

## MICROBIOLOGIA

Pasteur (1822-1895) è considerato come lo scienziato che ha scoperto la biologia odierna, tramite i suoi studi furono sui microrganismi invisibili ad occhio nudo (meno di 0,1 micron).

Questi sono: Batteri - Funghi (muffe e lieviti) - alghe - protozoi - archee - virus  
Inoltre studiò la fermentazione alcolica, pastorizzazione, colera dei polli, carbonchio bovino, rabbia, setticemia, tubercolosi e vaiolo.

Un altro importantissimo scienziato fu Koch (1843-1910), con il concetto di Eziologia (causale) come la tubercolosi.

Nel 1876 pubblica i "Postulati di Koch" (Antrace e carbonchio).

- Sostiene che il fattore eziologico è presente negli individui infetti e assente in quelli sani.
- Per trovare questo agente bisogna isolarlo.
- Se messo in coltura genera 1 specie omogenea.
- Se inoculato in un animale sano, esso si ammalerà.
- Da esso, isolandolo posso determinare l'agente eziologico.

Microrganismi:

Sono classificato in base:

- Tassonomia numerica**, ovvero analizzati i caratteri compatibili.
- Analisi genetica**, valutazione % C+G, grado di ibridazione DNA (se omologia maggiore di 70/75%, si ha la stessa specie).
- Analisi delle sequenze proteiche e nucleotidiche** (molecole DNA)

**Classificazione esseri viventi:** 3 domini: BATTERI e ARCHEA (procarioti) ed EUCARIOTI.  
Nello stesso ambito e stesse specie, possono esistere diversi ceppi.

Per identificare un batterio, bisogna colorarlo al microscopio (microscopia).

Il suo scopo è dare contrasto e differenziare i vari tipo morfologici ed evidenziarne le strutture.

**Coloranti basici:** carica+, affinità con strutture acide (Cristalvioletto)

**Coloranti acidi:** carica-, affinità con strutture basiche.

Inoltre possiamo trovare:

**Colorazioni semplici:** 1 solo colorante e il batterio è fissato sul vetrino.

**Coloranti differenziati:** + coloranti (gram e ziehl neelsen) e il bacterio fissato su vetrino.

Processo:

- 1) Si preleva un campione e si fissa su vetrino.
- 2) Si fa asciugare su fiamma viva
- 3) Si usa il colorante e si fa asciugare
- 4) Lo visualizzo al microscopio

Gram:

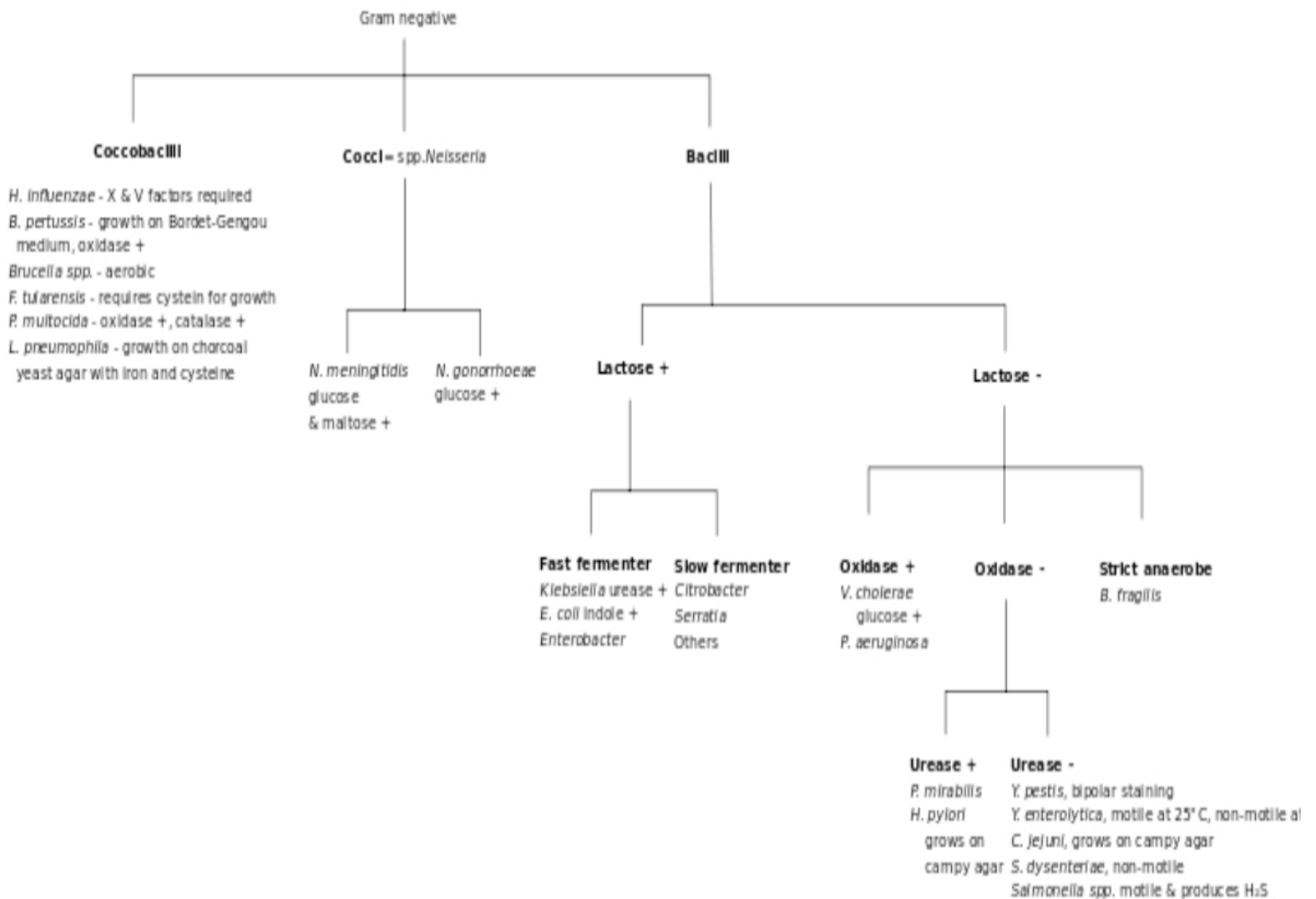
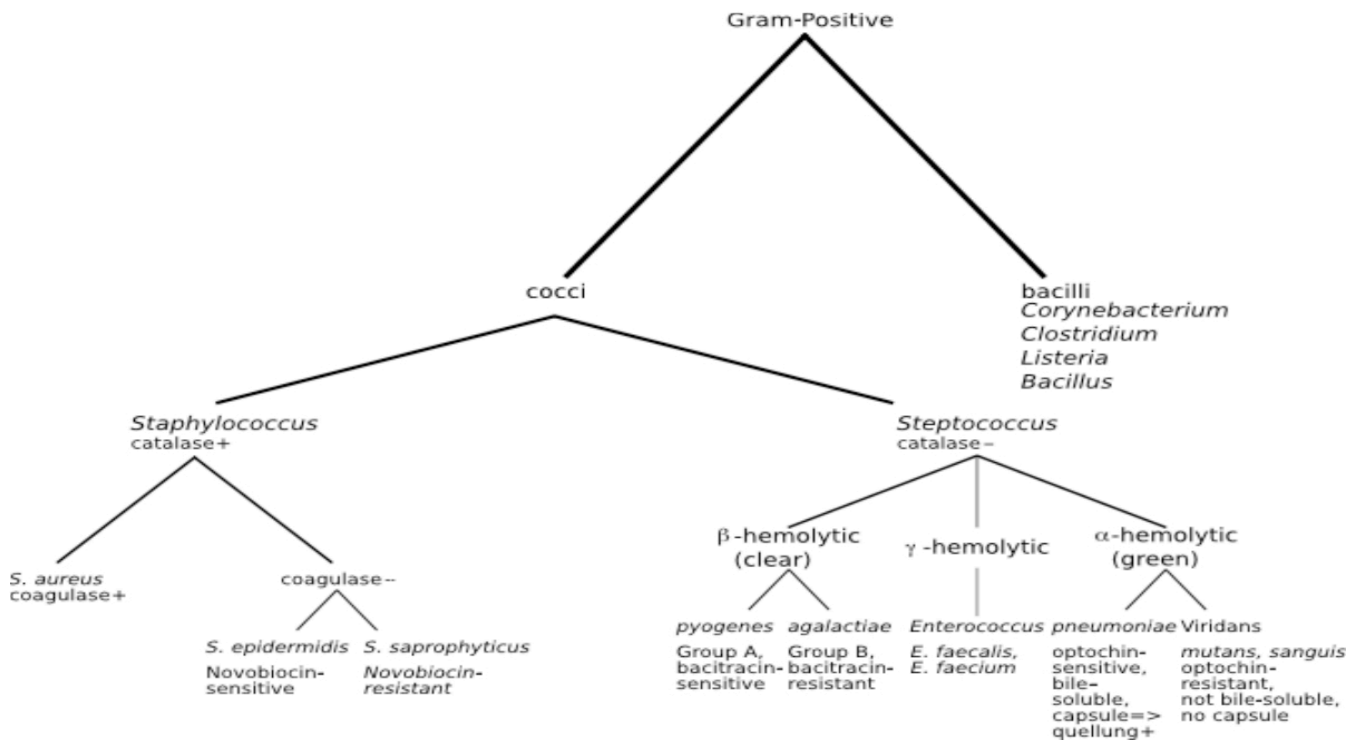
- Si usa nel processo di differenziazione, aggiungendo (Cristalvioletto, soluzione di Lugol o Mordensante)
- Si decolora con alcol, lasciano visibili solo i gram+
- Ai batteri decolorati, applico Safranina (rosa) ed evidenzio i gram-

**Gram+:**

- forma "cocco", alcuni a "bastoncino".
- Hanno una membrana plasmatica e una parete di Peptidoglicani che intrappola il Cristalvioletto bloccandolo in essa.

**Gram-:**

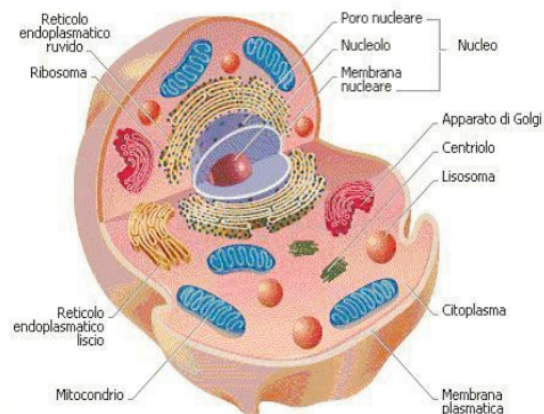
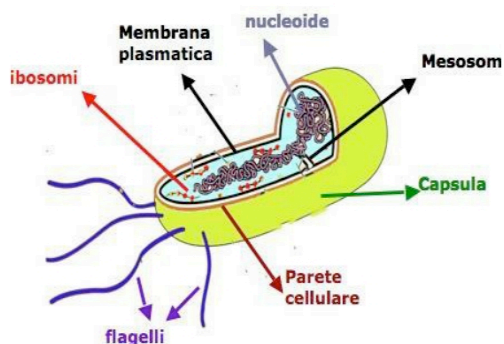
- forma "bastoncino"
- Hanno una membrana citoplasmatica, una parete di Peptidoglicani e una membrana lipidica esterna, che si scioglie decolorando il batterio in seguito all'aggiunta di alcol.
- Se non vedo batteri -&gt; potrebbe essere un virus virale



**DISPOSIZIONE SPECIE SPECIFICA:**

- A bastoncino = singoli , a doppio o a catenella (Coccobacillo)
- A virgola = es. vibrione del colera, ovvero a virgola (Spirochete)

## CELLULA BATTERICA



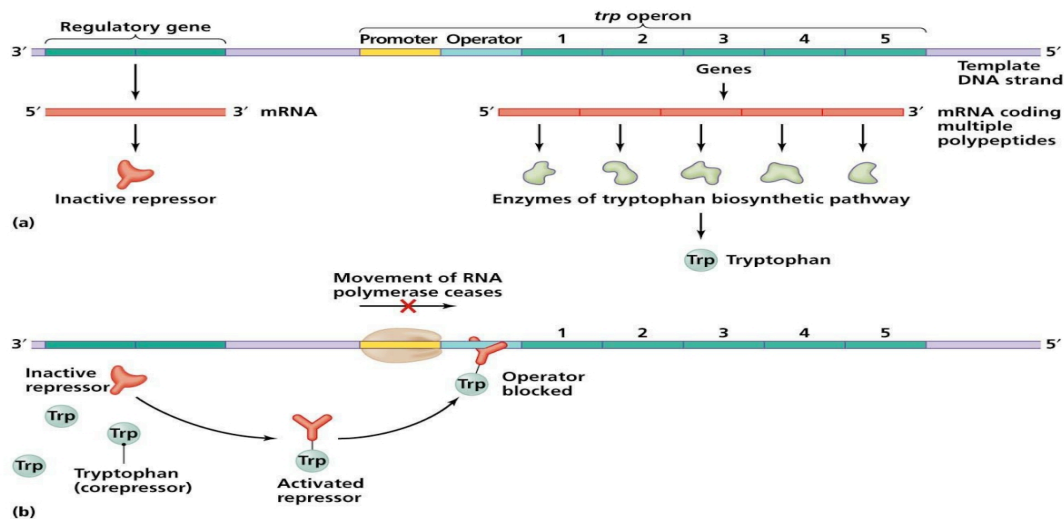
### CARATTERISTICHE:

- La cellula batterica è procariote, priva di nucleo, ma con un nucleotidi (DNA immerso nel citoplasma i nel protoplasto)
- DNA con 1 filamento con doppia elica chiusa.
- Non ha istoni ma proteine con medesima funzione.
- Densità genica elevata 85%, con pochi sprechi, come la mancanza di DNA ripetuto.
- Il genoma non è interrotto da introni ed è organizzato in unità trascrizioni (OPERONI)
- Il numero genico le dimensioni della cellula batterica, riflettono l'autonomia.
- Varità genomica anche nella stessa specie (coli 20 tipi).
- Plasticità elevata data dal endogeno, mentre la restante varia da ceppo a ceppo.

**Operoni:** geni controllati da 1 solo sistema di regolazione (lattosio), attivato solo se necessario scindendo i 2 monosaccaridi del lattosio.

Se attivato permette di dividere i batteri i LAC+ (lattosio come substrato) e LAC- ( fonte energetica).

Operone del triptofano:

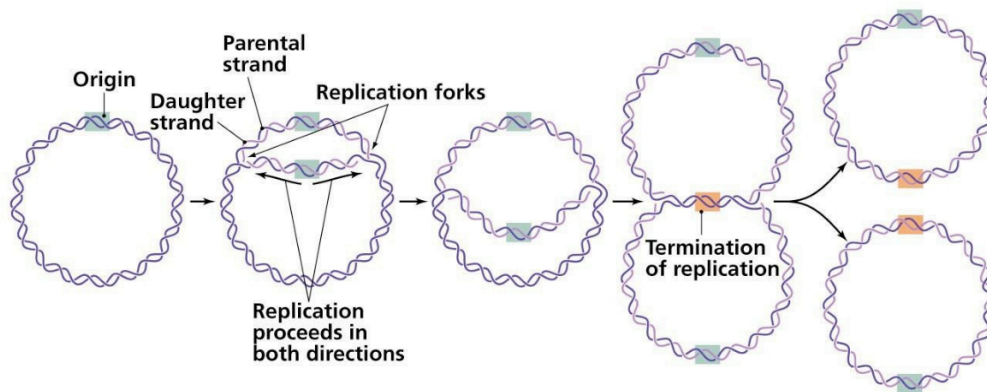


Sempre espresso, ma se scompare il batterio reprime questo operone.

Plasmide: Frammenti DNA circolare extracromosomico, autoreplicante e non fondamentale. Sono trasmessi per coniugazione, passando questa capacità ad un batterio che ne è privo.

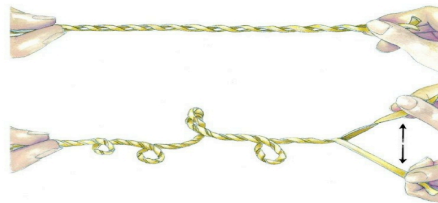
Isole di patogenicità: Contengono info di virulenza e trasmissione

## REPLICAZIONE



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

- Simile alla mitosi, il batterio è avvolto e strozzato fino a separazione in 2 cellule figlie.
- Molto rapida, pochi min.



**DNA batterici** è avvolto, ma viene svolto rapidamente dalla TOPOISOMERASI 2 (Girasi e Topoisomerasi 4), che è bersaglio degli antibatterici (Floroquinoloni), che inibiscono la replicazione dell'acido nucleico, inibendo i due enzimi.

**RNA batterici** nei mitocondri sono messaggeri e ribosomiali, con ribosomi 70S, che permettono agli antibiotici di inibire la sintesi batterica e non quella proteica dell'uomo (80S)

Nei batteri non ci sono compartimenti, quindi trascrizione e traduzione avvengono contemporaneamente nello stesso luogo.

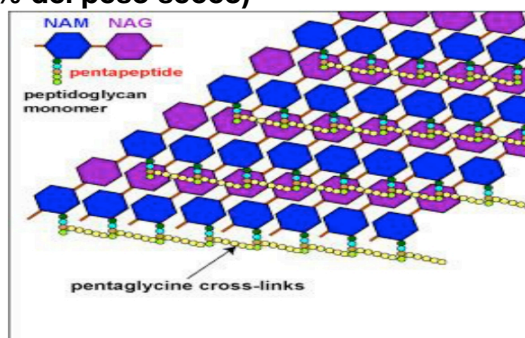
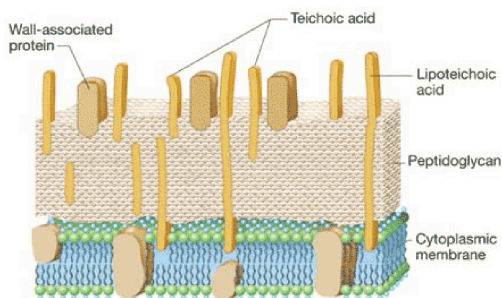
### **FUNZIONI DELLA MEMBRANA CITOPLASMATICA DEL BATTERIO:**

- E' un doppio strato lipidico simmetrico, con proteine non glicosilate e senza steroli, simili a quello eucariotico.
- Avvolge il citoplasma ed è idrofoba selettiva
- Accoglie proteine di trasporto, biosintesi (sintetizza ATP sulla membrana), idrolisi di substrati, traduzione del segnale e movimento.
- Svolge respirazione, fotosintesi che aiuta l'aumento del potenziale di membrana
- Presenta involucri ove si differenziano i batteri Gram+ e Gram—

### **Funzione della parete batterica:**

- Dare una forma
- Dare la carica- (importante per l'antifagocitosi, che permette di fuggire dai fagociti, e anti-completamento, insieme di proteine per la difesa batterica)
- Protezione
- Contiene alcuni antigeni, riconosciuti dal sistema immunitario umano.
- Media il contrasto tra cellula e cellula
- Permette adesione dei fagi, virus che attaccano i batteri
- E' bersaglio di farmaci antibatterici (peptidoglicani) come Betalattamici e glicopeptidi.

## PARETE GRAM+ (40% del peso secco)



2 membrane: Citoplasmatica e Peptidoglicano.

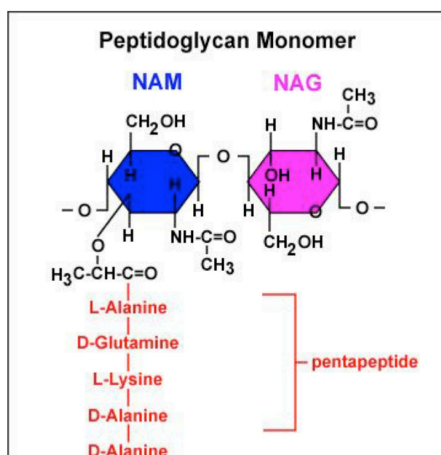
PEPTIDOGLICANO: Formato da una parte glucidica e una peptidica.

-La parte **GLUCIDICA** è formata da 2 amminozuccheri (1 N.Acetilmuramico NAM e 1 N.Acetilglucosamminico. NAG)

-Legati con legame B 1.6 glucosidico

-I dimeri sono legati con legame B 1.4 glucosidico, attaccato al Lisozima (proteina antibatterica) che danneggia la sua stabilità.

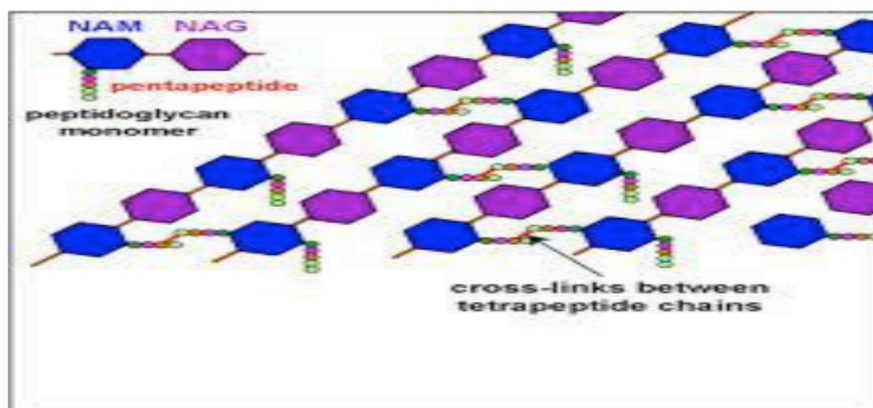
La parte **PEPTIDICA** è formata da un Pentapeptide con 5 aminoacidi.



-Per legare NAM e NAG, ci sono 5 cicline con legame crociato=ponete peptidico, co aminoacido in posizione 3 e l'altro in posizione 4 di un'altra catena.

-Vedo solo 4 Alanine perché PBP, stacca la 5a x ottenere energia necessaria al legame.

## PARETE GRAM-



-Meno compatto e più labile e sottile.

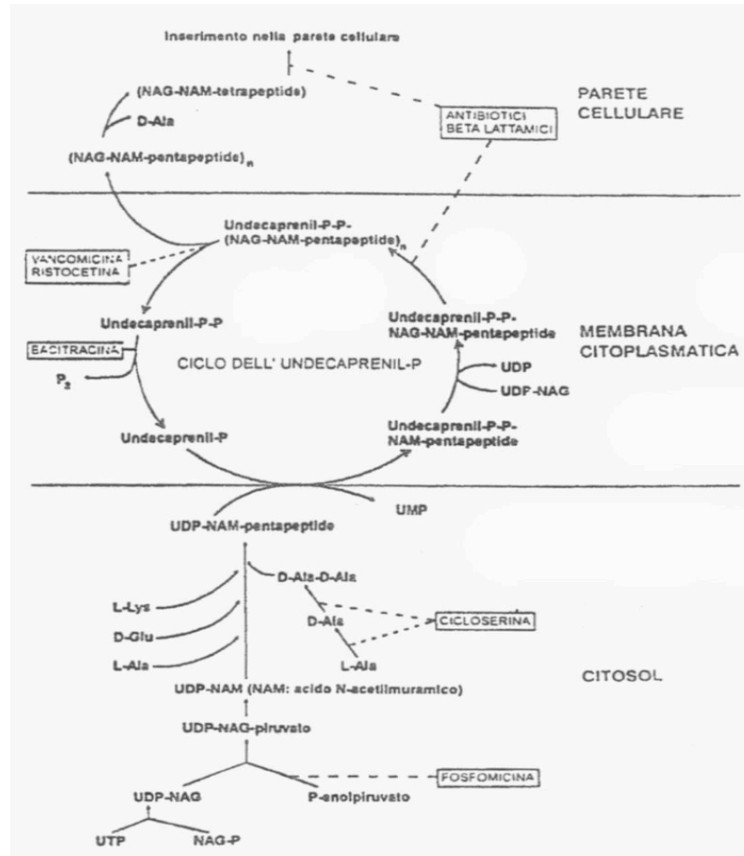
-Ha uno strato in più (membrana esterna)

-Non ha ponte Pentaciclinico, ma legame diretto peptidico tra posizione 3 e 4

## ARCHEA:

- hanno uno **pseudo-peptidoglicano** (non hanno il NAM ma n-acetil talosaminuronico NAT)
- non ci sono D-Aa
- il legame glucosidico tra NAG e NAT è di tipo  $\beta$ 1-3 (e non  $\beta$  1-4)

## SINTESI DELLA PARETE



Enorme dispendio energetico suddiviso in 3 compartimenti diversi (Citosol - Membrana citoplasmatica - parete).

**Citosol:** si forma UDP+NAM a cui si aggiungono aminoacidi= NAM-NAG pentapeptide+ NAG quando passa in membrana citoplasmatica.

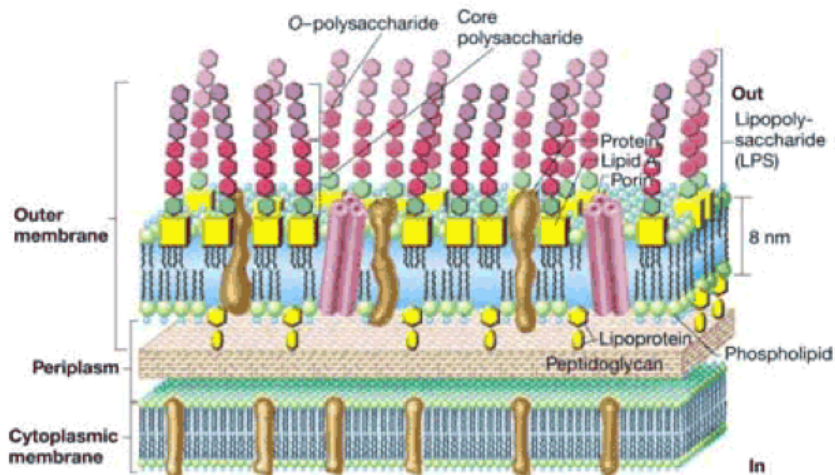
**Parete:** NAM-NAG pentapeptide viene inserito e curato da proteine "Peniciling-binding-proteins" (PBP), ovvero legano la penicillina prendendo il dimero e posizionato nelle maglie dei peptidoglicani legando antibiotici B-lattamici così da arrestare il sistema.

-Rimangono acidi TEICOICI sulla parete del peptidoglicano e LIPOTEICOICI, sulla membrana citoplasmatica. Essi sono polimeri (30u ripetute di alcol polivalenti come il glicerolo).

-Sono sostituiti con acido fosforico a cui si legano:

- 1) Monosaccaridi che danno carica-
- 2) Funzione strutturale
- 3) Lega magnesio che stabilizzano e legano a ioni che compongono la parete
- 4) Sono antigenici riconosciuti dal sistema immunitario
- 5) Fattori di virulenza

## PARETE GRAM-



Più  
quanto  
involucri:

1) Membrana

complessi in  
hanno 3

### citoplasmatica:

- Contiene ioni che forniscono carica-
- Contiene un endotossina tossica per l'uomo
- Permeabilità selettiva per agenti tossici con parte idrofobia per bloccare gli zuccheri ed una idrofila per il passaggio attraverso le Porine

**Porine:** Canali acquosi proteici da cui passano sostanze idrosolubili di varie grandezze e diametri.

I diametri variabili delle porine portano alla protezione batterica eliminando o restringendo i propri canali e impedendo l'entrata del farmaco.

2) Spazio periplasmatico (Peptidoglicano o mureina):

- Controlla le proteine di trasporto
- enzimi idrolitici che degradano le molecole
- enzimi detossificanti (vs farmaci)

### 3) Membrana esterna:

E' bistratificata asimmetrica (1 Fosfolipide rivolto all'interno e 1 Lipopolisaccaride rivolto verso l'esterno(LPS))

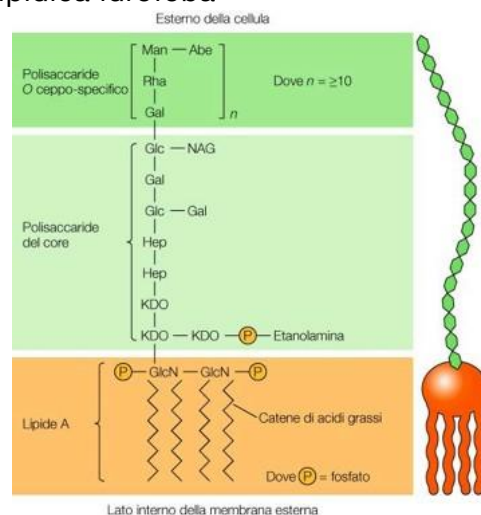
## LIPOPOLISACCARIDE

-Formata da lipidi+saccaridi, che rendono la parete lipidica idrofoba e quella zuccherina idrofila

-Ha 3 componenti:

- Lipide A:**
- disaccaride
  - dimero della cromatina
  - residui di AG (12-16C)
  - fosforilato e disterificato
  - Endotossina con parete tossica

**Core:** oligosaccaridi 6/7C e alcuni insoliti (KDO)



- Antigene O:** -Ha parete più esterna  
-E' riconosciuta dal sistema immunitario  
- E' diversa in ogni batterio  
-Ha una catena lunga di zuccheri identici che si ripetono fino a 40 volte  
-Serve per SIEROTIPIZZAZIONE, ovvero usar sieri per distinguere speciali geni o ceppi es. Coli (100 tipi)  
-Piu lunghi sono gli antigeni e più impediscono la Fagocitosi

**LOS-Lipoligosaccaride:** es. salmonella, sono patogeni che si modificano e accorciano la parte zuccherina rendendola simile ai nostri zuccheri mimetizzandoli.  
Può aggiungere acido Sialico per camuffarsi.

## **STRUTTURE ACCESSORIE**

Strato S: (gram+ e archea)

- superficiale
- struttura proteica e glicoproteica
- forma una parete proteica organizzata in dimeri - trimeri - esameri
- funzione di filtro tramite formazione di pori.

Glicocalice:

- rivestimento glucidico polisaccaridi, sintetizzato in superficie
- quando sottile ha uno strato mucoso e quando spesso ha uno strato detto CAPSULA on antigene K (alginato) non curabile.

Capsula:

- fattore di virulenza
- ruolo antifagocitosi
- fornisce protezione
- essenza zuccherina è antigenica, ovvero stimola il sistema immunitario (es.vaccino che riconosce gli zuccheri delle capsule)
- funzione di adesione al substrato
- resistenza agli antibiotici
- contiene recettori per fagi
- permette l'identificazione del batterio



## STRUTTURE DI MOVIMENTO ATTIVO

I batteri attuano movimenti come: Nuotare, Sciamare, Strisciare o Contrarre.  
Il movimento è fattore di virulenza tramite stimoli esterni.  
Oppure tramite strutture interne come i gradienti, luce, temperatura o flagelli e pili.

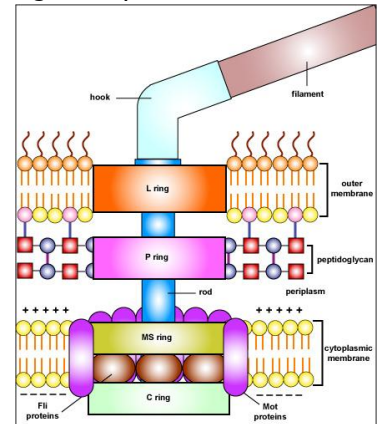
**Flagello:** (Gram+ e gram- e alcuni archea)

- Si muove nei fluidi tramite potenziale di membrana
- Ha filamenti lunghi e vuoti all'interno.
- Sono proteici (flagelline) specie specifiche e antigeniche.

-Una variante è l'**endoflagello** (filamento assiale) nelle spirochete, non libero di muoversi ma sono sotto membrana esterna con movimento a spirale.

**Pili o fimbrie:** (gram-)

- Sono appendici batteriche proteiche (piline)
- non sono flagellari
- funzione di adesione, secrezione di sostanze, interazione tra cellule e movimento.



**(pilo H)**, formato di adesina che si attacca al mannosio.

Pilo1: Escherichia coli uropatogeno (UPEC) responsabile di infezioni urinarie.

-cambia la sua punta di adesina per riconosce altri zuccheri presenti in altre zone corporee, crea un biofilm dove si protegge in stato quiescente per manifestarsi quando opportuno.

**Pilo4:** (pili di gram-)

- sottili e robusti composti di adesina e pilina.
- servono per adesione e creazione di biofilm, ma soprattutto per movimento e arretramento tramite polimerizzazione e depolimerizzazione.

**Pilo sessuale:** Media la coniugazione tramite un plasmide ad un batterio che ne è privo.

È fattore di virulenza

FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA BATTERICA:

1) TEMPERATURA:

2) Psicrofili: 0-25 (optimum 20-25°C) (microrganismi marini)

Mesofili: 20-45°C (optimum 30-37°C) (La maggior parte dei patogeni umani)

Termofili: 45-70°C (optimum 50-55°C)

Ipertermofili  $\geq 70^\circ\text{C}$  (Thermus aquaticus - DNA Polimerasi per la PCR (Taq))

2) OSSIGENO:

1) Aerobi obbligati: solo in presenza di O<sub>2</sub> atmosferico

2) Anaerobi obbligati: solo in assenza di O<sub>2</sub>ossigeno atmosferico

3) Anaerobi facoltativi: sia in condizioni aerobie che anaerobie

4) Microaerofili: crescono in ambienti con ridotta pressione parziale di ossigeno; crescono bene in atmosfera addizionata di CO<sub>2</sub>

5) Aerotolleranti

## BATTERI SPORIGENI E SPORULAZIONE

- Famiglia delle bacillaceae a forma di bastoncino nei gram+, con alcune eccezioni.
  - Sono saprofiti presenti nell'ambiente e causano nell'uomo patologie.
  - Possono trasformarsi in spore, inattaccabili. Sono forme di resistenza e derivano dalla modificazione del batterio e rilasciate come seme. Sono formate da strati protettivi del DNA e vivono nel terreno in stato di quiescenza al fine di formare il batterio quando necessario.
- 2 tipi:** Clostridium anaerobe e I bacillus aerobi/aneerobi facoltativi.

### Sporigeni clinici:

- Bacillus (Anthraxis, che provoca antrace e carbonchio)  
Cereus, provoca tossinfezioni alimentari.
- Clostridium:** Perfringens, Difficile, Tetani e Botulinum

### ANTHRACIS:

- Sporigeno che vive nel terreno come spora. Attacca animali erbivori di grossa taglia provocando il carbonchio. Per l'uomo invece vi sono 3 forme a seconda della zona colpita: Cutaneo - Gastrico - Polmonare.
- E' fattore di virulenza (plasmidi) che contengono le info per codificare la capsula proteica e la tossina plastifica, che essendo multifattoriale citosolica, uccide la cellula, provocando un edema con conseguente rilascio di h<sub>2</sub>o.

### ANTHRACIS CUTANEO: (25% dei casi)

- Attraverso le ferite cutanee, germina facendo rinascere il batterio.
- Bassa letalita', circa 20%
- Esiste il vaccino per i lavoratori più rischio che sono coloro a contatto con animali.

### ANTHRACIS GASTRICO:

- Dovuto a ingestione di cibi con spora che finisce nell'apparato gastro intestinale.
- Letalita che varia dal 20% al 60%
- Provoca necrosi, accumulo di h<sub>2</sub>o, ulcere e diarrea.

### ANTHRACIS POLMONARE:

- E' la forma più grave e fatale, anche se rara.
- Spora che viene respirata e finisce negli alveoli provocando linfadenite emorragica
- Possibile arma bioterroristica.

### BACILLUS CEREUS:

- Tossinfezione alimentare tramite 2 tossine diverse.
- Tossina con effetto emetico:
  - Produce vomito e crampi addominali
  - E' temperatura e acido stabile
  - Si manifesta da 1 a 8h e sparisce in meno di 24h
  - Effetto diarroico e crampi addominali:
  - Produce tossine termolabili.
  - Si manifesta tra 8 e 16h con sintomi per 20/24h

### CLOSTRIDIUM PERFRINGENS: Ha diverse forme:

- 1) **Gangrena gassosa** imionecrosi causata da spora che produce il batterio che produce a-  
Tossina con attacco enzimatico (lecitinasi), degradando fosfolipidi (lecitina) tramite zinco, uccidendo le cellule.
  - 2) **Enterotossina alimentare** che causa crampi addominali, febbre, vomito e diarrea.
- E' termolabile con incubazione di 2-24h e autolimitante in 24h.