

All'interno o sulla superficie del nostro corpo ci sono centinaia di diverse specie batteriche che costituiscono la flora batterica o MICROBIOTA

Gli organismi che vivono sulla superficie o all'interno di un organismo provocando dei danni all'ospite sono denominati parassiti microbici o patogeni

L'esito della interazione ospite-parassita dipende dalla patogenicità del ceppo stesso e dalla suscettibilità dell'ospite.

La misura quantitativa della patogenicità è indicata dalla virulenza del ceppo

## Microbioma: genoma collettivo della flora intestinale.

Il microbiota contiene un numero di cellule batteriche circa 100 volte superiore al numero di cellule del genoma umano. Il genoma di tutti questi batteri può essere considerato parte integrante del genoma di ciascun individuo ed il microbiota è un super-organo.

Il microbiota contribuisce alla salute dell'uomo fornendo una serie di funzioni fisiologiche assenti nel metabolismo umano.

- Digestione di zuccheri complessi
- Sintesi di acidi grassi a catena corta (butirril-coenzimaA)  
fonte di energia x le cellule
- Rimozione di sostanze tossiche derivanti dai processi fermentativi
- Detossificazione di sostanze tossiche
- Sintesi di vitamine B12 e K e degli isoprenoidi.

## Ruolo del microbiota: le funzioni di difesa.

Il microbiota svolge un ruolo di protezione contro i patogeni attraverso:

- Competizione per le sostanze nutrienti
- Esclusione di superficie ovvero ostacolare l'associazione del patogeno con la mucosa
- Produzione di sostanze antimicrobiche che limitano la colonizzazione

# Il microbiota del tratto intestinale

Il tratto gastrointestinale ha notevoli dimensioni e contiene un numero estremamente elevato di microrganismi.

Le condizioni ambientali sono essenzialmente anaerobie

- Ricco di nutrimento
- Valori variabili di pH 8 con pH estremi .

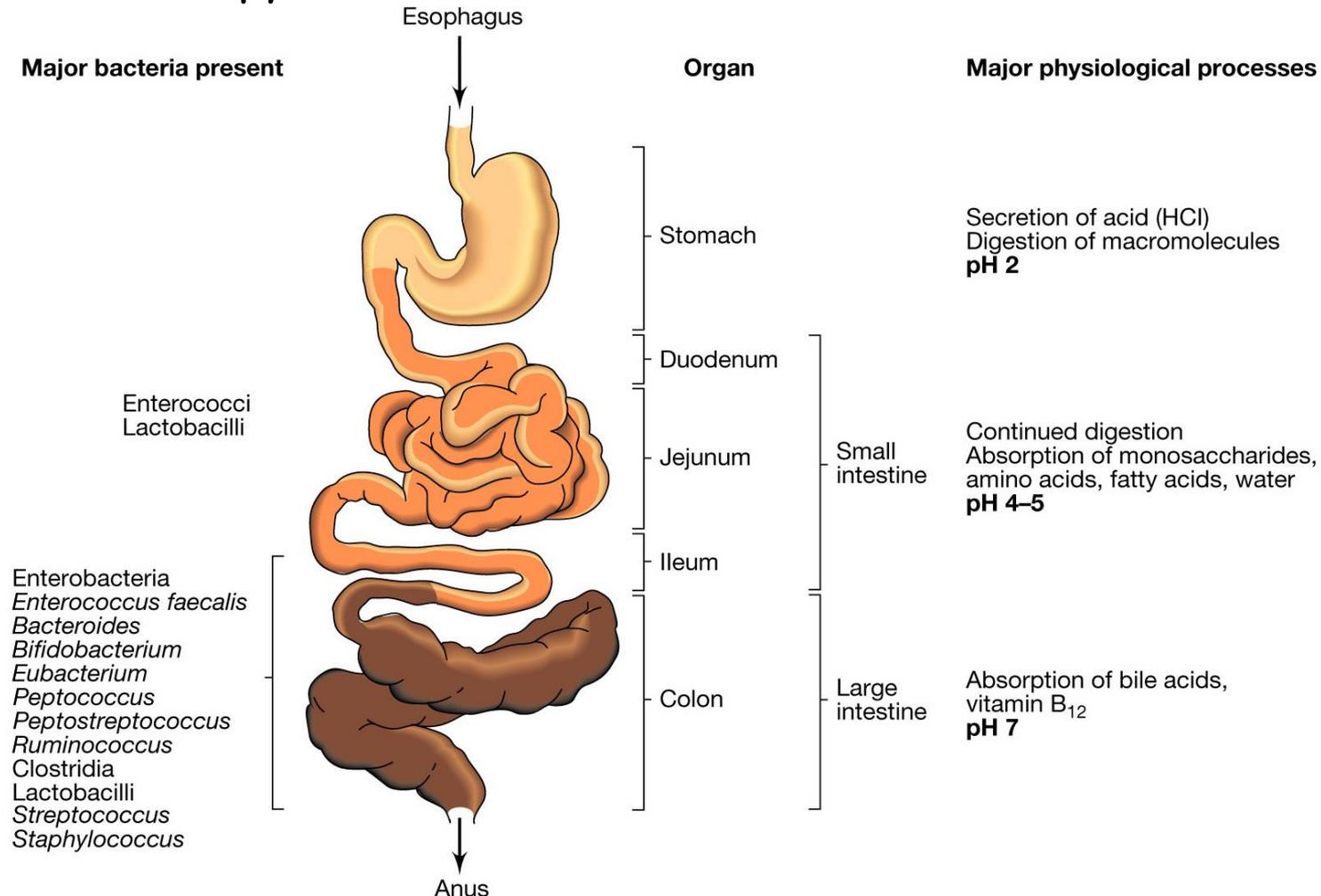
Per microbiota intestinale si intende quello adeso alle superficie.

Il numero di batteri varia da compartimento a compartimento

Nello stomaco si trova un pH molto basso ( pH2): presenti solo rari *Streptococcus spp.*

*Helicobacter pylori* l'agente dell'ulcera gastrica è presente in un alta percentuale di individui ma provoca la patologia solo in ristretto numero di casi

Il tratto gastrointestinale è formato da stomaco, intestino tenue e intestino crasso. Il pH dei liquidi gastrici dello stomaco è talmente basso che si può considerare una barriera chimica che si oppone all'ingresso di batteri. La sua parete può essere colonizzata da *Helicobacter pylori*



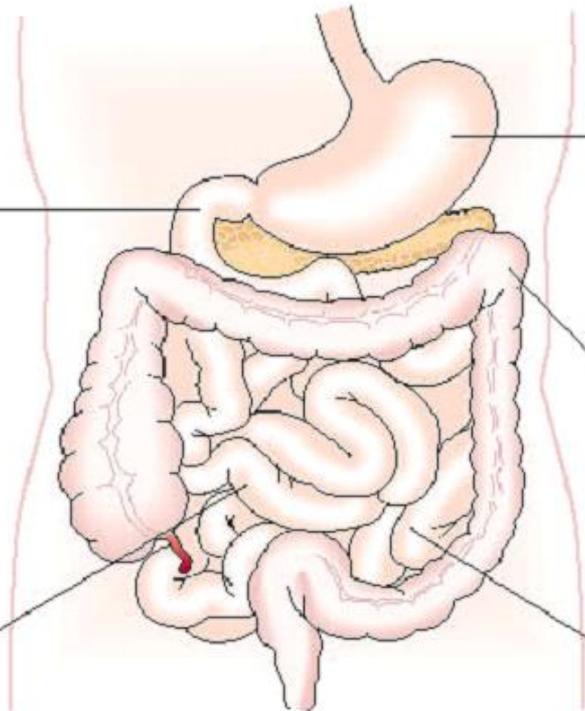
Nel duodeno e digiuno troviamo sempre un pH basso (pH4-5)  
La concentrazione batterica intorno ai  $10^5$  CFU/ml.  
Compaiono oltre alle specie presenti nello stomaco batteri  
dei generi *Bacteroides* e *Bifidobacterium*

### **Duodeno**

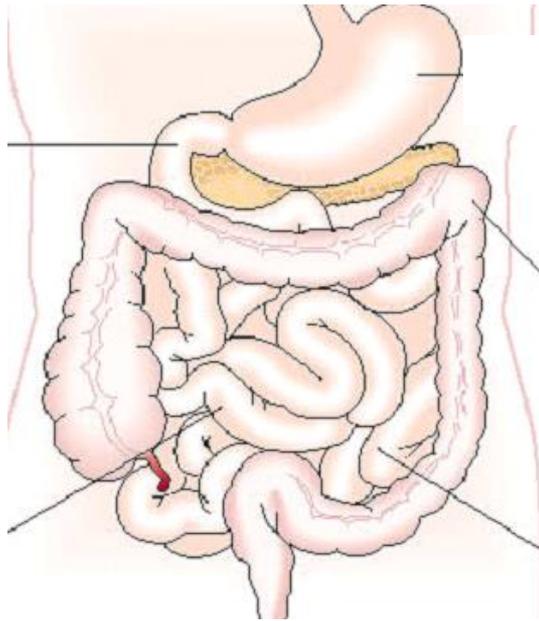
(scarsamente popolato;  
microflora più complessa  
dello stomaco; predominanza  
di streptococchi, lattobacilli,  
*Bacteroides* spp.,  
*Bifidobacterium* spp.)

### **Digiuno**

(scarsamente popolato;  
microflora più complessa  
dello stomaco; predominanza  
di streptococchi, lattobacilli,  
*Bacteroides* spp.,  
*Bifidobacterium* spp.)



Nell'ileo la concentrazione di microrganismi aumenta ( $10^9$ /ml) e si diversifica.



**Colon**  
(molto densamente popolato;  
microflora molto complessa;  
predominio di anaerobi obbligati)

**Ileo**  
(più densamente popolato  
del digiuno; microflora complessa)

Bacteroides spp  
Bifidobacterium  
Lactobacillus spp  
Enterococcus faecalis  
Veillonella spp  
Clostridium spp  
Escherichia coli (rari)

# Il microbiota del colon.

Nell'intestino crasso è presente un microbiota numeroso e vario (circa  $10^{14}$  batteri) pari ad 1kg di peso secco. Sono rappresentati 4 dei 50 Phyla identificati in natura.

Rilevanti sono :

i Bacteroides ( Gram negativi), tra i

Firmicutes che comprende batteri Gram+ quali Lactobacillus spp, Clostridium.

Inoltre sono presenti batteri appartenenti al phylum dei  $\gamma$ -proteobacteria (Escherichia coli) , agli Actinobacteria quali Bifidobacterium spp.

**INTESTINO CRASSO UMANO**

**Bacteroidetes**

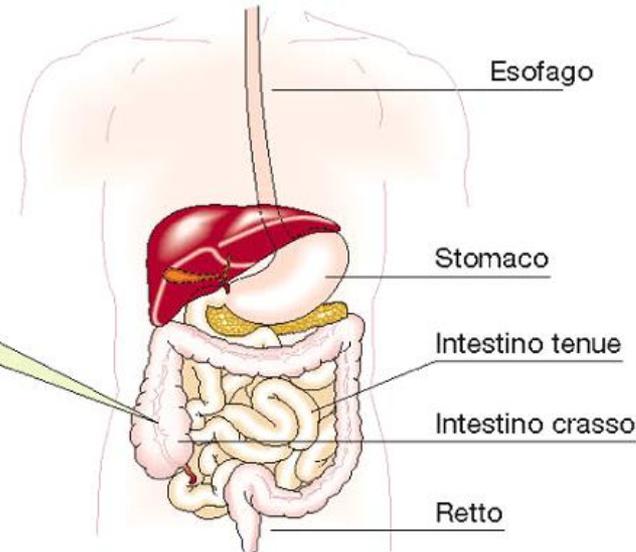
- *Bacteroides thetaiotaomicron*
- *Bacteroides ovatus*
- *Bacteroides cellulosoliticus*
- *Bacteroides* sp. nov.

**Firmicutes**

- *Roseburia intestinalis*
- *Roseburia inulinivorans*
- *Ruminococcus bromii*
- *Ruminococcus* sp. nov.
- *Eubacterium rectale*

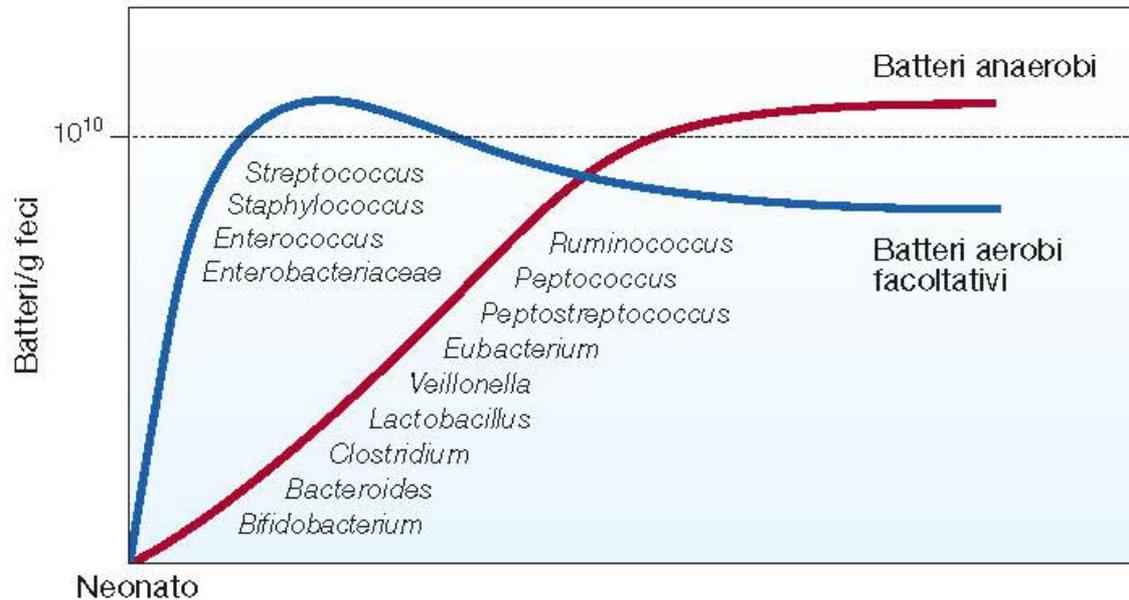
**Actinobacteria**

- *Bifidobacterium adolescentis*



Il profilo delle specie presenti varia da organismo ad organismo

## L'acquisizione della flora intestinale nel neonato



Nella flora del neonato sono presenti un maggior numero di batteri aerobi rispetto all'adulto (rapporto anaerobi /aerobi passa da 1,4 :1 a 50:1 verso i 2 anni fino a 200:1 negli adulti).

## I Probiotici

*Si definisce Probiotico un alimento che contiene un numero sufficientemente alto di microorganismi vivi e attivi, in grado di influenzare in modo benefico la salute dell'ospite, migliorando l'equilibrio della flora intestinale (Reid, 2003)*

I probiotici sono quindi quei microrganismi che ottimizzano le caratteristiche benefiche del microbiota intestinale .

Non devono alterare permanentemente la flora intestinale.

## Proprietà dei Probiotici

In generale un probiotico x utilizzo umano deve:

- essere di origine umana
- resistente agli acidi gastrici
- resistente ai sali biliari prodotti nel fegato,
- capace di aderire alle cellule epiteliali
- poter produrre sostanze antimicrobiche contro alcuni batteri (utilizzati come indicatori batteri come *Listeria*, *Clostridium* e come virus i Rotavirus
- poter colonizzare solo transitoriamente l'intestino (deve scomparire dopo 15 giorni).

Inoltre alcuni probiotici possono avere caratteristiche specifiche quali :

- capacità di ridurre il colesterolo ematico
- essere efficaci contro determinati patogeni
- Saper modulare la risposta immunitaria

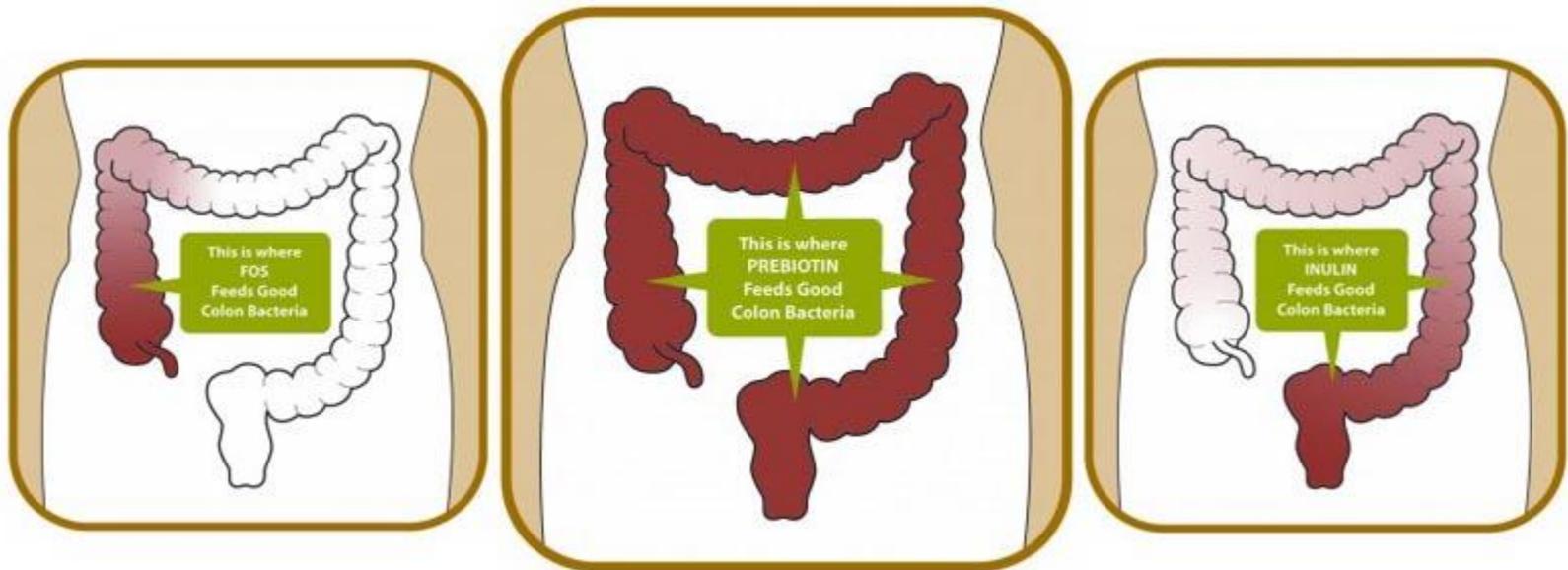
## I Prebiotici

I prebiotici sono "sostanze alimentari non idrolizzate dagli enzimi del tratto gastrointestinale che giunte nella parte distale dell'intestino favoriscono SELETTIVAMENTE la crescita e l'attività di un numero limitato di batteri".

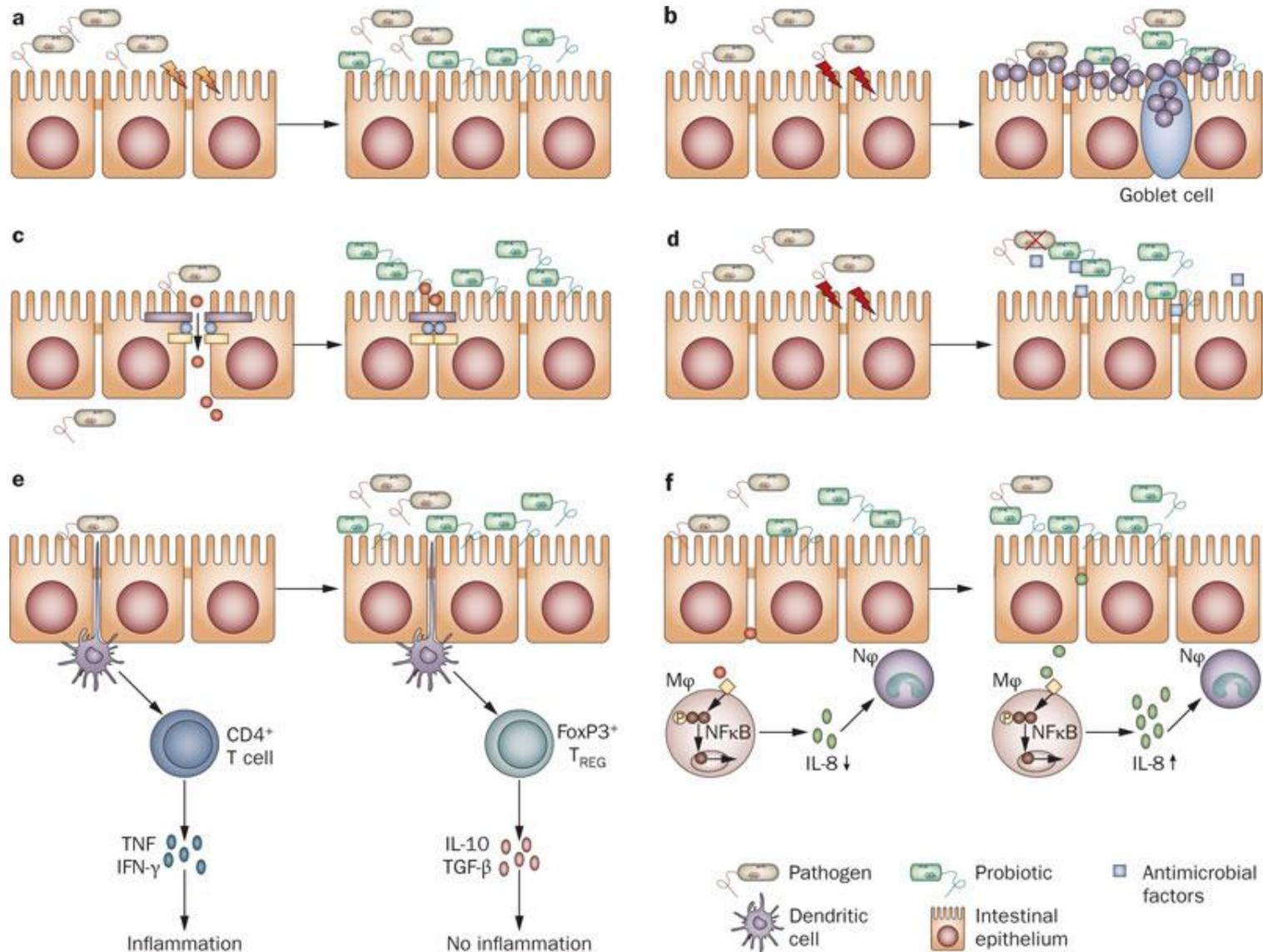
In generale i PREBIOTICI sono sostanze complesse come FRUTTOSIO-OLIGOSACCARIDI (FOS) contenenti fruttosio a vario livello di oligomerizzazione.

**SIMBIOTICI** sono associazioni tra **PREBIOTICI** e **PROBIOTICI**

FOS ( Fruttosio Oligosaccaridi) comunemente usato è l'INULINA contenuta nella cicoria che favorisce la fermentazione di Bifidobacterium incrementando il numero nell'intestino



# Diversi strategie "benefiche" dei probiotici



## Diversi strategie "benefiche" dei probiotici

- a) Alcuni ceppi possono bloccare l'entrata di un patogeno costituendo una barriera meccanica all'ingresso oppure
- b) creando una barriera di muco dovuta al rilascio di muco dalle cellule caliciformi .
- c) Alcuni probiotici incrementano l'integrità delle giunzioni "strette" apicali intercellulari aumentando l'espressione di proteine coinvolte nelle tight junction o prevenendo la redistribuzione delle proteine delle giunzioni strette bloccando così il passaggio di molecole verso la lamina propria.
- d) Alcuni probiotici producono fattori antimicrobici .
- e) Altri probiotici stimolano il sistema immunitario innato tramite le cellule dendritiche che inducono la produzione di citochine anti infiammatorie inclusa IL10 .
- f) Alcuni probiotici possono prevenire ( a sinistra) o favorire ( a destra) la risposta immunitaria innata dando l'avvio alla produzione di TNF e inibendo ( o attivando) NFkB nei macrofagi e inibendo o promuovendo la risposta immune dell'ospite influenzando la produzione di IL8 ed il successivo richiamo dei neutrofili nel sito di infezione.

Gli organismi costituiscono degli ambienti favorevoli per la crescita dei microrganismi

Ogni organo differisce chimicamente e fisicamente facendo in modo che si creino ambienti selettivi che favoriscono alcuni microrganismi rispetto ad altri

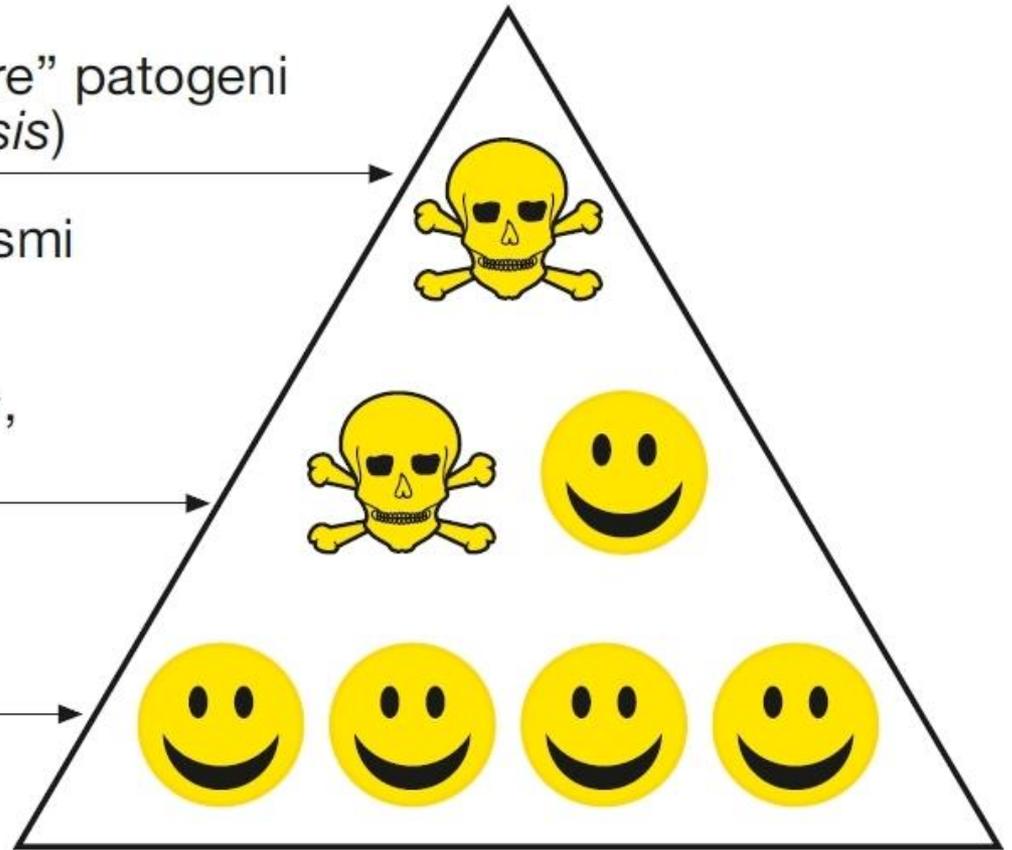
Gli organismi possiedono vari meccanismi di difesa che cooperano per prevenire o inibire l'invasione e la crescita dei microrganismi.

I microrganismi patogeni hanno sviluppato uno o più strategie per eludere i sistemi di difesa dell'ospite.

Solo pochi batteri sono “sempre” patogeni  
(es. *Mycobacterium tuberculosis*)

Un certo numero di microrganismi  
sono patogeni solo in  
determinate circostanze  
(es. *Streptococcus epidermidis*,  
*Escherichia coli*)

Molti microrganismi possono  
instaurare relazioni benefiche  
con l'ospite



**Figura 18.1 PIRAMIDE DELLE INTERAZIONI MICRORGANISMO-OSPITE.**

I microrganismi che causano malattie infettive possono essere suddivisi in patogeni

- obbligati
- accidentali
- opportunisti

**Patogeno obbligato** è un microrganismo come *Neisseria gonorrhoeae*, **incapace di vivere al di fuori dell'ospite**, la sopravvivenza del patogeno dipende dalla sua capacità di spostarsi da un ospite per aderire e colonizzare un altro ospite

**Patogeno accidentale** è un organismo onnipresente in natura e capace di **causare malattia solo in presenza di particolari condizioni** favorevoli.

*Clostridium tetani* provoca il tetano solo quando riesce a penetrare accidentalmente in una ferita profonda: la capacità di scatenare una patologia non è essenziale per la sopravvivenza della specie

**Patogeno opportunist**a è un organismo che non colpisce l'ospite sano ma che **può provocare la malattia in un individuo immunocompromesso** o non sano ( pazienti con AIDS, terapie anticancro)

*Streptococcus* può causare infezioni quando la cute è lesa o la resistenza dell'ospite è ridotta

I batteri in grado di avviare un processo infettivo aderiscono in maniera specifica alle cellule epiteliali attraverso interazioni proteina-proteina tra molecole presenti sulla superficie del patogeno e della cellula ospite.

Macromolecole responsabili dell'adesione sono

- Adesine
- Polisaccaridi sintetizzati e secreti dal batterio (capsula, glicocalice, stati mucillagenosi)
- Fimbrie o pili

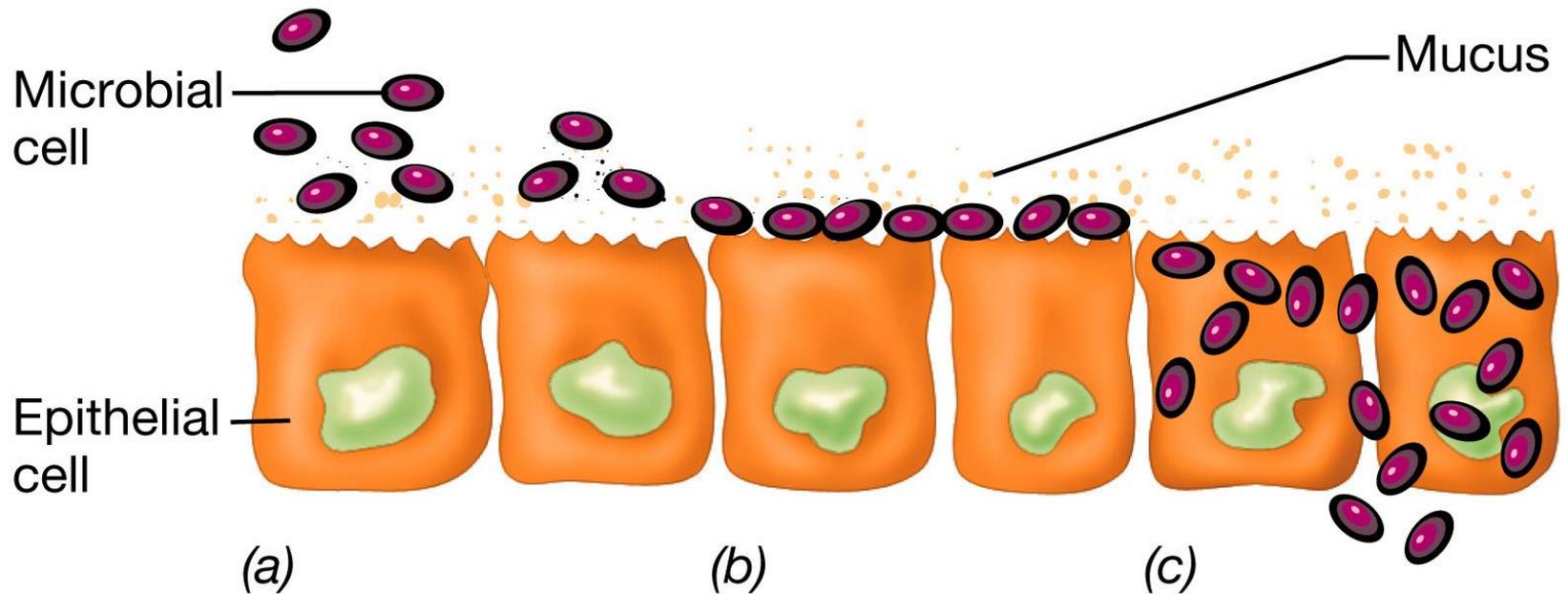
Le infezioni iniziano frequentemente a livello dei rivestimenti epiteliali delle mucose.

Mucose sono costituite da uno o più strati di cellule epiteliali unite strettamente l'una all'altra che si interfacciano con l'ambiente esterno. Sono rivestite da uno strato protettivo di muco costituito da glicoproteine solubili che servono a proteggere le cellule epiteliali

I batteri possono aderire alla superficie epiteliale grazie al riconoscimento specifico tra patogeno e cellula ospite. Quando la barriera costituita dalle mucose viene intaccata il microrganismo può penetrare nei tessuti più profondi.

# Interazione delle cellule batteriche con le mucose:

- Associazione lassa
- Adesione
- Invasione delle cellule epiteliali



## Virulenza

La virulenza è l'espressione della capacità di un microrganismo di determinare un danno nell'ospite. Contribuiscono alla virulenza

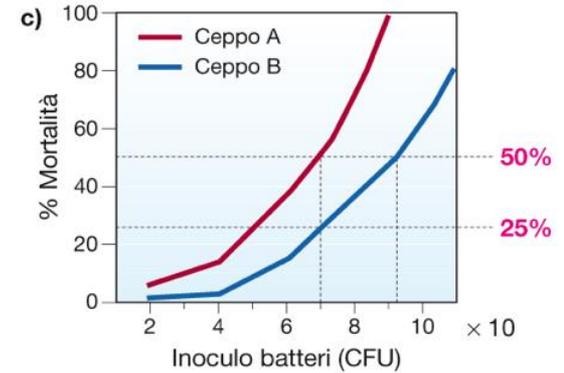
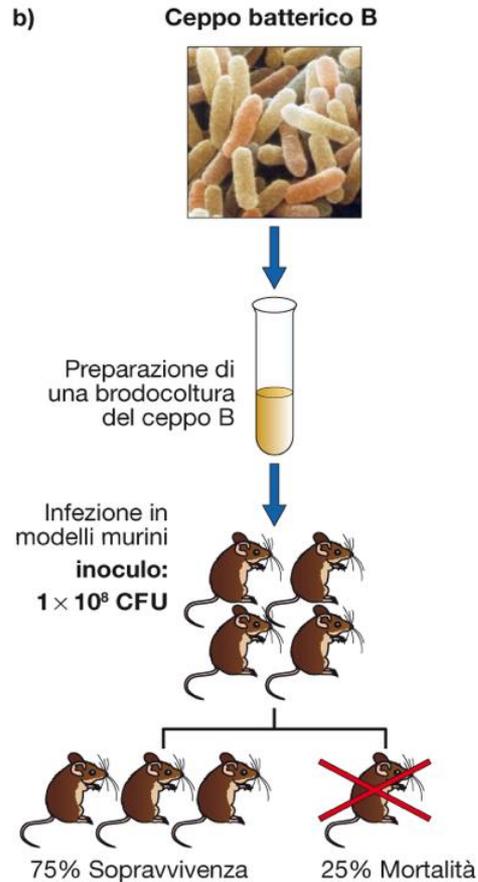
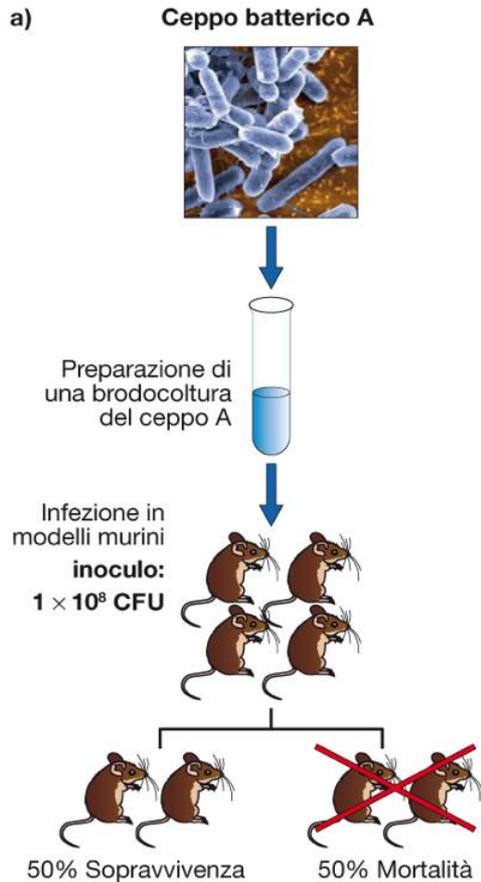
**TOSSICITA'** capacità di un 'organismo di produrre tossine

**INVASIVITA'** capacità di un organismo di proliferare nei tessuti fino ad inibire le funzioni dell'ospite.

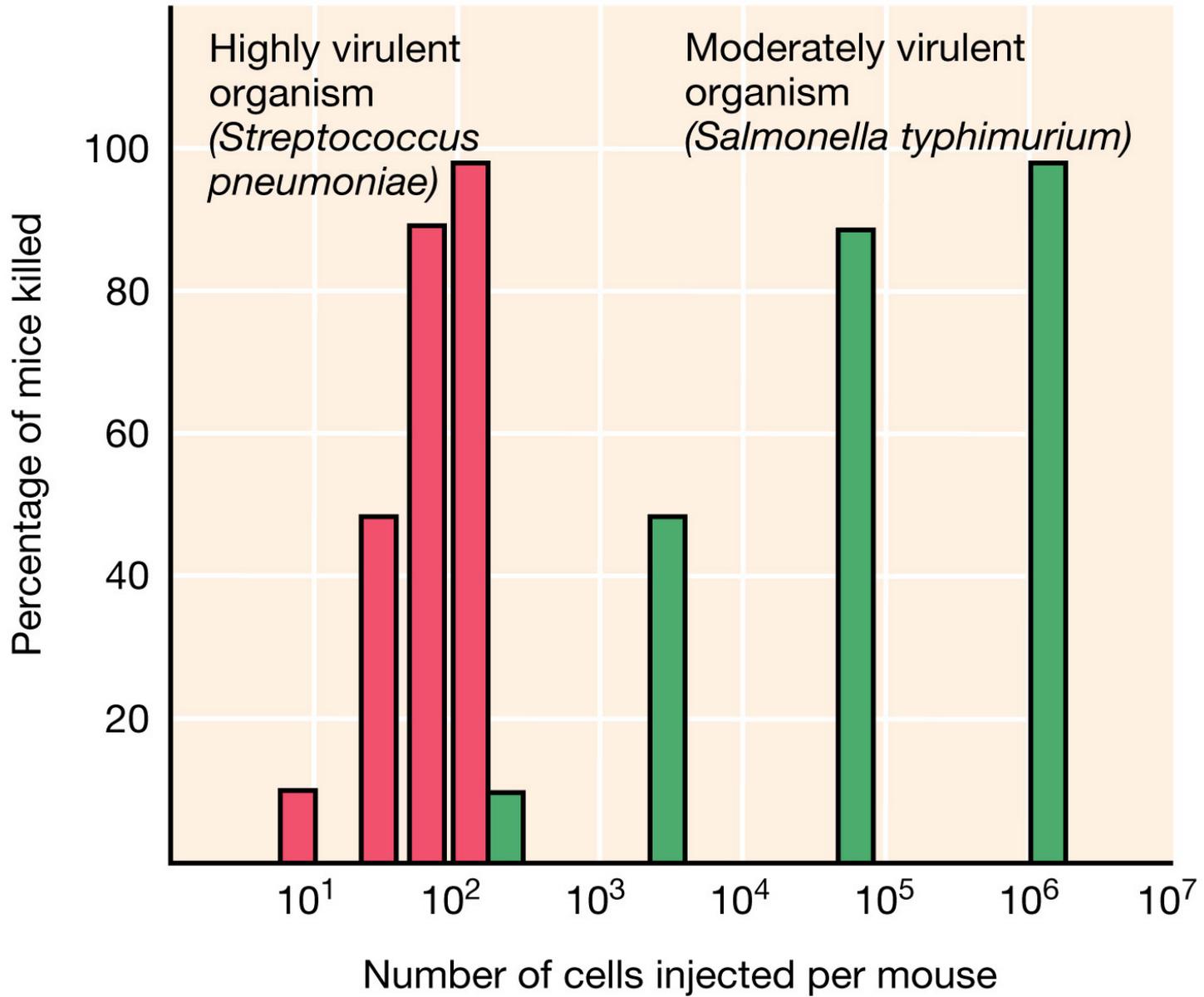
La virulenza di un microrganismo può essere stimata valutando la LD50 o dose letale 50 ovvero la dose necessaria perché un agente uccida il 50% degli animali saggiati.

Ceppi patogeni molto virulenti possono presentare piccole differenze nel numero di batteri richiesti per uccidere il 50 o il 100% della popolazione.

**Maggiore è la LD50 meno virulento è il ceppo.**



$LD_{50}$  è un parametro importante per capire la virulenza di un ceppo. Maggiore sarà la  $LD_{50}$  minore sarà la virulenza molto



## Attenuazione

L'attenuazione è un fenomeno che determina una diminuzione nel livello di virulenza di un ceppo.

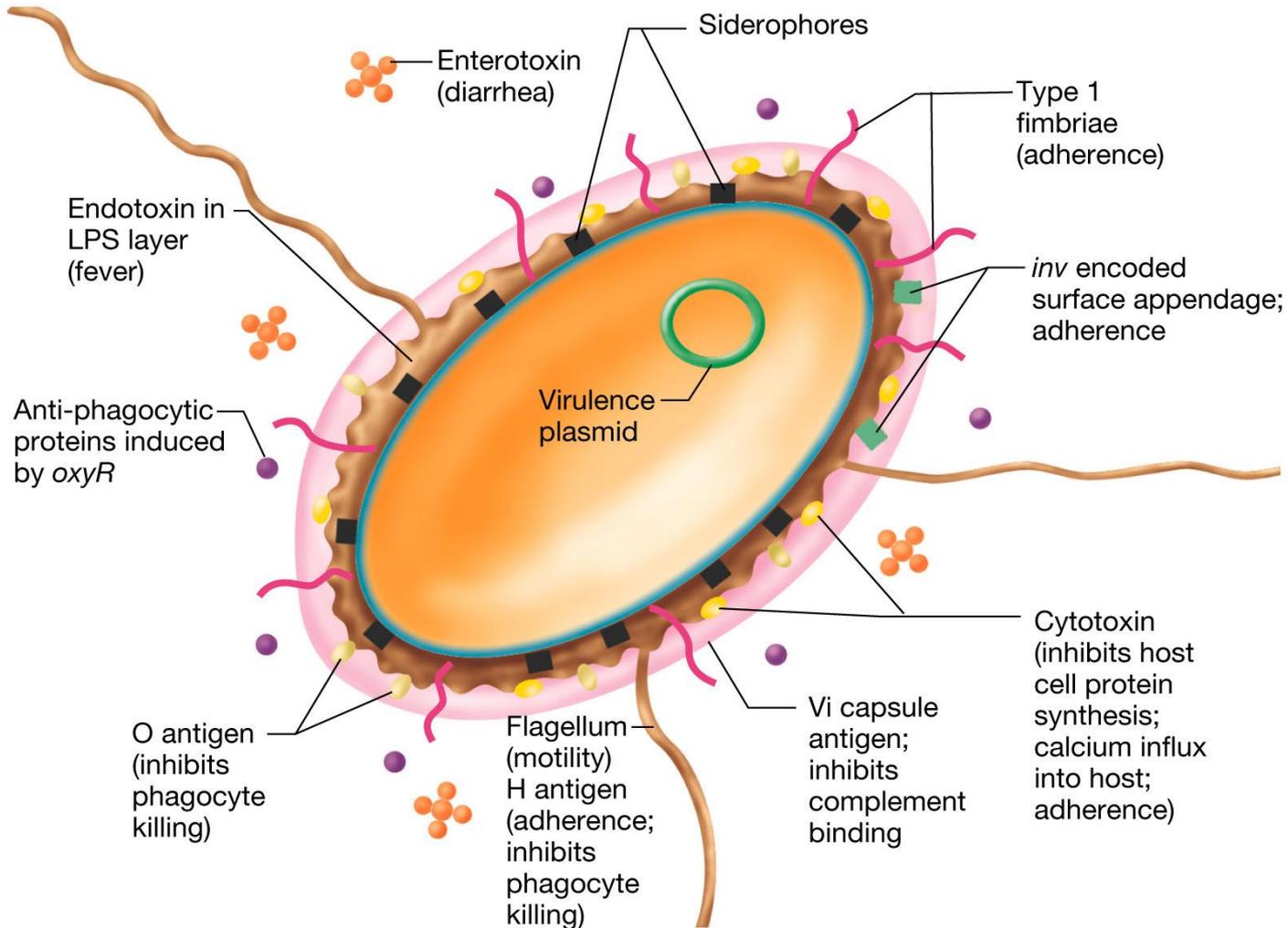
Molto frequentemente ceppi virulenti coltivati in laboratorio diventano attenuati in quanto all'interno di una popolazione le varianti non virulente possono crescere più rapidamente nei terreni di coltura.

Ma se vengono reiniettati nell'animale le varianti virulente possono riprendere il sopravvento all'interno della popolazione in quanto sono più idonee alla vita nell'ospite.

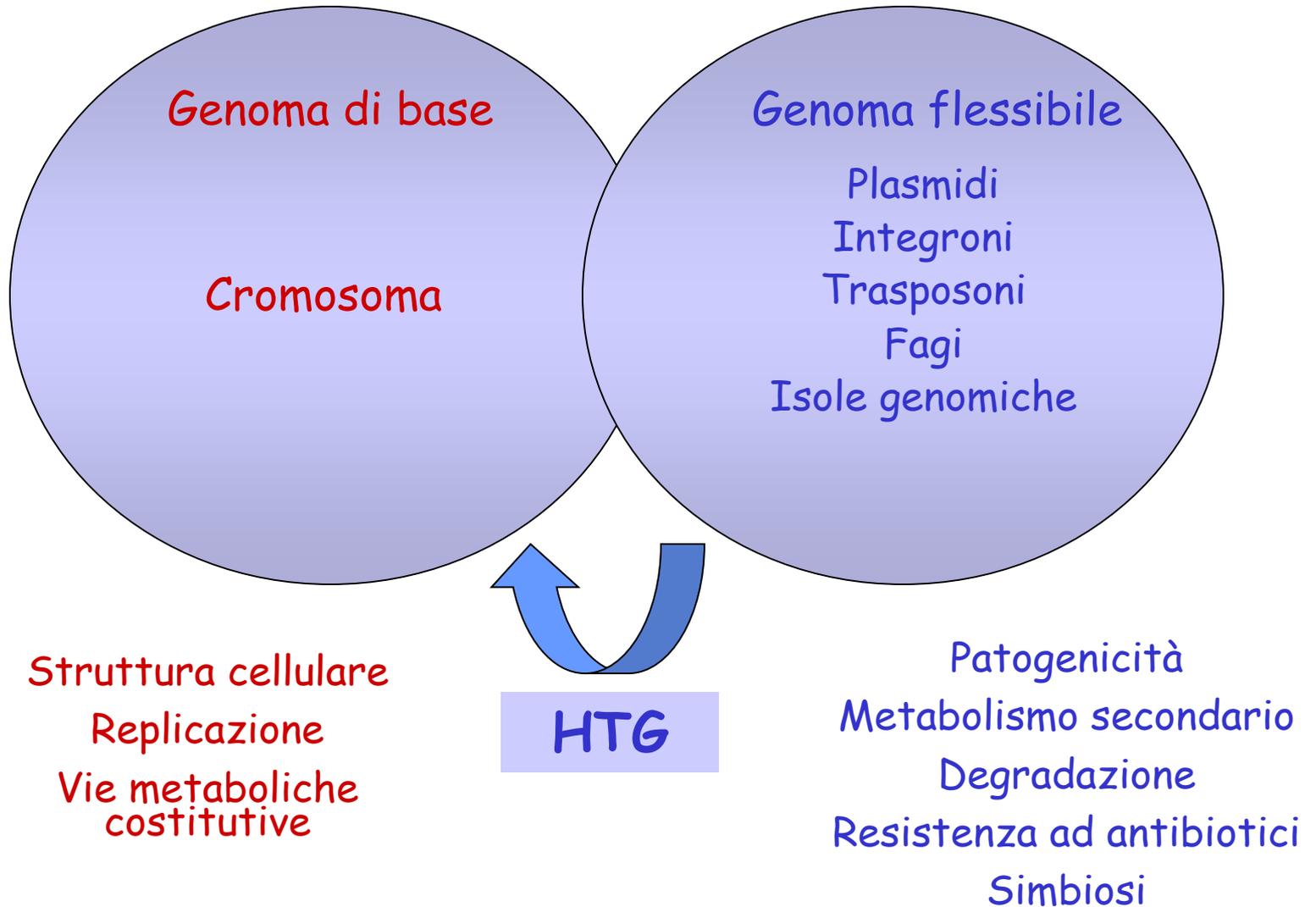
Può essere determinata geneticamente dalla perdita di uno o più fattori collegati alla virulenza.

La virulenza di un microrganismo è un fenomeno multi fattoriale ed è necessaria la presenza di numerosi fattori di virulenza perchè un ceppo diventi patogeno.

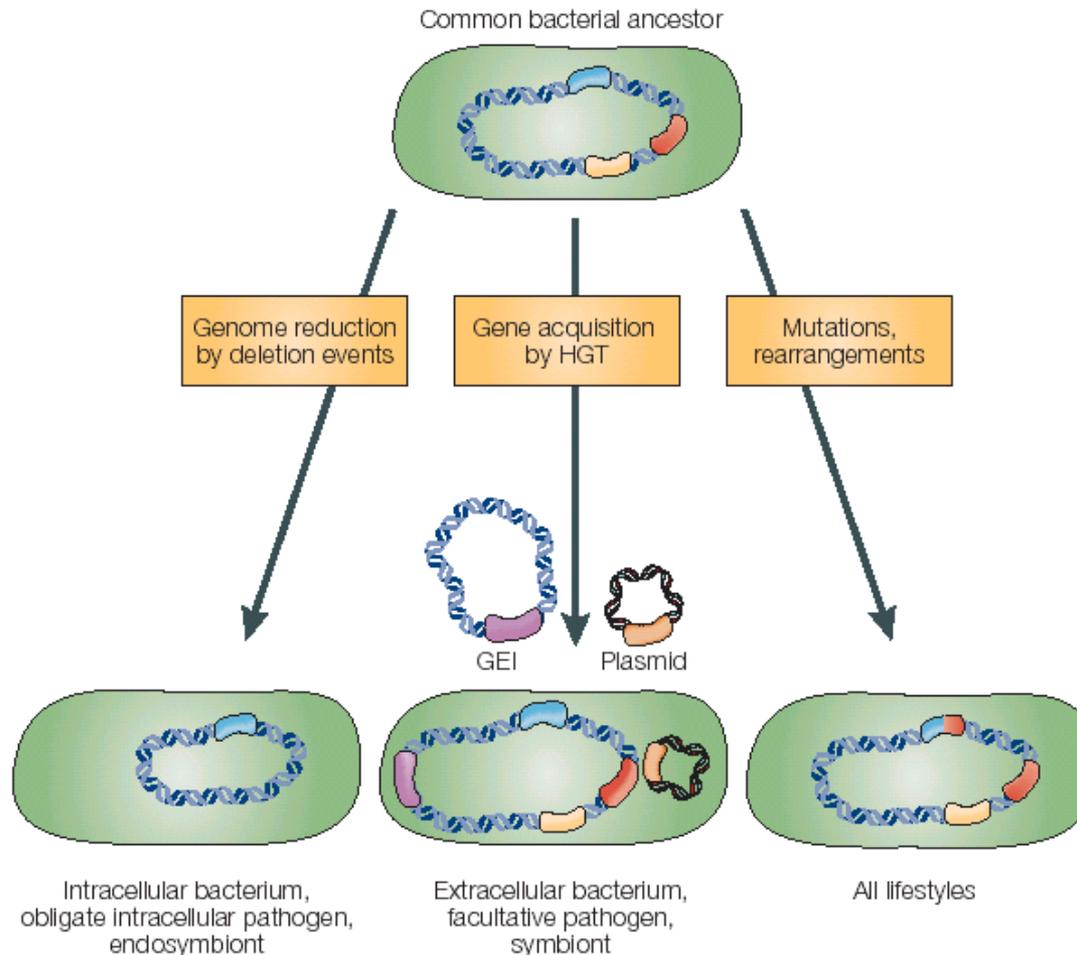
La patogenicità è un fenomeno multifattoriale che dipende dall'espressione di numerosi fattori di virulenza codificati sia dal cromosoma che da fattori genetici mobili quali plasmidi / fagi /PAI



# EVOLUZIONE DEL GENOMA BATTERICO



Evoluzione di un microrganismo: un microrganismo commensale può diventare patogeno in seguito all'acquisizione di geni di virulenza e alla perdita di alcuni fattori presenti sul genoma del progenitore che hanno un effetto di antivirulenza



## Horizontal gene transfer HGT

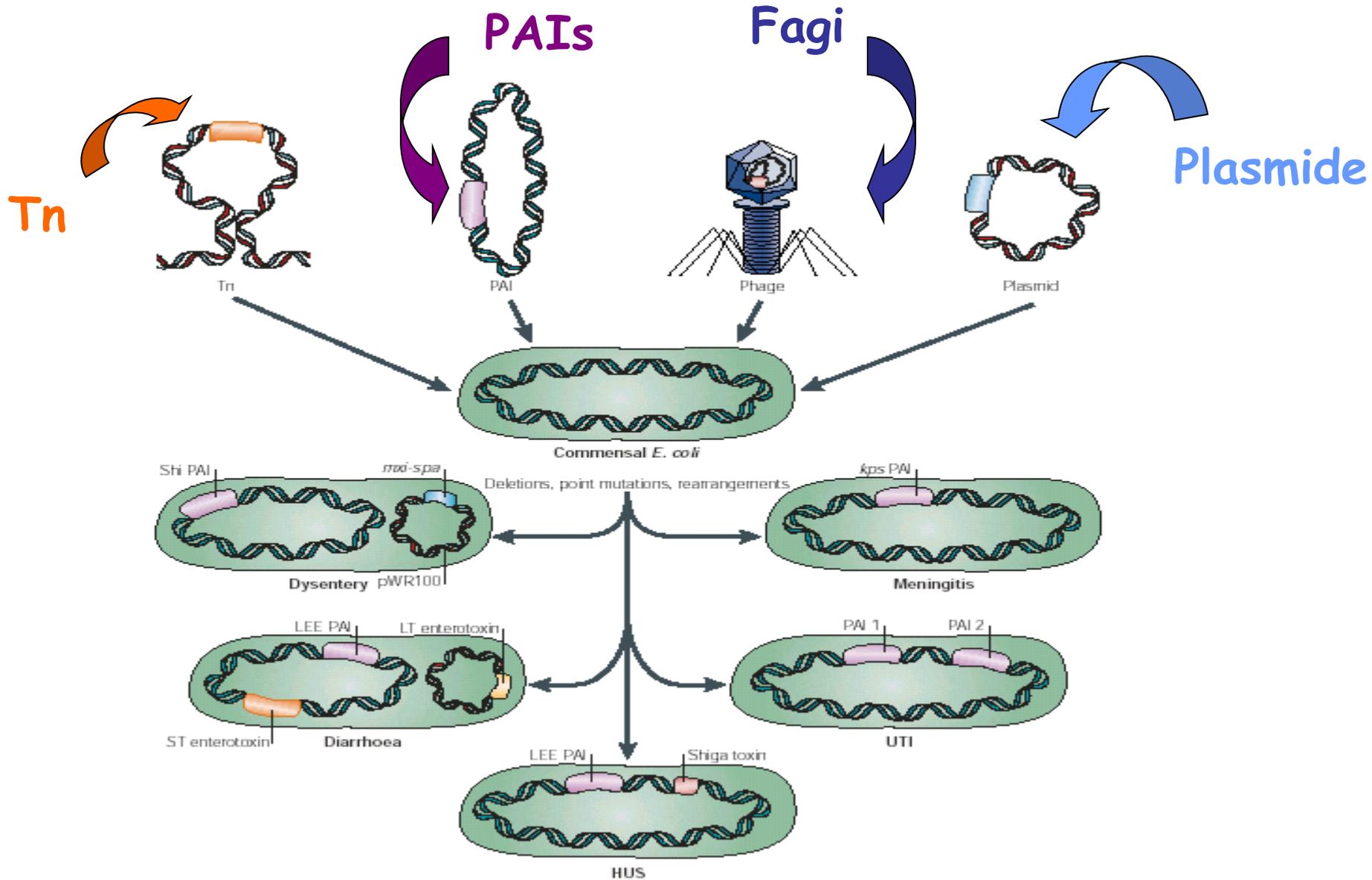
Trasferimento genico orizzontale o trasferimento genico laterale è un fenomeno evolutivo che coinvolge scambi genetici tra differenti linee evolutive

Per lungo tempo si è dibattuto sul ruolo del HGT nell'evoluzione perché variava completamente la tradizionale visione dell'evoluzione della vita ed era difficile da provare

Nel 1991 si riuscì a dimostrare che in E.coli 10-16% del genoma risultava da HGT:

**Il fenomeno quindi aveva un ruolo essenziale nell'evoluzione**

# Le principali strutture coinvolte nel trasferimento genico orizzontale



## PATOGENICITA'

I geni di virulenza sono frequentemente localizzati su elementi genetici mobili o ex mobili quali le isole di patogenicità PAI

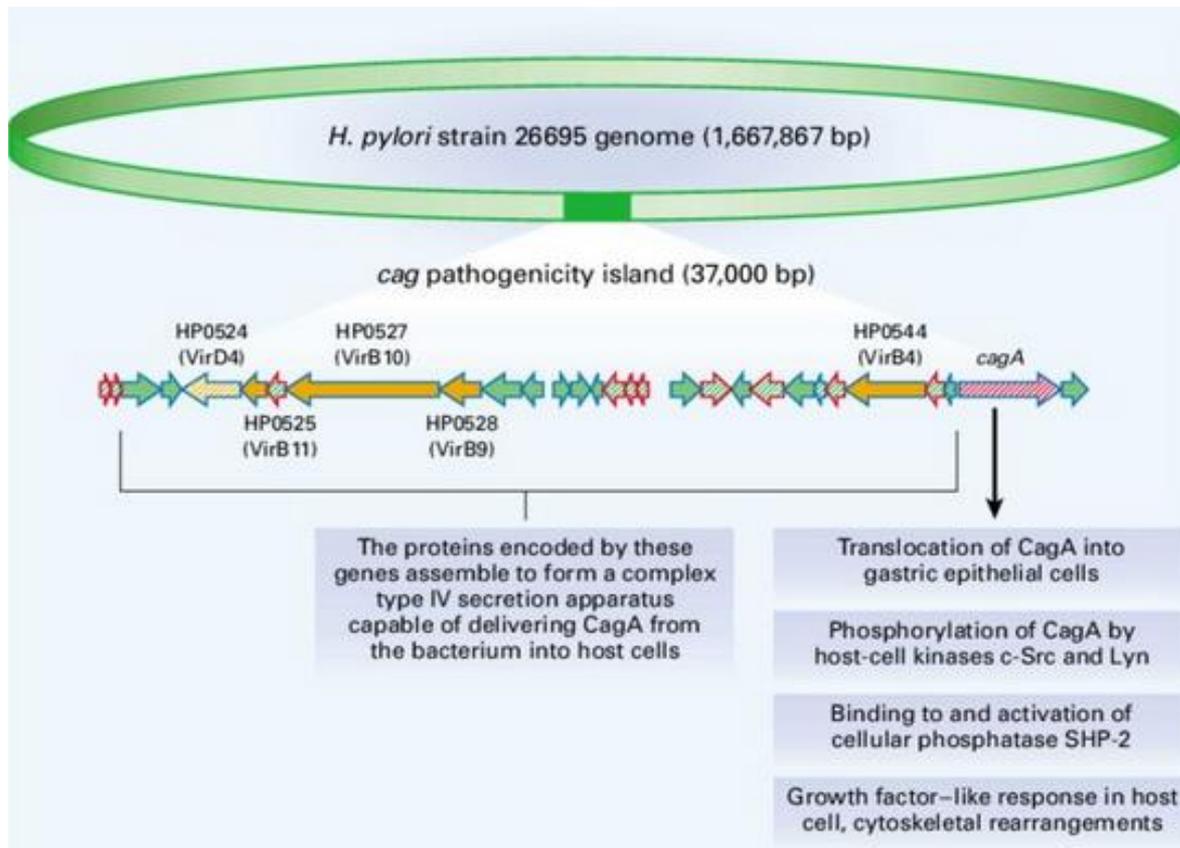
I geni acquisiti devono poi inserirsi in sistemi di regolazione che permettano di ottimizzare l'espressione e di coordinarla con gli altri geni di virulenza

Spesso i sistemi a due componenti o le proteine del nucleotide annettono sotto il loro controllo i nuovi geni in modo che vengano espressi in risposta a stimoli ambientali ed in modo coordinato

## FITNESS

Determinanti coinvolti nel miglioramento dell'adattamento all'ambiente o nel potenziamento delle strategie di sopravvivenza possono essere trasferiti per HGT e si ritrovano sia in batteri patogeni che in commensali

L'isola di patogenicità di *Helicobacter pylori*: un'isola all'interno del genoma che contiene la gran parte dei geni di virulenza.



# ISOLE DI PATOGENICITA'



- Contengono uno o più geni di virulenza
- Sono presenti solo nei ceppi patogeni
- Sono di grandi dimensioni 10-200 kb
- Hanno un diverso contenuto in G+C (recente HTG)
- Sono spesso inserite in geni per tRNA
- Sono fiancheggiate da sequenze di DNA direttamente ripetute (DR)
- Sono associate a elementi genetici mobili
- Sono instabili
- Rappresentano strutture a mosaico

## Che cosa vuol dire contenuto in G+C?

- Nel DNA G (Guanina) sono accoppiate con le C ( Citosina)
- La quantità in G+C è tipica di ogni specie batterica e varia dal 30 al 70%
- Se una specifica regione nel genoma ha un contenuto in G+C molto diverso dalla restante parte di genoma molto probabilmente deriva da eventi di trasferimento genico orizzontale (HGT)

G+C

52%

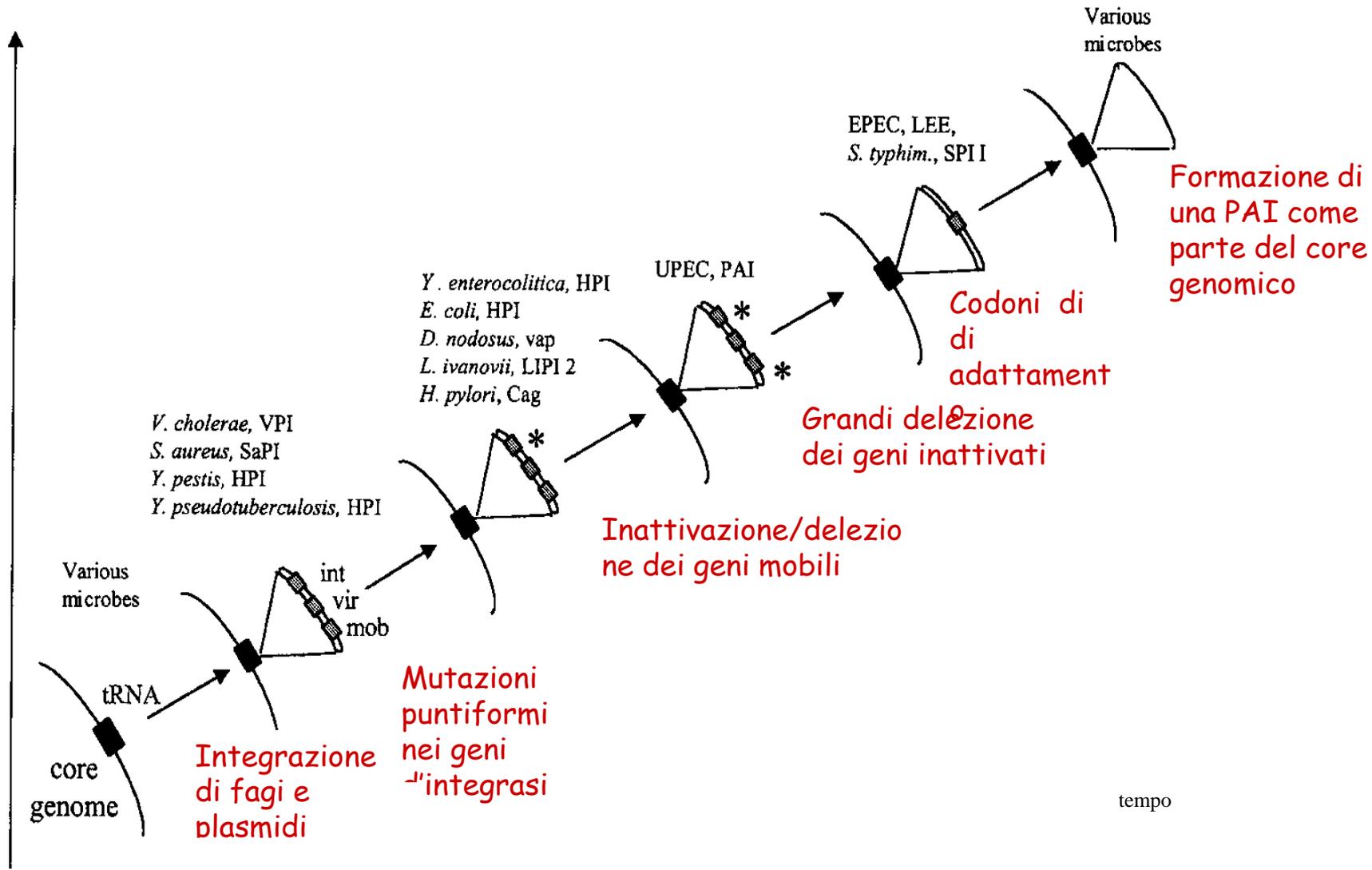
47%

52%

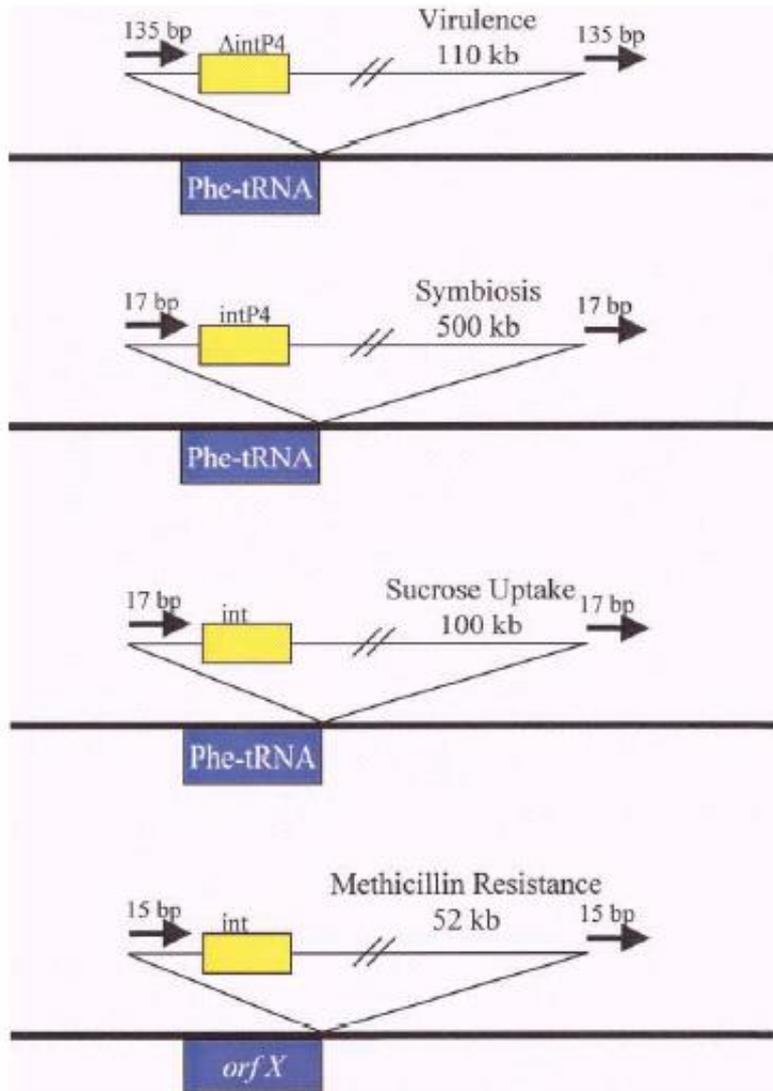
# Caratteristiche generali delle Isole di patogenicità e delle isole genomiche in genere

- Sono regioni di DNA acquisite tramite HGT inserite nelle vicinanze dei **tRNA**.
- Sono fiancheggiate da **DR**
- Contengono diversi geni coinvolti nel processo di adattamento
- Contengono elementi IS funzionali o difettivi
- contiene geni legati alla motilità
- Ruolo fondamentale svolto dal gene **INT** che codifica per l'**INTEGRASI** coinvolta nell'inserzione e delezione di regioni di DNA fiancheggiate da DR

# Stadi evolutivi della formazione dell'isola di patogenicità



Non soltanto Pathogenicity Island : il fenomeno coinvolge altri gruppi di geni → Genomic Island



Geni di virulenza

Pathogenicity island  
*Uropathogenic E.coli*

Geni per la simbiosi

Symbiosis Island  
*Mesorhizobium loti*

Geni per l'utilizzazione di zuccheri

Metabolic Island  
*Salmonella senftenberg*

Geni per la resistenza ad uno o più antibiotici

Resistance Island  
*Staphylococcus aureus*

Sei interessato ai diversi aspetti della Microbiologia ??

I nostri corsi specialistici nelle LM

Genetica dei Microrganismi ( prof. F. Ascenzioni)

Microbiologia Cellulare e Vaccinologia ( Dr.ssa Martina Pasqua )

Microbiologia molecolare e genomica microbica ( Prof. B. Colonna- A. Carattoli )

Virologia Molecolare ( Prof. Grossi)

Microbiologia ambientale ( Prof. Colonna -A.Carattoli )

# **Microbiologia molecolare e genomica microbica**

## **B.Colonna A.Carattoli**

**Insegnamento del Corso di Laurea in Biotecnologie Genomiche, Industriali e Ambientali  
Selezionabile come esame a libera scelta per le LM in Biologia e Tecnologie cellulari (BTC),  
Genetica e Biologia Molecolare (GBM), Biotecnologie mediche e farmaceutiche**

### Programma del corso

#### *Genomica microbica*

- Genoma dei batteri e analisi dati di sequenza
- Genoma minimo e genoma sintetico: verso il batterio artificiale
- Origine ed evoluzione del genoma di batteri patogeni modello:
  - Microbioma intestinale: analisi genomica e metagenomica
  - Microbioma alimentare e salute dell'uomo
- Il resistoma: evoluzione delle antibiotiche resistenze

#### *Microbiologia molecolare*

- Controllo epigenetico nei batteri
- Differenziamento nei batteri: modelli e regolazione
- Piccoli RNA e regolazione genica nei batteri
- L'immunità nei batteri, le sequenze CRISPR e la resistenza ai batteriofagi
- Nuove strategie antibatteriche: farmaci mirati e terapia fagica
- Biologia sintetica: concetti di base e potenziali applicazioni