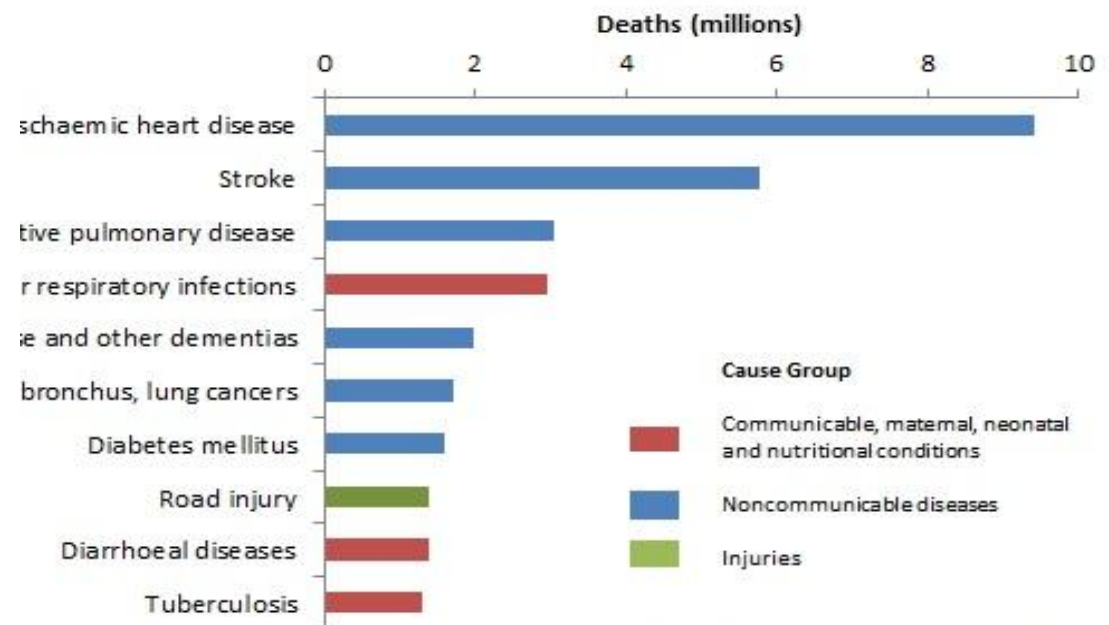


The leading infectious causes of death in the world in 2004
 (Source: WHO, 2008)

<i>Cause of Death (%)</i>	<i>Estimated number of deaths</i>
• Respiratory infections	4.259.000
• Diarrheal diseases	2.163.000
• HIV/AIDS	2.040.000
• Tuberculosis	1.464.000
• Malaria	889.000
• Measles	424.000
• Meningitis	340.000
• Pertussis	254.000
• Tetanus	163.000
• Hepatitis B*	105.000

* Does not include liver cancer and cirrhosis resulting from chronic hepatitis virus infection.

Top 10 global causes of deaths, 2016



Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization; 2018.

L'importanza dei microrganismi

I microbi possono essere:

- **causa di malattie che colpiscono l'uomo, il regno animale e vegetale;**

MA SONO:

- **essenziali per la vita (es. cicli geochimici e fertilizzazione del suolo);**
- **componenti fondamentali del nostro organismo (microbiota).**

Che cosa sono i microrganismi?

- **Organismi così piccoli da non poter essere osservati ad occhio nudo ma al microscopio**
- **Sub-cellulari (microscopio elettronico): Virus, viroidi, prioni**
- **Cellulari (microscopio ottico) con due diverse strutture: procarioti (batteri) ed eucarioti (miceti, protozoi)**
- **I microrganismi derivano da altri microrganismi (non si originano spontaneamente dalla materia inanimata).**

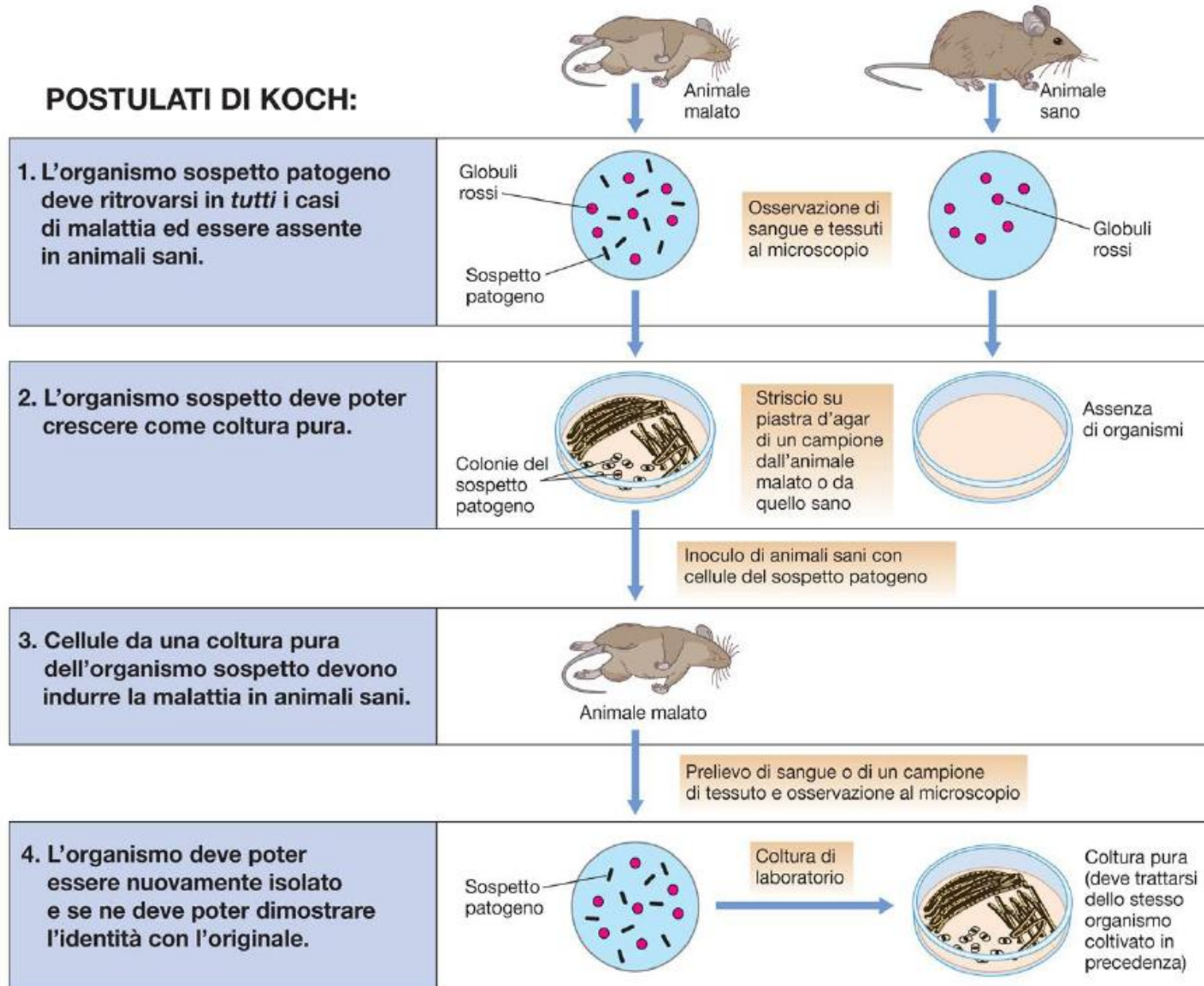
Un po' di storia:

- Fino al XVII secolo si pensava che gli organismi viventi potessero generarsi spontaneamente dalla materia in decomposizione.
- Francesco Redi (1626-1697) confutò la teoria della Biogenesi, conducendo esperimenti sulla carne in putrefazione.
- Il concetto di generazione spontanea persistette, tuttavia, per i microrganismi.
- Antony van Leeuwenhoek nel 1676 scopre gli “animalcules” grazie al suo microscopio.

Un po' di storia:

- Spallanzani introduce la pratica della sterilizzazione dei terreni e nel 1799 attacca la teoria della Biogenesi
- Theodor Schwann nel 1838-1839 introduce la teoria cellulare insieme a Schleiden.
- Pasteur (1822-1895) studia la fermentazione e realizza il vaccino antirabbico
- John Tyndall nel 1877 dimostra che la polvere può trasportare i germi.
- Fernand Cohn scopre le endospore termoresistenti.
- Robert Koch nel 1876 introduce il concetto di eziologia.

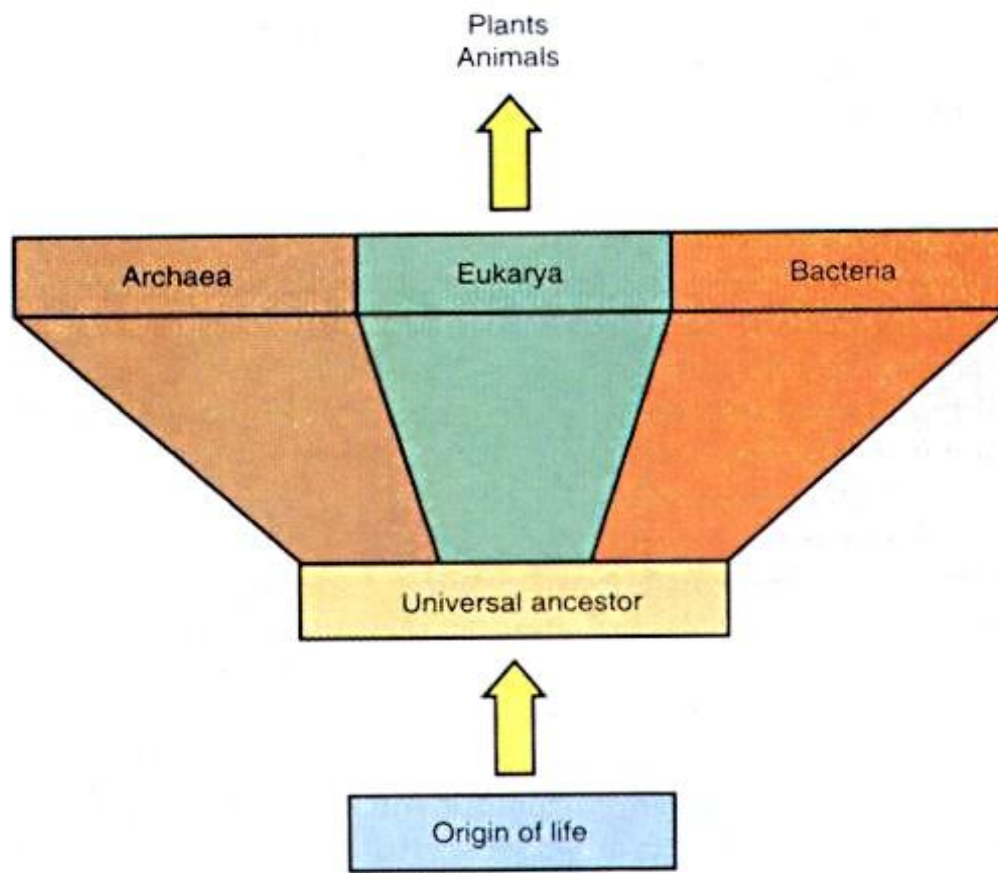
POSTULATI DI KOCH:



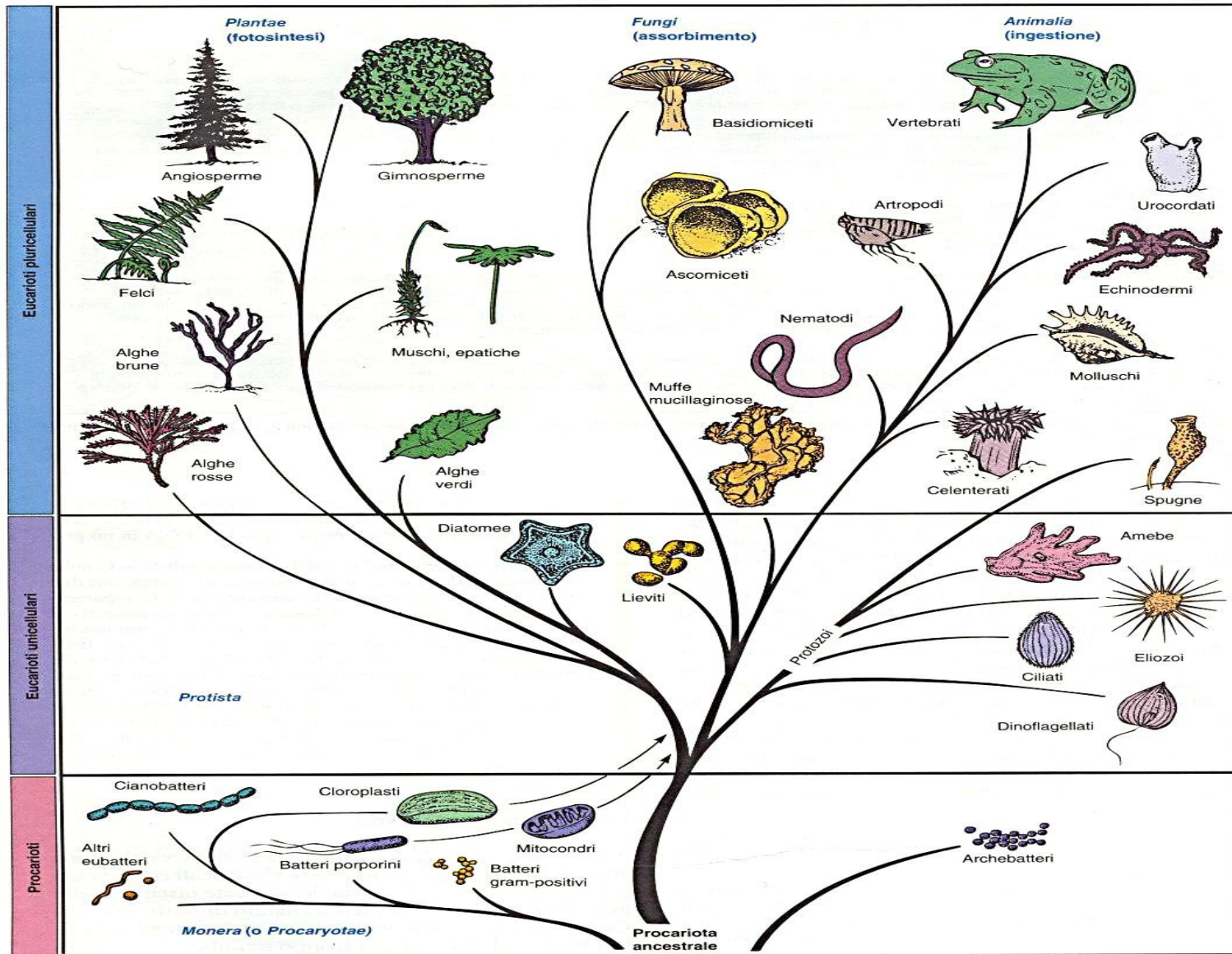
Caratteristiche dei MICRORGANISMI cellulari

- **Capacità di riprodursi.**
- **Capacità di assimilare sostanze alimentari e di metabolizzarle per ricavarne energia ed accrescersi.**
- **Capacità di espellere prodotti di rifiuto.**

- **Possono subire mutazioni e adattarsi ai cambiamenti che insorgono nel loro ambiente.**

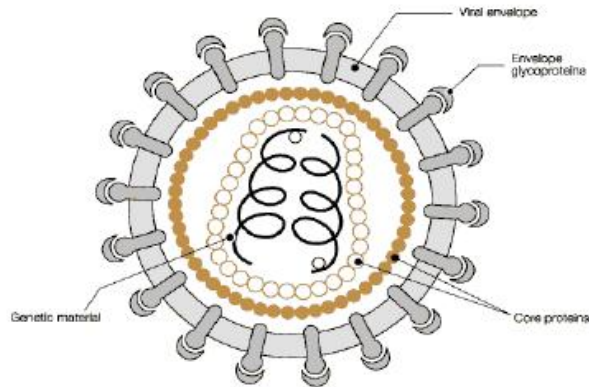


Teoria evolutiva dei cinque regni

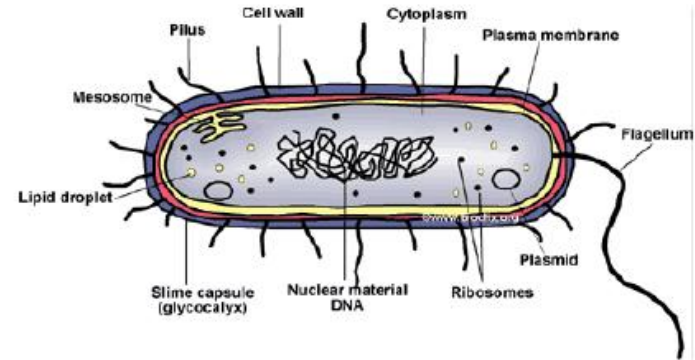


DIVERSE STRUTTURE DEI MICRORGANISMI

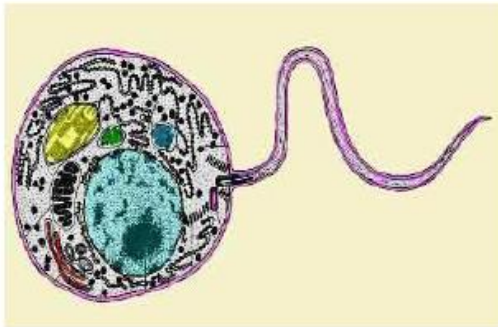
VIRUS



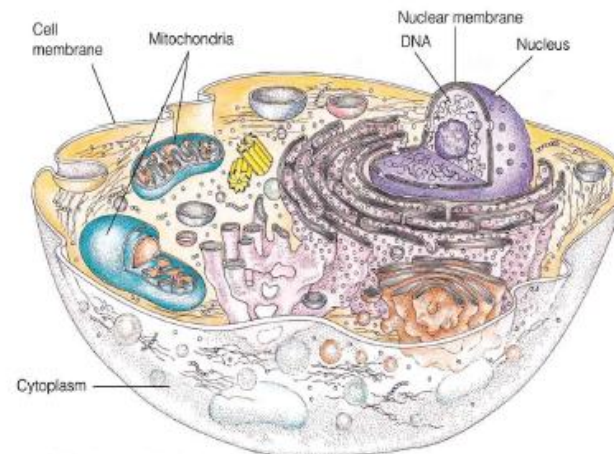
BATTERIO



PROTOZOO



CELLULA EUCARIOTICA



Macroparassiti

Organismi pluricellulari
(vermi, acari etc.)

PROTOZOI E FUNGHI

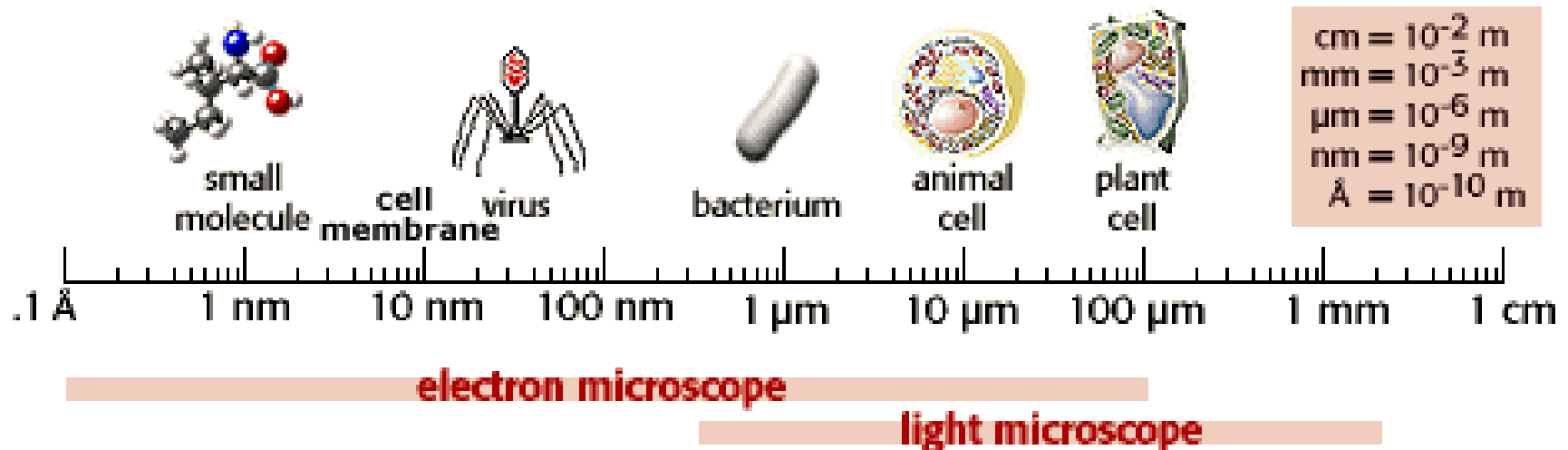
Organismi unicellulari
(struttura cellulare complessa)

BATTERI

(struttura cellulare più semplice)

VIRUS

(una molecola di acido nucleico + proteine)



MICRORGANISMI e OSPITE

<i>Microrganismi:</i>	<u><i>Saprophyti</i></u>	Specie che vivono nell'ambiente senza contatti con l'uomo
	<u><i>Commensali</i></u>	Specie che vivono su cute e mucose umane senza provocare alcun danno (in particolari condizioni: patogeni opportunisti)
	<u><i>Parassiti</i></u>	Specie che, invadendo l'organismo umano e moltiplicandosi al suo interno, possono provocare l'insorgenza di malattie

Microrganismi cellulari: PROCARIOTI ed EUCARIOTI

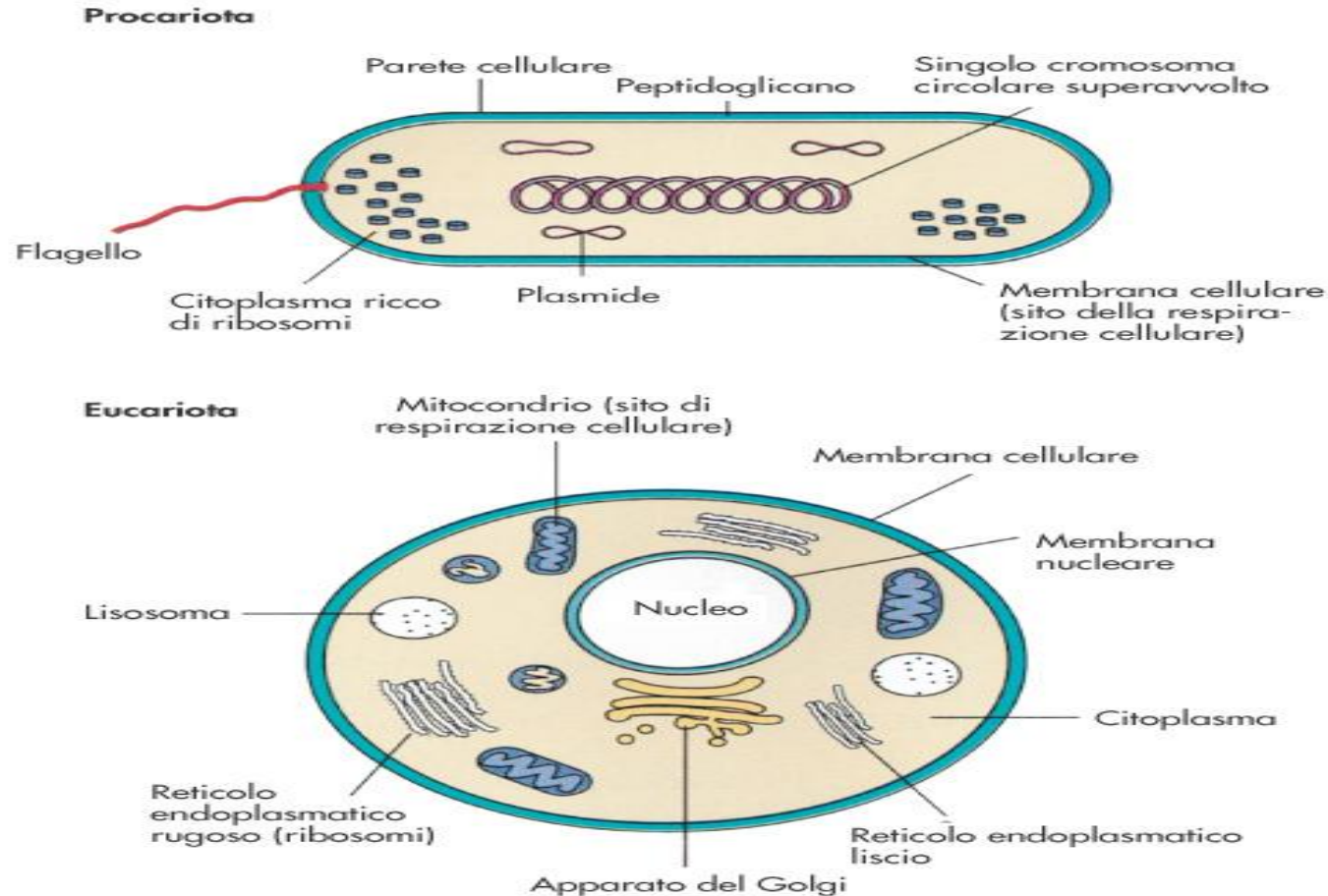
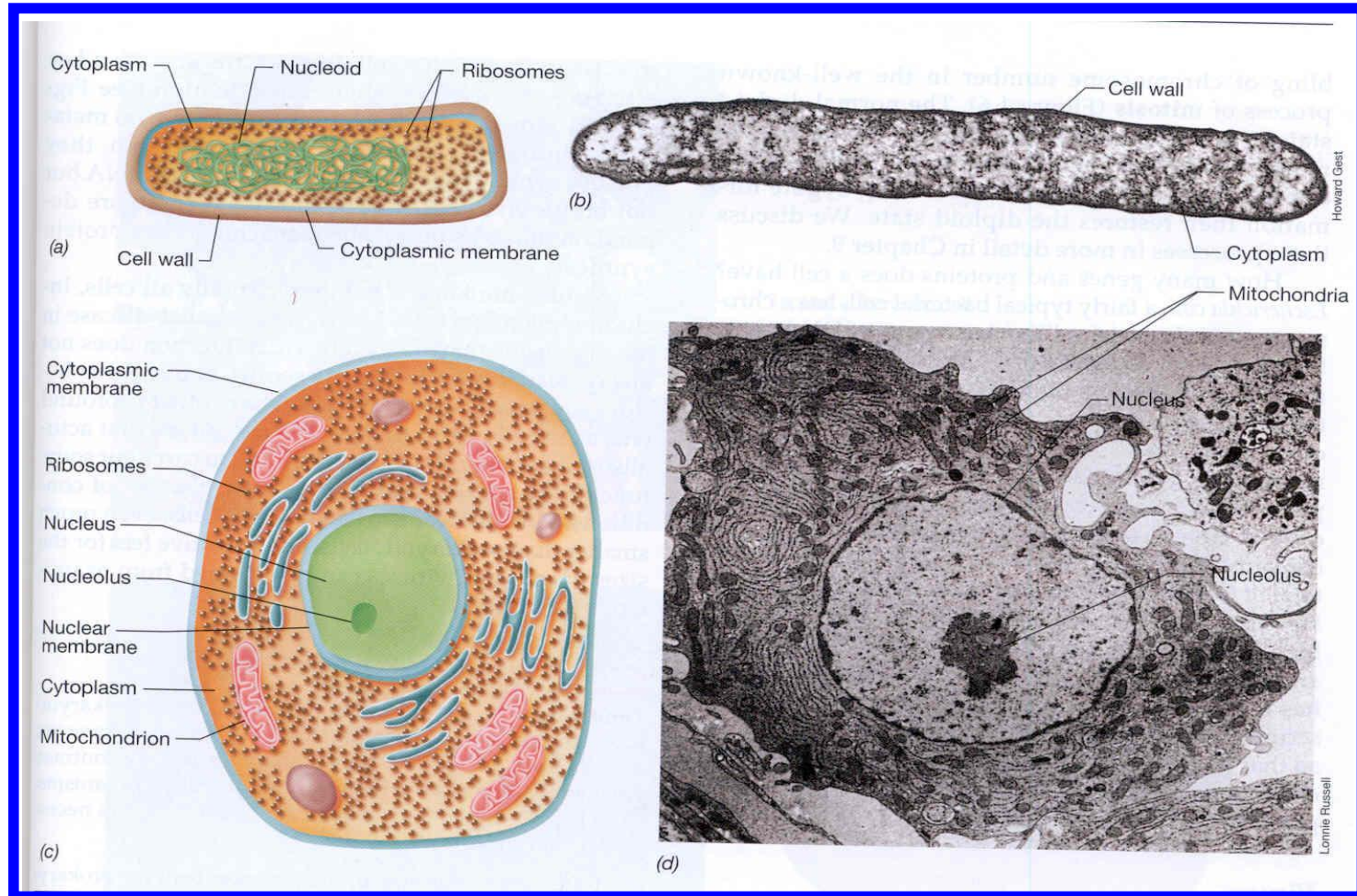


FIGURA 3-1. Caratteristiche principali di procarioti ed eucarioti.

cellula Procariotica (BATTERI) e cellula Eucariotica



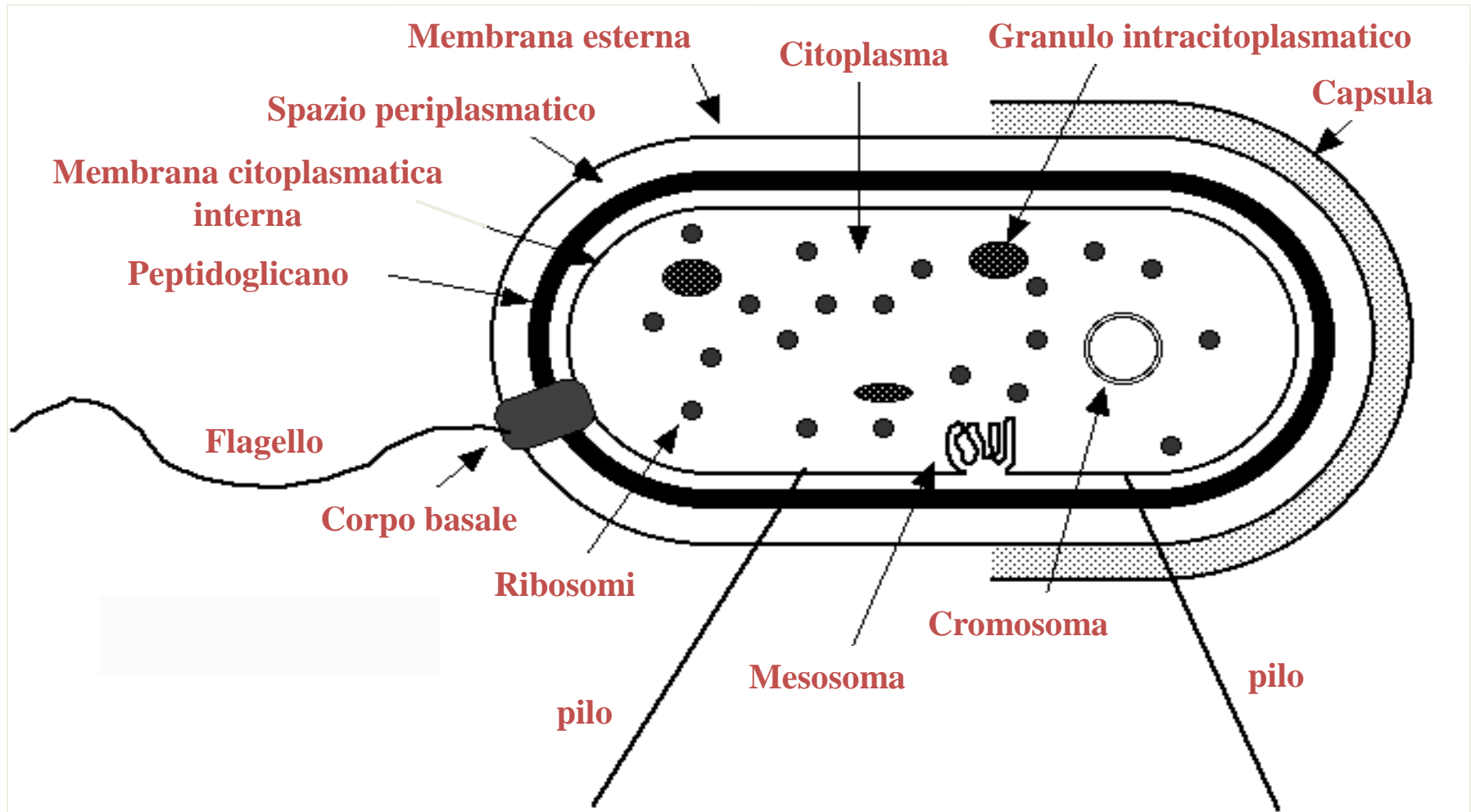
Principali differenze fra EUCARIOTI e PROCARIOTI

Caratteristica	Eucarioti	Procarioti
Nucleo	Presente ; Più molecole di DNA legato a proteine (istoni) organizzato in cromosomi nel nucleo delimitato da membrana	Assente ; il DNA è disperso in un area nucleare (nucleoide) sprovvista di membrana; istoni assenti
Nucleolo	Presente	Assente
DNA extra-cromosomico	Organuli quali cloroplasti e mitocondri hanno un proprio DNA	DNA plasmidico quale componente extra-cromosomico
Parete cellulare	Presente nelle alghe e nei funghi; assente nei protozoi e negli organismi superiori	Presente in tutti i gruppi di batteri eccetto i micoplasmi
Membrana citoplasmatica	Contiene steroli	Steroli assenti
Riproduzione	Sessuata (Mitosi e meiosi) o asessuata	Asessuata (fissione binaria)

Principali differenze fra EUCARIOTI e PROCARIOTI

Ribosomi	Coefficiente di sedimentazione 80S; adesi ad un sistema membranario detto reticolo endoplasmatico	Coefficiente di sedimentazione 70S presenti nel citoplasma in forma indipendente
Respirazione	Nei mitocondri	Associata alla membrana citoplasmatica
Fotosintesi	nei cloroplasti	non associata con organuli
Motilità	Flagelli (cilie) o movimenti ameboidi	Flagelli, filamenti assiali, alcuni movimenti di scivolamento
Dimensioni	20 μ m in media	1-10 μ m
Habitat	Quasi esclusivamente ambienti aerobi	Ambienti aerobi ed anaerobi

ORGANIZZAZIONE DELLA CELLULA BATTERICA



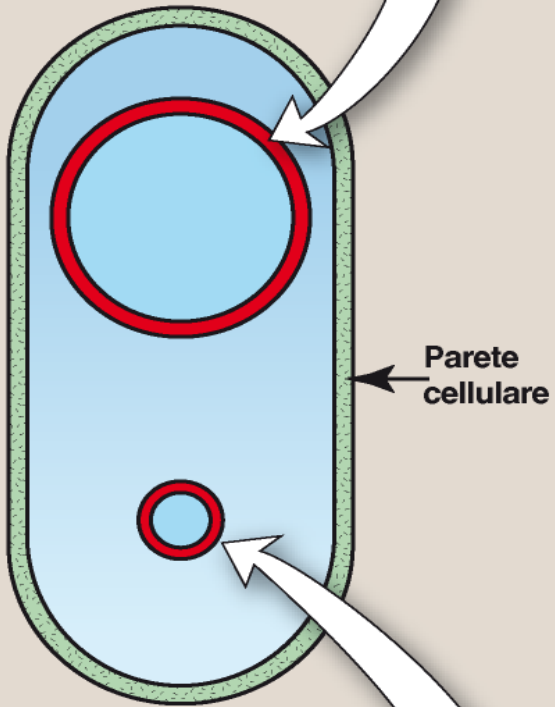
IL CROMOSOMA BATTERICO

Cromosoma batterico: singola molecola di DNA con **struttura circolare** raggomitolata e immersa nel citoplasma;

Il cromosoma batterico è il depositario dell'informazione genetica cellulare.

CROMOSOMA

- DNA circolare, a doppio filamento
- 3000 geni (3000 kilobasi)
- Singola copia per cellula
- Altamente avvolto nella cellula



BATTERIO

PLASMIDE

- DNA circolare, a doppio filamento
- 5-100 geni (5-100 kilobasi)
- 1-20 copie per cellula

IL GENOMA BATTERICO

PLASMIDI/episomi

- i plasmidi si replicano in modo autonomo e contengono geni non essenziali per la cellula batterica
- responsabili di meccanismi di virulenza come produzione di tossine, pili ed altri tipi di adesine e dei meccanismi di resistenza nei confronti di agenti antibatterici.
- Alcuni plasmidi (episomi) possono integrarsi nel cromosoma batterico e, dopo l'integrazione, si replicano con il cromosoma stesso.
- Un episoma può separarsi dal cromosoma e tornare a replicarsi autonomamente

CITOPLASMA

Il citosol batterico è privo di mitocondri, cloroplasti, ergastoplasma e sistema vacuolare.

Sono presenti ribosomi e granuli di varia natura (Inclusioni citoplasmatiche).

Inclusioni citoplasmatiche: ribosomi

- I ribosomi sono particelle citoplasmatiche che permettono la sintesi proteica.
- Sono composti dal 60% da RNA e dal 40% da proteine.
- Presentano una costante di sedimentazione di 70S.

Inclusioni citoplasmatiche: granuli

- **Glicogeno**, rappresenta una riserva di carbonio.
- Granuli metacromatici, funzione di riserva di fosfato.
- Granuli di lipidi (polimeri dell'acido beta-idrossi-butirrico) costituiscono una riserva energetica per la cellula batterica.
- Granuli di zolfo (solfobatteri) e granuli di ferro (ferrobatteri).

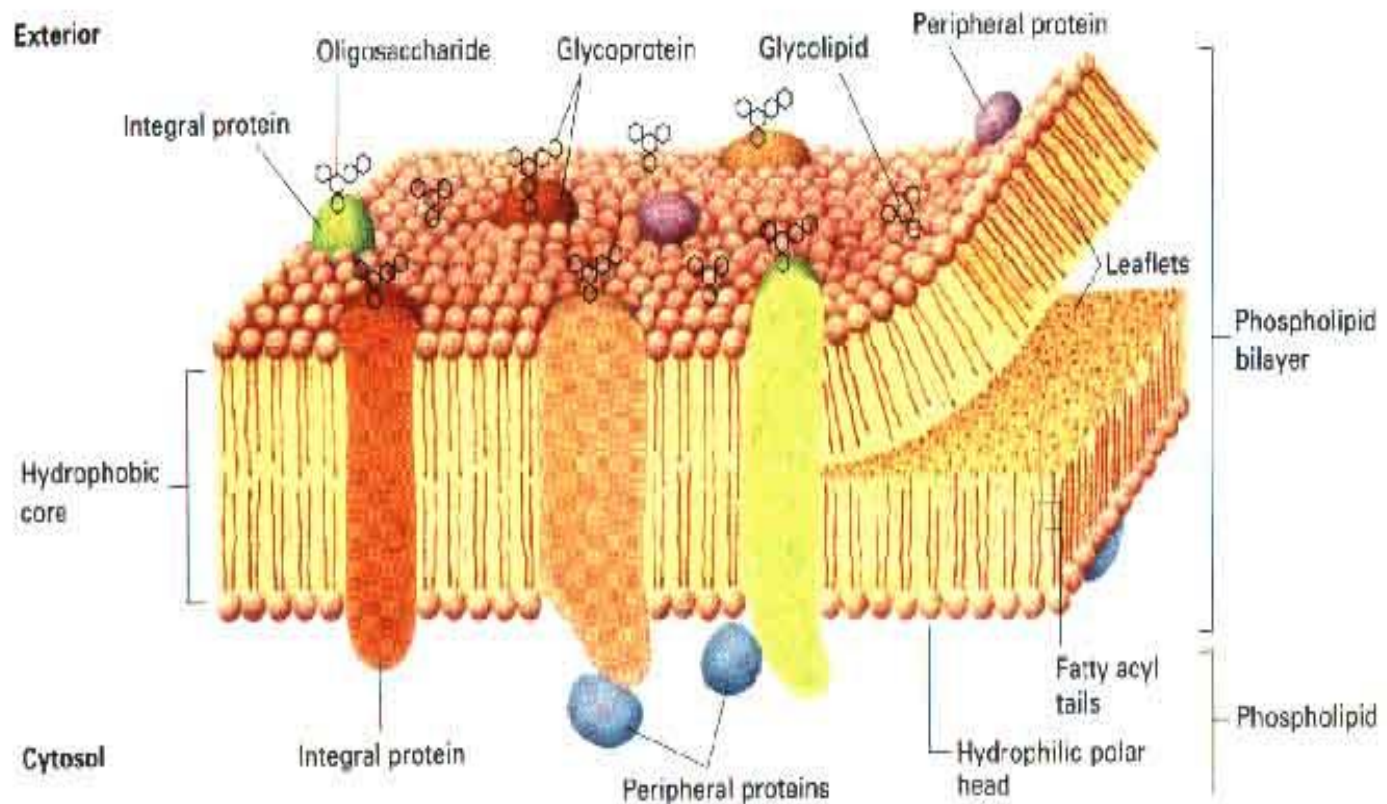
Membrana cellulare

- Struttura: doppio strato fosfolipidico nel quale sono immerse diverse proteine
- Costituita: - 40% lipidi (fosfolipidi)
 - 60% proteine
 - carboidrati (piccole quantità)

Membrana cellulare

La membrana cellulare e' costituita da fosfolipidi con i gruppi idrofobici rivolti all'interno e quelli idrofili all'esterno dove si associano con l'acqua.

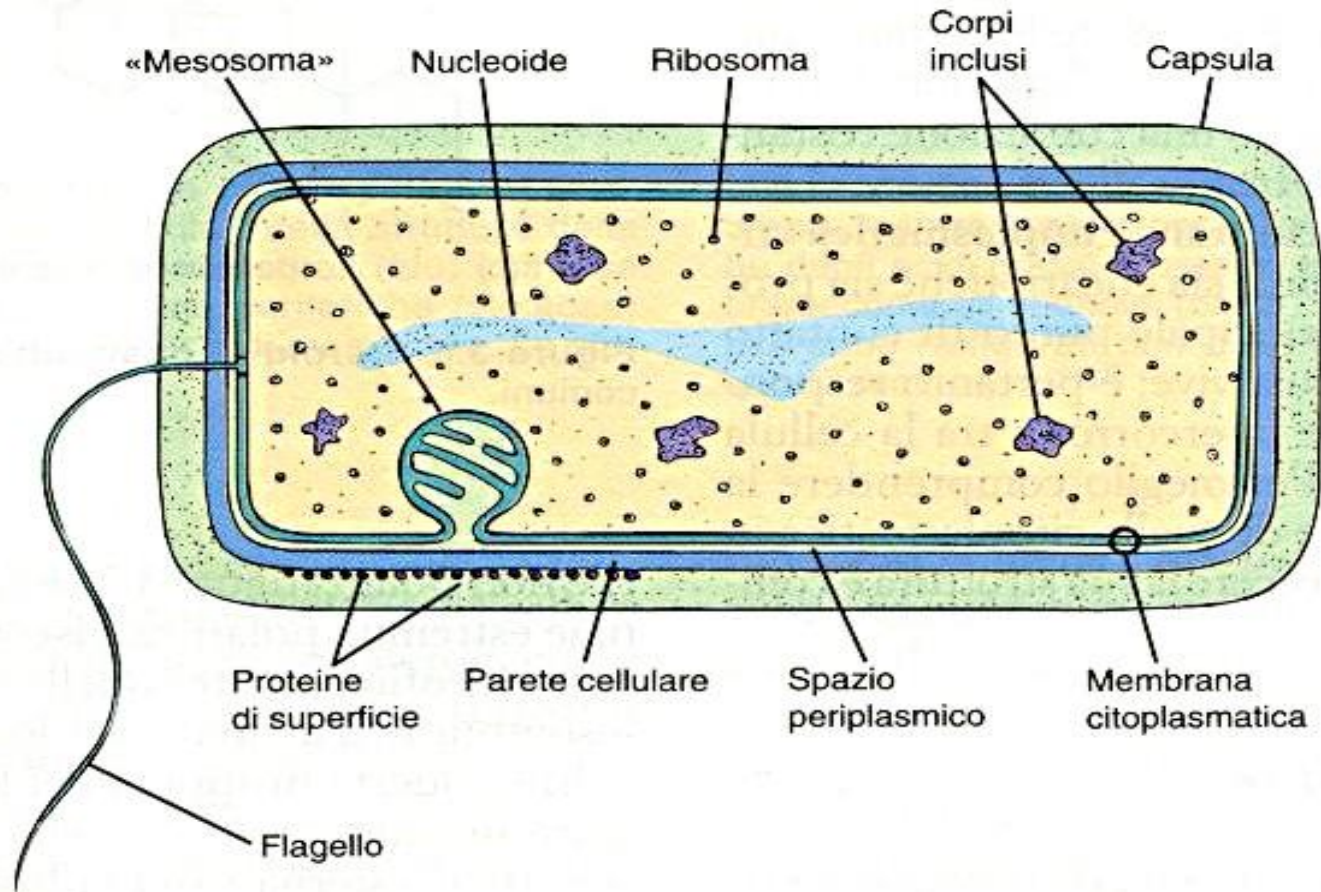
Nella matrice sono inserite proteine idrofobiche



Funzioni della membrana cellulare

- **Produzione di energia:** è la sede degli enzimi della catena respiratoria per la fosforilazione ossidativa.
- **Scambi con ambiente extra-cellulare:** trasporto di cataboliti all' esterno e di sostanze nutritive all' interno (diffusione passiva o trasporto attivo)
- **Sintesi del peptidoglicano (parete cellulare)**

Mesosoma è un'invaginazione della membrana citoplasmatica di notevoli dimensioni, di forma irregolare.



PARETE CELLULARE

Funzioni di mantenere forma e rigidità della cellula e di protezione dai danni meccanici e dalla lisi osmotica.

Il componente fondamentale è un polimero detto **peptidoglicano**.

Peptidoglicano

- **Scheletro glicanico**
 - Acido N-acetilmuramico **NAM**
 - N-acetilglucosammina **NAG**
- **Catene laterali peptidiche**
 - D- L- aminoacidi
 - Acido diaminopimelico
 - **Legami crociati peptidici**

PARETE CELLULARE BATTERICA: PEPTIDOGLICANO

STRUTTURA

- Il peptidoglicano è una struttura rigida formata dalla ripetizione di una *unità strutturale* assolutamente peculiare della cellula procariotica, la quale non ha riscontro in altre strutture biologiche.
- *unità strutturale* formata da **2 carboidrati azotati** (amminozuccheri):

N-acetilglucosamina

Molto diffuso come costituente di diversi materiali biologici



Acido N-acetilmuramico

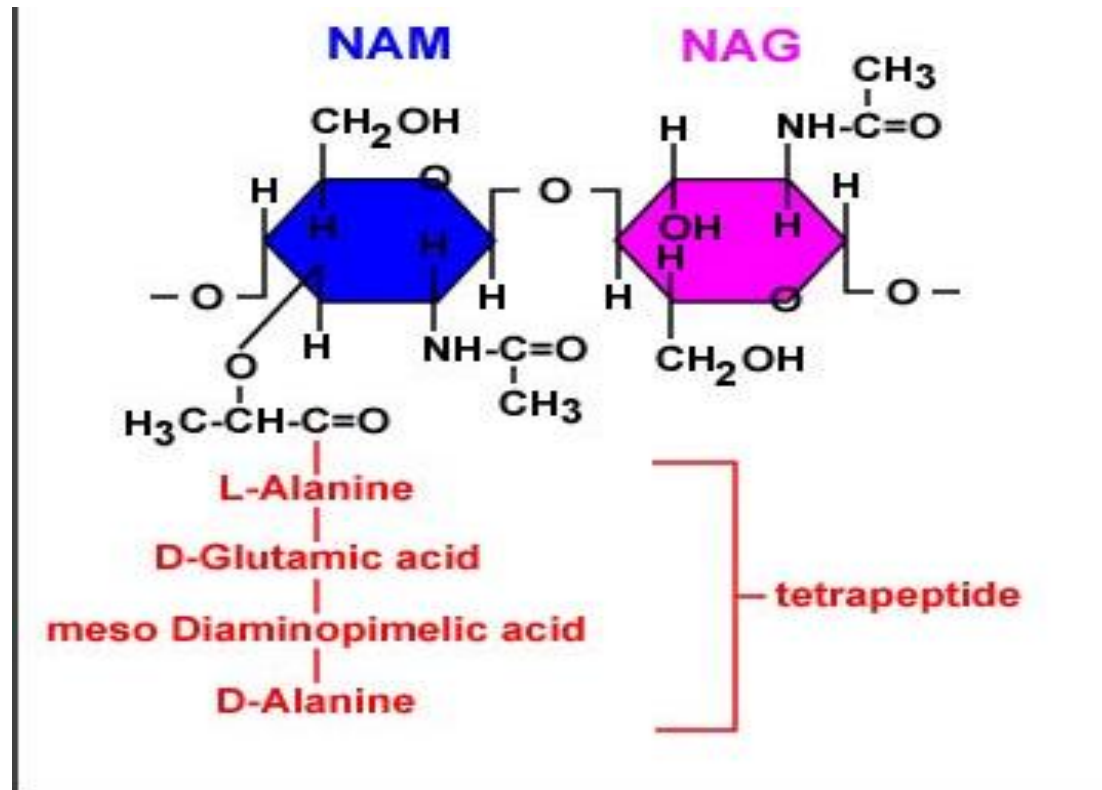
NAM



Assolutamente specifico della parete cellulare batterica.

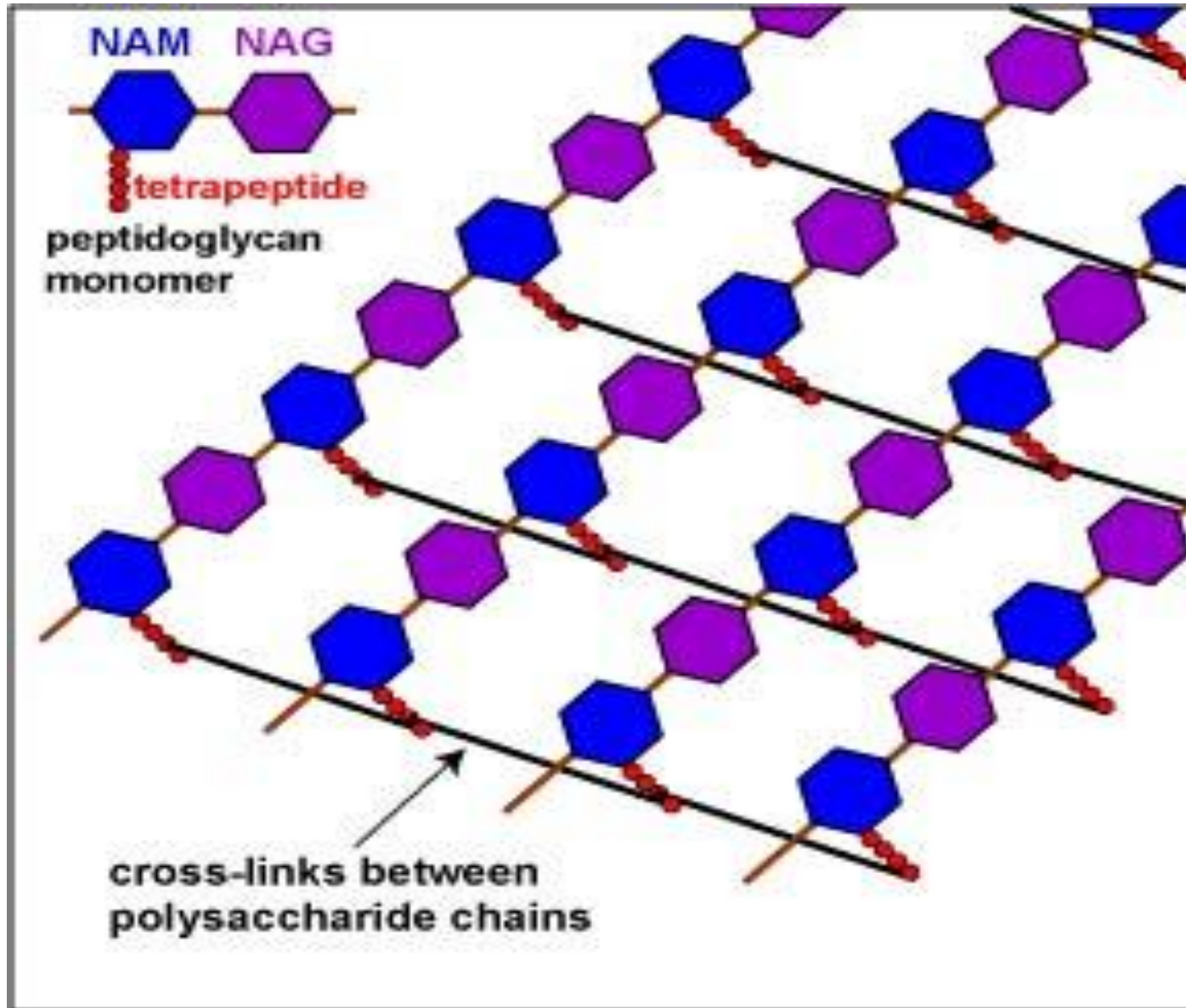
tetrapeptide

Il monomero del Peptidoglicano



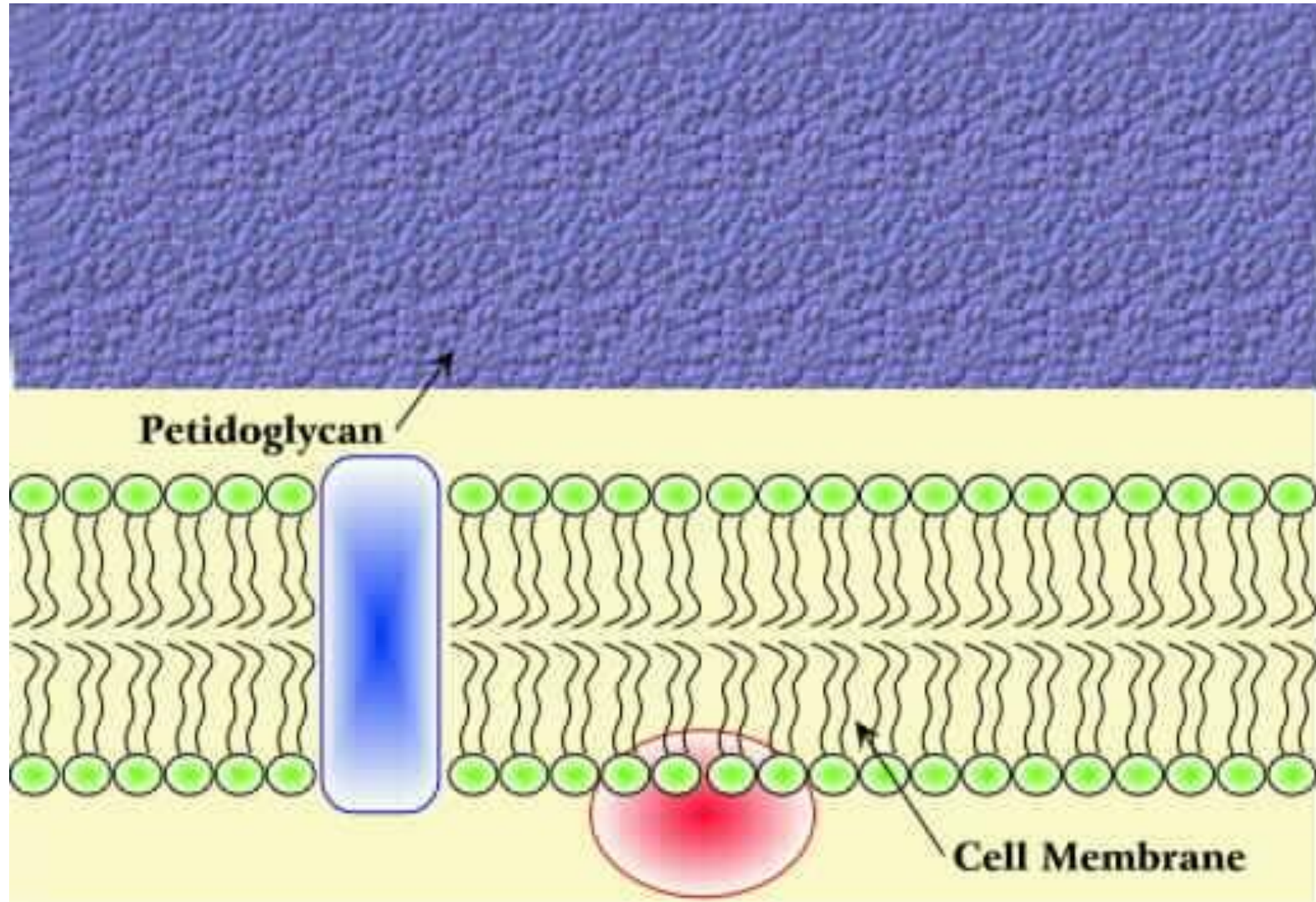
- NAM= N-Acetil muramico
- NAG= N-Acetil glucosammina,
- Sono degli **AMMINOZUCCHERI**

Struttura del peptidoglicano



BATTERI GRAM positivi

PARETE COSTITUITA DA UNO SPESSO STRATO DI PEPTIDOGLICANO

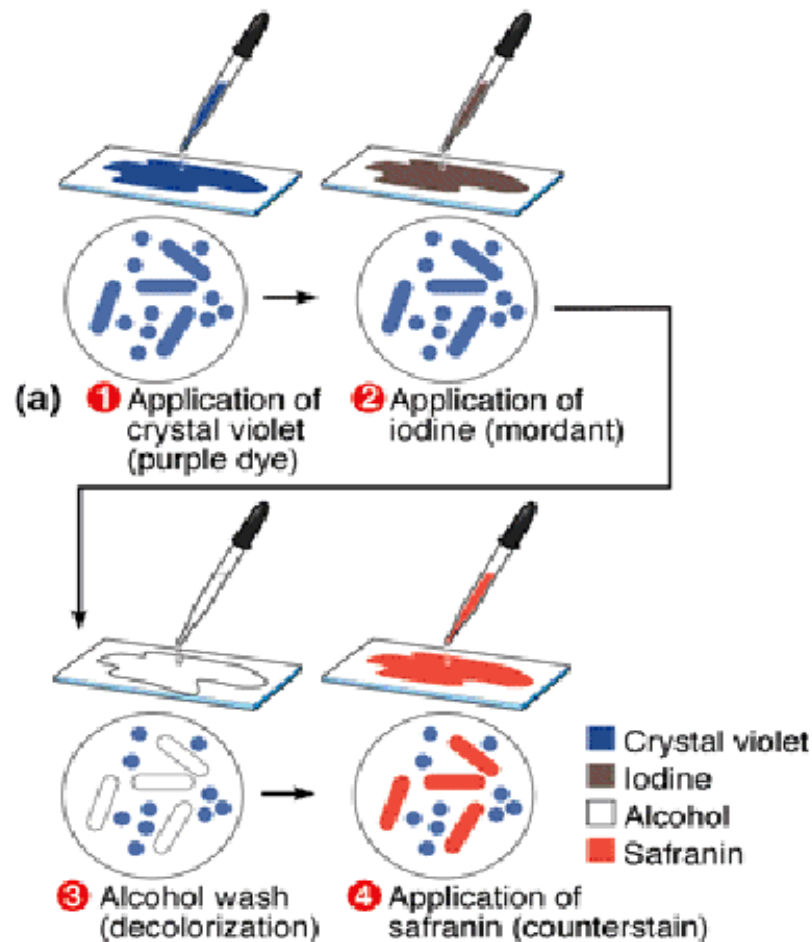


Hans Christian Joachim Gram



- Nato a Copenhagen il 13 Settembre 1853.
- Batteriologo danese. Nel 1884 mise a punto la colorazione omonima nel tentativo di differenziare *Klebsiella pneumoniae* dagli pneumococchi

Colorazione di Gram

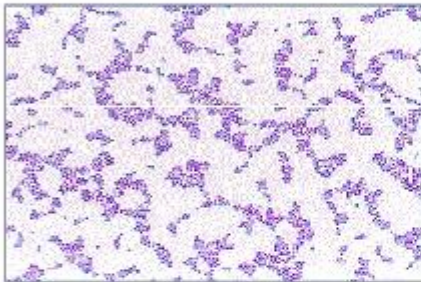


© BENJAMIN/CUMMINGS

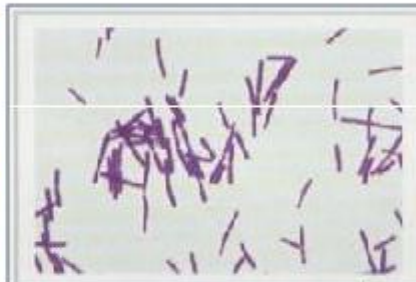
1. Fissare gli strisci al calore
2. Coprire con cristalvioletto per 1-2 min
3. Lavare con acqua. Non asciugare
4. Coprire con la soluzione iodio-iodurata di Lugol per 1-2 min
5. Lavare con acqua. Non asciugare
6. Decolorare per 10 sec con alcool-acetone
7. Lavare con acqua. Non asciugare
8. Coprire con safranina (2.5% in alcool 95%) per 1-2 min
9. Lavare con acqua e lasciare asciugare

Colorazione di Gram

Osservazione microscopica

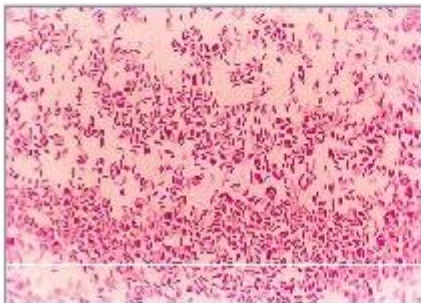


(*Staphylococcus epidermidis*)



Bacilli Gram +

I batteri **Gram+**
(*Staphylococcus* spp,
Streptococcus spp, etc)
appaiono **viola**



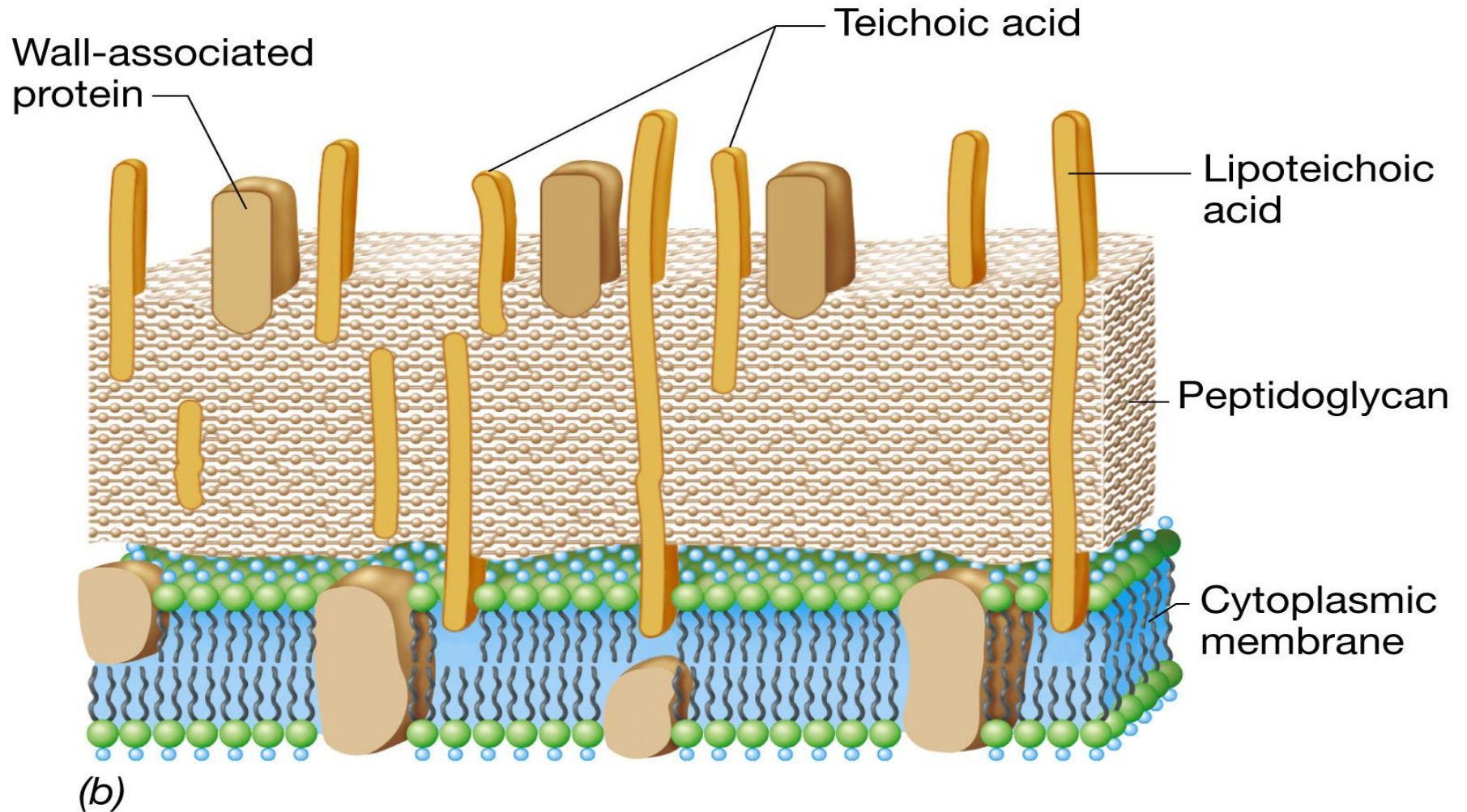
(*Escherichia coli*)



Bacilli Gram -

I batteri **Gram -**
(*E. coli*, *P. aeruginosa*,
Neisseriaceae , etc)
appaiono **rossi**

BATTERI GRAM POSITIVI: STRATO DI PEPTIDOGLICANO E MOLECOLE ASSOCIATE

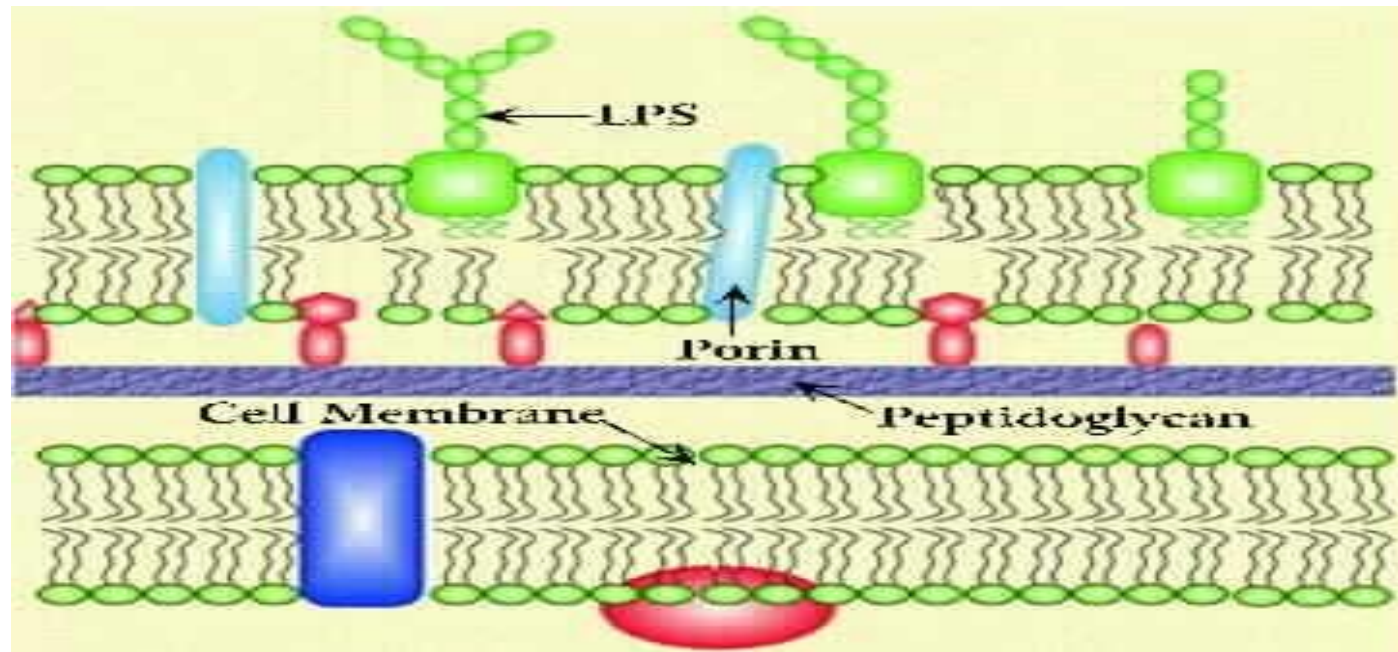


BATTERI GRAM negativi

LA PARETE E' COSTITUITA DA UNO STRATO SOTTILE DI PEPTIDOGLICANO E DA UNA MEMBRANA ESTERNA

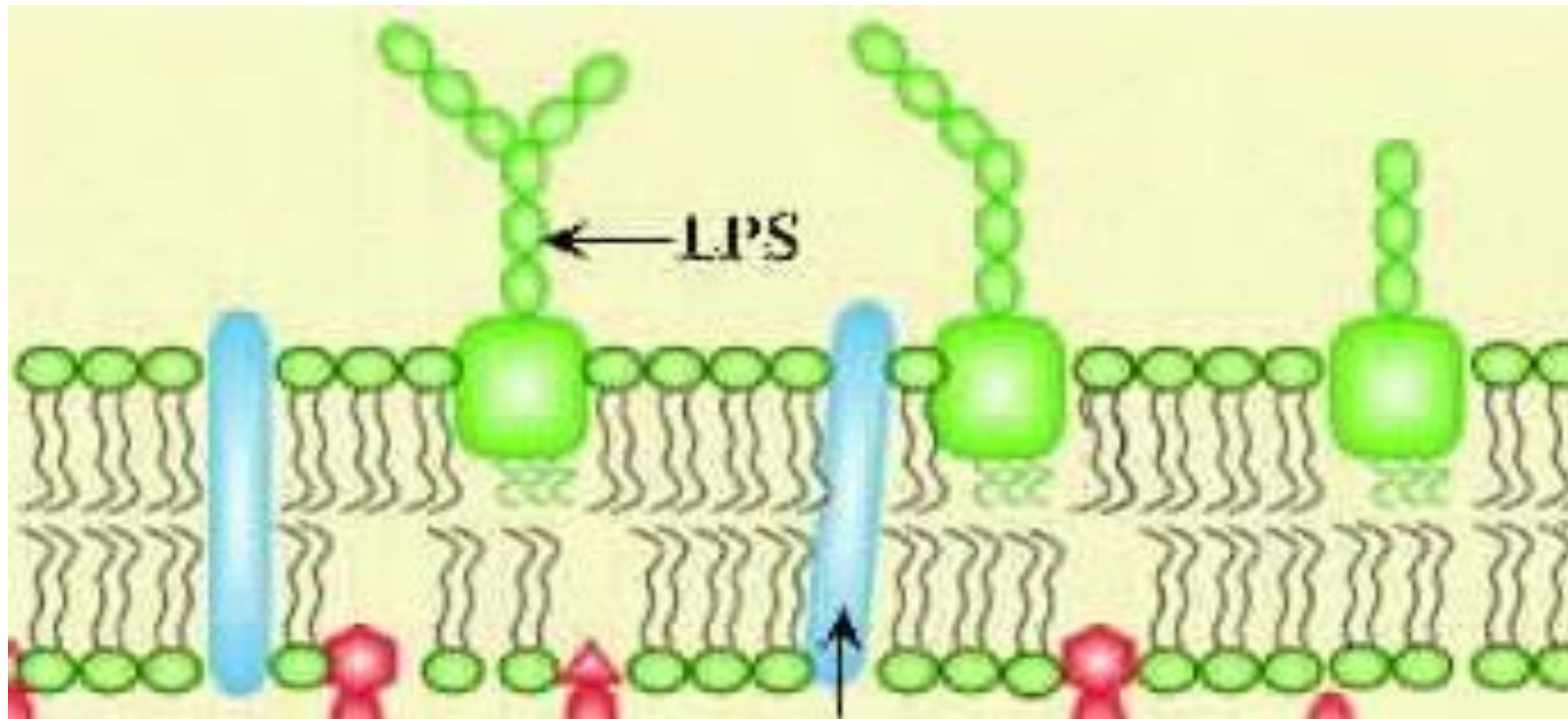
FUNZIONI MEMBRANA ESTERNA:

- Diffusione passiva: presenza di canali detti “porine” che permettono il passaggio di zuccheri, aminoacidi e ioni minerali.
- Trasporto attivo: proteine carrier per molecole idrofile di maggiore dimensione.



MEMBRANA ESTERNA

La membrana esterna, presente solo nei batteri Gram-, ha una struttura bilaminare ma con una organizzazione asimmetrica cioè il foglietto esterno è costituito da uno strato complesso denominato LPS: lipopolisaccaride.

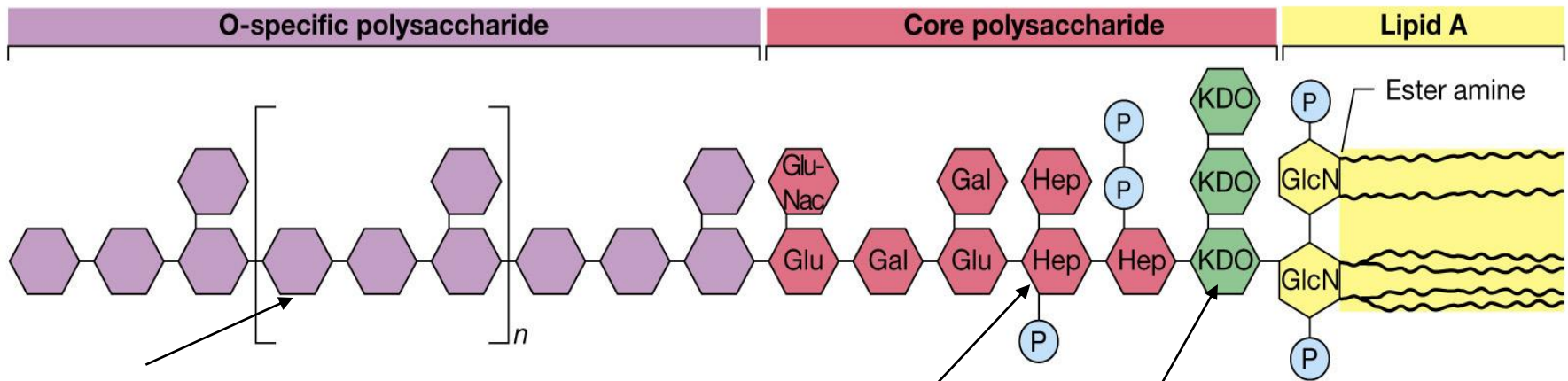


• Struttura del LIPOPOLISACCARIDE (LPS)

• ANTIGENE O (Regione antigenica variabile)

• CORE POLISACCARIDICO

• LIPIDE A (endotossina)

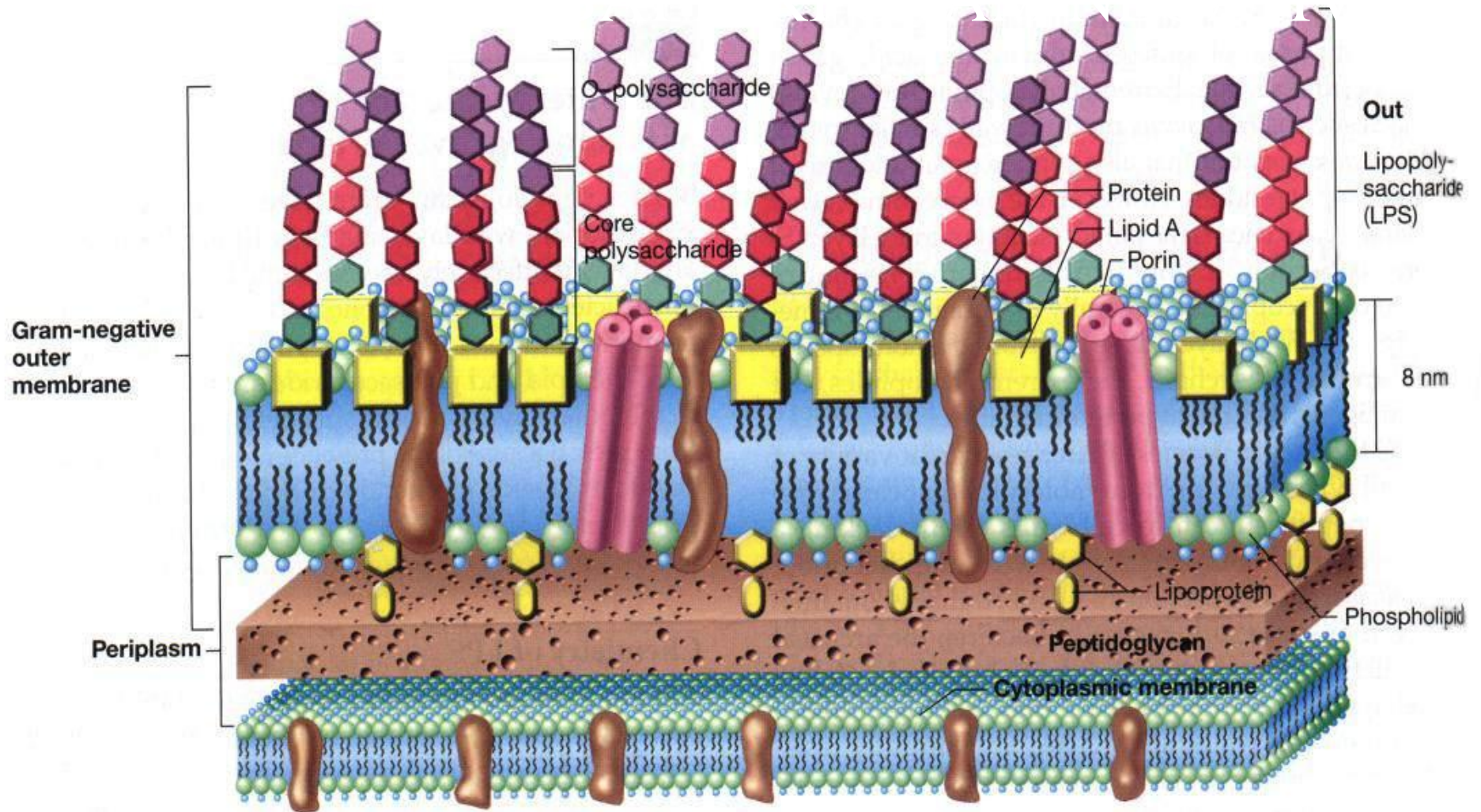


•Zuccheri

•Zuccheri peculiari: Eptosio

•KDO= Ketodeossiotonico

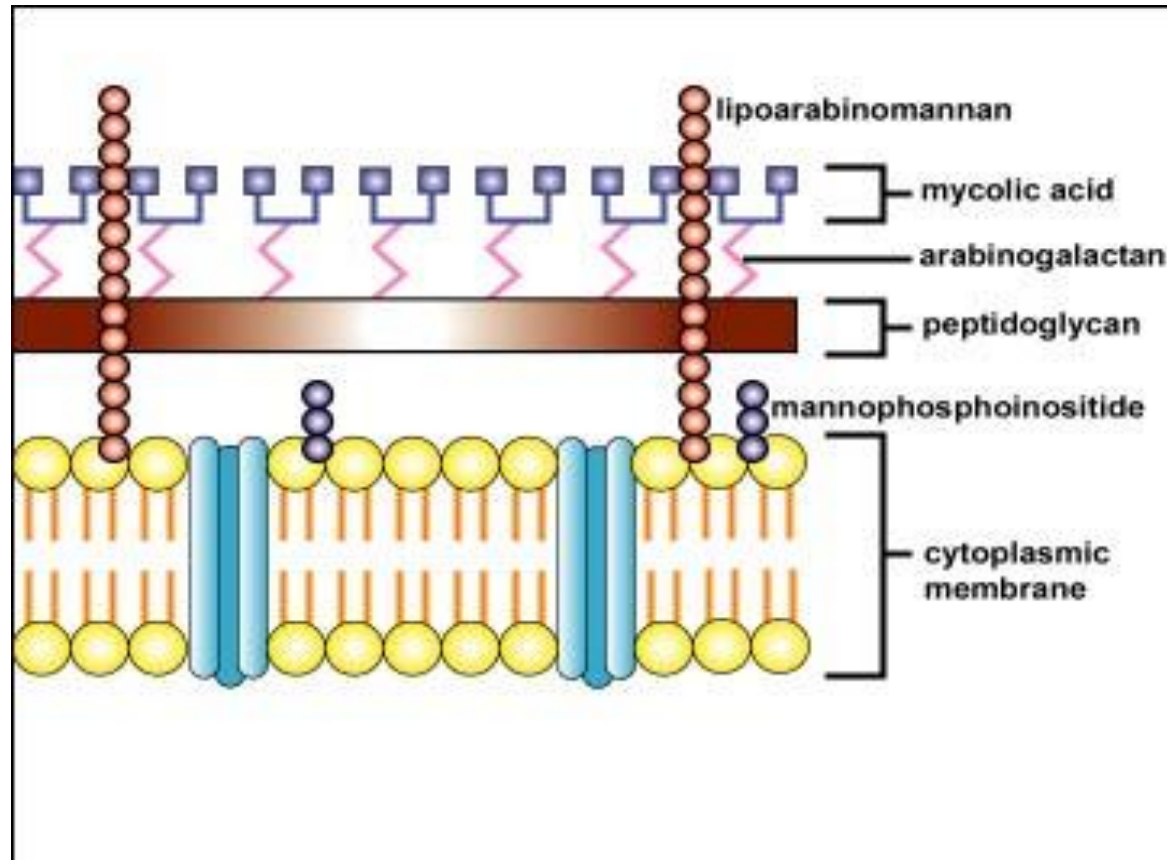
BATTERI GRAM negativi



BATTERI CON PARETE PARTICOLARE: MICOBATTERI

- PARETE formata da spesso strato di peptidoglicano (simile ai Gram +) legato a polisaccaridi esterificati con **acidi micolici**.
- Le catene peptidiche dello strato esterno sono importanti antigeni (PPD, derivati proteici purificati). Più esternamente ci sono polipeptidi, acidi micolici, lipidi liberi, glicolipidi, ecc.
- Colorazione differenziale (acido resistenza)
- Nei terreni selettivi crescita lenta

Struttura della parete dei Micobatteri (Acido-alcool resistenti)



BATTERI PRIVI DI PARETE MICOPLASMI

- Assenza di parete e presenza di steroli nella membrana citoplasmatica
- Sono insensibili agli antibiotici che interferiscono con la sintesi del peptidoglicano.
- Nei terreni solidi formano colonie di piccole dimensioni, difficilmente apprezzabili ad occhio nudo
-

CAPSULA

Batteri Gram+ e Gram- possono presentare un ulteriore involucro esterno mucoso detto capsula; generalmente costituita da polisaccaridi.

Proprietà:

- favorisce resistenza nell'ambiente, adesione cellulare e quindi la colonizzazione;
- azione antifagocitaria;
- resistenza agli antibiotici;
- favorisce aggregazione (biofilm).

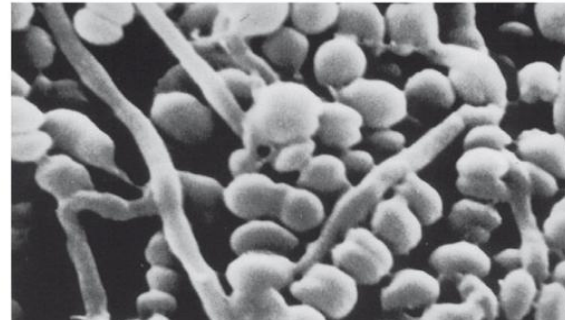
BIOFILM

Biofilm : stretta interazione tra batteri che promuove la colonizzazione stabile di alcune specie (**interazioni sinergiche**) e impedisce quella di altre (**interazioni antagonistiche**).

La cooperazione avviene tra specie batteriche che producono set distinti di enzimi (**complementazione enzimatica**) necessari per utilizzare nutrienti diversi.

Rappresenta una barriera microbiologica alla colonizzazione di specie esogene potenzialmente patogene per l'ospite (es biofilm dentale) ma....

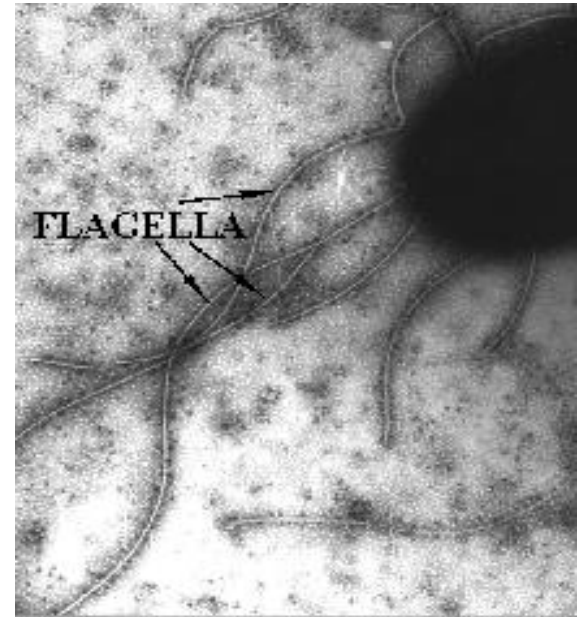
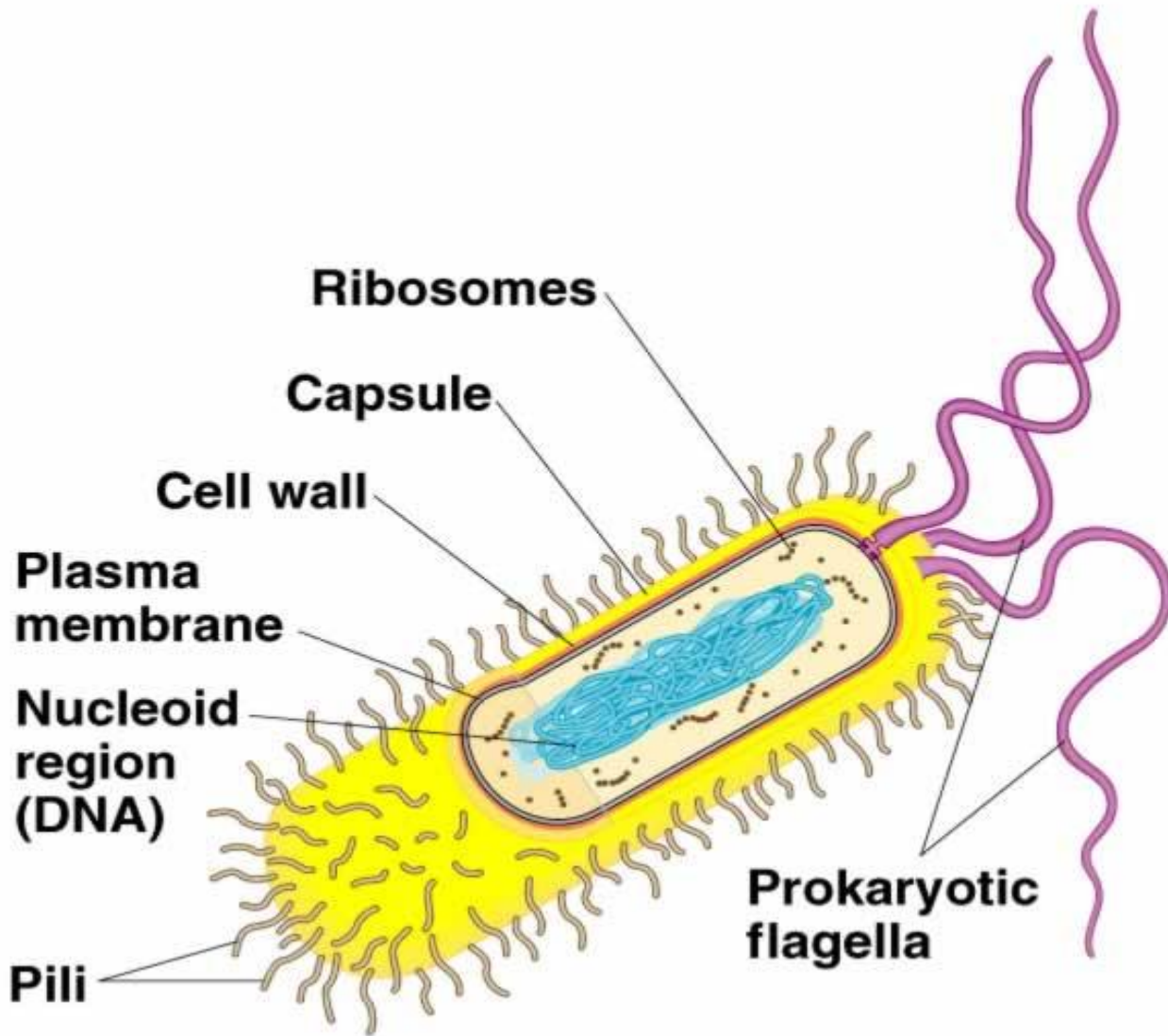
la **capacità di coaggregare** che permette l'adesione alle superfici conferisce una maggiore **resistenza alla fagocitosi e all'azione degli antibiotici**.



Flagelli



- I flagelli sono appendici cellulari che permettono il movimento alla cellula batterica.
- Essendo strutture superficiali, i flagelli conferiscono proprietà antigeniche.
- Fattore di virulenza poiché consente al batterio la motilità.



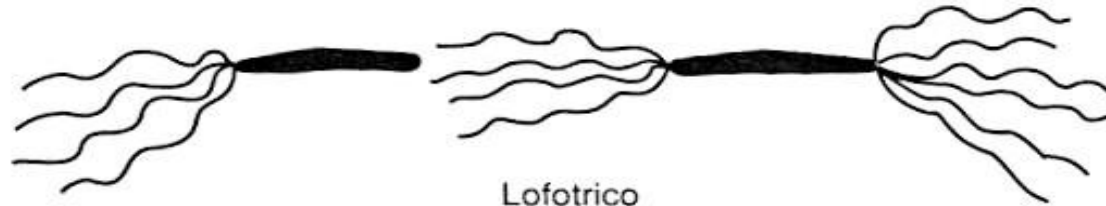
Dislocazione dei flagelli nelle cellule batteriche



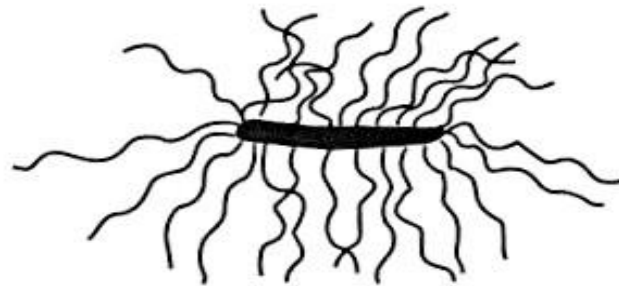
Monotrico



Anfitrico

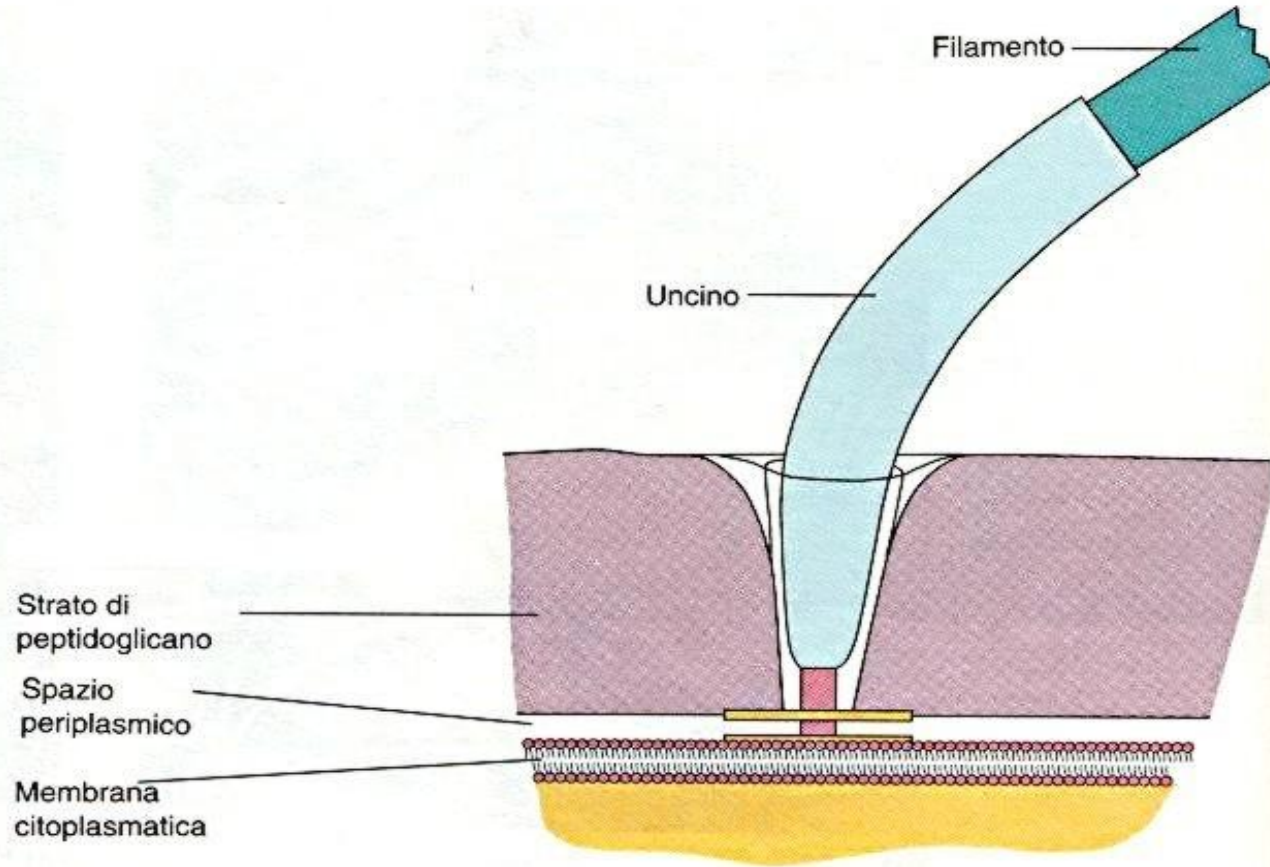


Lofotrico

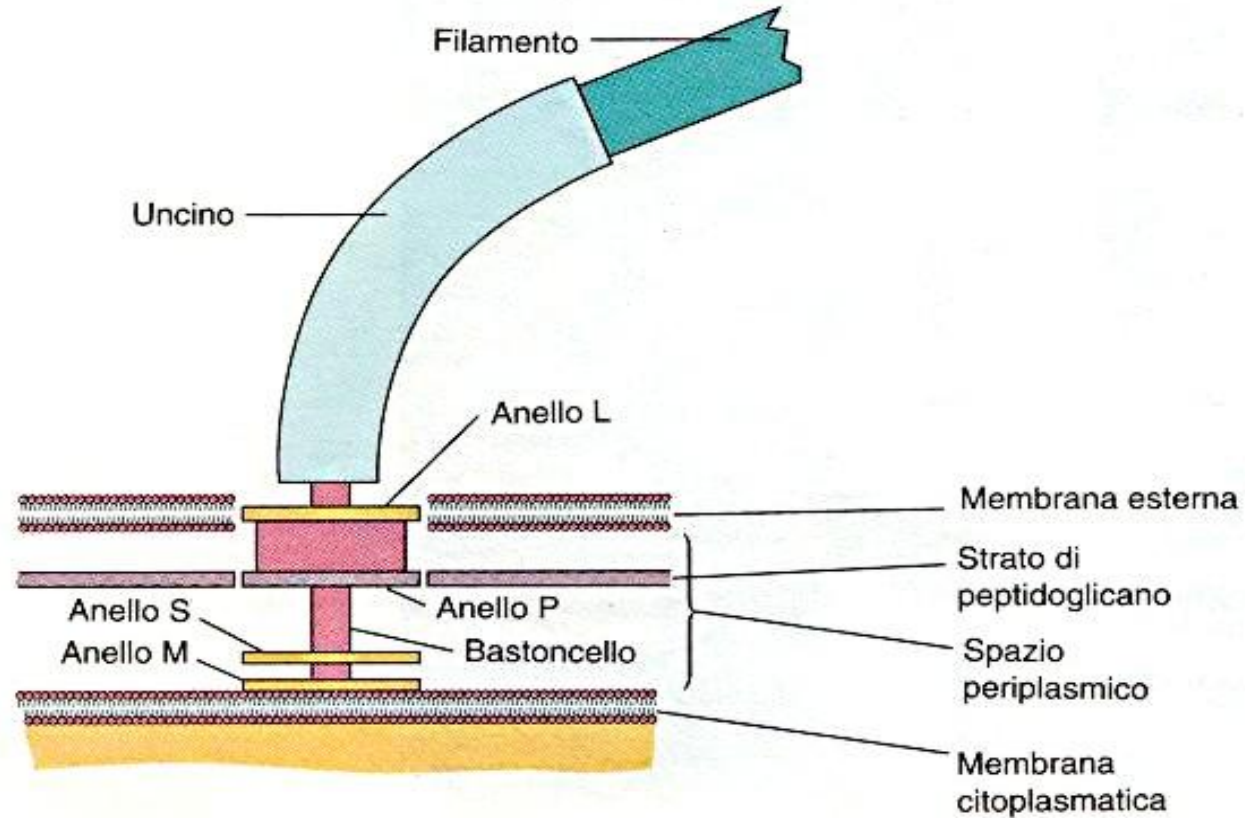


Peritrico

Struttura dei flagelli nei GRAM+

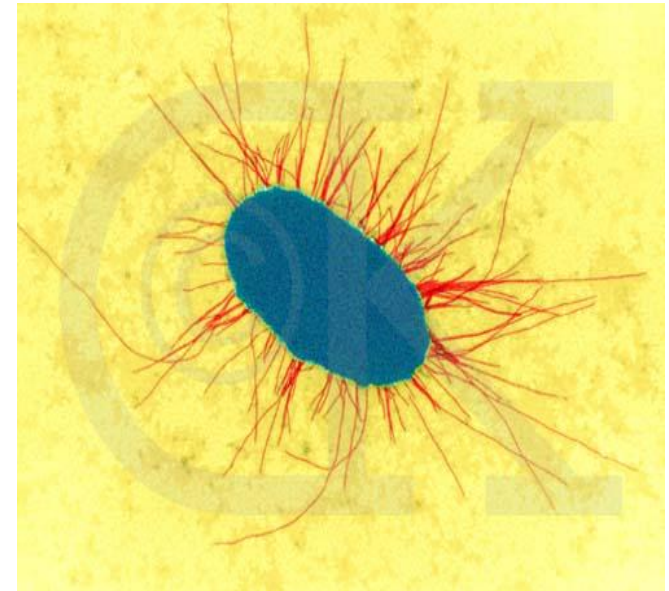


Struttura dei flagelli nei GRAM-



Pili

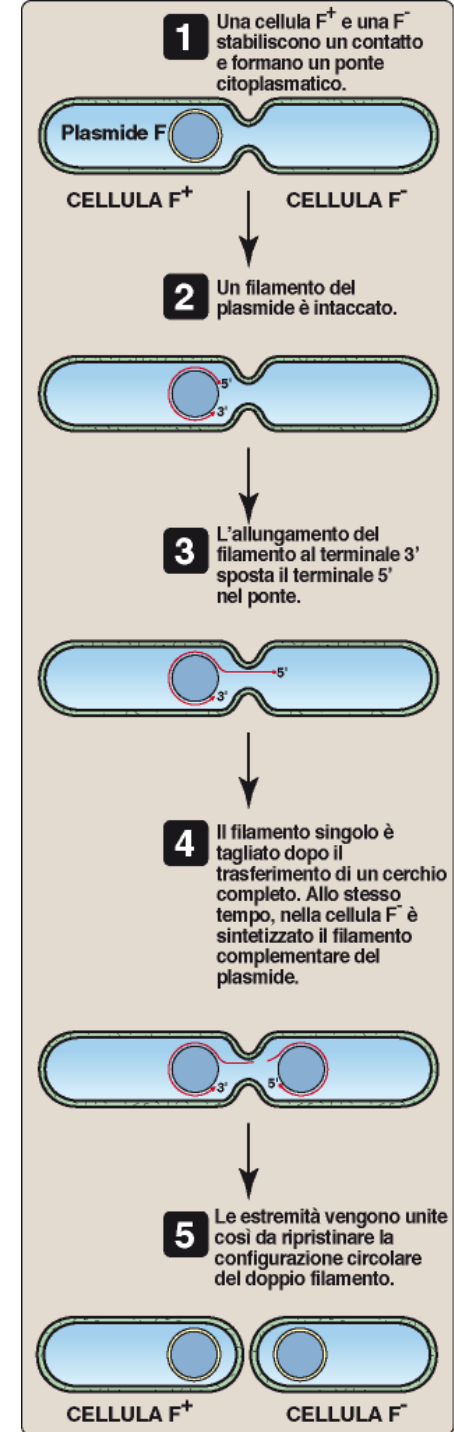
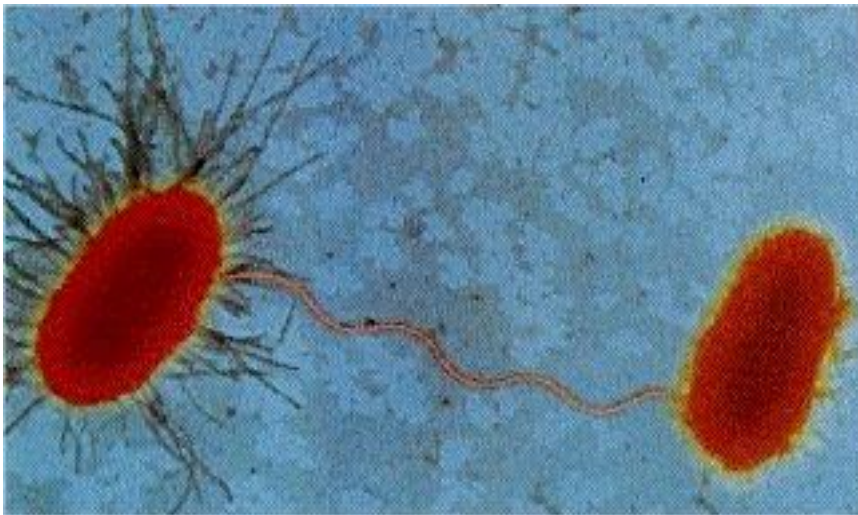
- Pili (o fimbrie): appendici filamentose piu' corte, più sottili e più numerosi dei flagelli; strutture proteiche che si formano a livello della membrana cellulare.
- Responsabili del processo di adesione alla cellula ospite.
- I pili sono fondamentali nel fenomeno di coniugazione.



Coniugazione

Coniugazione: modalità di trasmissione di informazioni genetiche fra due cellule.

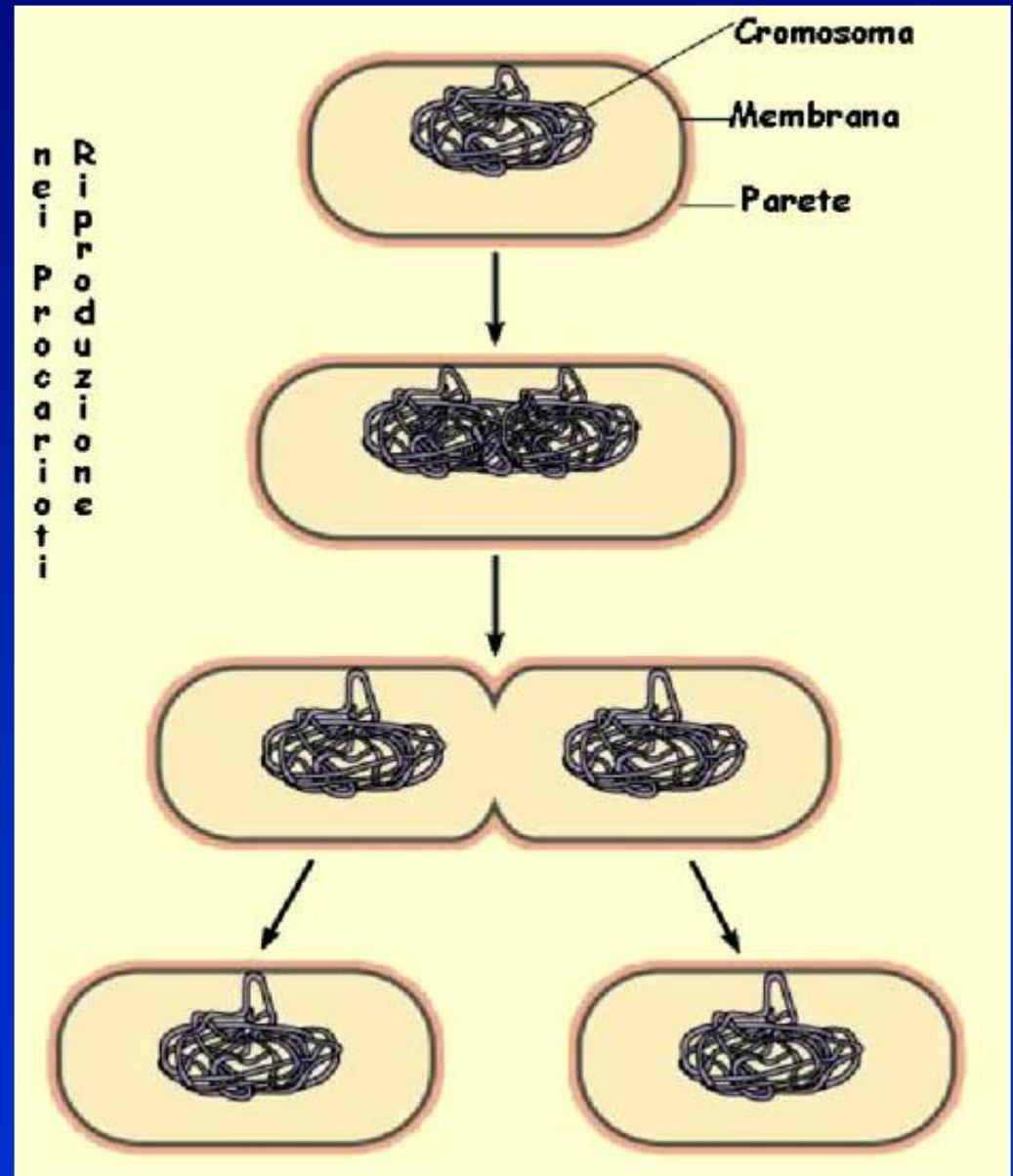
Avviene tramite i pili coniugativi, anche detti *pili F* (F = fertilità)



RIPRODUZIONE

SCISSIONE BINARIA

- Cellula madre \longrightarrow 2 cellule figlie (crescita con aumento esponenziale)
- Tempo di riproduzione da pochi minuti ad alcuni giorni
- Separazione completa
- Separazione incompleta (catene, grappoli, palizzate, ecc.)

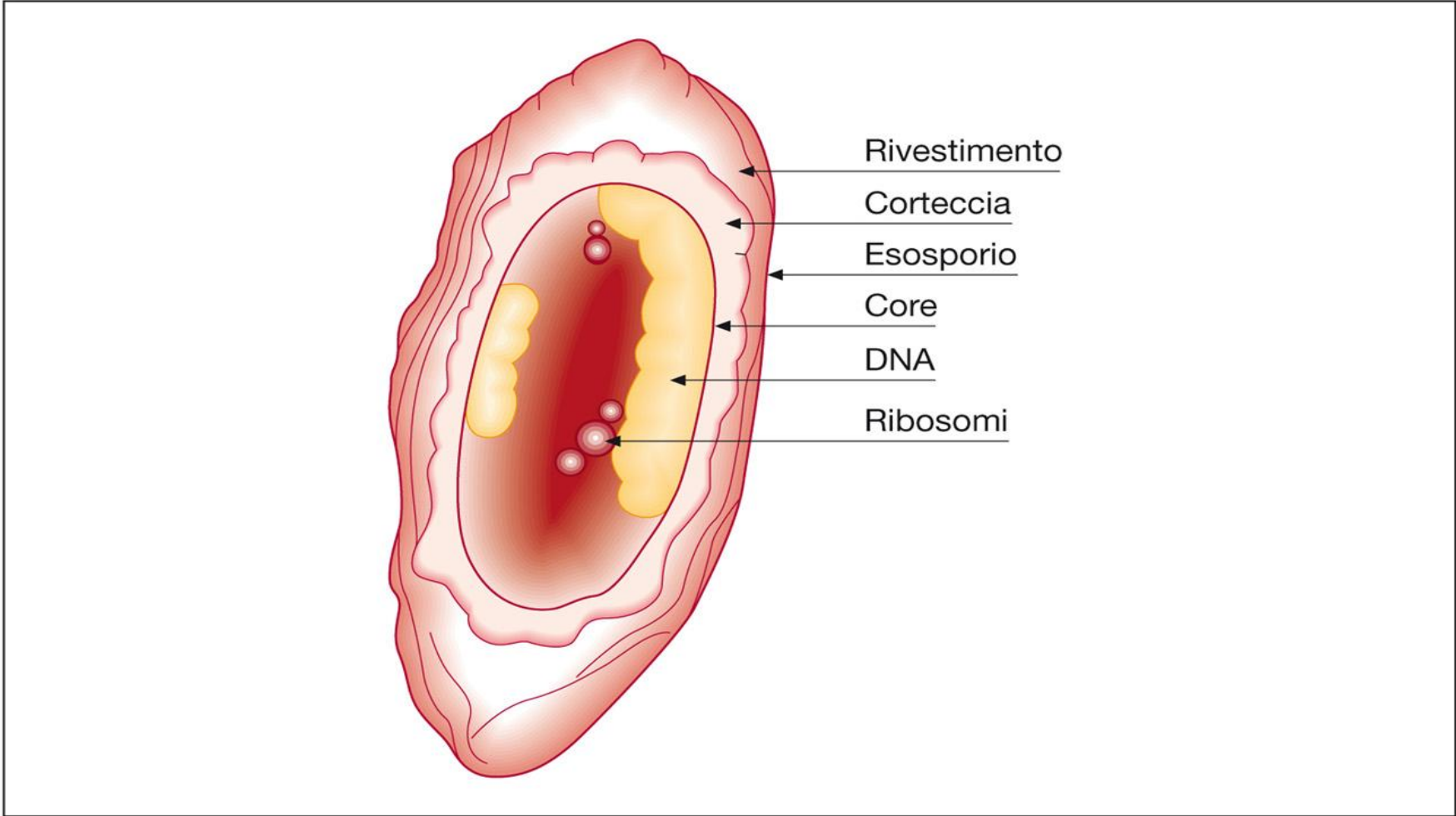


SPORULAZIONE

Spore: forma di resistenza (a numerosi agenti fisici e chimici) caratterizzata dall'assenza di ogni attività metabolica (es. *Clostridium tetani*, *C. botulinum*).

In condizioni favorevoli: GERMINAZIONE (passaggio alla forma vegetativa).





SPORE

Elevata resistenza a

ALTE TEMPERATURE (es *Clostridium botulinum* 330min a 100 C, *C. tetani* 90min a 100 C, forme vegetative : 5-10min 80 C)

RADIAZIONI UV

INVECCHIAMENTO

DISINFETTANTI

TERMORESISTENZA: a. DISIDRATAZIONE

b. MINERALIZZAZIONE

In condizioni favorevoli: GERMINAZIONE (passaggio alla forma vegetativa).

MORFOLOGIA CELLULA BATTERICA

Forma

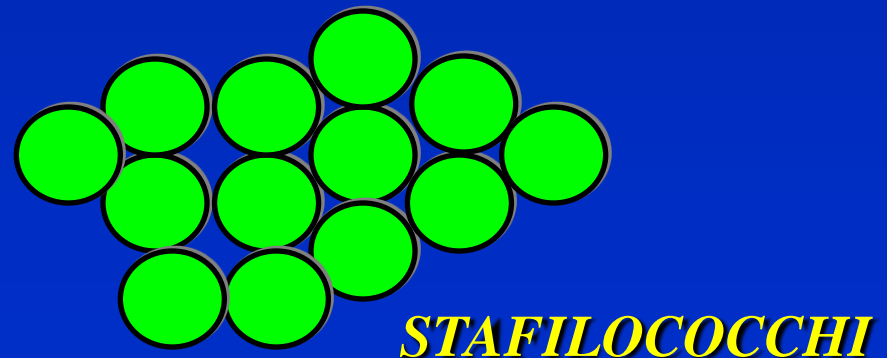
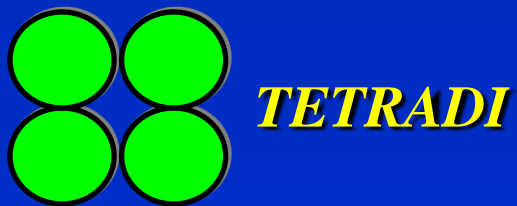
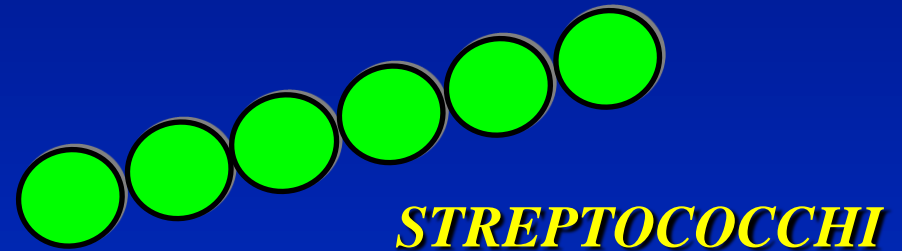
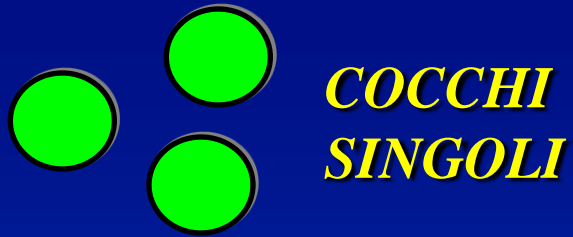


Sferica (cocchi)

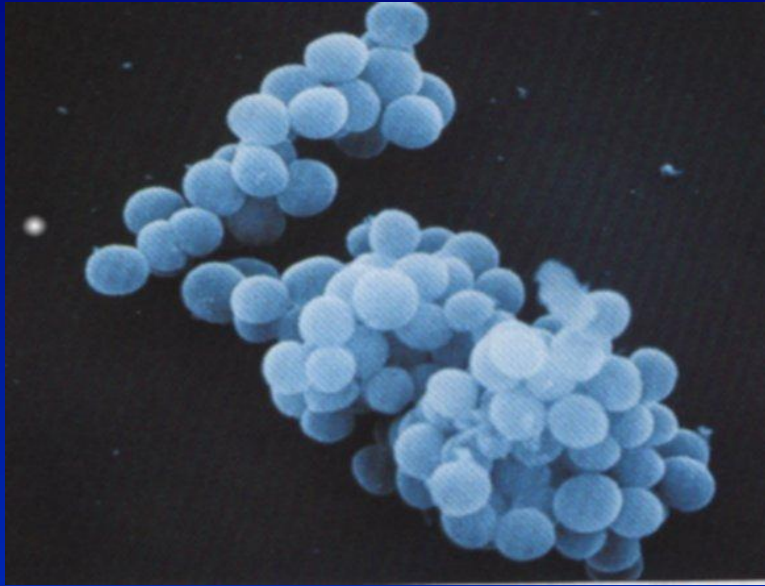
**Cilindrica/bastoncellare
(bacilli)**

Curvata (vibrioni, spirilli)

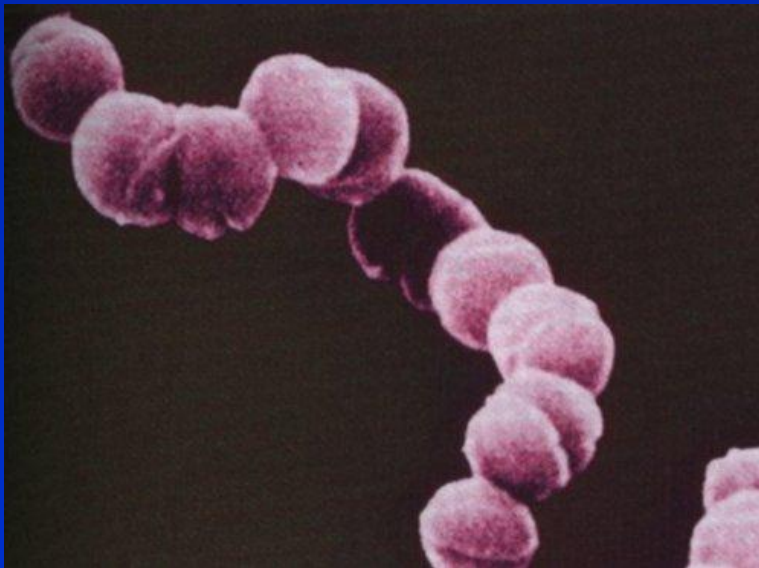
MORFOLOGIA BATTERICA (COCCHI)



MORFOLOGIA BATTERICA



STAFILOCOCCHI

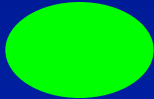


STREPTOCOCCHI

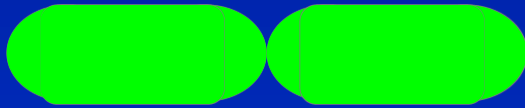
MORFOLOGIA BATTERICA (BACILLI)



BACILLI



COCCOBACILLI



DIPLOBACILLI



STREPTOBACILLI

MORFOLOGIA BATTERICA

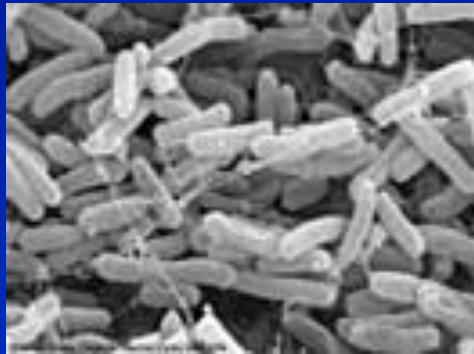


COCCHI

ESEMPI

STREPTOCOCCHI

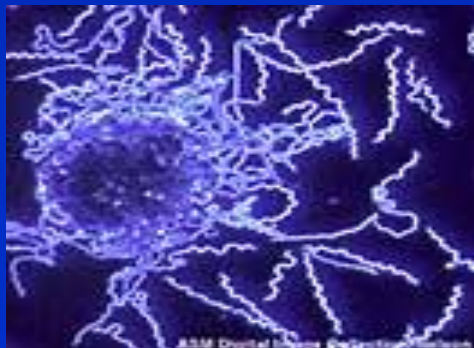
STAFILOCOCCHI



BACILLI

E. COLI

S. TYPHI



SPIRILLI

TREPONEMA

PALLIDUM

V. CHOLERAЕ