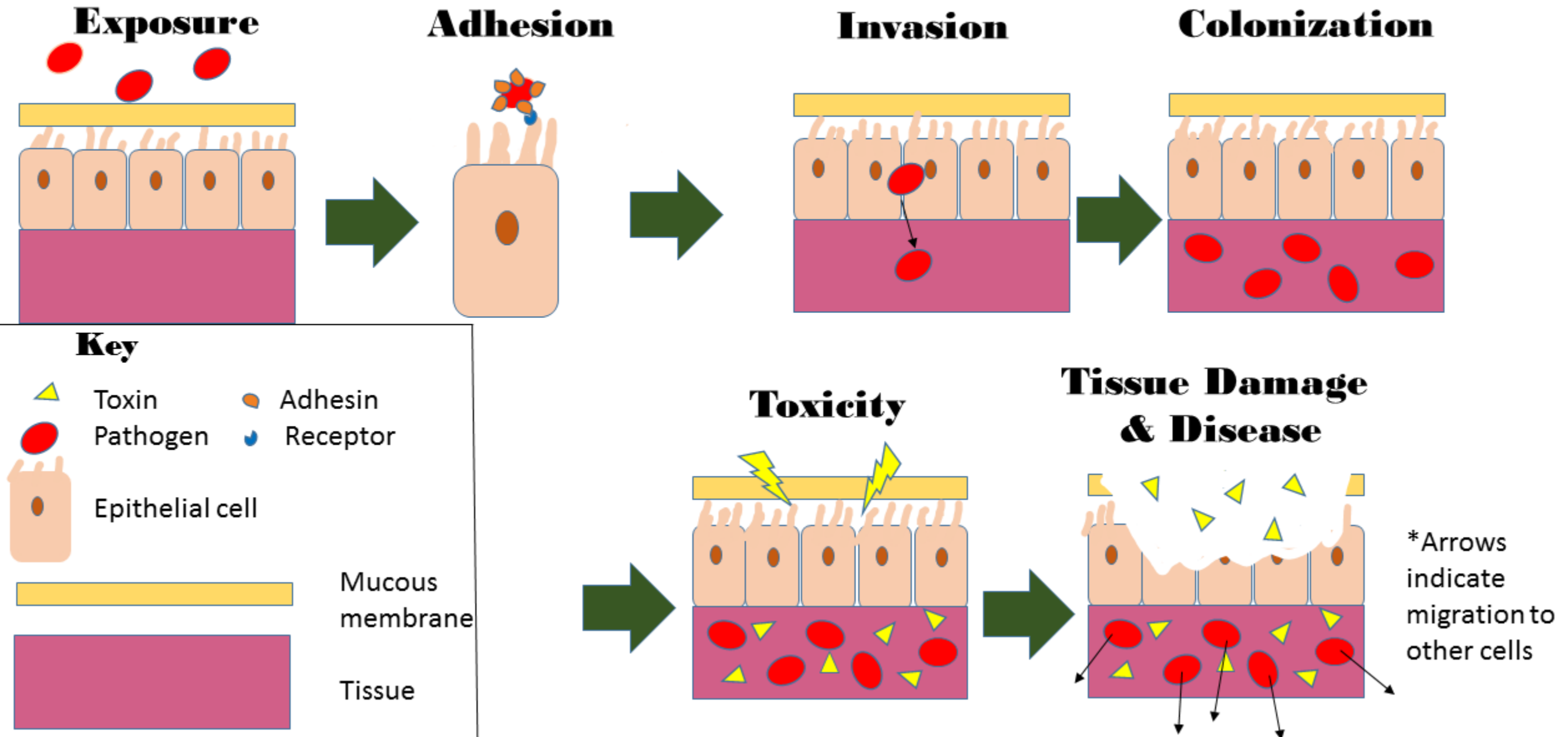


Pathogenic Infection



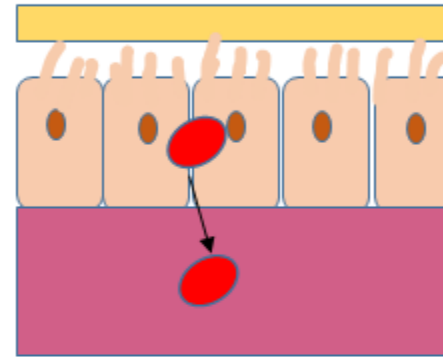
Pathogenic Infection

La patogenesi è promossa dalla produzione di:

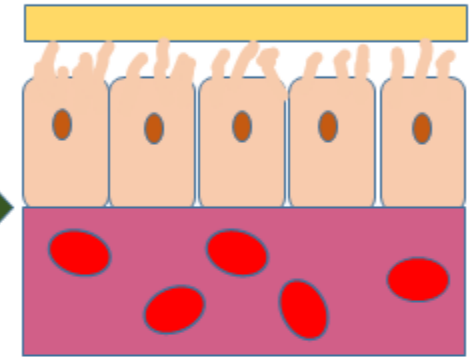
FATTORI DI VIRULENZA

TOSSINE

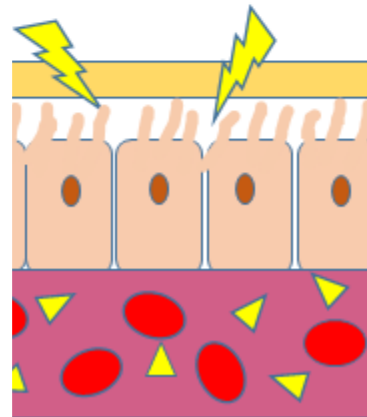
Invasion



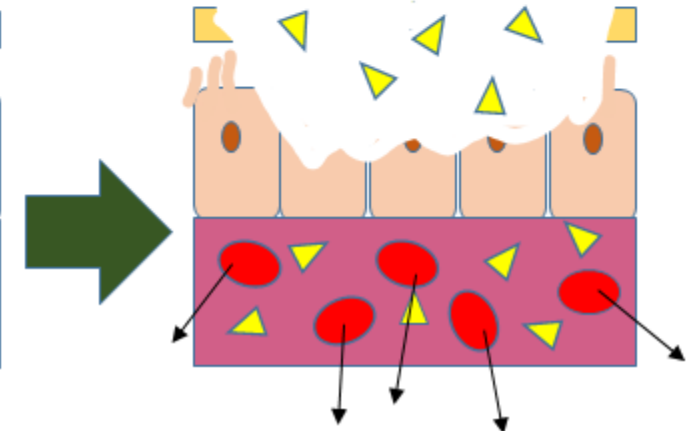
Colonization



Toxicity



Tissue Damage & Disease



*Arrows indicate migration to other cells

FATTORI DI VIRULENZA

Molecole che aiutano il batterio a colonizzare l'ospite

Fattori di virulenza citosolici
facilitano il batterio a subire un rapido
adattamento metabolico e rapidi
cambiamenti fisiologici e morfologici.

Fattori di virulenza
associati alla membrana
aiutano il batterio
nell'adesione e nell'evasione
della cellula ospite.

Fattori di virulenza secretori
aiutano il batterio a superare la
risposta immunitaria innata e
adattativa dell'ospite. In patogeni
extracellulari, i fattori di virulenza
secretori agiscono sinergicamente per
uccidere le cellule dell'ospite.

FATTORI DI VIRULENZA

Salmonella

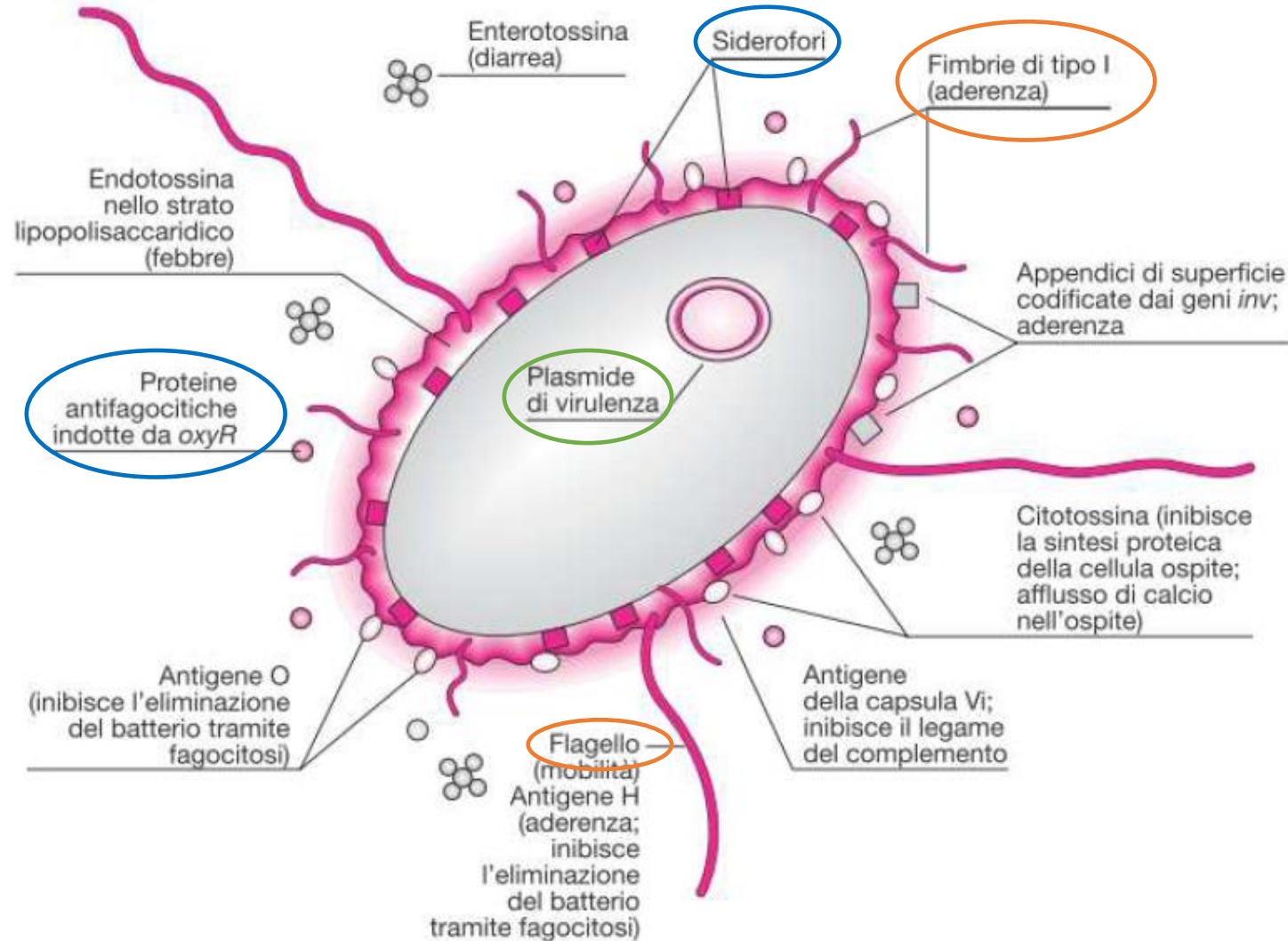
L'esito di un'infezione da *Salmonella* è determinato dallo stato dell'ospite e dallo stato del batterio. Mentre l'età, i fattori genetici e ambientali influenzano principalmente lo stato dell'ospite, lo stato del batterio è determinato dai cosiddetti fattori di virulenza.

Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium

Table 2 Main virulence factors, DNA location, and main functions

Virulence factor	Location	Function
SipA	SPI-1 ^a	Cytoskeleton rearrangement Chemotaxis
SipB	SPI-1	Translocation of effector proteins Macrophage apoptosis impairment
SipC	SPI-1	Chemotaxis Cytoskeleton rearrangement
SptP	SPI-1	Suppression of innate immunity
<i>irr</i> genes	SPI-2	Production of tetrathionate reductase
SpiC	SPI-2	Translocation of effector proteins Survival within SCV ^c
SseB	SPI-2	Formation of macromolecular structures which serves as a translocon
SseC	SPI-2	Formation of macromolecular structures which serves as a translocon
SseD	SPI-2	Formation of macromolecular structures which serves as a translocon
SseF	SPI-2	SCV perinuclear migration Microtubule aggregation SIF formation ^b
SseG	SPI-2	SCV perinuclear migration Microtubule aggregation SIF formation
MisL	SPI-3	Long-term persistence
MgtCB	SPI-3	Survival within macrophages
MarT	SPI-3	Activation of MisL expression
SiiE	SPI-4	Adhesion to the epithelium
SopB	SPI-5	Prevents apoptosis of epithelial cells
SigE	SPI-5	Chaperone
SpvR	pSLT	Regulation of <i>spv</i> genes
SpvB	pSLT	Prevents actin polymerization
SpvC	pSLT	Inhibits MAP kinase and immune signaling
Type I Fimbriae	Chromosome	Adhesion to the epithelium
SifA	Chromosome	SIF formation SCV maintenance
SseJ	Chromosome	SIF formation
SopE	Chromosome	Induce membrane ruffling in cell cultures
SopE2	Chromosome	Induce membrane ruffling in cell cultures

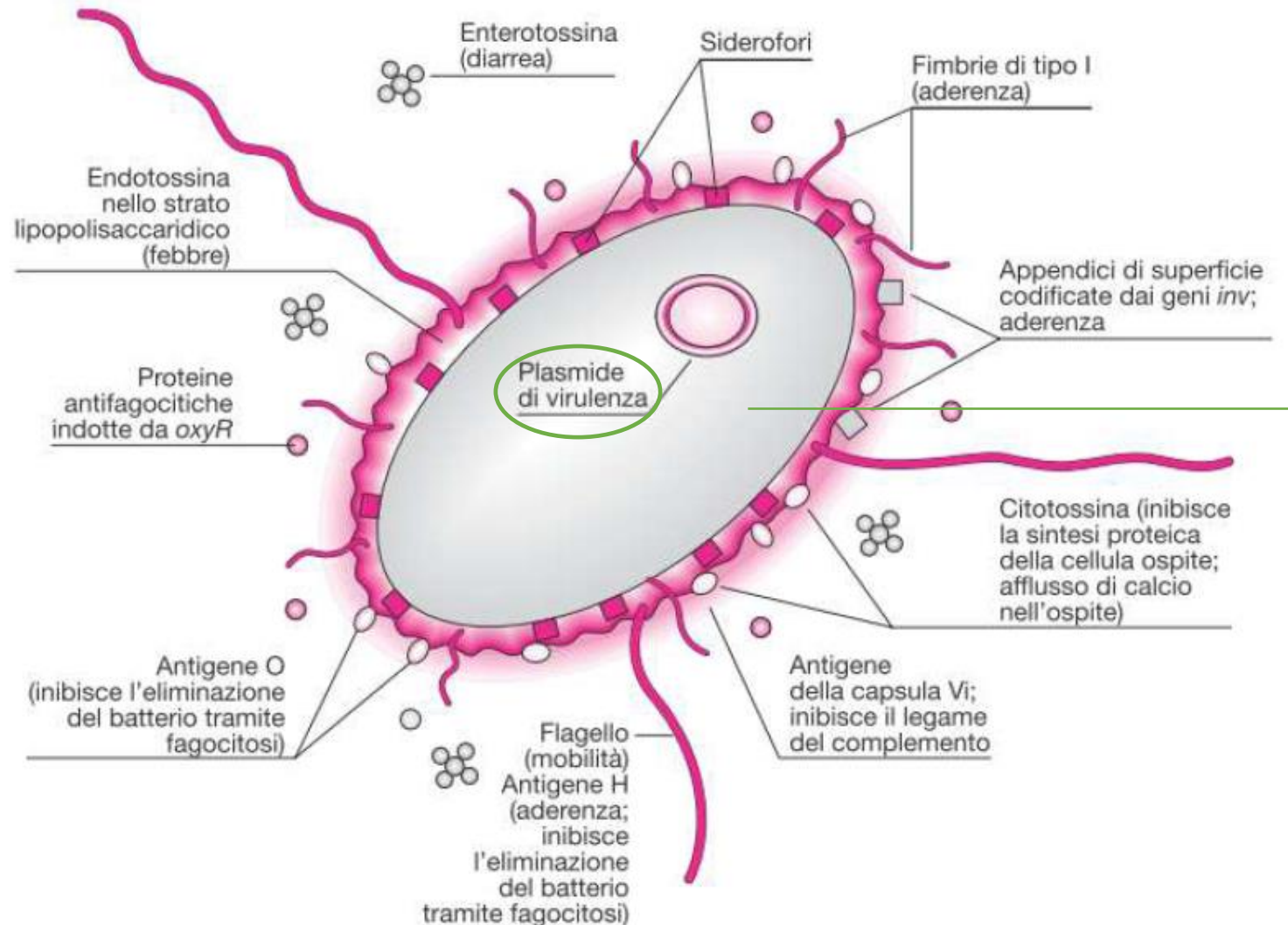
^aSPI *Salmonella* pathogenicity island



Fattori di virulenza citosolici

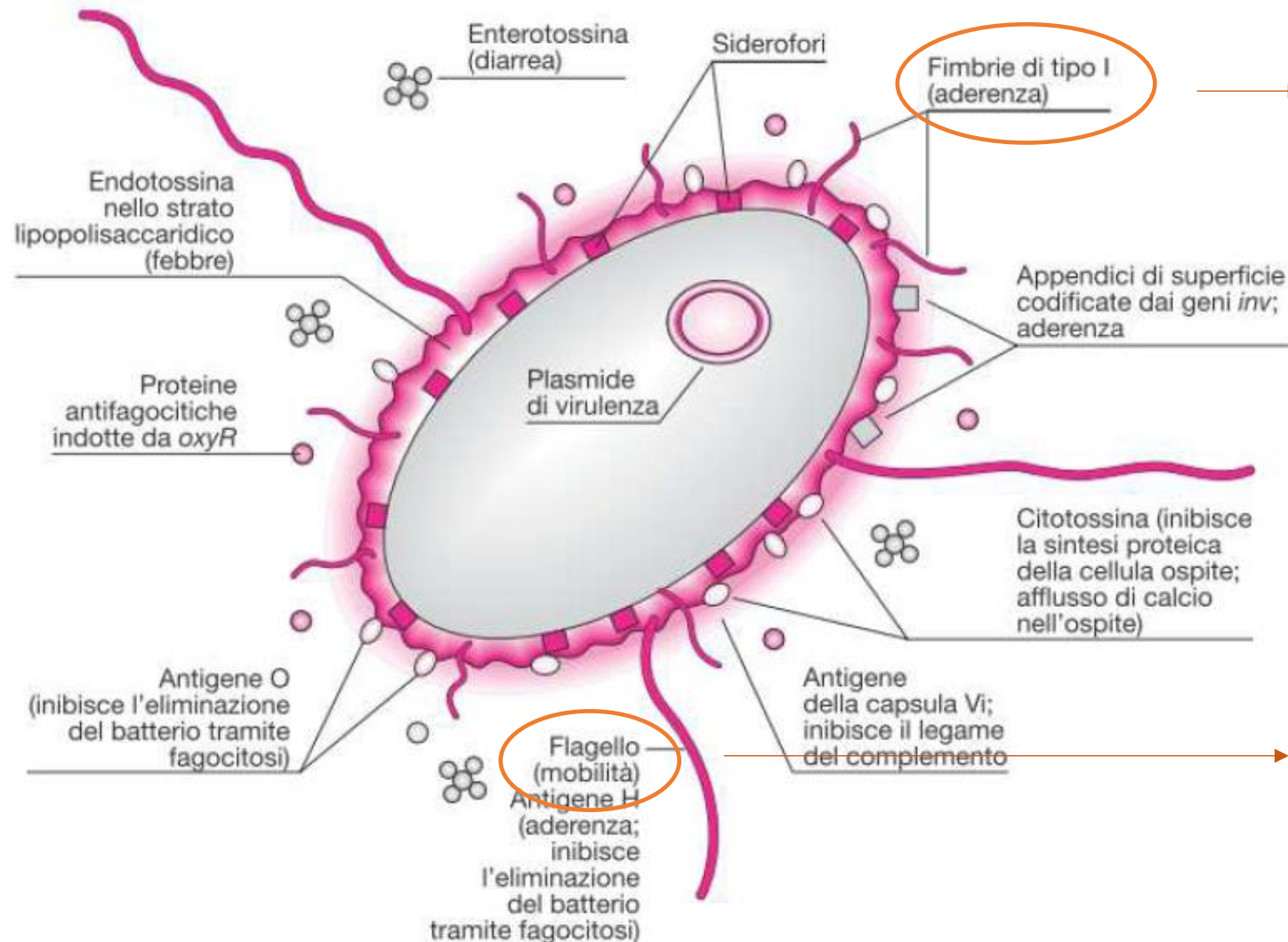
Fattori di virulenza associati alla membrana

Fattori di virulenza secretori



Plasmide di virulenza a basso numero di copie (1-2 copie per cellula) di dimensioni variabili a seconda del sierotipo (da 50 kb a 110 kb). Il plasmide di virulenza ospita i geni codificanti per i principali fattori di virulenza di *Salmonella*. Ad esempio, il locus *spv* (del plasmide di virulenza di *Salmonella*) di 7,8 kb che ospita 5 geni *spv* RABCD che hanno un ruolo nella moltiplicazione intracellulare di *Salmonella*.

Salmonella: fattori di virulenza associati alla membrana

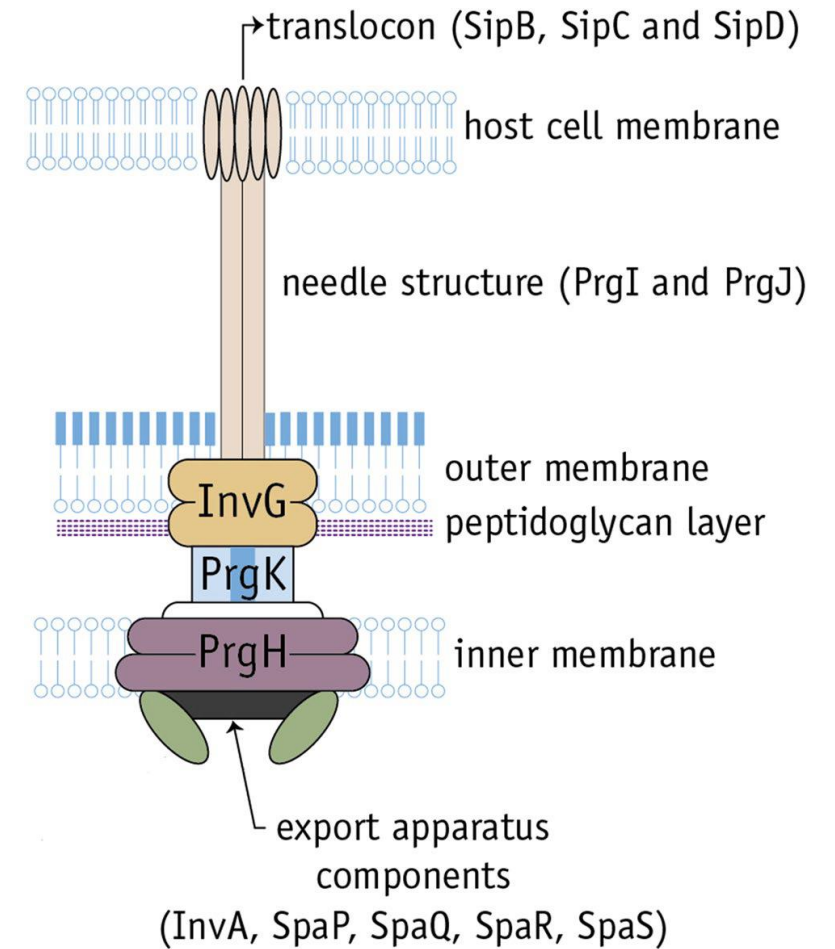
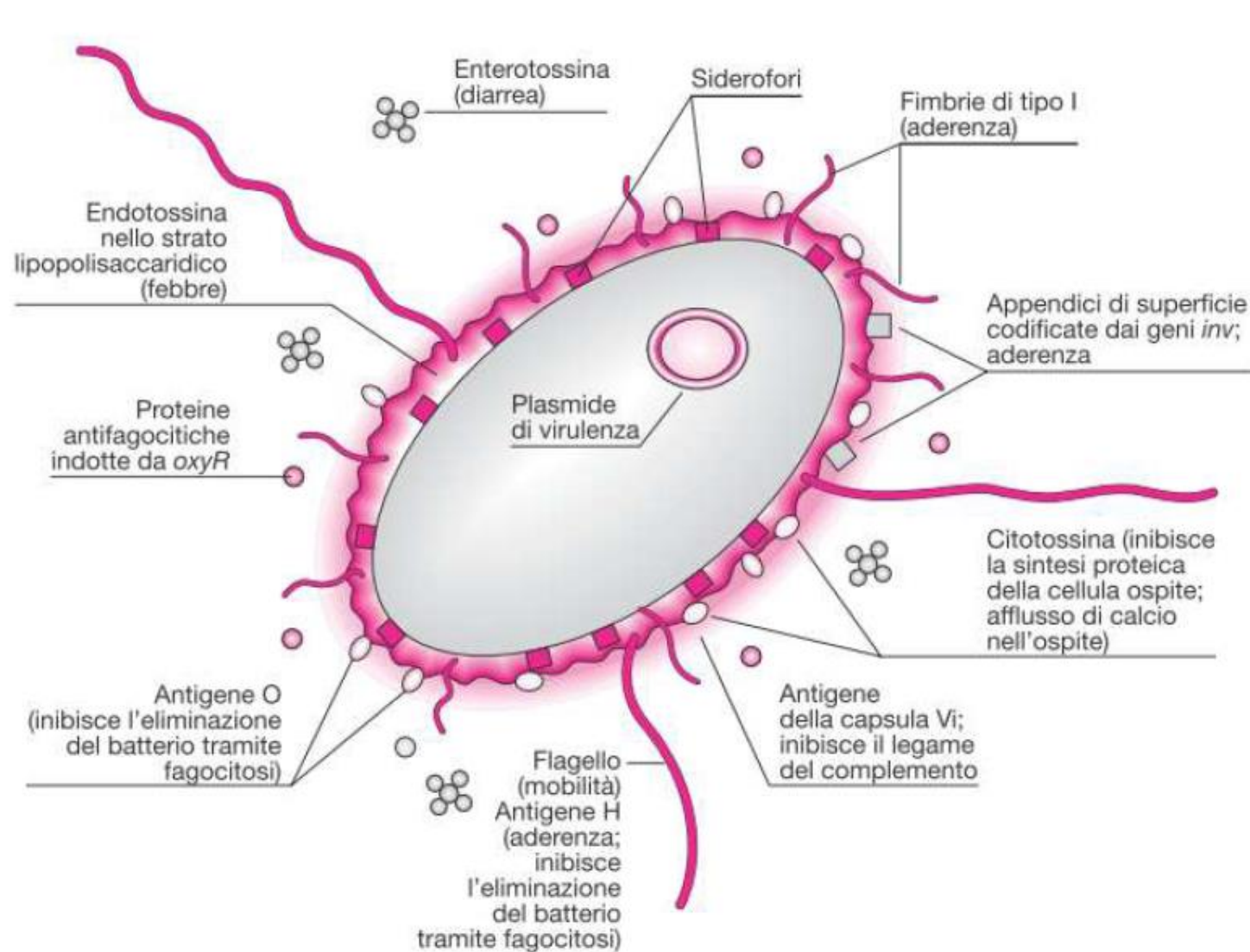


Salmonella ha 13 loci predetti per le fimbrie, molti dei quali sono indotti in vivo e sono necessari per:

- formazione del biofilm,
- adesione alle cellule dell'ospite,
- colonizzazione,
- non per la sopravvivenza intracellulare.

La motilità flagellare può aumentare l'invasività di *Salmonella*

Salmonella: fattori di virulenza secretori

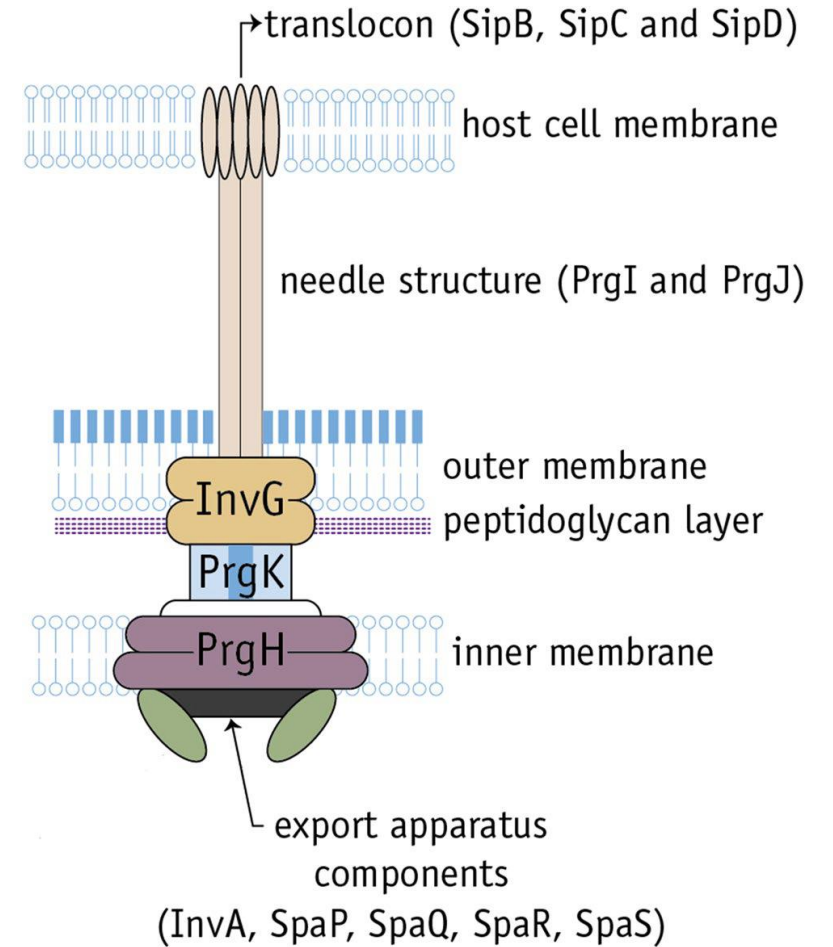


Salmonella: fattori di virulenza secretori

Salmonella possiede un apparato molecolare chiamato Sistema di secrezione di tipo III (T3SS) responsabile di iniettare proteine effettrici nel citosol delle cellule ospiti.

Gli effettori esportati alterano le funzioni cellulari come la struttura del citoscheletro, il trasporto di membrana, la trasduzione del segnale e l'espressione di citochine.

Questi cambiamenti permettono l'invasione e la permanenza del batterio nella cellula infettata.



TOSSINE

Gruppo di sostanze solubili, secrete dalle cellule batteriche in grado di alterare il metabolismo delle cellule con effetti deleteri per l'organismo ospite.

Caratteristiche:

- Comprendono una varietà di molecole con meccanismi di azione molto diversi → possono agire alterando strutture vitali della cellula ospite quali la membrana esterna o agendo su uno specifico obiettivo intracellulare (es. rimodellamento del citoscheletro, innesco di processi di morte e sintesi proteica)
- Diverse tossine, prodotte anche da organismi diversi, spesso colpiscono molecole bersaglio comuni → proteine che rivestono ruoli chiave nei processi fisiologici della cellula eucariote (es. proteine della famiglia delle piccole GTPasi della famiglia Rho, Rac, CDC42 importanti nei meccanismi di polimerizzazione dell'actina)
- Un singolo patogeno può produrre un numero elevato di tossine con differenti meccanismi di azione in diverse cellule bersaglio, in coerenza con le fasi del processo di patogenesi in cui queste molecole sono coinvolte

TOSSINE

Contribuiscono al danno tissutale provocato dai batteri

ESOTOSSINE

Proteine extracellulari ad azione estremamente tossica secrete principalmente da batteri Gram-positivi e solo da alcuni batteri Gram-negativi.

ENTEROTOSSINE

Esotossine che agiscono sull'intestino tenue provocando un'abbondante secrezione di fluidi nel lumen intestinale, che porta a vomito e diarrea.

ENDOTOSSINE

Componenti lipopolisaccaridiche (LPS), termostabili, della membrana esterna dei batteri Gram-negativi, liberate nella circolazione dell'ospite a seguito della lisi della cellula batterica.

ESOTOSSINE

Tabella 19.4 TOSSINE CHE AGISCONO DALL'ESTERNO DELLA CELLULA.

Tipologia	Microrganismo	Tossina
Superantigeni	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SPE-A, C, G, H, I, J, M, SSA
	<i>Staphylococcus aureus</i>	SEA, SEB, SEC(1-3), SED, SEE, SEG-Q, TSST
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	SPE-A7, SPE-G ^{dys} , SDM
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	YPM-A, YPMB
Tossine RTX	<i>Escherichia coli</i>	HylA (emolisina)
	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	LtxA (emolisina)
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	ApxIA-ApxIVA (emolisina-leucotossina)
	<i>Bordetella pertussis</i>	CyaA (emolisina-adenilico-ciclastasi)
	<i>Proteus vulgaris</i>	PvxA (emolisina)
Tossine che si legano al colesterolo (citolisine)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumolisina
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Streptolisina O
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriolisina O
	<i>Clostridium perfringens</i>	Perfringolisina O
	<i>Clostridium tetani</i>	Tetanolisina
	<i>Bacillus cereus</i>	Cereolisina
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Turingolisina

ESOTOSSINE

- Rilasciate nell'ambiente circostante da microrganismi in crescita, diffondendo quindi dal focolaio di infezione verso altre parti del corpo.
- Si dividono in 3 categorie:
 1. **Tossine citolitiche** → sono enzimi che attaccano i costituenti cellulari come la membrana esterna delle cellule animali, provocandone lisi e morte. Esempio: tossine che agiscono sui globuli rossi del sangue, *emolisine*; tossine che agiscono sui fosfolipidi della membrana citoplasmatica della cellula ospite, *fosfolipasi*.
 2. **Tossine A-B** → la porzione biologicamente attiva della tossina può essere internalizzata dalla cellula bersaglio e svolgere nel citoplasma la sua azione deleteria. Sono costituite da due subunità legate covalentemente: componente B si lega ad un recettore presente sulla superficie cellulare, in modo da permettere il trasferimento della subunità A attraverso la membrana della cellula bersaglio. Esempio: *tossina difterica, tetanica e botulinica*.
 3. **Tossine superantigeniche** → stimolano un elevato numero di cellule deputate alla risposta immunitaria, provocando così una estesa reazione infiammatoria.

TOSSINE CITOLITICHE

- Formano pori sulla superficie cellulare
- Causano danni di differente entità, a seconda della dimensione del poro
- La lesione sulla membrana cellulare porta inevitabilmente sia all'efflusso sia all'influsso di piccole molecole e acqua sia alla distruzione del potenziale di membrana
- A seconda della dimensione del poro, la cellula coinvolta può sia recuperare sia andare incontro a morte
- Sono classificate anche in base alle dimensioni del poro nelle membrane della cellula bersaglio
 - Tossine che formano «pori piccoli» (1-1,5nm) determinano la permeabilità selettiva di molecole con massa molecolare <2kDa. Es: **α -emolisina di *Escherichia coli*** secreta mediante il sistema di secrezione di tipo I; bersaglia diverse tipologie di cellula tra cui eritrociti, leucociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali del rene, monociti. Il danno prodotto inizia con la permeabilizzazione della membrana cellulare con perdita di piccoli soluti, shock osmotico e morte.
 - Tossine che formano «pori di grandi dimensioni» (fino a 35nm di diametro). Il meccanismo di azione comporta il legame al colesterolo sulla membrana delle cellule bersaglio, oligomerizzazione dei monomeri con conseguente formazione del poro. I pori formati permettono il flusso di molecole di piccole e grandi dimensioni che portano inevitabilmente a morte la cellula. Es: **streptolisina-O di *Streptococcus pyogenes***

SUPERANTIGENI

- Agiscono all'esterno della cellula
- Prodotti principalmente da batteri Gram positivi: streptococchi e stafilococchi
- Tossina 1 della sindrome da shock tossico (**TSST-1**) prodotta da *Staphylococcus aureus* → interagisce direttamente con il T cell receptor (TCR) dei linfociti T helper e contemporaneamente con le molecole di MHC (Major Histocompatibility Complex) II sulle cellule APC (Antigen Presenting Cell), come ad esempio i macrofagi.
 - Condizioni fisiologiche → antigene convenzionale catturato e processato da APC che lo presentano in associazione con MHCII sottoforma di peptidi al TCR delle cellule immunocompetenti come linfociti T helper. Ogni peptide attiva uno o più cloni di linfociti T che attivano immunità adattativa.
 - In presenza di super-antigeni → mediano il legame tra MCHII e TCR in assenza dell'antigene convenzionale e di conseguenza procedono all'attivazione aspecifica di un sottogruppo di linfociti T helper con conseguente rilascio di mediatori dell'infiammazione come interleuchine-1, 6, 8. Ne risulta una reazione generalizzata e non localizzata al solo tessuto/organo colpito.

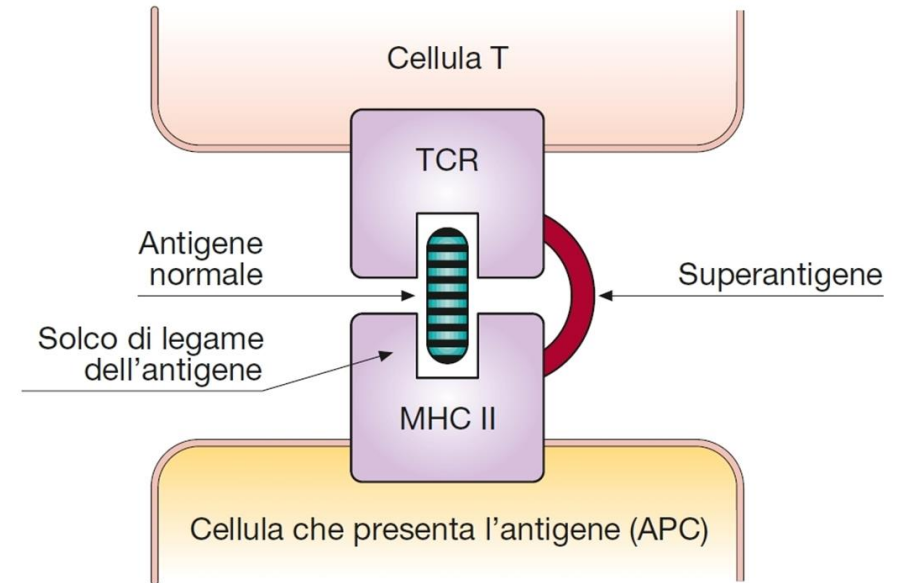


Figura 19.20 STRUTTURA DI UN SUPERANTIGENE. Un superantigene lega direttamente la molecola MHC-II (*major histocompatibility complex*) presente sulle cellule APC (*antigen presenting cells*) e interagisce in maniera aspecifica con il TCR (*T cell receptor*) dei linfociti T, al di fuori del solco dove sono normalmente presenti gli antigeni, attivandoli in maniera non-specifica.

TOSSINE A/B

- Tossine solubili con bersagli intracellulari → tossine che devono raggiungere il citoplasma delle cellule bersaglio per svolgere il loro ruolo biologico
- Struttura costituita da un dominio «tossico» che esplica l'attività biologica, dominio A, e un dominio carrier (trasportatore), dominio B, che media l'interazione della tossina al recettore della cellula eucariota
- I domini A e B possono essere costituiti da monomeri tenuti insieme da un ponte disolfuro, es: tossina tetanica, botulinica e difterica. In seguito al legame del dominio B con lo specifico recettore sulla cellula eucariota, al momento dell'internalizzazione avverrà una riduzione autocatalitica del legame S-S e il solo dominio A verrà internalizzato dalla cellula bersaglio oppure il dominio B rimarrà all'esterno della cellula sulla membrana

TOSSINE A/B

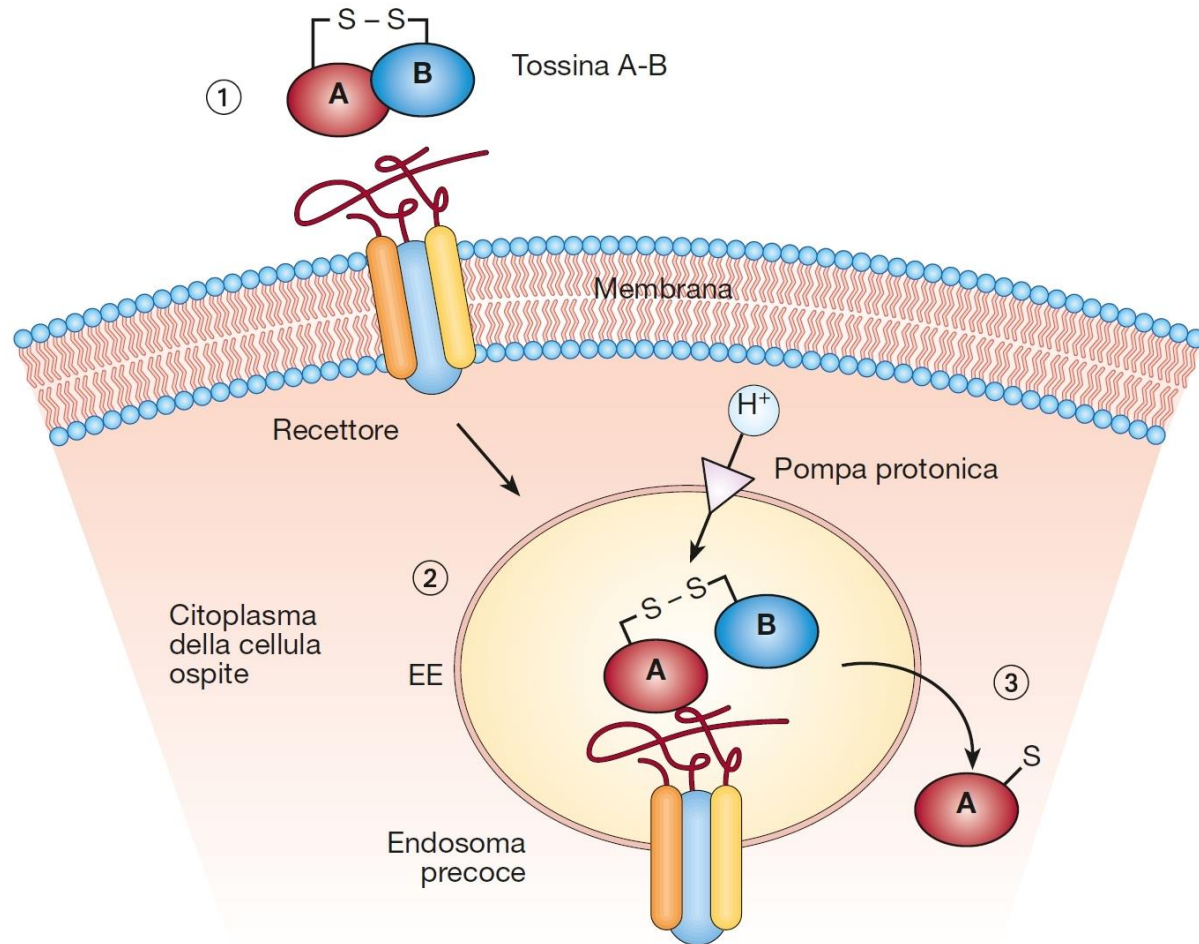


Figura 19.21 INTERNALIZZAZIONE DI UNA TOSSINA MONOMERICA A-B. **(1)** La tossina viene a contatto attraverso il dominio B con lo specifico recettore sulla membrana della cellula ospite. **(2)** Dopo l'internalizzazione, la tossina si trova all'interno dell'endosoma precoce dove avviene un processo di acidificazione a causa dell'attivazione delle pompe protoniche di membrana. **(3)** Questo processo causa la riduzione del legame disolfuro del complesso A-B e il rilascio nel citosol del dominio attivo A.

TOSSINE A/B

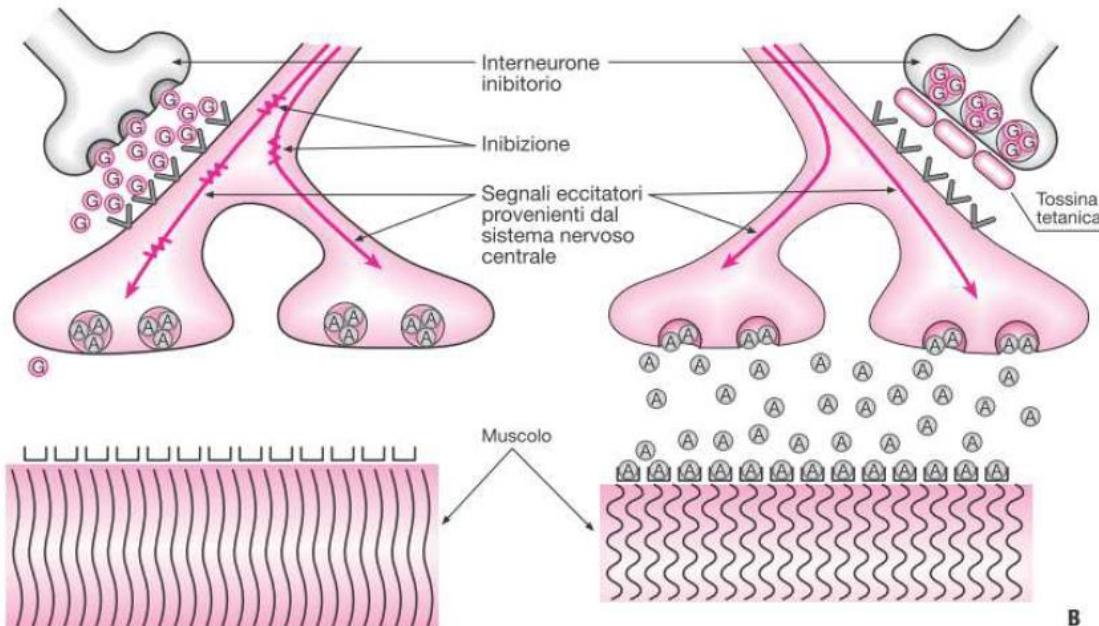
Tabella 19.5 ESEMPI DELLE ATTIVITÀ ENZIMATICHE DELLE TOSSINE A-B.

Funzione enzimatica	Tossina	Microrganismo	Effetto
ADP-ribosiltransferasi	CT(AB ₅)	<i>Vibrio cholerae</i>	Attivazione dell'adenilato ciclasi con susseguenti aumenti del livello di cAMP. Deregolazione nel flusso di ioni. Diarrea
	ExoA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Blocco della sintesi proteica
	PTX	<i>Bordetella pertussis</i>	Attivazione dell'adenilato ciclasi con susseguenti aumenti del livello di cAMP. Alterazione delle vie di segnalazione cellulari
	DTX	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Blocco della sintesi proteica
	C2	<i>Clostridium botulinum</i>	Alterazioni strutturali e funzionali del citoscheletro
N-glicosilazione	STx1, STx2	<i>Escherichia coli</i>	Blocco della sintesi proteica
Glicosilazione	TcdA, TcdB	<i>Clostridium difficile</i>	Alterazione del citoscheletro
Deamidazione	CNF1, CNF2	<i>Escherichia coli</i>	Alterazione del citoscheletro
Attività proteasica	TeNT	<i>Clostridium tetani</i>	Inibizione del rilascio di neurotrasmettitori
	BoNT	<i>Clostridium botulinum</i>	Inibizione del rilascio di neurotrasmettitori
	LF	<i>Bacillus anthracis</i>	Rilascio di citochine pro-infiammatorie
Attività adenilato-ciclasica	CyA	<i>Bordetella pertussis</i>	Innalzamento dei livelli di cAMP. Alterazione della trasduzione del segnale
	EF	<i>Bacillus anthracis</i>	Innalzamento dei livelli di cAMP. Accumulo di fluidi

- Neurotossine → definite tali sulla base del loro bersaglio, le cellule del sistema nervoso centrale e periferico
- Bloccano il rilascio di neurotrasmettitori implicati nel controllo della contrazione muscolare → effetti diversi
- Batteri Gram positivi sporigeni, anaerobi obbligati, del suolo

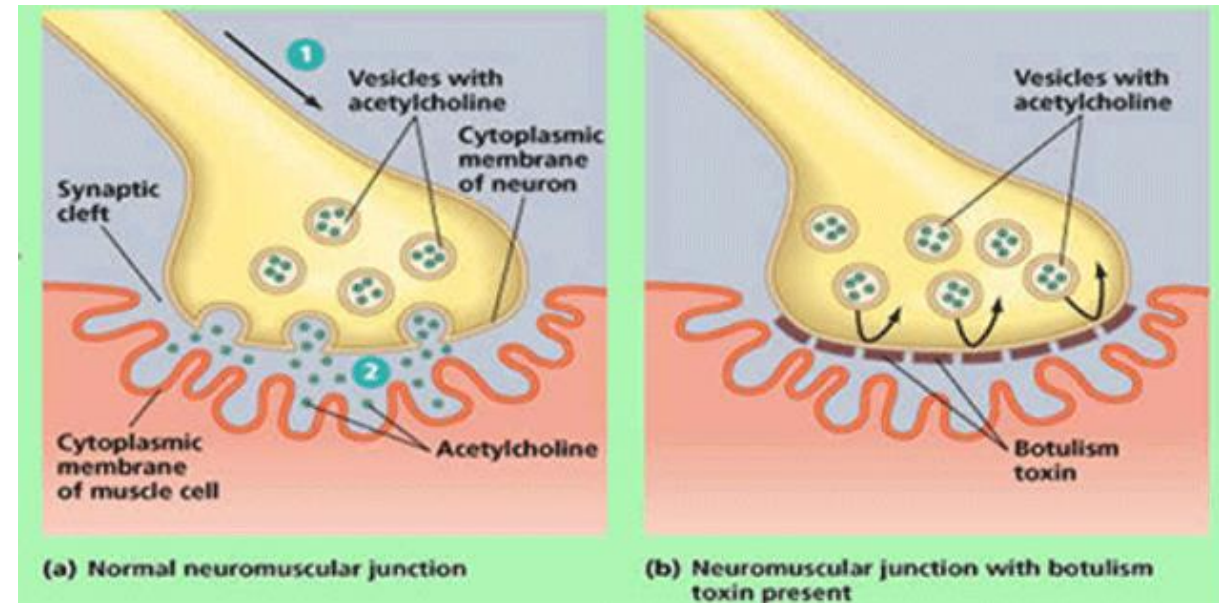
Clostridium tetani

stato patologico indotto dalla sua tossina si definisce paralisi spastica



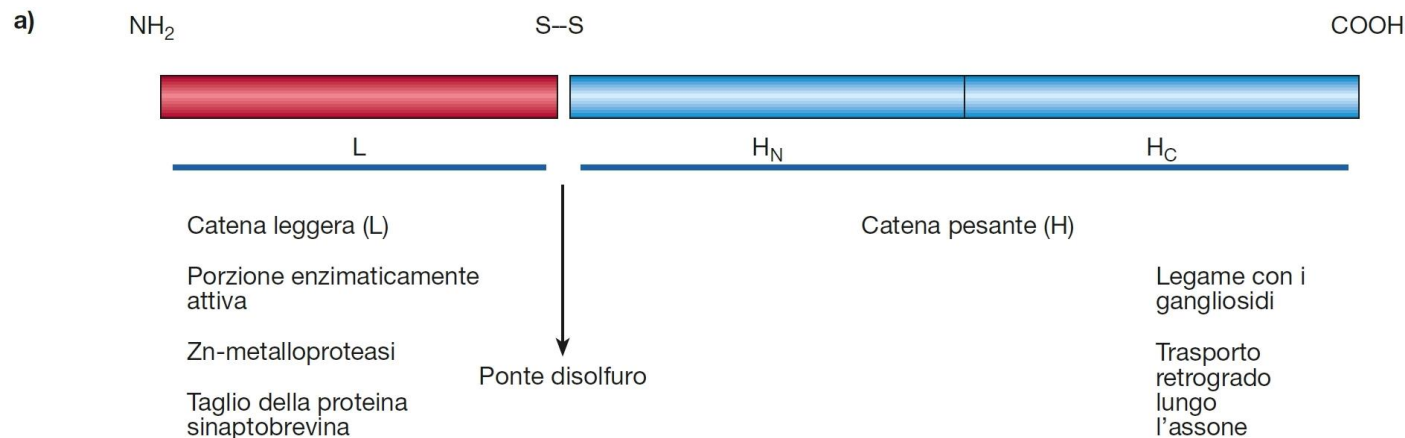
Clostridium botulinum

stato patologico causato dalla sua tossina si caratterizza come paralisi flaccida



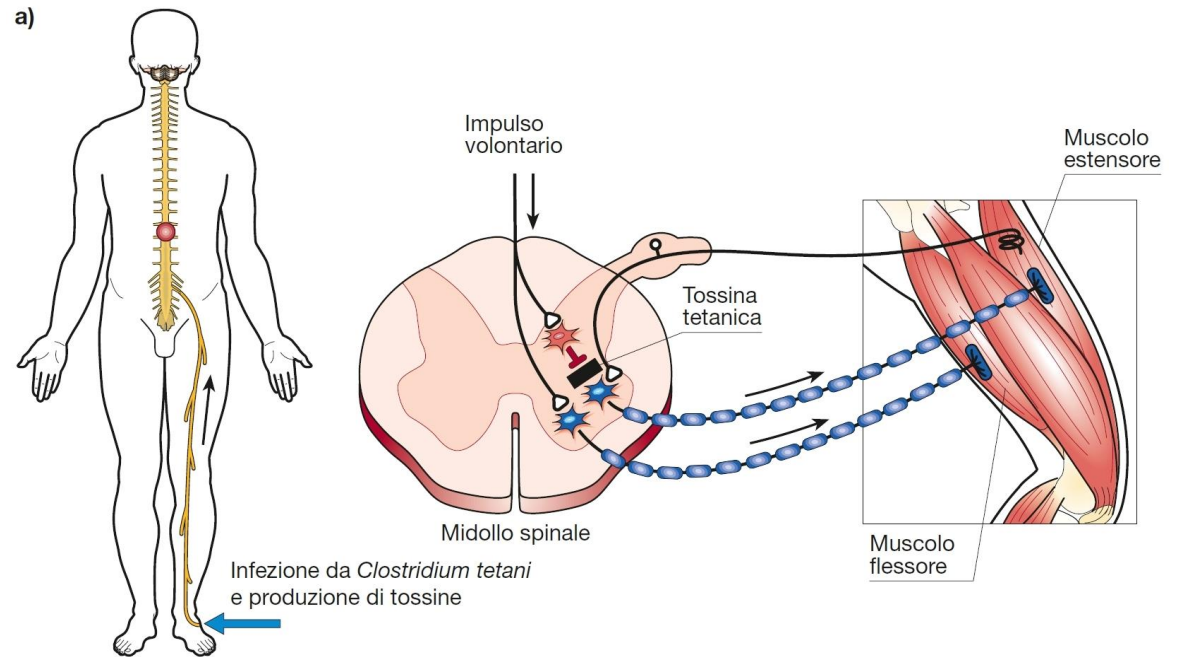
Tossina tetanica prodotta da *Clostridium tetani*

- Si conosce una sola tossina tetanica
- Tossina A-B prodotta come singola catena polipeptidica di 150 kDa. In seguito la catena polipeptidica genera per proteolisi due frammenti:
 - Catena heavy (H) di 100kDa è coinvolta nel legame con il recettore sulle cellule bersaglio e funge da traslocatore per la porzione attiva
 - Catena light (L) di 50kDa è la subunità attiva della tossina che agisce nel citosol delle cellule bersaglio



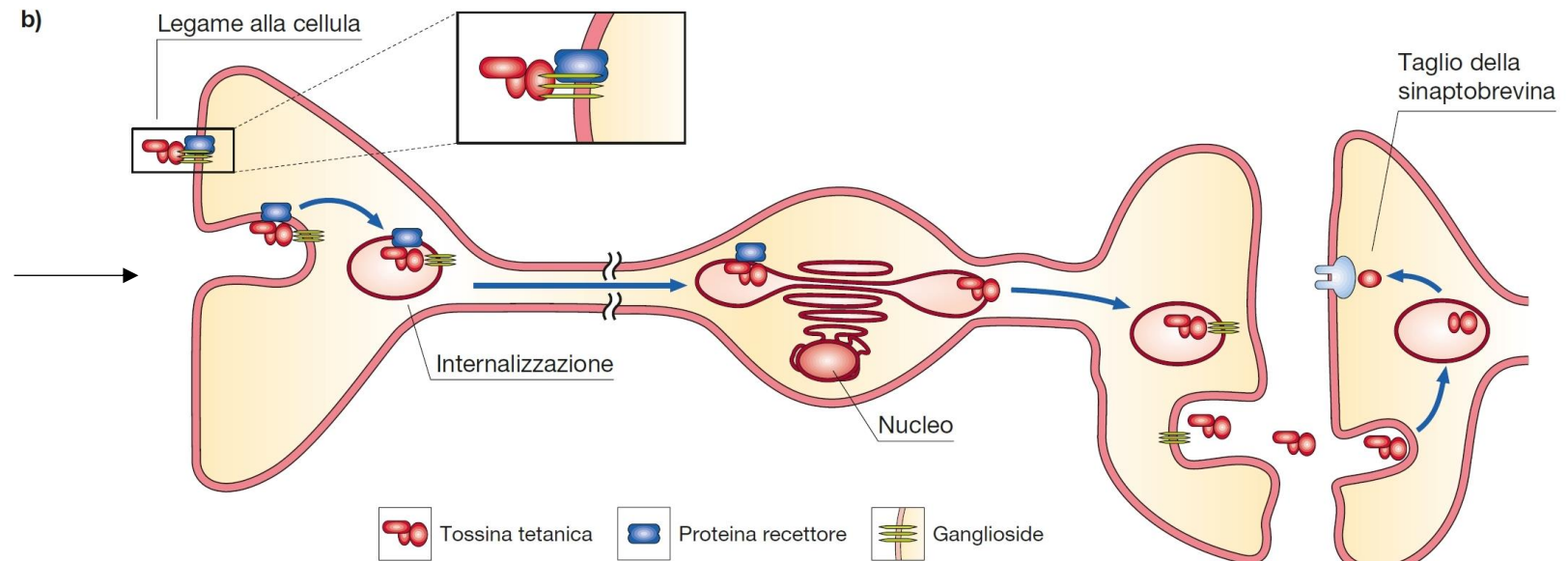
Tossina tetanica prodotta da *Clostridium tetani*

- La tossina viene introdotta mediante ferite infette da *Clostridium tetani* → quanto più è profonda la ferita (ambiente anaerobio) tanto più c'è rischio che possa essere infetta da *C. tetani*
- Viene poi internalizzata dai motoneuroni terminali



- Seguendo il trasporto assonale retrogrado lungo i microtubuli e i microfilamenti, la tossina raggiunge il sistema nervoso centrale e in particolare gli interneuroni inibitori dove viene rilasciata nel citosol mediante il classico meccanismo delle tossine A-B

Interneuroni motori
hanno un ruolo
importante nella
trasmissione dello
stimolo contrattile alle
cellule muscolari



ESOTOSSINE

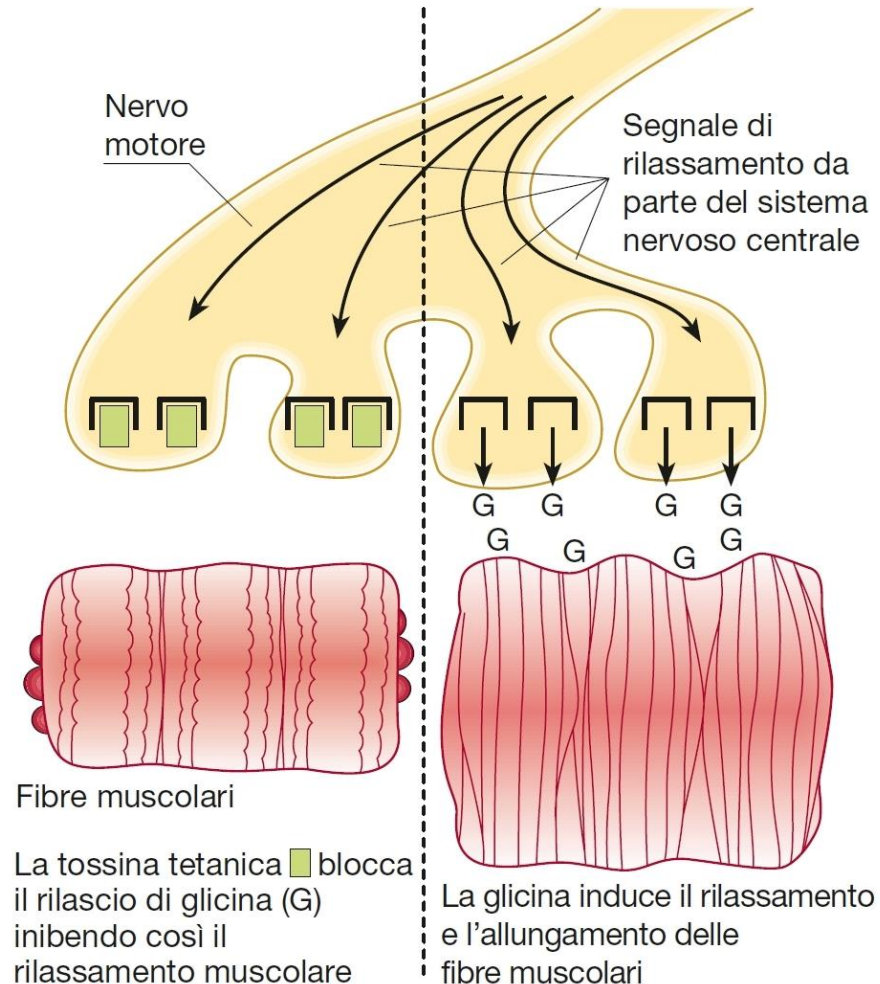
Tossina tetanica prodotta da *Clostridium tetani*

Condizione patologica

La tossina tetanica agisce sulle SNARE impedendo la fusione delle vescicole contenenti il neurotrasmettitore con la membrana presinaptica e contrastandone il rilascio

Questo determina la continuazione dello stimolo contrattile del muscolo

Paralisi spastica

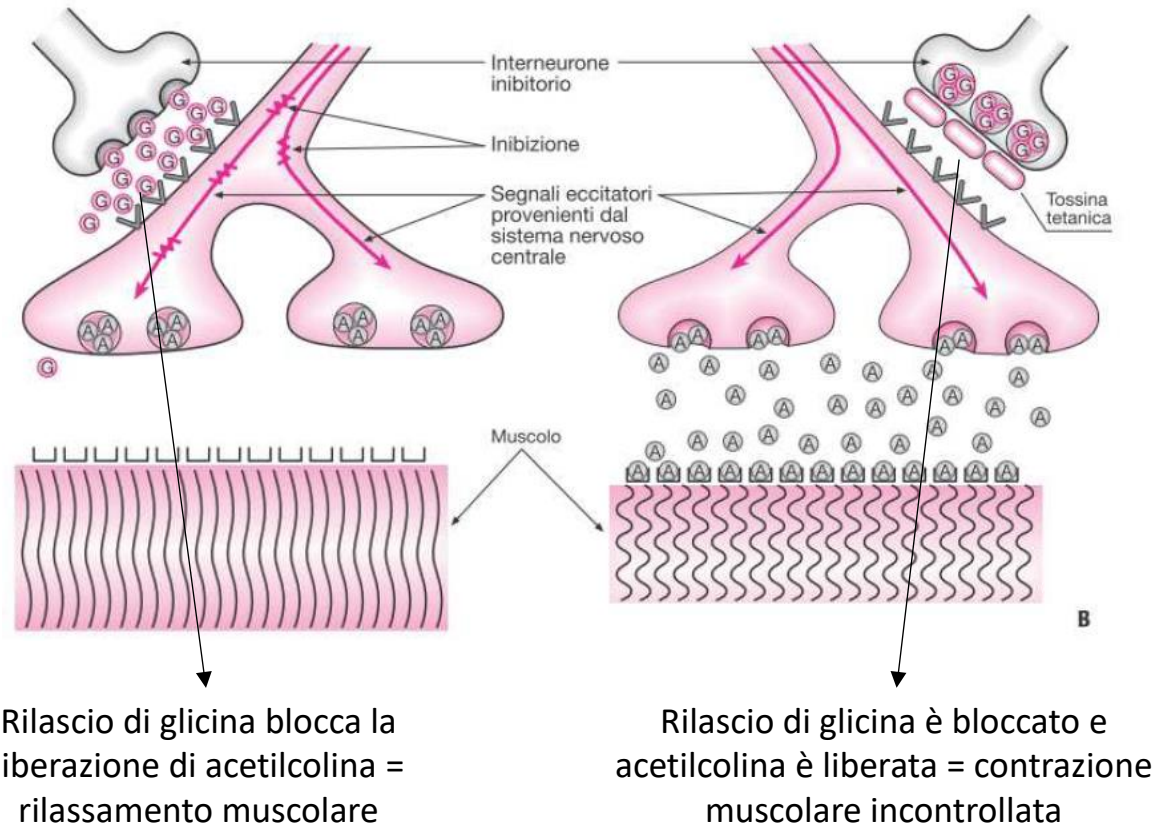


Condizione fisiologica

Interneuroni motori interrompono il circuito dello stimolo mediante il rilascio di neurotrasmettitori inibitori, di solito glicina o acido gamma-aminobutirrico (GABA), che inibiscono il rilascio di Acetilcolina da parte dei motoneuroni

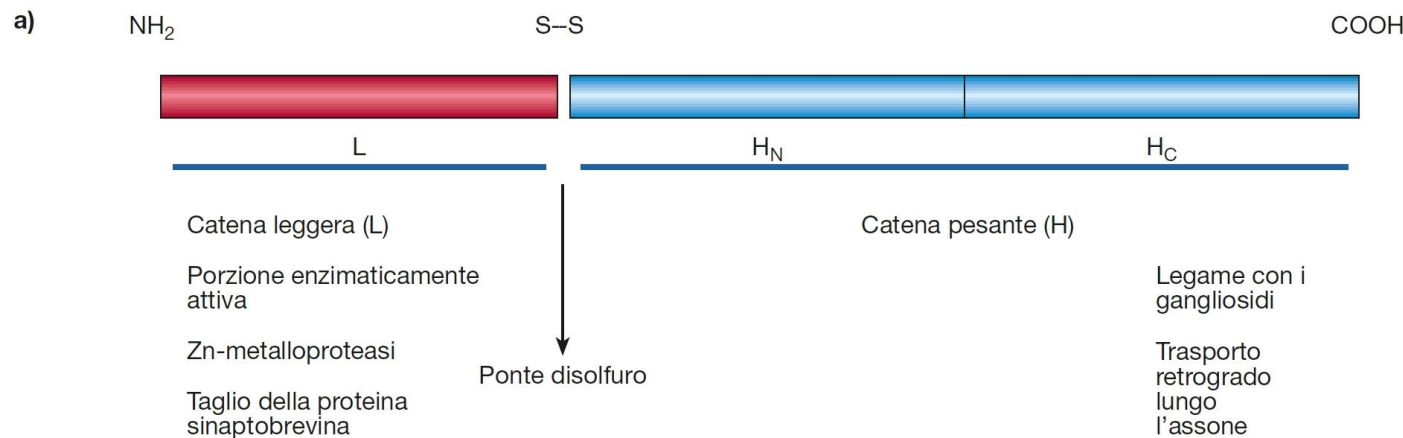
Avviene il blocco della contrazione della cellula muscolare

Tossina tetanica prodotta da *Clostridium tetani*



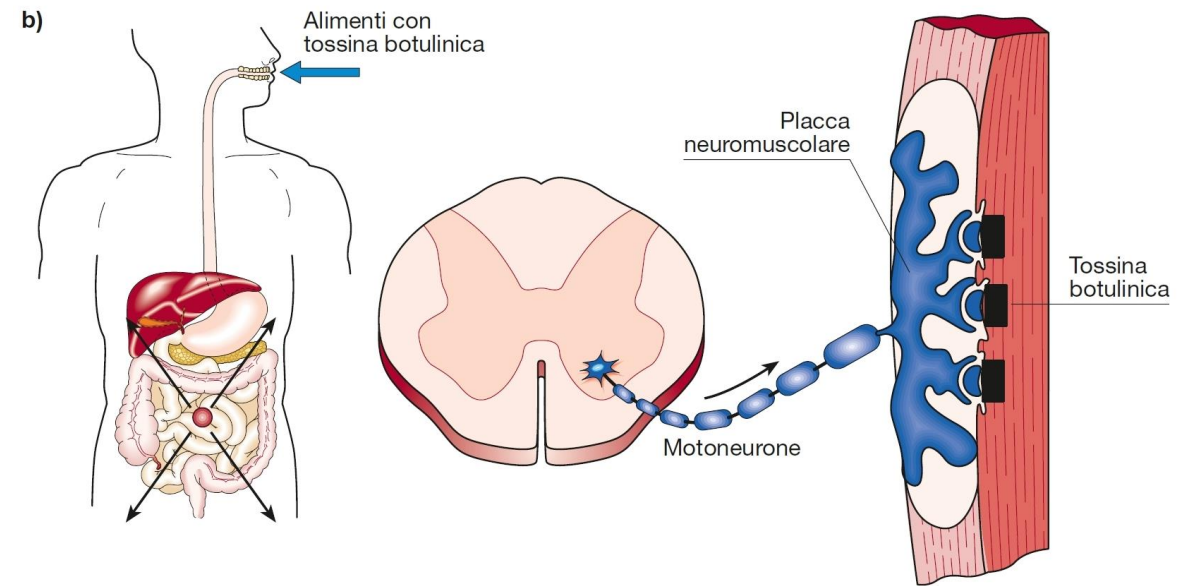
Tossina botulinica prodotta da *Clostridium botulinum*

- È uno dei veleni più potenti esistenti in natura: pochi nanogrammi sono sufficienti per uccidere un essere umano
- Esistono diversi sierotipi di tossina botulinica
- Tossina A-B prodotta come singola catena polipeptidica di 150 kDa. In seguito la catena polipeptidica genera per proteolisi due frammenti:
 - Catena heavy (H) di 100kDa è coinvolta nel legame con il recettore sulle cellule bersaglio e funge da traslocatore per la porzione attiva
 - Catena light (L) di 50kDa è la subunità attiva della tossina che agisce nel citosol delle cellule bersaglio



Tossina botulinica prodotta da *Clostridium botulinum*

- Raramente è in grado di crescere nell'organismo animale ma può crescere e produrre la tossina in alimenti conservati non correttamente → non c'è necessità di venire a contatto con il batterio affinché la tossina possa esercitare la sua azione
- La tossina ingerita con alimenti contaminati non viene inattivata dall'acidità gastrica ma, al contrario, viene internalizzata dalle cellule dell'epitelio gastrico. Da qui per transitosi raggiunge il lato basolaterale delle cellule che compongono la barriera epiteliale e può avere accesso alla circolazione sanguigna
- Raggiunge i motoneuroni associati al sistema nervoso periferico



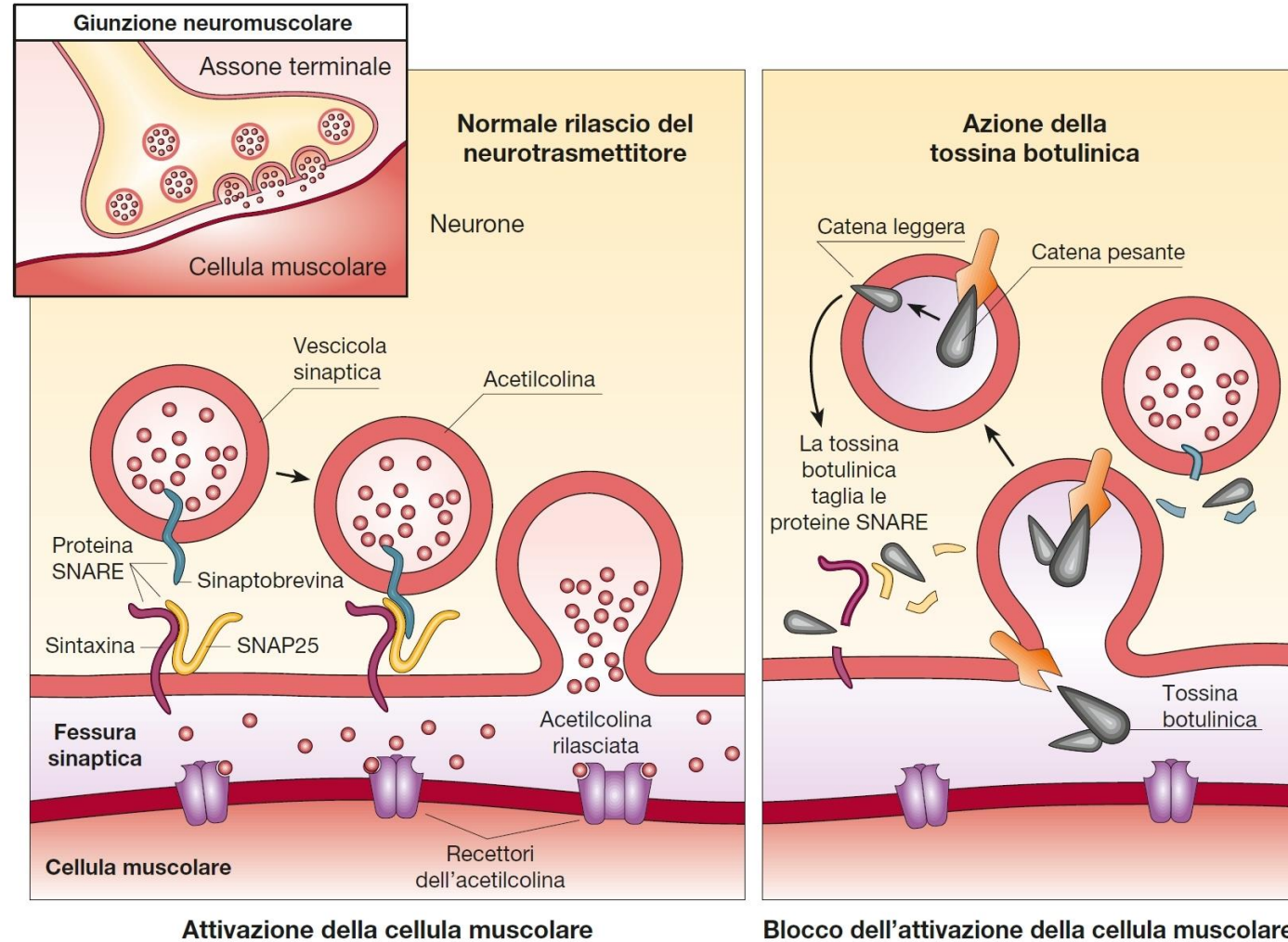
ESOTOSSINE

Tossina botulinica prodotta da *Clostridium botulinum*

Condizione fisiologica

A livello delle sinapsi neuromuscolari, il motoneurone presinaptico rilascia il neurotrasmettore, l'Acetilcolina, mediante un meccanismo che comporta la fusione sulla membrana cellulare di vescicole contenenti Acetilcolina → SNARE

Avviene la propagazione dello stimolo e la contrazione muscolare



Condizione patologica

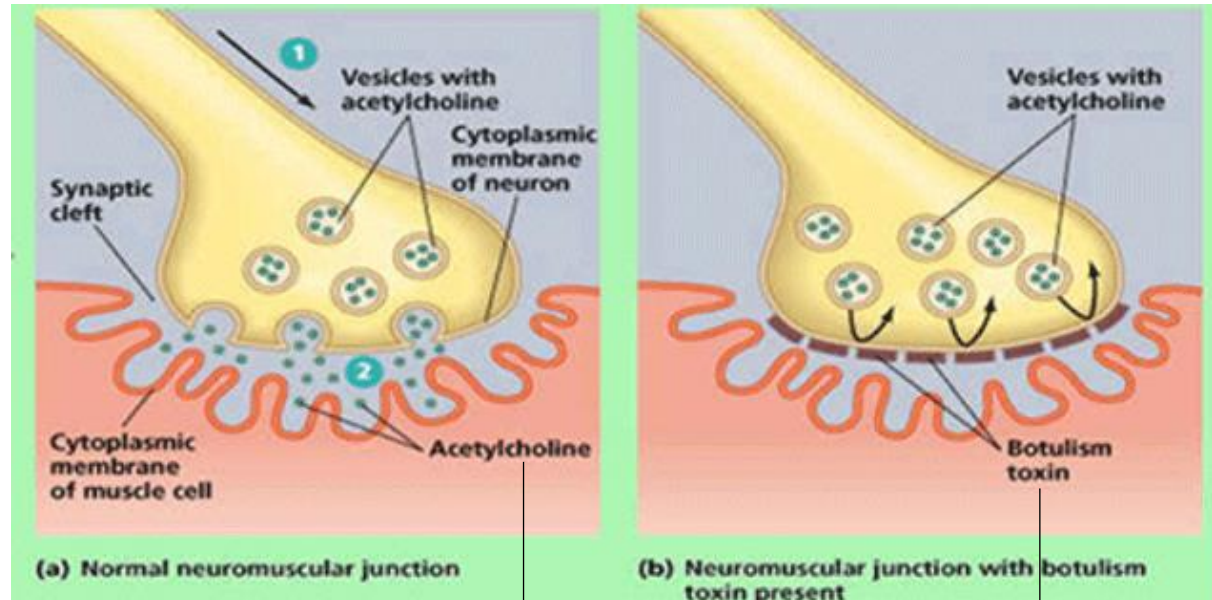
La tossina, una volta internalizzata dai motoneuroni, viene rilasciata nel citosol dove esercita la sua azione proteolitica sulle proteine del complesso SNARE

Impedimento nella fusione delle vescicole e mancato rilascio dell'Acetilcolina con conseguente assenza di contrazione muscolare

Paralisi flaccida

ESOTOSSINE

Tossina botulinica prodotta da *Clostridium botulinum*

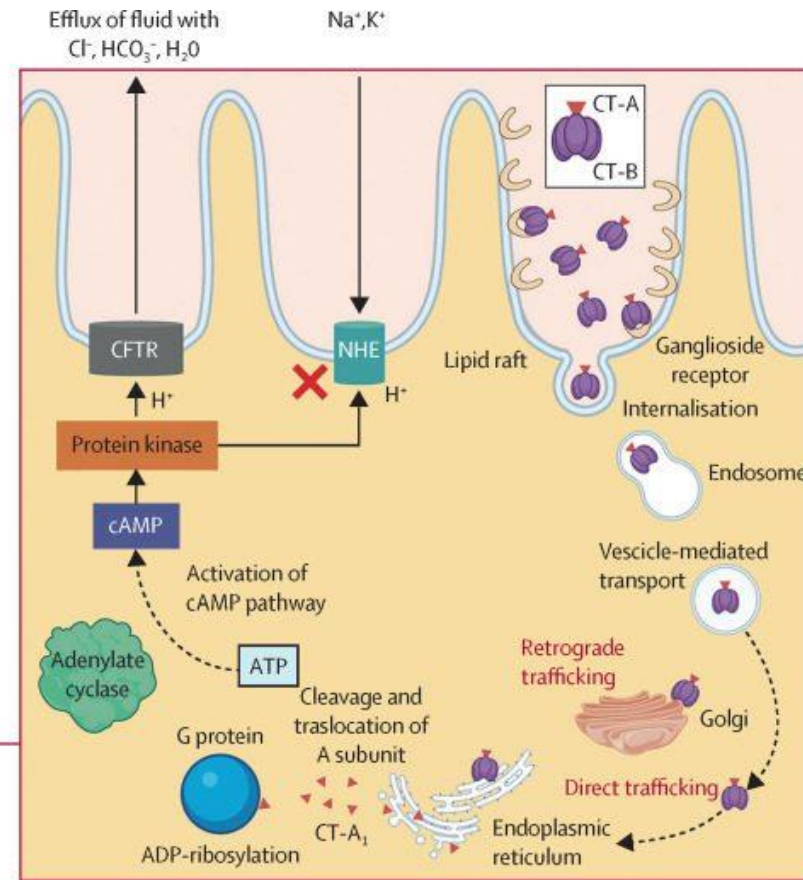
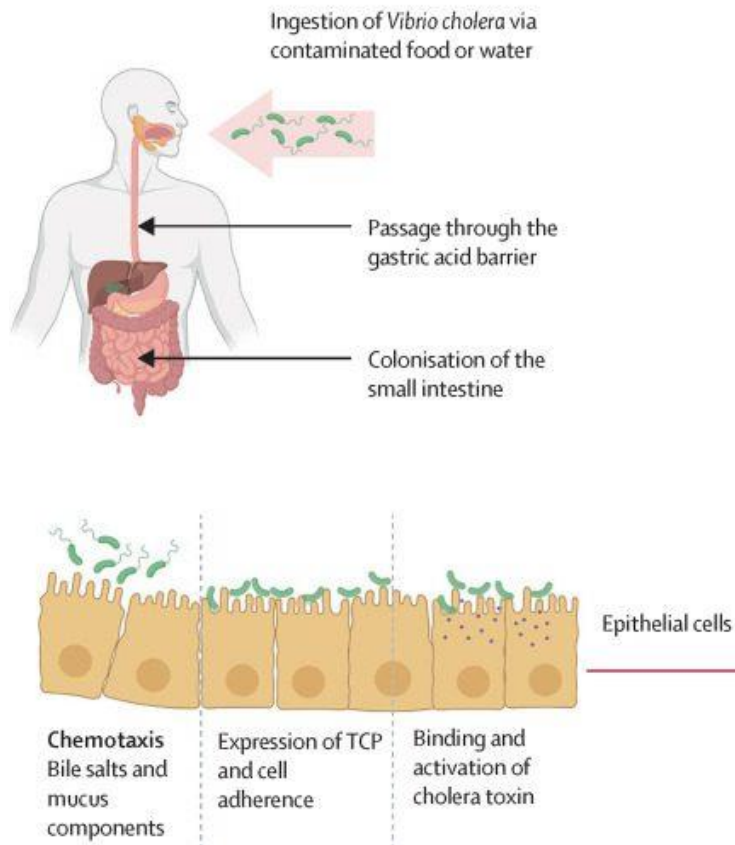


Induce la contrazione
delle fibre muscolari

Blocca il rilascio di Acetilcolina
inibendo la contrazione

ENTEROTOSSINE

La tossina colerica



- Prodotta da *Vibrio cholerae*, agente eziologico del colera
- Tossina A-B: subunità B lega il ganglioside GM1 presente sulla membrana delle cellule epiteliali; subunità A viene trasferita nel citoplasma della cellula bersaglio
- Subunità A attiva l'enzima cellulare adenilatociclastasi che converte l'ATP in AMP ciclico → l'aumento dei livelli di AMP ciclico provoca una secrezione attiva di ioni cloro e bicarbonato da parte delle cellule della mucosa nel lumen intestinale. → massiva perdita di liquidi, disidratazione e morte.

TOSSINE

Malattia alimentare da *Staphylococcus aureus*

S. aureus cresce negli alimenti; produce tossina



La tossina è ingerita; interagisce con le terminazioni nervose dello stomaco



Sintomi:
vomito, dolore addominale

Botulismo

Clostridium botulinum cresce negli alimenti; produce tossina



La tossina è ingerita; circola nel sangue verso i neuroni



Sintomi:
paralisi flaccida

Tetano

C. tetani cresce nelle ferite; produce tossina



La tossina penetra nel sangue; si dirige verso i neuroni



Sintomi:
paralisi spastica

Difterite

Corynebacterium diphtheriae cresce nel cavo orofaringeo; produce tossina



La tossina penetra nel sangue; si sposta ai vari organi (soprattutto cuore)



Sintomi:
insufficienza cardiaca

Shock settico da *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes cresce nelle ferite



I batteri penetrano nel sangue; producono tossine



Sintomi:
febbre, eruzione, shock