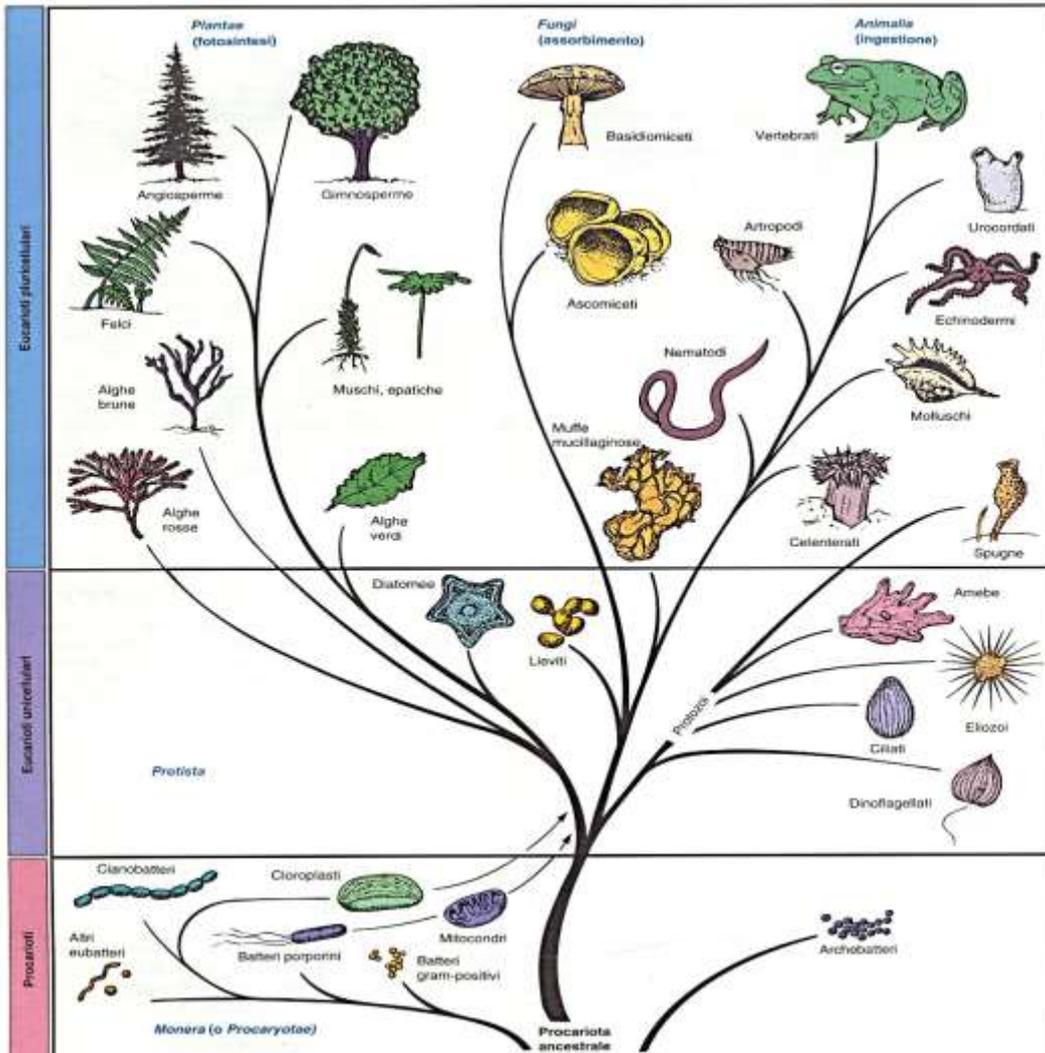


• **PARTIAMO DAL PROGENITORE ANCESTRALE**

C'è un essere progenitore di tutti gli altri esseri viventi: per una serie di circostanze, tra cui la forte disponibilità di energia, è comparsa, da sostanze inorganiche, la prima sostanza organica animata. Questa sostanza è la nostra progenitrice, è la sostanza da cui si sono formati tutti gli esseri viventi



• **DIMENSIONE DEGLI ORGANISMI DELLA MICROBIOLOGIA**

<u>virus</u>	0,05 - 1 micron	<i>(sono visibili solo al microscopio elettronico)</i>
<u>batterio</u>	0,5 - 1,5 micron	<i>(sono visibili anche al microscopio ottico)</i>
<u>globulo rosso</u>	5 micron	
<u>linfocita</u>	5 - 8 micron	
<u>spermatozoo</u>	60 micron	

• GRUPPI FONDAMENTALI DI MICROORGANISMI

<u>ORGANIZZAZIONE CELLULARE:</u>	<u>MICROBI:</u>
<u>Procarioti</u>	Batteri (sono parassiti)
<u>Eucarioti</u>	Funghi, Protozoi (plasmodio della malaria) Alghe
<u>Acellulari</u>	Virus (prioni) (sono esseri viventi ma che necessitano di altri esseri viventi per esprimere la loro capacità di replicarsi)

• DIFFERE. TRA CELLULE EUCARIOTE E CELLULE PROCARIOTE

1. La cellula eucariote non ha parete cellulare (a meno che non sia una cellula vegetale)
2. Appartengono al gruppo degli Eucarioti: le alghe, i funghi, i protozoi, le piante superiori e gli animali
3. sono cellule più piccole rispetto alle cellule eucariote
4. sono anche più semplici, meno complesse
5. la cellula eucariote ha un vero e proprio nucleo (cioè avvolto da membrana nucleare)
6. la cellula eucariote ha i mitocondri (che i batteri non hanno);
presenta Cloroplasti se è una cellula eucariote vegetale
7. la cellula eucariote può avere RER e REL; le cellule batteriche no.
 - Le cellule procariote hanno ribosomi liberi nei quali avviene la sintesi proteica (stessa funzione che hanno quelli della cellula eucariote)
 - sono più piccoli di quelli eucariotici e con diversa struttura
9. la cellula eucariote è la cellula che caratterizza gli organismi pluricellulari (piante, animali, uomo)
10. sia le cellule eucariote sia quelle procariote (batteri) HANNO UN METABOLISMO E SONO ETERTROFE, a differenza delle cellule vegetali che sono AUTOTROFE

• TASSONOMIA DEI BATTERI

I batteri fanno parte del regno dei PROTISTI

Il regno dei protisti è una categoria residuale, artificiosa, una sorta di contenitore per tutti gli organismi non inseribili in altri regni. (Attualmente, anche alla luce di recenti studi si sta cercando di abbandonare tale categoria per seguire criteri più oggettivi)

I batteri si differenziano per:

1. MORFOLOGIA
2. DIMENSIONE
3. CARATTERISTICHE DI COLORAZIONE
4. CARATTERISTICHE METABOLICHE
5. CARATTERISTICHE ANTIGENICHE
6. CARATTERISTICHE GENETICHE

A seconda di queste 6 caratteristiche, si può individuare la seguente classificazione:

1. **Eubatteri** (batteri veri e propri)
2. **Spirochete** (es. *Treponema pallidum*)
3. **Micoplasm** (*M. pneumoniae*)
4. **Rickettsie** (es. *Coxiella burnetii*; *R. prowazekii*)
5. **Clamidie** (es. *Chlamydia Psittaci* e *Trachomatis*)

• **CARATTERISTICHE DELLA CELLULA BATTERICA**

Membrana citoplasmatica	Barriera permeabile in modo selettivo, confine meccanico della cellula, trasporto dei nutrienti e dei prodotti di rifiuto, sito di molti processi metabolici (respirazione, fotosintesi), individuazione dei segnali ambientali per la chemiotassi
Vacuolo gassoso	Galleggiabilità per fluttuare in ambienti acquatici
Ribosomi	Sintesi proteica
Corpi inclusi	Riserva di carbonio, fosfato e altre sostanze
Nucleoide	Localizzazione del materiale genetico (DNA)
Spazio periplasmico	Contiene enzimi idrolitici e proteine di legame per la processazione e l'assunzione dei nutrienti
Parete cellulare	Conferisce la forma ai batteri e protezione dalla lisi in soluzioni diluite
Capsule e strati mucosi	Resistenza alla fagocitosi e aderenza alle superfici
Fimbrie e pili	Attecchimento alle superfici, coniugazione dei batteri
Flagelli	Motilità
Endospora	Sopravvivenza in condizioni ambientali avverse

1. hanno un elevato rapporto superficie/volume (hanno poche robe al loro interno rispetto alla loro dimensione)
2. il passaggio e l'utilizzo dei nutrienti è facile attraverso la loro membrana
3. Sono di piccole dimensioni visibili con il microscopio ottico. ()
4. Non posseggono un vero e proprio nucleo (non hanno la membrana nucleare); posseggono tuttavia del materiale nucleare nel NUCLEOIDE (che è una regione dalla forma irregolare all'interno della cellula che contiene materiale genetico) (solo i globuli rossi sono cellule prive di nucleo).
5. Posseggono il CITOPLASMA che è formato principalmente da H₂O e sostanza in sospensione
6. Sono privi di RER e REL ma posseggono i RIBOSOMI dove avviene la sintesi proteica
7. Non hanno i MITOCONDRI; posseggono invece i MESOSOMI.

Mesosomi

- * Intervengono nella cellula batterica in vari processi riproduttivi e metabolici.
- * Partecipano alla formazione di setti durante il processo di divisione della cellula.
- * Sono associati alla replicazione del materiale nucleare batterico.
- * Sono associati a processi enzimatici che di solito avvengono nei mitocondri (quelli cioè che danno origine ad ATP e quindi a molecole ad alto contenuto energetico)

8. I batteri hanno, in generale, **3 STRUTTURE DIFENSIVE:**

1. PARETE (costante)
2. MEMBRANA (costante)
3. CAPSULA (incostante)

9. I batteri hanno delle strutture in più rispetto alle cellule eucariote:

- Capsula, Flagelli, Meccanismo di Sporulazione e Corpi inclusi sono **strutture INCOSTANTI**
- Parete, Acido Nucleico (+plasmidi), Membrana, Mesosomi e Citoplasma; sono **strutture PRESENTI IN TUTTI I BATTERI**

• **STRUTTURE PRESENTI IN TUTTI I BATTERI**

(Parete, Acido Nucleico, Membrana, Mesosomi e Citoplasma)

1. **Parete cellulare (1° STRUTTURA DIFENSIVA)**

- ◆ Una caratteristica fondamentale della cellula dei procarioti è il fatto che questa cellula abbia una membrana esterna, diversa dalla membrana cellulare: la PARETE CELLULARE.
- ◆ La parete cellulare è simile a quella che è presente sulle cellule vegetali, dove serve a dare forma e struttura alla cellula: rappresenta l'esoscheletro dei batteri
- ◆ Nei batteri è una struttura di rivestimento cellulare posta all'esterno rispetto alla membrana e più internamente rispetto ad un'altra struttura chiamata CAPSULA.
- ◆ È una struttura ANTIGENICA, cioè è una struttura che è in grado di stimolare il sistema immunitario.
Questa è una capacità che viene usata molto spesso per il riconoscimento degli organismi
- ◆ Ha funzione
 1. di supporto strutturale
 2. di protezione dovuta alla sua rigidità (la presenza della parete protegge la cellula da eventuali lisi osmotiche).

La parete si oppone all'aumento di volume che, per osmosi, subirebbe la cellula se venisse messa in H₂O distillata, o in tutte le soluzioni IPOTONICHE: la parete, essendo rigida impedirà l'ingresso di H₂O dopo un certo livello impedendo così l'esplosione della cellula procariote: ECCO PERCHE' I BATTERI IN ACQUA NON ESPLODONO.

Se invece mettessi il batterio in una soluzione IPERTONICA, sempre per un fenomeno osmotico, ci sarebbe una fuoriuscita di H₂O dalla cellula procariote verso la soluzione che sta all'esterno. In questo caso, la PARETE CELLULARE, non si opporrebbe alla fuoriuscita di liquido e quindi non sarebbe più in grado di proteggere il batterio da morte per disidratazione.

(infatti conservare gli alimenti sotto sale è un'ottima tecnica proprio perchè il sale, essendo ovviamente una soluzione ipertonica, fa disidratate il batterio, uccidendolo)

- ◆ In base al tipo di parete che un batterio presenta, (maggiore o minore quantità di lipopolisaccaridi) si identificano due classi di batteri:

Gram+

Gram-

(è costituita nei GRAM- dal 1 al 10% di peptidoglicano e nei GRAM+ per il 40-80%)

Questi batteri differiscono molto dal punto di vista della struttura parietale e, anzi, la differente risposta alla COLORAZIONE DI GRAM è proprio conseguenza diretta delle differenze dal punto di vista della parete.

1. Parete cellulare dei GRAM+ :

1. spessa
2. rigida
3. composta da strati di peptidoglicano e altri polimeri con potere antigenico

2. Parete cellulare dei GRAM- :

1. sottile
2. composta solo da peptidoglicano
3. i gram- sono protetti da capsula (che è ricca di fosfolipidi)

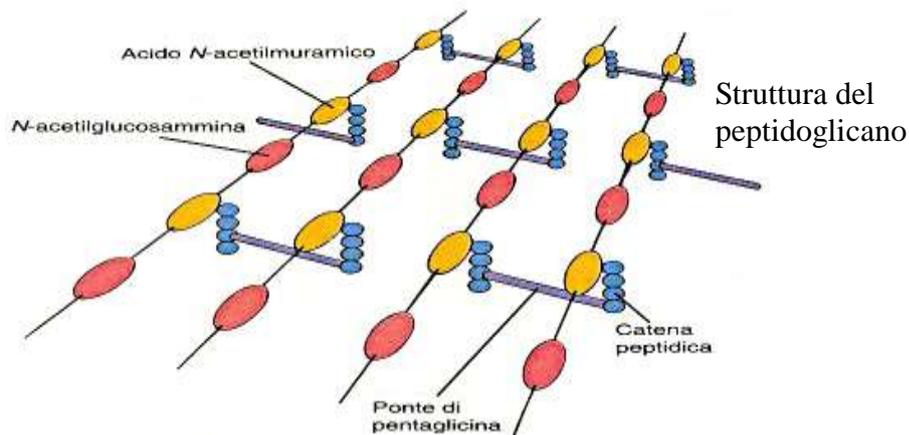
- ◆ Ha una struttura POLIMERICA chiamata:

MUREINA o PEPTIDOGLICANO o MUCOPROTEINA

- è costituita da polimeri molto grandi: fatti da 3 unità:

1. acetilglucosammina (polimero)
2. acido acetilmuramico (polimero)
3. peptide costituito da 4 o 5 amminoacidi (ponte di proteine che lega i polimeri)

- questa struttura polimerica, è una struttura A RETICOLO (quindi una struttura rigida che può dunque dare forma ai batteri)



- ◆ Nella parete dei GRAM- (e solo su quella dei gram-) sono presenti delle ENDOTOSSINE chiamate anche FATTORI CHE STIMOLANO LA FEBBRE o PIROGENI

2. Nucleo dei procarioti e acido nucleico (batteri)

Il contenuto dell'acido nucleico non è avvolto da una membrana, come lo è nelle cellule eucariote, ma è una struttura chimica che è per la stragrande maggioranza dei batteri ad un unico filamento circolare (cromosoma batterico) e NON E' AVVOLTA DA MEMBRANA NUCLEARE (**nucleoide**)

Le nostre cellule hanno un numero di cromosomi pari a 46; il materiale nucleare batterico, invece, ha UN UNICO CROMOSOMA (costituito da un'unica elica di DNA) e comprende:

1. il suddetto cromosoma batterico
2. elementi genetici trasponibili
3. DNA fagico
4. plasmidi

L'acido nucleico batterico, comunque, assume la stessa identica funzione di qualsiasi altro acido nucleico delle altre cellule viventi:

codificare per la formazione delle proteine e da questo, poi, organizzare il sistema di regolazione di tutta la cellula

→ Plasmidi

- I batteri possono veicolare nel loro citoplasma piccole porzioni di materiale genetico extracromosomiale circolare: i PLASMIDI.
- I plasmidi sono costituiti da porzioni di DNA a doppia elica che possono replicarsi ma sono materiali genetici assestanti e garantiscono, a chi li possiede, notevoli vantaggi in particolari condizioni di crescita
(alcuni di questi plasmidi codificano per un enzima che distrugge la penicillina:
la penicillinasi)
- Il plasmide ha autonomia rispetto al cromosoma batterico infatti può replicarsi autonomamente e rimanere nella cellula batterica per numerose generazioni.
- Contengono da 50 a 100 geni.
- Le informazioni che veicolano codificano per determinate caratteristiche non essenziali per la sopravvivenza della cellula; un batterio, infatti, sicuramente ha il cromosoma ma non necessariamente deve avere il plasmide
- Le informazioni che vengono codificate da un plasmide sono, seppur un numero significativo, numericamente molto inferiori rispetto a quelle codificate dal cromosoma batterico.
- Se un batterio dovesse perdere il suo plasmide, quella cellula batterica non perderà le sue caratteristiche originali. (cioè: la perdita del plasmide non inefficia la capacità della cellula batterica di moltiplicarsi e le sue capacità di metabolismo)
- I plasmidi sono da 1/20 a 1/100 della dimensione di un cromosoma.

- Alcuni plasmidi possono integrarsi nel cromosoma in tal caso prendono il nome di **episomi**.
In queste condizioni, non si replicano più in modo autonomo, ma in sincronia con il cromosoma stesso.
- Un episoma può separarsi dal cromosoma e tornare a replicarsi autonomamente sotto forma di plasmide.

- I plasmidi **possono aumentare il potere patogeno dei batteri** (potendo essere

fattori di invasione, o di produzione di tossine)

alcuni plasmidi, essendo costituiti da geni che codificano per determinate proteine, possono:

1. far diventare resistenti a determinati antibiotici batteri che non lo erano (***meccanismo della coniugazione***)
2. aumentare la virulenza dei batteri (alcuni plasmidi codificano per tossine o per fattori di invasione)
3. intervenire sul metabolismo di alcuni batteri

→ ***processi di acquisizione di un plasmide***

La maggior parte dei batteri patogeni possono scambiare materiale genetico andando incontro a fenomeni di ricombinazione genica. Innanzi tutto, sappiamo che i batteri si replicano per scissione binaria, tecnica in cui le due cellule figlie conterranno lo stesso identico DNA della cellula madre.

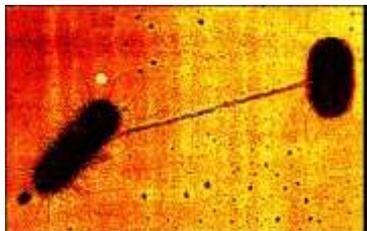
La moltiplicazione batterica per scissione binaria avviene tranquillamente a prescindere che ci sia o meno la presenza di 1 o + plasmidi.

Ci sono 3 sistemi che permettano ad una cellula di acquisire un plasmide dall'esterno:

1. CONIUGAZIONE
2. TRASFORMAZIONE
3. TRANSDUZIONE

✓ CONIUGAZIONE

- scambio di materiale genetico da un **batterio donatore** ad un **batterio ricevente** attraverso il pilo sessuale che crea un ponte tra i due.
- i due batteri devono essere compatibili (escherichia coli – escherichia coli)
- il plasmide, prima di essere donato, si replica e una copia rimarrà alla cellula donatrice mentre l'altra copia verrà donata al batterio ricevente.
- Il processo di coniugazione, avviene solo se la cellula possiede un particolare gene che codifica per il pilo sessuale. (il pilo sessuale, infatti, è diverso da tutti gli altri pili!!)
- La tecnica di coniugazione è importante perchè è quella che consente a microrganismi che non erano resistenti ad un determinato antibiotico, di diventarlo.

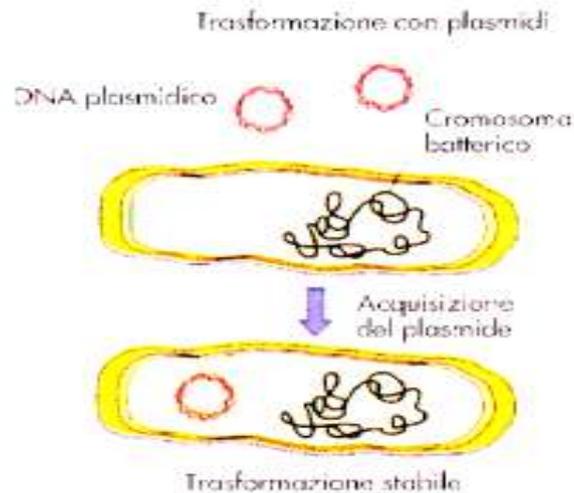


✓ TRASFORMAZIONE

- acquisizione di nuovi marcatori genetici attraverso l'incorporazione di DNA esogeno (cioè: la cellula che possiede il plasmide, lo elimina nell'ambiente; ci sarà poi un batterio che lo fagociterà dentro di sé e lo ingloberà nel suo citoplasma)
- il DNA inglobato dal batterio per fagocitosi può avere un duplice destino:
 1. o originerà il plasmide vero e proprio (cioè autonomo e che codifica per delle proteine (ad esempio delle tossine))
 2. oppure si integrerà nel cromosoma batterico (**episoma**) e seguirà la sua moltiplicazione per poi eventualmente staccarsi dal cromosoma stesso e

- dare origine al plasmide con tutte le sue caratteristiche proprie
- Il batterio ricevente deve essere competente (deve avere un'affinità col batterio donatore)

illustrazione di trasformazione con generazione di plasmide autonomo



✓ TRASDUZIONE

- ricombinazione genetica attraverso un'infezione fagica (cioè: il batteriofago (virus che infetta i batteri) trasmette il suo acido nucleico nella cellula batterica che ha infettato, insieme al plasmide che aveva recuperato quando aveva infettato un altro batterio contenente quel plasmide)
- quando il fago infetta il batterio possono avvenire 2 tipi di azioni:
 1. ciclo litico (ciclo produttivo con moltiplicazione virale attiva)
 - * infezione da parte di fagi virulenti (che si moltiplicano velocemente dentro la cellula batterica) e conseguente lisi cellulare con liberazione dei virus.
 - * La trasmissione del plasmide non avviene
 2. ciclo lisogeno (ciclo non produttivo senza moltiplicazione virale)
 - * infezione con fagi temperati e integrazione del genoma virale (plasmide compreso) con il genoma batterico senza lisi cellulare.
 - * Questo è il modo in cui avviene la trasmissione del plasmide (il batteriofago infetta la cellula batterica senza creargli danno e integrando il plasmide nel cromosoma batterico. Il plasmide poi diventerà plasmide vero e proprio.)
 - * Quando un batterio viene infettato da un fago, non può essere infettato da altri fagi successivamente alla prima infezione, quindi non ci possono essere plasmidi diversi contemporaneamente.

• **RESISTENZA BATTERICA**

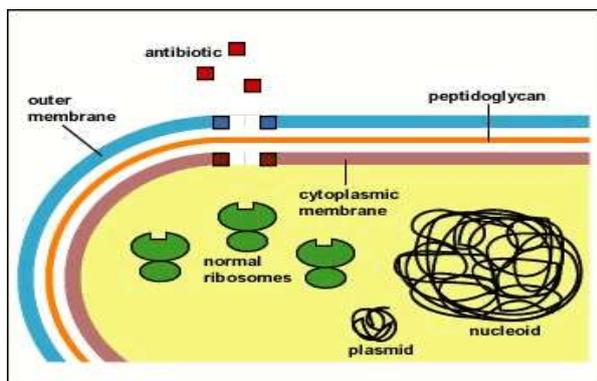
La cellula batterica produce enzimi che detossificano o inattivano gli antibiotici

L'uso della PENICELLINA e poi di tutti gli altri antibiotici trovati nel tempo ha portato i batteri a reagire creando delle resistenze agli antibiotici:

(*Penicillinasi: enzima che inattiva la penicillina*)

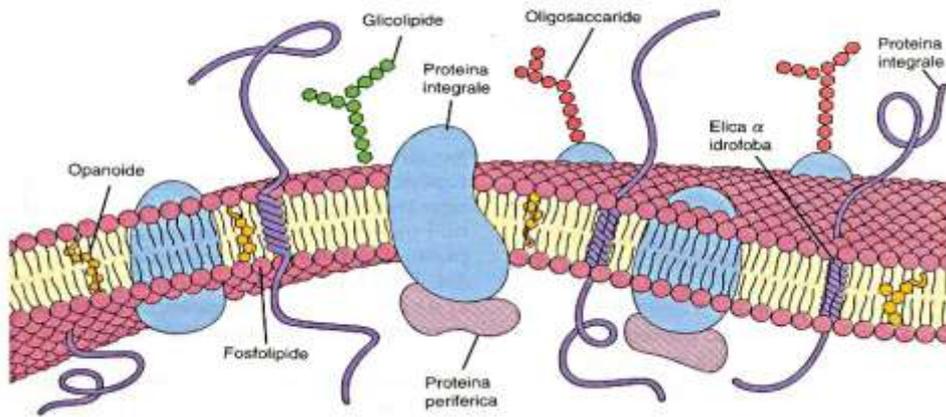
- Lo *stafilococco aureo*
 - 98% di resistenza nei confronti della penicillina,
 - 32% con la meticellina (farmaco alternativo alla penicillina).

- *Leptococco fecalis*
 - 70% di resistenza con la cistofosicina (farmaco utilizzato nelle infezioni urinarie)
 - 70% con l'anticillina.
 - *Lo streptococco pneumonie* (principale responsabile delle broncopolmoniti, e delle meningiti)
 - 10% di resistenza verso il farmaco delle tetracicline
 - 37% di resistenza alle penicilline.
- Ci possono essere 2 tipi di resistenze in un batterio:
 1. resistenza plasmidica
 - è una resistenza trasferibile che può essere trasferita attraverso:
 - un fenomeno di coniugazione
 - un fenomeno di trasformazione
 - un fenomeno di trasduzione (con fago)
 2. resistenza cromosomica
 - è una resistenza non trasferibile perchè il cromosoma non può essere trasferito



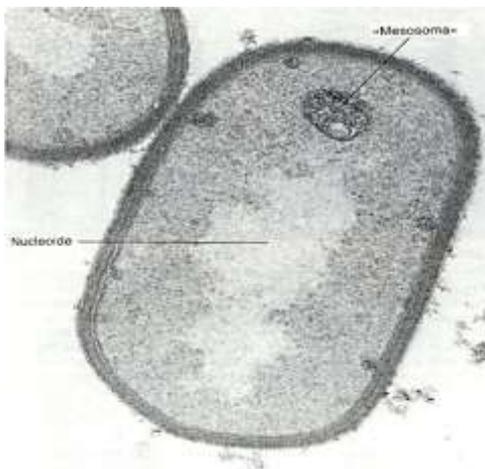
3. Membrana citoplasmatica (2° STRUTTURA DIFENSIVA)

- ✓ La MEMBRANA CITOPLASMATICA è una struttura semi permeabile. Funge da protezione e permette il trasporto di sostanze regolando i rapporti fra interno ed esterno della cellula.
 - Il trasporto può essere, come in tutte le cellule, passivo o attivo.
- ✓ Nella membrana avvengono tutte le funzioni vitali del batterio ed è sede di parecchi enzimi: ad esempio viene controllata la DIVISIONE CELLULARE e tramite il **mesosoma** avviene la corretta ripartizione del DNA che è per la stragrande maggioranza dei batteri ad un unico filamento circolare e non è racchiuso da membrana (**nucleoide**)
- ✓ E' formata da un doppio strato di fosfolipidi con delle proteine in mezzo:
 - i lipidi e le proteine sono nella proporzione di 1:5 e costituiscono il 10-26% del peso secco batterico. La struttura, abbiamo detto, è costituita da un doppio strato di fosfolipidi. In più però ci sono anche catene di acidi grassi, orientate in modo perpendicolare al piano della membrana e due strati esterni di proteine globulari.
- ✓ Danni a questa membrana, da parte di agenti chimici o fisici, possono provocare la morte della cellula batterica.
- ✓ È una struttura fondamentale nel metabolismo dei batteri.



4. Mesosomi

- ✓ Il mesosoma è una particolare organizzazione della membrana
- ✓ Svolge 2 funzioni:
 1. è la sede dei meccanismi di produzione di energia
 2. partecipa alla divisione cellulare (partecipa alla formazione dei setti durante il processo di divisione cellulare)
- ✓ Sono associati in maniera complicata al materiale nucleare batterico ed alla sua replicazione.
- ✓ Sono associati a processi enzimatici (hanno la funzione dei mitocondri)



5. Citoplasma

- Il citoplasma batterico è più semplice delle di quello delle cellule eucariote.
- Contiene proteine ed enzimi per il metabolismo; acidi nucleici (plasmidi) ; carboidrati, lipidi; DNA; ribosomi (+ piccoli) ed **inclusioni citoplasmatiche** (ribosomi).
Alcune proteine batteriche contenute nel citoplasma sono anche tossine (costituiscono un meccanismo di patogenicità legato alla sintesi proteica batterica.)
- Nel CITOPLASMA vi sono i PLASMIDI che sono piccole molecole di DNA con informazioni genetiche anche importanti.

• STRUTTURE INCONSTANTI

(Capsula, Limo, Flagelli, Pili o Fimbrie, Meccanismo di Sporulazione e Corpi inclusi)

1. Capsula batterica (3° STRUTTURA DIFENSIVA)

Alcuni batteri hanno un ulteriore involucro esterno, la CAPSULA.

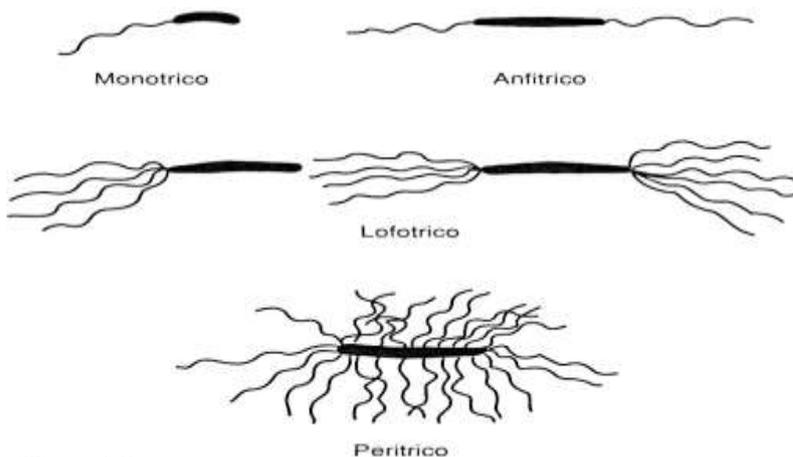
- Con il termine CAPSULA BATTERICA si tende ad individuare una serie di strutture che rivestono alcune cellule batteriche;
- tutte le componenti capsulari, vengono a posizionarsi sull'esterno rispetto alla parete cellulare, e spesso alcune componenti della parete stessa contribuiscono alla formazione della capsula, perciò la capsula è spesso tenacemente aderente alla parete
- la capsula ha funzione di difesa
- E' una struttura polisaccaridica lassa e viscosa
- tende ad impedire l'ingresso del colorante (ragione, questa, per cui la colorazione ALCOOL-ACIDO RESISTENTE si fa a caldo: il calore dilata le capsule di alcuni batteri e, in questo modo, fa passare il colore)
- aumenta la resistenza alla fagocitosi **quindi diventa un fattore di virulenza**
- in vitro è spesso assente, mentre è presente dal vivo e in provetta.

2. Limo

- ◆ E' una massa viscosa che circonda la cellula.
- ◆ È formato anch'esso da sostanze organiche.
- ◆ Ha la funzione di meccanismo di adesione della cellula batterica alle nostre cellule (è uno dei fattori di patogenicità e aumenta la virulenza)

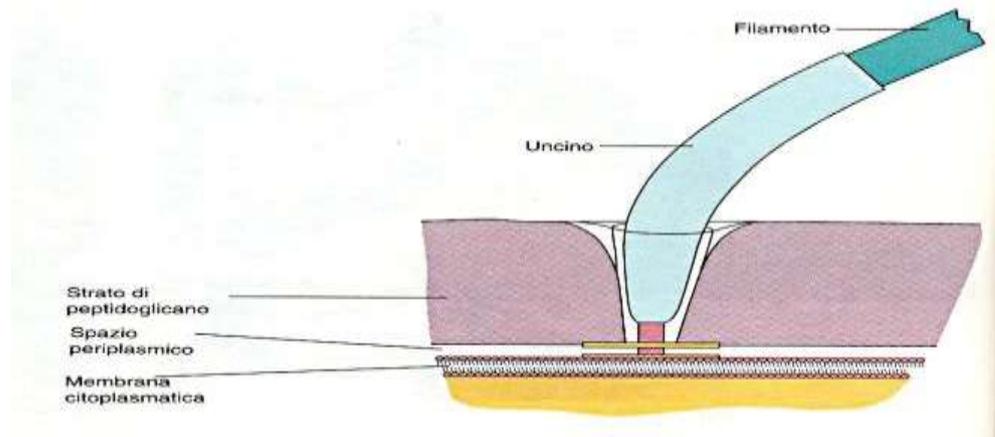
3. Flagelli

- × I flagelli sono elementi proteici che servono al movimento della cellula.
- × Rispetto al corpo cellulare i flagelli possono disporsi nel modo seguente:



DISLOCAZIONE DEI
FLAGELLI NELLE
CELLULE
BATTERICHE

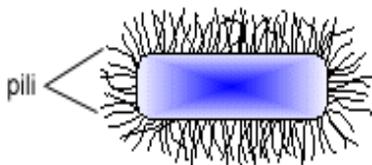
- × I flagelli hanno degli anelli che si vanno ad incernierare tra la **membrana** e la **parete cellulare (peptidoglicano)**. Questo sistema permette ai flagelli di avere una struttura rigida nella quale poter trasferire il movimento riuscendo così a muovere il batterio.



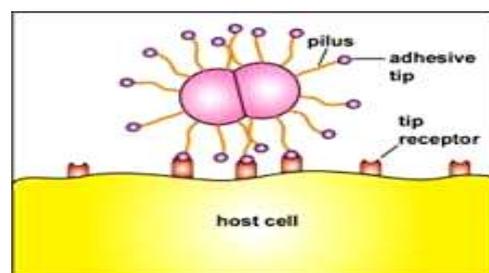
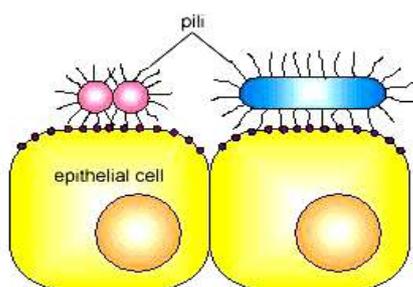
- × Normalmente i Flagelli sono presenti nei batteri Gram-.
- × I Flagelli stessi sono ANTIGENI
(sono quindi in grado di stimolare la formazione di anticorpi)

4. Pili o Fimbrie

- ✓ Sono protezioni esterne filamentose.
- ✓ Sono più piccole dei flagelli.
- ✓ Sono appendici di fissazione ed, in alcuni casi, sono destinati alla coniugazione batterica.
- ✓ Sono strutture proteiche
- ✓ Sono fattori di virulenza
- ✓ Si trovano a centinaia intorno al batterio e favoriscono l'adesività (nomi alternativi: lectine, evasine, aggressive)



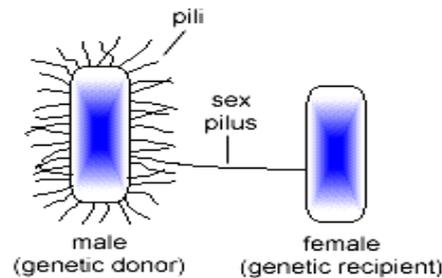
- ✓ Come fattore di adesività le punte delle fimbrie contengono delle proteine (*lectine*) che legano specifici zuccheri (e.g., mannosio)
- ✓ **Impediscono la fagocitazione quindi sono fattori di Patogenicità**



- ✓ Attraverso il pili, in particolare il PILO SESSUALE, possono avvenire degli scambi

genetici fra batteri molto simili tra di loro.

- Il PILO SESSUALE è un pilo che si è specializzato secondo una codifica precisa contenuta nell'acido nucleico batterico.
- Il pilo sessuale fa da ponte tra una cellula batterica ed un'altra: crea un'unione.
- Il pilo sessuale si può definire come una sorta di ponte cavo attraverso il quale passano delle informazioni mediante l'acido nucleico (DNA) (*si veda anche il meccanismo di acquisizione dei plasmidi: coniugazione*)



5. Meccanismo di sporulazione

- La spora è una struttura protettiva presente in particolare nei batteri gram+.
- Permette al microrganismo di sopravvivere in condizioni difficili nell'ambiente esterno.
- Le spore del *microrganismo del tetano*, una volta introdotte con una ferita, passano da **forma sporigena** a **forma vegetativa** o **stato vegetativo** (tornano in forma vegetativa quando rientrano in contatto con un ambiente idoneo)

stato vegetativo: situazione di attiva moltiplicazione e metabolismo del microrganismo
(concetto ripreso dopo quando parliamo dei protozoi: forma trofozoita)

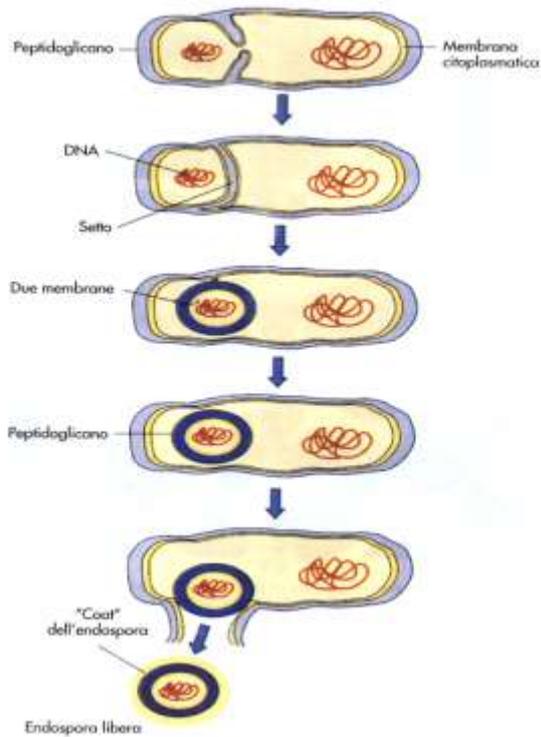
- La spora è una forma di silenzio dal punto di vista metabolico e replicativo, è come una specie di ibernazione; rappresenta, inoltre, una forma di resistenza batterica importante.
- Le spore resistono al calore anche fino a temperature che raggiungono valori di 100-110°C (motivo per cui durante le sterilizzazioni si devono raggiungere tali T°)
- La spora contiene:
 1. una copia completa del cromosoma batterico (condizione senza la quale non riuscirebbe a trasformarsi in fase vegetativa)
 2. concentrazioni minime di proteine essenziali e di ribosomi (strutture nelle quali avviene la sintesi proteica)
 3. un'alta concentrazione di ioni Ca⁺ legati all'acido dipicolinico (che è il componente fondamentale dei rivestimenti delle spore)
- La spora ha 3 rivestimenti:
 1. Membrana
 2. Parete
 3. Teca sporale(- è molto rigida e poco permeabile;
- protegge il materiale nucleico della spora)
- La spora, alle volte, può rimanere dentro la vecchia struttura cellulare che avrà, quindi, solo la "funzione" di dare una forma particolare alla spora. Infatti, in questo caso, la vecchia

- struttura cellulare non conterà più nulla e diventerà solo una sorta di adesività morta
- ci sono batteri sporigeni non patogeni e patogeni.

Esempi di batteri sporigeni patogeni:

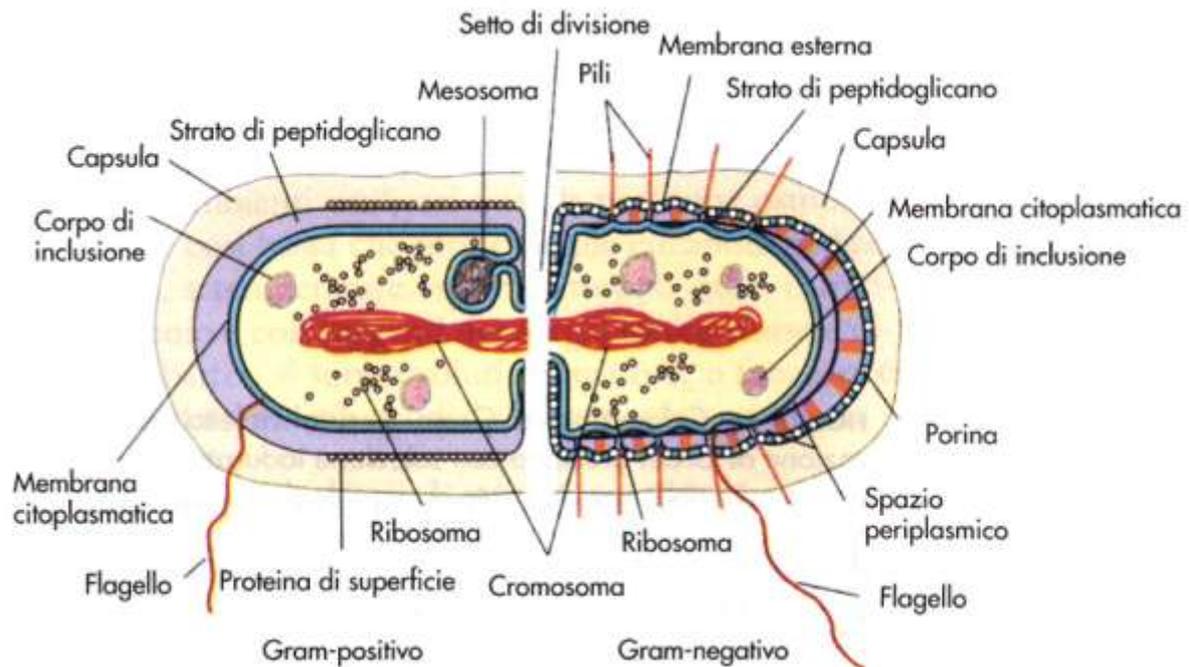
1. clostridium perfringens
2. clostridium tetanii
3. clostridium butulinico

- Il processo di sporulazione è reversibile



Processo di sporulazione

1. cellula in fase vegetativa con contenuto di acido nucleico
2. un po alla volta, i diversi processi che si formano (duplicazione del materiale genetico della struttura cellulare del microrganismo; ecc), portano alla formazione della **teca sporale** che rimarrà dentro la vecchia struttura del microrganismo e che avvolgerà l'acido nucleico copiato.
3. Un processo di attivazione farà tornare il batterio, una volta che troverà le condizioni ottimali, dalla fase sporagica a quella vegetativa uscendo dalla teca sporale attraverso la ESO SPORULAZIONE (dettata interamente dal acido nucleico della spora).
4. Attraverso la eso sporulazione il microrganismo ritorna alla fase vegetativa, cioè alla fase di attiva moltiplicazione.



• FORMA DEI BATTERI

Abbiamo visto che la PARETE serve a dare forma e struttura alla cellula ed è proprio grazie alla loro parete rigida che è possibile individuare morfologicamente il tipo di batterio in esame.

Cocchi: (*lo staphylococcus aureus produce pus nelle ferite chirurgiche*)

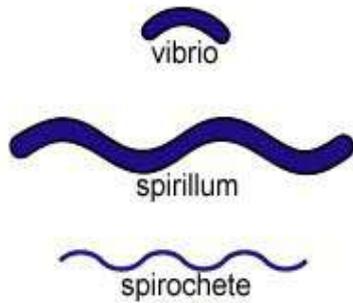
1. 0,5-1 μm ,
2. sferici o ovali,
3. con aspetti diversi secondo il piano di divisione:
 - diplococco,
 - tetraedo,
 - sarcina,
 - a catena,
 - a grappolo

Bacilli: (*salmonella: è un bacillo gram-*)

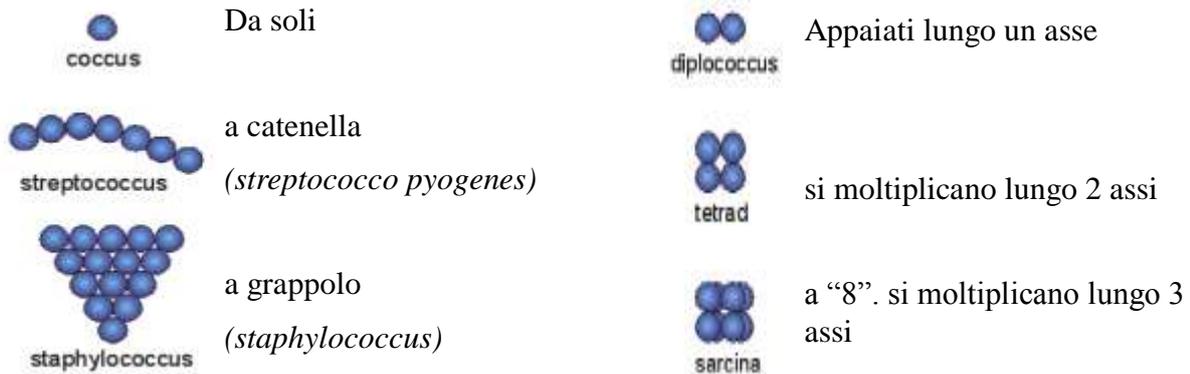
1. 0,5-1 μm 1-4 μm ,
2. cilindrici, singoli o a catena, ovali (cocco-bacilli)

Spirilli: (*treponema pallido: è una spirocheta che produce la sifilide*)

1. 1-100 μm ,
2. a forma di virgola (**vibrione**)
3. rigido e spesso (**spirillo**)
4. a spirale flessibile (**spirocheta**)



• Tipologie di cocchi distinte in base alla replicazione



• COLORAZIONE DEI BATTERI

- I batteri non sono, di norma, pigmentati.
- L'immagine che si avrebbe dall'osservazione di un batterio non pigmentato al microscopio ottico, sarebbe solo quella del bordo della sua parete.
- Di conseguenza i batteri si osservano al microscopio ottico previa idonea colorazione.
- I coloranti che vengono usati in batteriologia, colorano il citoplasma.
- La diversità di risposta alle colorazioni dipende essenzialmente da 2 fattori:
 1. **dalla composizione della parete**
(per la colorazione di gram)
 2. **dalla presenza della capsula** (struttura aggiuntiva all'esterno della parete)
(per la colorazione acido alcool resistente)
- Ci sono 2 tipi di colorazioni: SEMPLICI e DOPPIE
 1. Colorazioni semplici:
adottano un solo tipo di colorante che è in grado di pigmentare il citoplasma della cellula batterica
 2. Colorazioni doppie:
adottano 2 coloranti. (COLORAZIONE DI GRAM)

■ Colorazione di GRAM

- E' la colorazione più usata in batteriologia.
- É talmente usata che la distinzione maggioritaria fatta tra i batteri fa riferimento a questa colorazione:

batteri gram+ e bateri gram-

- Cominciamo col dire che la colorazione di gram è indipendente dalla forma che il batterio assume.
- Questo tipo di colorazione è utile per continuare il processo di riconoscimento del batterio analizzato al fine di identificarlo.
- La colorazione di gram, è interessante, oltre che per riconoscere la morfologia dei batteri e per la suddivisione degli stessi in gram+ e gram-, anche per la **scelta dell'antibiotico da utilizzare per una determinata patologia.**
(uno stesso antibiotico, infatti, potrà agire o sui gram+ o sui gram-; non su entrambi.)
- I 2 coloranti usati nella colorazione di gram (che è una colorazione doppia) sono:
 1. uno di colore viola (**violetto di genziana**)
 2. uno di colore rosso (**fucsina basica**)
- I preparati batterici vengono dapprima colorati con **violetto di genziana**, decolorati con solventi organici quali **alcool etilico** e successivamente contro colorati con **fucsina basica**.
- I batteri che **resistono all'azione del solvente e rimangono viola sono indicati come Gram⁺**, quelli che **vengono decolorati e assumono il colore rosso sono indicati come Gram⁻**.

PROCEDURA

1. Applicare il materiale d'esame: liquidi biologici, essudati, pus, colture solide o liquide, su un vetrino portaoggetti sgrassato.
2. Ricoprire con la soluzione violetto di genziana per 1 minuto.
(*la cellula verrà colorata di viola*)
3. Decolorare con l'alcool etilico.
(*la cellula ha perso il suo colore*)
4. Ricoprire con fucsina basica da 10 secondi a 1 minuto.
(*la cellula si colora di rosso*)
5. lasciare asciugare (anche con l'aiuto di carta bibula).
6. Osservare al microscopio.
(*quando si aggiunge la Fucsina Basica (che è rossa) chi si era precedentemente decolorato con l'alcool etilico si colorerà di rosso; chi non si era decolorato non si renderà permeabile alla fucsina e rimarrà colorato in viola*)

→ Risultati

Batteri GRAM-POSITIVI

BLU-VIOLETTO

Batteri GRAM-NEGATIVI

ROSSO-ARANCIO

- Quindi i **BATTERI GRAM⁺** sono quei batteri che assumono il colore violetto perchè trattengono il colorante (cristalvioletto o violetto di genziana) per la presenza di “involucro cellulari” poco permeabili:
una caratteristica dei batteri gram+ è che sono loro di solito a fare godere del processo di sporulazione
 - *es: stafilococchi; streptobacilli; diplococchi*
- I **BATTERI GRAM⁻** sono quei batteri che si decolorano con l'alcool e assumono il colore rosso della colorazione successiva (fucsina basica)
una caratteristica dei batteri gram- è che di solito solo loro a possedere flagelli
 - *es: neisserie, bacilli, vibrioni*

- L'alcool agisce in maniera diversa nei confronti dei batteri, a seconda della composizione della loro parete:
 - I BATTERI GRAM + hanno un contenuto di grassi più basso rispetto ai gram- e quindi subiscono l'azione dell'alcool (che è quella di fare da solvente nei confronti dei lipidi) molto più lentamente. Conseguentemente a questo fatto, si genererà un buco sulla loro parete molto più lentamente e il colorante violetto rimmarrà all'interno di essa.
 - I BATTERI GRAM – hanno una parete ricca di lipidi e quindi l'alcool (che agisce sempre da ottimo solvente per le sostanze lipidiche) riuscirà a fare breccia più rapidamente rispetto al tempo impiegato per fare il buco sulla parete dei gram+ (che, invece era povera di lipidi). Quindi entrerà all'interno della cellula ed estrarrà il colore viola che quindi verrà poi sostituito dal rosso della fucsina basica.

2. Parete cellulare dei GRAM+ :

4. spessa
5. rigida
6. composta da strati di peptidoglicano e altri polimeri con potere antigenico

3. Parete cellulare dei GRAM- :

1. sottile
2. composta solo da peptidoglicano
3. i gram- sono protetti da capsula (che è ricca di fosfolipidi)

- La diversa struttura condiziona l'attività dei chemioterapici (antibiotici) utilizzati per inibire o uccidere i batteri patogeni

➔ **batteri gram- di interesse medico:**

1. Enterobatteri:
 - * *escherichia coli*
 - * *salmonelle*
 - * *shigelle*
 - * *yersine*
 - * *klebsielle*
2. Compilobacter
3. Helicobacter:
 - * *helicobacter pilori*
4. Brucelle; Bordetelle (*pertosse*); Legionelle; Pseudomonas
5. Neisserie (*gonorrea e meningite*)
6. Vibrioni:
 - * *vibrione del colera*
7. pasteurelle:
 - * *pasteurella (peste)*
 - * *haemophilus influenzae*

➔ **batteri gram+ di interesse medico:**

1. Micrococchi; Enterococchi; Stafilococchi; Streptococchi; Clostridi; Corynebacteri (*difterite*); Lattobacilli; Listerie
2. Spirochete
 - * *treponema pallidum (sifilide)*
 - * *leptospira*

* borrelia

■ Colorazione ALCOOL ACIDO RESISTENTE

- I batteri acido alcool resistenti, sono un gruppo più ristretto
- In particolare si notino i Micobatteri
 - *(tra cui il batterio della tubercolosi e quello della lebbra)*
- I batteri alcool acido resistente si colorano di rosso dopo una colorazione ACIDO ALCOOL RESISTENTE.
- La colorazione ACIDO ALCOOL RESISTENTE , è più utile rispetto alla colorazione di gram e quindi, in un certo senso, più importante. Essa infatti, essendo rivolta solo a quei microrganismi sensibili a questa colorazione, è usata in maniera più frequente per finalità diagnostiche.

PROCEDURA

1. coloro la cellula procariote con la fucsina basica a caldo.
*(a questo punto, tutti i batteri si coloreranno di rosso.
Usa il colorante a caldo, per dilatare la capsula dei batteri che ce l'hanno in modo tale che questa mi faccia passare il colorante)*
2. uso quindi una miscela di H₂SO₄ o di HCl con dell'alcool etilico.
(la miscela ottenuta è un decolorante più forte dell'alcool etilico da solo)
3. il vetrino, a questo punto, viene immerso in questo nuovo decolorante. Data la potenza di questo decolorante, si decoloreranno tutti i batteri tranne quelli ALCOOL ACIDO RESISTENTI.
4. Controcoloro con il BLU DI METILENE
(tutti i batteri che erano stati precedentemente decolorati, verranno colorati in blu; quelli che invece non si erano decolorati, e che quindi avevano mantenuto la colorazione rossa, rimarranno tali.)

BATTERI ALCOOL ACIDO RESISTENTI: sono quei batteri che si colorano male con il metodo gram, assumono il colore rosso del colorante (fucsina) e resistono alla decolorazione con acido.

Sono batteri alcool acido resistenti:

1. Mycobacterium tuberculosis
2. batterio della lebbra

→ **batteri alcool-acido resistenti:**

1. Mycobacterium Tuberculosis

● RIPRODUZIONE DEI BATTERI

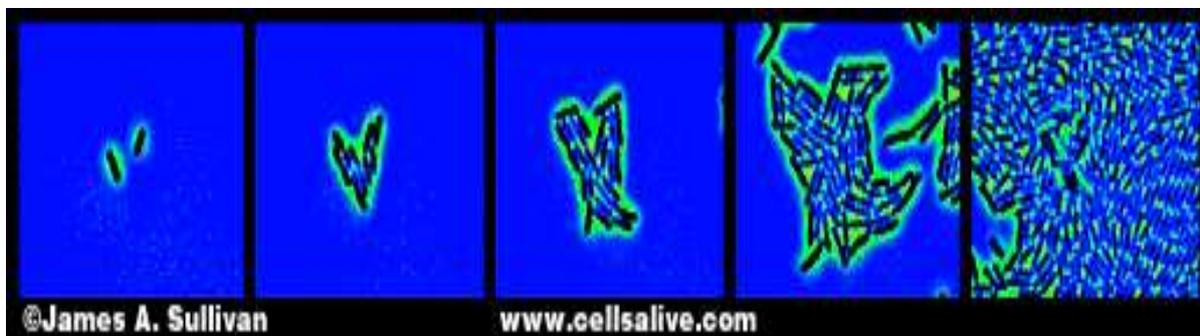
- ◆ I batteri si riproducono attraverso la riproduzione sessuata più semplice che si conosca: LA SCISSIONE BINARIA (ciascuna cellula batterica si raddoppia)
- ◆ Il meccanismo avviene con PROGRESSIONE GEOMETRICA
- ◆ Il materiale genetico (DNA) è una unica molecola circolare (CROMOSOMA BATTERICO) che raddoppia consentendo l'esatta ripartizione del materiale genetico tra le due cellule figlie
- ◆ prima della separazione delle 2 cellule figlie si ha la auto replicazione dell'acido nucleico in 2 copie perfettamente identiche.
Poi, attraverso un meccanismo di strozzatura del citoplasma e di invaginazione della

membrana. La cellula comincia a dividersi in due parti ognuna contenente una delle due copie del materiale genetico. Con l'accentuarsi sempre maggiore della strozzatura, le due parti si distaccheranno sempre più fino alla separazione.

La duplicazione del DNA è una moltiplicazione che prevede la solita *forcella di replicazione* dell'acido nucleico e l'utilizzo di alcuni enzimi: in particolare del DNA SINTETASI (enzimi che si trovano già dentro la cellula)

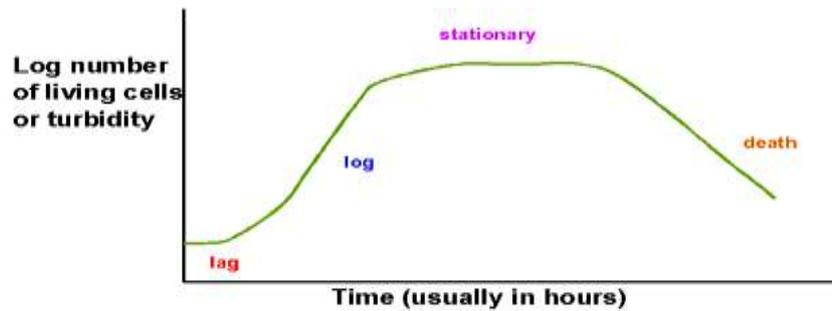
Alcuni antibiotici agiscono sulla capacità di replicazione dell'acido nucleico, impedendola: *citofloxacina*

- ◆ (In particolari situazioni ambientali, alcuni germi formano cellule differenziate sia strutturalmente che funzionalmente, dette *SPORE*. Queste spore rappresentano forme di resistenza importanti.) gram+
- ◆ Sappiamo che la scissione binaria è una tecnica di moltiplicazione molto semplice. In condizioni ottimali, avviene in un tempo molto breve: ogni 20 min. È facile quindi dedurre che i batteri daranno origine ad una progenie davvero molto elevata in un periodo di tempo estremamente breve. Questo aspetto è fondamentale per quanto riguarda il rapporto che si crea tra individuo ospite e parassita, se si parla di batteri patogeni!



(crescita di *ESCHERICCHIA COLI*, batterio che normalmente fa parte della flora batterica intestino. Ogni 20min si replicano: in 43 ore diventano così numerosi da occupare tutto il volume della terra e dopo 45 ore pesano come tutta la terra)

- ◆ Il tipo di crescita dei batteri si dice: **FASE LOGARITMICA**.
- ◆ La quantità di batteri vivi che si origina (sia nel nostro organismo, sia in un terreno di cultura) **ha un limite oltre il quale non può andare sia dal punto di vista della numerosità, sia dal punto di vista del volume occupato.** (*auto limitazione*)
Infatti, ad un certo punto, dalla fase logaritmica si passerà alla *fase stazionaria* (fase in cui la crescita dei batteri si stabilizzerà).
Questo accade perchè nel sistema si sommano due fattori:
 1. sostanze tossiche in graduale aumento
 2. sostanze nutritive in graduale diminuzioneConseguenza di ciò è che la *curva di crescita* comincerà a decrescere fino al punto di morte di tutti i microrganismi in quel determinato sistema.



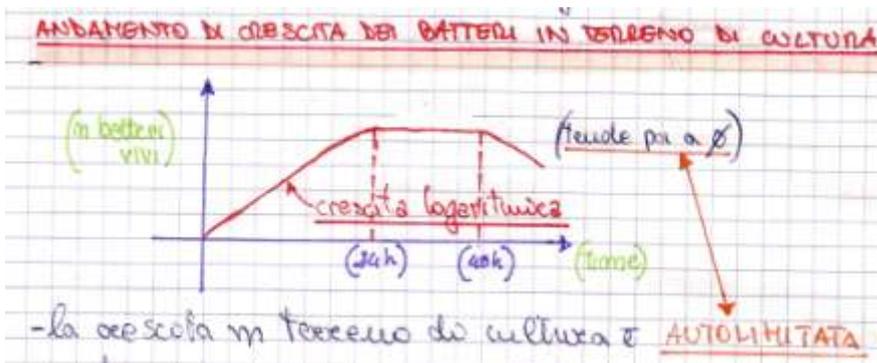
The Growth Curve

- I protisti (che comprendono i batteri ma non solo) possono essere coltivati in vitro fornendo loro idonee sostanze per il loro sviluppo e idonee circostanze:
 1. energia
 2. nutrienti
 3. temperatura ottimale
 4. PH ottimale (che può cambiare da microrganismo a microrganismo)
- I BATTERI non hanno bisogno di altri esseri viventi per moltiplicarsi ma solo di una particolare fonte da dove possano trarre nutrimento.
- I batteri crescono in BRODI (terreni di coltura liquidi) o in AGAR (terreni di coltura solidi.)

Questi terreni di coltura contengono le sostanze nutritive di cui il batterio ha bisogno

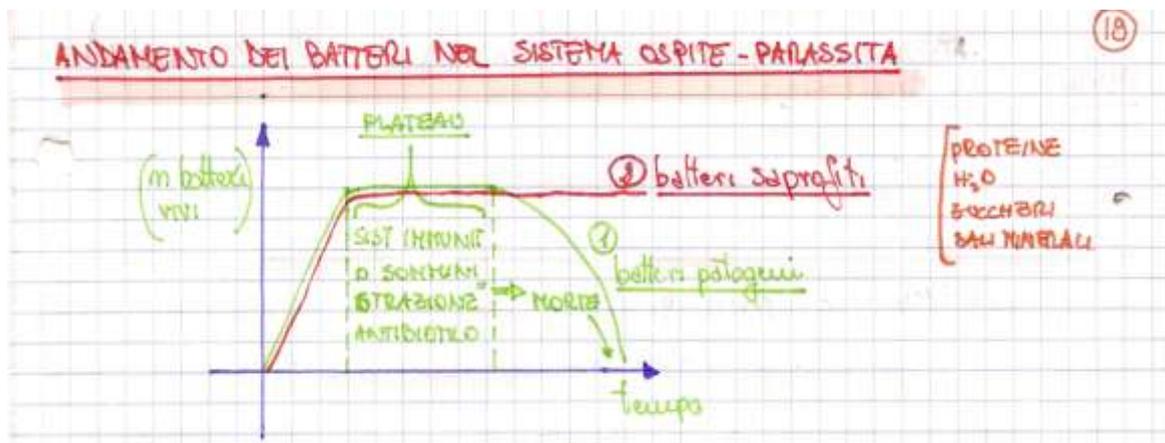
1. proteine
2. H₂O
3. vitamine
4. zuccheri
5. sali minerali

• Andamento di crescita dei batteri in terreno di coltura



- La crescita in terreno di coltura è autolimitata per 2 motivi:
 1. il brodo di coltura ha un limitato numero di sostanze nutritive
 2. i batteri emettono sostanze tossiche sia per gli altri sia per loro stessi
 Ecco perchè il numero di batteri vivi, che all'inizio ha un andamento di crescita a carattere logaritmico, dopo un certo punto non crescerà più e successivamente diminuirà.

• Andamento di crescita dei batteri nel sistema ospite-parassita.



- Entra in gioco un meccanismo di competizione tra il nostro organismo e i batteri dato dal nostro SISTEMA IMMUNITARIO: praticamente si apre una guerra tra i batteri e il nostro corpo.
- Questa guerra può portare alla curva numero 1 non perchè fosse mancato il nutrimento al batterio, ma perchè il nostro sistema immunitario (senza che noi ce ne fossimo accorti) è riuscito a distruggerlo.
- L'esito che è descritto dalla curva numero 2 ritrae il rapporto di equilibrio che, invece, si viene a creare tra il nostro sistema immunitario, i batteri e le sostanze che noi cediamo a loro.
Ovviamente questo equilibrio viene posto in essere solo ed esclusivamente se il nostro sistema immunitario è fisiologicamente attivo e solo ed esclusivamente in determinate zone del nostro organismo, come ad esempio nell'intestino o nel cavo oro-faringeo.
La curva descrive un iniziale aumento della quantità batterica e poi un platò in cui il numero di batteri vivi si mantiene costante nel tempo (fase stazionaria).
- I batteri che entrano a far parte di questo equilibrio si chiamano BATTERI SAPROFITI (cioè quei microrganismi che si nutrono di materia organica morta o in decomposizione. Hanno funzione di *decompositori* cioè contribuiscono a “smontare” le sostanze organiche in elementi inorganici o comunque meno complessi. Il loro habitat naturale è l'ambiente quindi vivono nell'ambiente. Questi microrganismi, sebbene restino comunque dei parassiti e cioè necessitano di un ospite per sopravvivere, quando vengono in contatto con quest'ultimo, normalmente, non gli recano alcun danno.)

• COLTURE BATTERICHE

- Una colonia batterica è un ammasso di cellule tutte uguali che ha origine da una cellula madre, anch'essa identica. **Le colonie devono essere isolate perchè a microrganismi diversi corrispondono colonie di aspetto diverso.**
- I batteri o gli altri microrganismi, quando crescono su un terreno di laboratorio, sono chiamati coltura batterica.
- Avere una coltura batterica serve a studiare il **metabolismo del microrganismo** e quindi poterlo identificare .

metabolismo dei batteri

La membrana cellulare è fondamentale nei processi metabolici del batteri. Abbiamo detto che i batteri sono eterotrofi (hanno bisogno di sostanze complesse per il loro metabolismo)

Quindi i batteri, per la crescita, hanno bisogno di una sorgente di carbonio e azoto, una sorgente di energia, acqua e vari ioni:

1. *ossigeno* (che può essere presente o assente)

A seconda del metabolismo rispetto all'ossigeno i batteri si dividono in:

- **Aerobi obbligati:** crescita solo in presenza di ossigeno (*Mycobacterium tuberculosis*)
- **Anaerobi obbligati:** crescita solo in completa assenza di ossigeno (*Clostridium tetani*)
- **Anaerobi facoltativi:** la maggior parte dei batteri possono crescere sia in presenza che in assenza di ossigeno (*la maggior parte dei batteri*)

2. *energia*
3. *nutrienti*
4. *temperatura ottimale*
5. *PH ottimale* (che può cambiare da microrganismo a microrganismo)

I batteri patogeni ricavano energia dal metabolismo di zuccheri, grassi e proteine.

La distinzione tra autotrofi ed eterotrofi, si può fare anche in base alla fonte di carbonio utilizzato per la crescita:

- **autotrofi:** utilizzano solo carbonio inorganico (CO₂)
- **eterotrofi:** utilizzano carbonio di composti organici

La tassonomia del metabolismo comprende due grosse categorie:

1. catabolismo:

si parte da proteine, polisaccaridi e lipidi: attraverso diverse reazioni degradative si ottiene ATP

2. anabolismo:

si sfrutta ATP per dare sostanze complesse a partire da sostanze più semplici

Grazie alle caratteristiche metaboliche dei batteri, queste cellule possono essere coltivate in vitro partendo da sostanze organiche non viventi.

Questa è una caratteristica che non troviamo né con i virus (che necessitano un'altra cellula vivente per moltiplicarsi), né tanto meno nell'essere umano (che ha bisogno dell'utero materno).

di

- Si possono individuare dei **caratteri culturali** (caratteri che forniscono indizi utili per l'identificazione dei batteri):

Il più importante è il fattore di accrescimento:

(l'aspetto (caratteri di accrescimento) che i batteri assumono dopo essere cresciuti su vari terreni.)

- Ci sono vari tipi di colture batteriche:

1. COLTURE MISTE

La popolazione microbica presente nel nostro ambiente è normalmente grande e complessa. Molte differenti specie microbiche abitano normalmente varie parti del nostro corpo (orale, intestinale, cutanea) ed in modo analogo il nostro ambiente (aria, suolo, acqua): si parla allora di colture miste.

2. COLTURE PURE

Una coltura pura è costituita da una popolazione di cellule derivate tutte da un'unica

cellula madre. Essa rappresenta una condizione artificiale per l'accrescimento dei batteri ed è una condizione imposta da manipolazioni di laboratorio.

3. COLONIE SU AGAR

L'agar è, sostanzialmente, un estratto di alghe rosse marine della famiglia delle Geliciaeae. Il potere di solidificazione varia a seconda del tipo di alga da cui deriva

4. ACCRESCIMENTO SU AGAR A BECCO DI CLARINO (terreno solido)

E' una tecnica particolare che permette lo sviluppo su terreno solido

Le colonie di coltura su agar a becco di clarino si differenziano per:

1. Dimensioni.
2. Margine o bordo.
3. Altezza.
4. Pigmentazione
5. Caratteri ottici.

5. ACCRESCIMENTO SU BRODO NUTRITIZIO (terreno liquido)

Senza un supporto solido ma solo con un supporto liquido

Le colonie di coltura su brodo nutrizio si differenziano per:

1. Quantità di accrescimento.
2. Distribuzione del accrescimento in tutto il brodo.
3. Odore.
4. Torbidità
(tanto più è torbida la sospensione, tanto più è alta la quantità di microrganismi. Se è trasparente, non c'è crescita.)
5. Mucosità
(batteri ricchi di grassi nella loro parete daranno colonie mucose)
6. Presenza di gas disciolto
(bollicine nella coltura batterica)

→ Una condizione per poter studiare i microrganismi è poterli coltivare nelle condizioni di laboratorio. Per questo scopo si devono conoscere quali sostanze nutritive e quali condizioni fisiche essi richiedono.

1. Zuccheri/Glucosio (come fonte di carbonio e di energia)
2. Peptone (aminoacidi per la fonte azoto)
3. Estratto di lievito (come vitamine)
4. Indicatori di PH, di sali minerali
5. H₂O

→ Tali informazioni hanno consentito di sviluppare numerosi terreni o mezzi per la loro coltura: **chiamati terreni specifici.**

1. Terreno arricchito.

(ad esempio con sangue, siero, emoglobina)

- è un terreno in cui qualunque batterio si può replicare
- fornisce tutte le risorse indispensabili alla moltiplicazione di tutti i microrganismi

2. Terreno selettivo.

(sono terreni che fanno crescere solo alcuni tipi di microorganismi)

3. Terreno differenziale o cromogeno

(sono terreni che differenziano le caratteristiche metaboliche dei microrganismi che voglio coltivare e si colorano in modo diverso a seconda del batterio che ci si

sviluppa)

- ad esempio: metto un terreno con del lattosio e un indicatore di PH.
Se cresceranno batteri che fermentano il lattosio, il mio indicatore di PH virerà di colore (da incolore a rosso)perchè il lattosio fermentato acidificherà il mezzo.
Se cresceranno batteri che non fermentano il lattosio, il mio indicatore di PH rimarrà incolore.

4. terreno di saggio.

(sono terreni che servono per saggiare gli antibiotici o i disinfettanti)

5. terreni di mantenimento

(sono dei terreni che vengono utilizzati per il trasporto del materiale biologico dal letto del paziente al laboratorio)

- il batterio deve essere mantenuto vivo dal momento di raccolta a quello di esame in laboratorio.

● **PREPARAZIONE DI UN TERRENO DI COLTURA**

Esistono, a seconda della quantità di agar 3 tipologie di terreni di coltura:

1. liquido; (45-50 °C) *(si fa l'isolamento e la coltura)*
2. semisolido (+Agar 0,5%); *(si fa solo l'isolamento del batterio)*
3. solido (+Agar 2%). *(si fa solo l'isolamento del batterio)*

La procedura per preparare un terreno di coltura è riassumibile in 4 punti:

1. Dissoluzione degli ingredienti in H₂O.
2. Determinazione del PH ed eventuale correzione.
3. Distribuzione in contenitori idonei.
(i contenitori si chiamano PIASTRE: sono contenitori semplicissimi con un coperchio e una base sulla quale distribuire il terreno di coltura)
4. Sterilizzazione.
(se non li sterilizzo non so se la crescita di un eventuale batterio, sia dovuta alla non sterilizzazione o all'effettiva presenza di quel microrganismo nel terreno di coltura stesso.)

Se è necessario misurare quanti batteri sono presenti in un determinato liquido biologico si può fare un TEST DI DILUIZIONE (lo uso negli alimenti, nelle urine ecc ecc)

Se voglio isolare un campione di urina e verificare se questa urina è sterile oppure no, posso prendere un centimetro cubo di urina, in un terreno già solido, lo diffondo in tutta la mia superficie, e poi conto le colonie. *(se avrò 100 colonie avrò 100 batteri per centimetro cubo).*

Se non riesco a contare le colonie perchè sono tantissime sono tutte ammassate, diluisco il campione originario. (se suppongo che il campione che ottengo è diluito per 10 alla meno 2 dico che è diluito 100 volte: se in quel campione riscontro 20 colonie, dico che ne ho individuate solo il 20%: quindi per trovare il numero di batteri si conta il numero di colonie e lo si moltiplica per il fattore di diluizione)

Quando anche 1 solo batterio, invece, può voler dire infezione, prendo il liquido in questione (tipo il liquor) e non lo diluisco. Lo esamo così com'è.

● **RAPPORTI TRA MICRORGANISMI E ORGANISMI SUPERIORI:**

1. **mutualismo:** rapporto vantaggioso per entrambi

2. **commensalismo**: un contraente trae beneficio, l'altro è indifferente
3. **parassitismo**: un contraente trae beneficio, l'altro riceve un danno (i batteri sono parassiti)

● I microrganismi si possono perciò suddividere in:

1. *saprofiti*

(cioè quei microrganismi che si nutrono di materia organica morta o in decomposizione. Hanno funzione di *decompositori* cioè contribuiscono a “smontare” le sostanze organiche in elementi inorganici o comunque meno complessi. Il loro habitat naturale è l'ambiente quindi vivono nell'ambiente. Questi microrganismi, sebbene restino comunque dei parassiti e cioè necessitano di un ospite per sopravvivere, quando vengono in contatto con quest'ultimo, normalmente, non gli recano alcun danno.)

2. *commensali*

(Vivono sulla cute e sulle mucose del nostro organismo, a contatto quindi con l'uomo; sono ospiti abituali (*popolazione residente*) e, se restano nel distretto anatomico in cui si sviluppano, non recano alcun danno. Il termine "commensale" sta ad indicare: “colui che partecipa ad un pranzo”. Tali parassiti infatti trovano nell'organismo che li ospita i materiali nutritivi che gli sono necessari per vivere e per riprodursi, ecco perchè vivono senza arrecare danno a chi li ospita instaurando un vero e proprio equilibrio.

Il commensalismo è una convivenza tra il parassita e il suo ospite mediata da uno scambio di favori reciproco:

- Il favore che l'ospite fa al parassita è quello di fornirgli gli elementi nutritivi
- I favori che il parassita fa all'ospite sono 2:
 1. non creare danni
 2. aiutare l'ospite in qualche attività
 - (*l'escherichia coli, nell'intestino, favorisce la sintesi della vitamina k*)
 - (*il lactobacillo acidofilo, nella mucosa della donna, crea un PH acido crea condizioni sfavorevoli per lo sviluppo e la proliferazione di microrganismi patogeni*)

Tipici parassiti commensali sono:

1. escherichia coli (che vivono nel nostro intestino)
2. lactobacillo acidofilo (presente nella mucosa vaginale della donna in età fertile)
3. streptococco viridante (presente nel cavo orofaringeo)
4. stafilococco epidermidis (presente nella cute)

- * I distretti colonizzati sono tutte le parti comunicanti con l'esterno: cute e mucose (cavità orale, prime vie respiratorie (solo le vie aeree superiori), apparato intestinale, uro-genitale, congiuntiva, canale uditivo esterno)

I batteri, in questi distretti, hanno funzioni importanti:

1. produzione di vitamine (K e gruppo B) (escherichia coli)
2. stimolazione e maturazione del sistema immunitario (sistema di equilibrio tra flora batterica e sistema immunitario)
3. competizione con patogeni (lactobacillo acidofilo) I residenti possono impedire la competizione tra i patogeni:
 - i lactobacilli acidofili occupano la mucosa vaginale che quindi non

potrà fungere da sito di infezione per un eventuale patogeno; in più creano un PH acido, e i patogeni che arrivano fisicamente nel lume del canale vaginale non riusciranno a moltiplicarsi.

- La vaginite, allora, si ha solo con l'assenza di residenti

* I distretti sterili sono tutti quei distretti che, invece, rimangono senza la colonizzazione di batteri salvo quando diventano infetti (sterili vie sanguigne e linfatiche, organi interni, sistema nervoso)

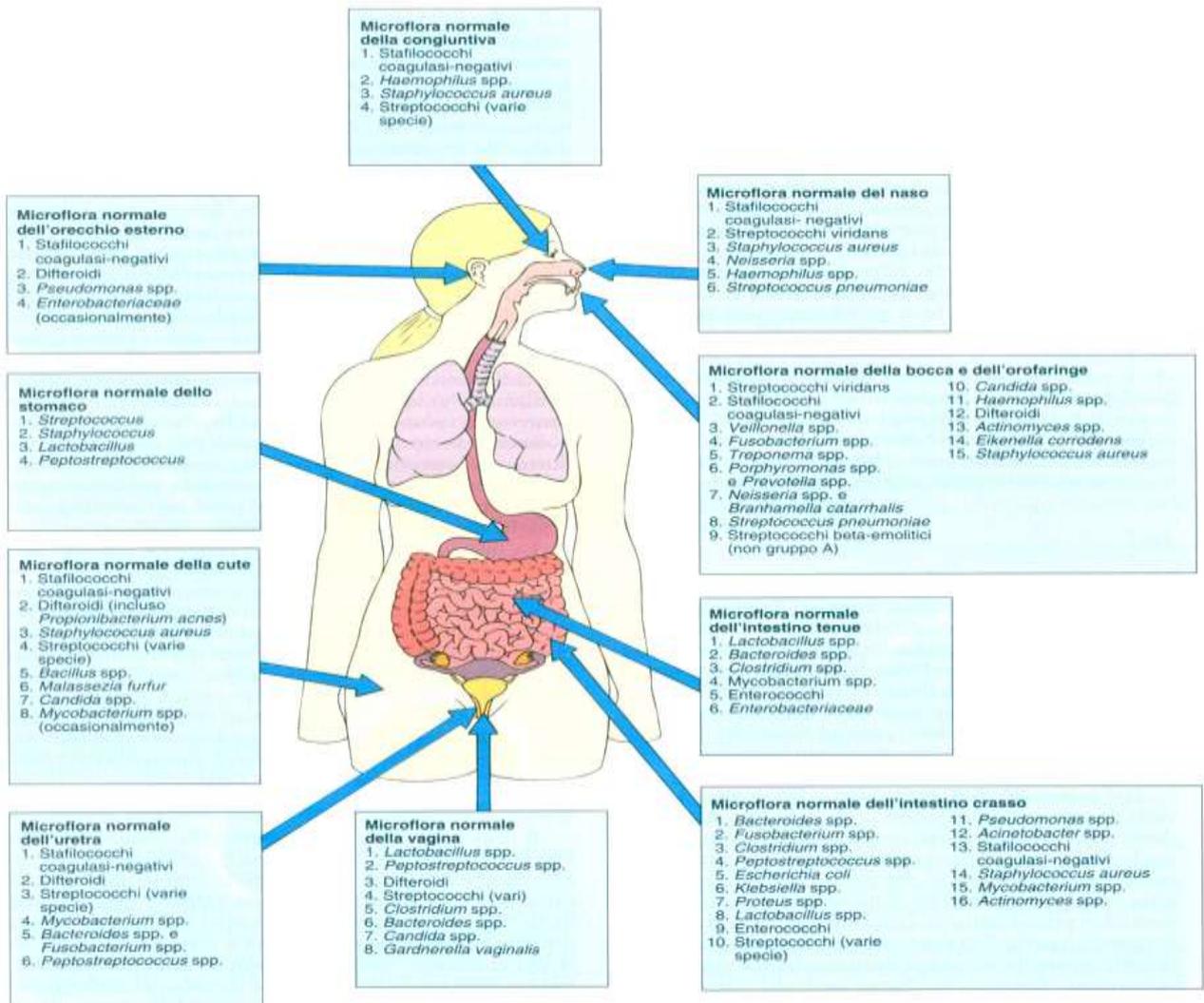


Figura 29.8 Microflora normale dell'uomo. Microrganismi che costituiscono la microflora normale nelle varie parti del corpo.

3. parassiti patogeni

(Gli organismi patogeni veri e propri sono quei parassiti che aggrediscono l'ospite causando danno.)

4. patogeni opportunisti

(sono microrganismi ambientali saprofiti (*pseudomonas aeruginosa*) o commensali (*escherichia coli*, *candida albicans*) che aggrediscono (e quindi diventano patogeni veri e propri) solo in assenza delle normali barriere difensive, si può dire che quindi approfittano di alcune condizione del loro ospite)

L'esempio più comune lo si ha con l'herpex. (l'herpex è un virus non un batterio)

La ricomparsa dell'herpex è legata al fatto che il nostro sistema immunitario non riesce più a mantenere quell'equilibrio che, dopo la prima infezione di herpex simplex, si era venuto a creare fra sistema immunitario e virus.

Non a caso la ricomparsa dell'herpex si verifica sempre in concomitanza ad un'influenza o, più in generale, ad occasioni di stress da parte dell'organismo: in presenza di situazioni, quindi, che ritraggono un mutamento dell'equilibrio interno delle difese, con momentaneo impegno del sistema immunitario costretto, evidentemente, a diminuire le sue capacità di difesa nei confronti dell'herpex

Nei soggetti con HIV, questo è molto evidente: in un soggetto con HIV si può assistere anche alla sua morte per infezione generalizzata da herpex simplex proprio a causa dell'inadeguatezza del sistema immunitario a creare l'equilibrio opportuno fra virus e organismo

Il problema delle infezioni da microrganismi opportunisti è un problema sempre più grande a causa di un numero di persone con scarse difese sempre in aumento. I motivi possono essere:

1. *malattie (immaturi; AIDS; traumatizzati gravi; ecc)*
2. *uso di farmaci immuno soppressori*
3. *interventi chirurgici complessi (trapianti, innesto di protesi; ecc)*

i microrganismi opportunisti si possono trovare:

* **Pelle**

- Staphylococcus aureus,
- S. epidermidis
- Propionibacterium acnes

* **Intestino**

- Bacteroides
- Enterobacteriaceae

● **PATOGENICITA' E CARATTERISTICHE DEI MICRORG. PATOGENI**

- La patogenicità è legata a caratteristiche sia del microrganismo, sia dell'ospite
- La patogenicità è la capacità intrinseca del microrganismo di dare la malattia (ad esempio la produzione della tossina del colera da parte del vibrione del colera).
- Dipende dalla **invasività**, che è la capacità di superare le difese corporee e dalla **tossigenicità** che è la capacità di produrre sostanze tossiche che possono agire *anche a distanza dal punto di infezione*:

(*clostridium tetanii*: entra nella soluzione di continuità della cute attraverso una ferita e poi agisce a livello del sistema nervoso centrale)

- Il grado di patogenicità è dato dalla **virulenza** (capacità del patogeno di dare manifestazioni cliniche di diverse gravità)

La virulenza è legata a fattori che possono essere presenti o meno in un microrganismo patogeno:

1. capsula
2. limo
3. pili
4. plasmidi

- “**distretto anatomico**”

Il batterio del vibrione del colera, fa il colera solo se arriva attivo nell'intestino: lì, attraverso la tossina colerica, esplica la sua attività patogena. In altri distretti anatomici, non dà infezione.

I batteri escherichia coli, se sono nell'intestino, non recano danno all'ospite; se però cambiano il loro distretto anatomico, ad esempio arrivano al Sistema Nervoso Centrale, danno una meningite da escherichia coli

- I microrganismi patogeni sono microrganismi in grado di provocare malattia:
- Non necessariamente un microrganismo patogeno può generare danno: un parametro fondamentale che esplicita **la patogenicità** di un microrganismo, oltre alla **virulenza** e quindi all'eventuale presenza della **capsula** e/o del **limo** (ammesso che il microrganismo sia un batterio) o della presenza di **plasmidi**, è quello della: **CARICA INFETTANTE o CARICA BATTERICA**, cioè del quantitativo effettivo di cellule batteriche.

- **FATTORI DI PATOGENICITA' E QUINDI DI VIRULENZA**

Questi fattori possono trovarsi tutti assieme ma non è detto.

1. **FATTORI DI ADESIONE**

(pili)

2. **FATTORI DI INVASIONE**

- Sono quei fattori che favoriscono la diffusione dei patogeni all'interno dell'organismo.
- Non è detto che tutti i batteri adottino il processo di invasione: (ci sono batteri che invadono il tessuto, altri no.)
- Idrolizzano componenti dei tessuti umani favorendo la penetrazione in profondità. (l'azione degli enzimi)
- *Emolisine, fosfolipasi e lecitinasi* sono enzimi simili che agiscono sulle cellule vicine al sito d'infezione, non a distanza (come fanno invece le esotossine) (ad esempio: affinché la salmonella tifi arrivi al sistema circolatorio deve, una volta entrata con gli alimenti, superare la barriera gastrica, arrivare all'intestino e superare la mucosa intestinale. Questo lo fa attraverso un meccanismo invasivo che viene fornito dalla produzione di sostanze enzimatiche che degradano la mucosa intestinale. Superata la mucosa arriva al circolo e da le febbri tifoidee)

2. **CAPACITA' DEL MICRORGANISMO DI SOPRAVVIVERE ALL'INTERNO DELL'OSPITE**

I microrganismi patogeni sono in grado di contrastare o eludere le difese dell'organismo

- *mimetismo antigenico* (il sistema immunitario non riconosce come antigene il microrganismo e quindi non si mette in azione)
- *fattori antifagocitari* (strutture cellulari o sost. secrete che impediscono l'attacco dei fagociti -capsula-)
- *capacità di sopravvivere e/o moltiplicarsi all'interno delle cellule fagocitarie* (le cellule fagocitarie inglobano il microrganismo ma non lo uccidono. Ecco che il microrganismo si svilupperà all'interno delle stesse cellule che lo hanno fagocitato)

3. **PRODUZIONE DI TOSSINE BATTERICHE**

Le tossine batteriche possono essere di 2 tipi:

1. **ENDOTOSSINE** (lipopolisaccaridi) *Sono anche chiamate **pirogeni** (stimolano la febbre)*

- × le endotossine non sono così tossiche, come ad esempio le esotossine (tossina tetanica), ma insieme al meccanismo di **invasività** e di moltiplicazione, aumentano il meccanismo di patogenicità dei batteri.

- * essendo delle proteine, subiscono la degradazione ma questo non impedisce loro di emanare il loro potere tossico
- * sono scarsamente immunogeni (non sono dei grandi antigeni)
- * si liberano per lisi della cellula batterica
- * danno permeabilità vascolare
- * danno vasodilatazione
- * danno ipotensione
- * danno shock emodinamico (shock tossico)
- * Sono prodotti di degradazione, in particolare della degradazione della parete
- * esempi di endo tossine sono:
 - endotossina dell'escherichia coli
(è quella che provoca delle meningiti da coli. Il fattore tossico, oltre che essere provocato dall'invasione delle meningi, è provocato dalla disgregazione della parete cellulare che produce un effetto tossico. Questo effetto tossico, accompagnato dall'invasione delle meningi, reca la meningite da coli.)
 - endotossine prodotte dalle salmonelle
(insieme ad un meccanismo di invasività, le salmonelle hanno una tossicità data dalla liberazione di pezzi di parete nel torrente circolatorio. Danno febbre)

2. ESOTOSSINE (proteine).

(le esotossine, essendo proteine, subiscono il fenomeno della degradazione proteica però prima producono un effetto tossico: quindi il fatto che si deteriorino non è sufficiente per diminuire l'effetto tossico.)

- * hanno uno spiccato potere immunogeno
- * possono avere struttura monomerica o dimerica
(Queste ultime sono distinte in due peptidi (A e B), legati da ponti disolfurici, dove A è il peptide con attività tossica, generalmente enzimatica, e B è quello che si lega a specifici recettori della cellula bersaglio.)
- * La loro produzione può essere sotto:
 - controllo plasmidico
 - controllo cromosomico: insito nel cromosoma della cellula stessa (es. tossina colerica)
 - controllo fagico (virus che infettano i batteri): conversione lisogena
- * possono essere ESOTOSSINE CITOLITICHE
Provocano la lisi della cellula bersaglio (c'è una grande specificità tra tossina e distretto anatomico: tossina colerica agisce solo nell'intestino)
- * possono essere ESOTOSSINE CHE INIBISCONO LA SINTESI PROTEICA
Inibiscono la sintesi proteica della cellula ospite (un esempio è la tossina A (quella che esprime la funzione tossica) difterica e la tossina A di *P.aeruginosa*.) Solitamente dimeriche, si legano irreversibilmente alla cellula mediante interazione tra un recettore specifico della cellula e il frammento B della tossina, mentre il frammento A costituisce la frazione tossica.
- * possono essere ESOTOSSINE CHE ALTERANO IL CONTENUTO INTRA CELLULARE DI AMP-Ciclico (tossina colerica)
la tossina colerica agisce attraverso il meccanismo della formazione dell'AMP-Ciclico rovesciando il meccanismo di azione delle cellule della

mucosa intestinale: invece di assorbire H₂O, la rilasciano con produzione di diarrea.

- * possono essere ESOTOSSINE CHE AGISCONO DA SUPERANTIGENI
Sono tossine generalmente monomeriche (non hanno i 2 frammenti A e B). Sono caratterizzate dalla capacità di attivare in modo non specifico i linfociti T, legandosi ad un recettore specifico presente su queste cellule. (*enterotossine* e esotossina dello shock tossico di *Staphylococcus aureus*, superantigene di *Streptococcus pyogenes*)
- * possono essere ESOTOSSINE ENTEROTOSSICHE
(Quindi, l'enterotossina stafilococcica (nominata parlando delle esotossine superantigeni) è un superantigene, provocato dallo *Staphylococcus aureus* che agisce a livello del canale intestinale: da noi viene chiamata enterotossina stafilococcica)
Gruppo piuttosto eterogeneo di tossine che esplicano la loro azione a livello della mucosa intestinale causando diarrea e vomito.
- * possono essere ESOTOSSINE NEUROTROPE
agiscono a livello del sistema nervoso interferendo con la trasmissione degli impulsi nervosi.
Alcuni esempi sono:
la tossina tetanica che blocca il rilascio dei neurotrasmettitori a livello inibitorio della contrazione muscolare (paralisi spastica) e
la tossina botulinica che impedisce il rilascio di acetilcolina dalle sinapsi colinergiche periferiche (paralisi flaccida).

Caratteristiche	Esotossine	Endotossine
Origine	Batteri Gram-positivi e negativi	Batteri Gram-negativi
Localizzazione	Sintesi nel citoplasma e rilascio	Componenti della parete cellulare
Natura chimica	Proteine (PM 50-1000 kDa)	Lipopolisaccaridi (PM 10 kDa)
Stabilità	Termolabili a 60-100 °C per 30 min	Termostabili
Antigenicità	Presente	Presente
Formano anafossine	Si	No
Tossicità	Elevata	Relativamente bassa
Specificità d'azione	Elevata. Effetto specifico per ciascuna tossina	Bassa. Effetto comune per tutte le endotossine
Attività enzimatica	Presente	Assente
Pirogenicità	Occasionale	Presente

(termostabili) = temperature anche elevate non generano nessun danno alle endotossine. Paradossalmente, quindi, è possibile avere un liquido sterile, perchè sono morti tutti i batteri, tutti i virus e tutte le tossine sono state eliminate (perchè esposto magari a temperature superiori a 100 °C), ma tossico perchè ci sono ancora le endotossine, che sono rimaste. Le sostanze che si ignettano

infatti sono sterili e atossiche.)
(**antigenicità**= stimolazione del sistema immunitario)
(**anatossine**= sostanze che mantengono il loro potere antigenico ma perdono quello tossico. Le esotossine si possono trasformare in anatossine. Le endotossine no:)

Le tossine possono avere anche una tassonomia in base alla parte del nostro organismo che possono colpire

1. Tossine neurotrophe (tossina tetanica e botulinica)
2. Enterotossine (tossina colerica, enterotossine di *E. coli*)
3. Tossine pantrope (tossina difterica, tossina di *Shiga* prodotta da *Shigella dysenteriae*)

4. PRODOTTI METABOLICI DELLA CRESCITA BATTERICA

- Sono sostanze enzimatiche; gassose e acide che possono prodotte dal metabolismo dei batteri che aumentano la virulenza **collagenase e hyaluronidase (sono enzimi)**

5. INDUZIONE AD UNA INFIAMMAZIONE ECCESSIVA

- Moltiplica l'effetto dell'invasione e dell'adesione del microorganismo

6. RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

- La resistenza agli antibiotici si può avere attraverso l'acquisizione di plasmidi o attraverso il cromosoma.

7. ELUSIONE DELLA "CLEARANCE" FAGOCITARIA ED IMMUNITARIA

- L'elusione dall'attività fagocitaria immunitaria (ricordiamo che i pili e la capsula svolgono una funzione antifagocitaria) è un fattore che aumenta notevolmente la virulenza

Ad esempio i fattori di virulenza degli stafilococchi: (non è detto che tutti gli stafilococchi abbiano tutte queste componenti! C'è una estrema variabilità tra i microrganismi: ad esempio non tutti gli stafilococchi aurei sono uguali anche se si chiamano tutti nello stesso modo)

FATTORI DI VIRULENZA	EFFETTI BIOLOGICI
COMPONENTI STRUTTURALI	
Capsula	Inibisce la chemiotassi e la fagocitosi Facilita l'adesione ai corpi estranei
Peptidoglicano	Conferisce stabilità osmotica Stimola la produzione di pirogeno endogeno (attività simile a quella dell'endotossina)
Proteina A	Inibisce la fagocitosi Inibisce la rimozione mediata da anticorpi legando i recettori per Fc di IgG1, IgG2 e IgG4 Chemioattraente per i leucociti
Acido teicoico	Anticomplementare Regola la concentrazione cationica della membrana cellulare
Membrana citoplasmatica	Si lega alla fibronectina Barriera osmotica Regola il trasporto dentro e fuori dalla cellula Sito di enzimi biosintetici e respiratori
TOSSINE	
Citotossine (alfa, beta, delta, gamma, leucocidina)	Tossiche per molte cellule, inclusi leucociti, eritrociti, macrofagi, piastrine e fibroblasti
Tossina esfoliativa	Danneggia il muscolo liscio vascolare Stimola i linfociti T a rilasciare citochine (superantigeni)
Tossina-1 della sindrome da shock tossico	Rompe i desmosomi nello strato granuloso dell'epidermide
Enterotossine (da A ad E)	Superantigene (stimola i linfociti T a rilasciare citochine) Superantigene (stimola le mastcellule) Aumenta la peristalsi intestinale e la perdita di liquido Effetto sul sistema nervoso centrale espresso da nausea e vomito
ENZIMI	
Coagulasi	Trasforma il fibrinogeno in fibrina Protegge lo <i>S. aureus</i> dalla fagocitosi
Catalasi	Converte il perossido d'idrogeno in acqua ed ossigeno
Ialuronidasi	Idrolizza gli acidi ialuronici del tessuto connettivo favorendo la diffusione degli stafilococchi nel tessuto
Fibrinolisinasi	Scioglie i coaguli di fibrina
Lipasi	Idrolizza i lipidi
Nucleasi	Idrolizza il DNA
Penicillinasi	Idrolizza le penicilline

● FASI DEL PROCESSO INFETTIVO; INFEZIONE E MALATTIA

- Le fasi del processo infettivo sono 5:

1. Ingresso (nel sito anatomico)

2. Adesione
(pili)

3. Penetrazione:

- × Ci sono 2 meccanismi di penetrazione:

1. per distruzione del tessuto

2. attraverso meccanismi invasivi che consentono di penetrare direttamente nelle cellule dell'epitelio (utilizzati anche per penetrare nei fagociti professionali)

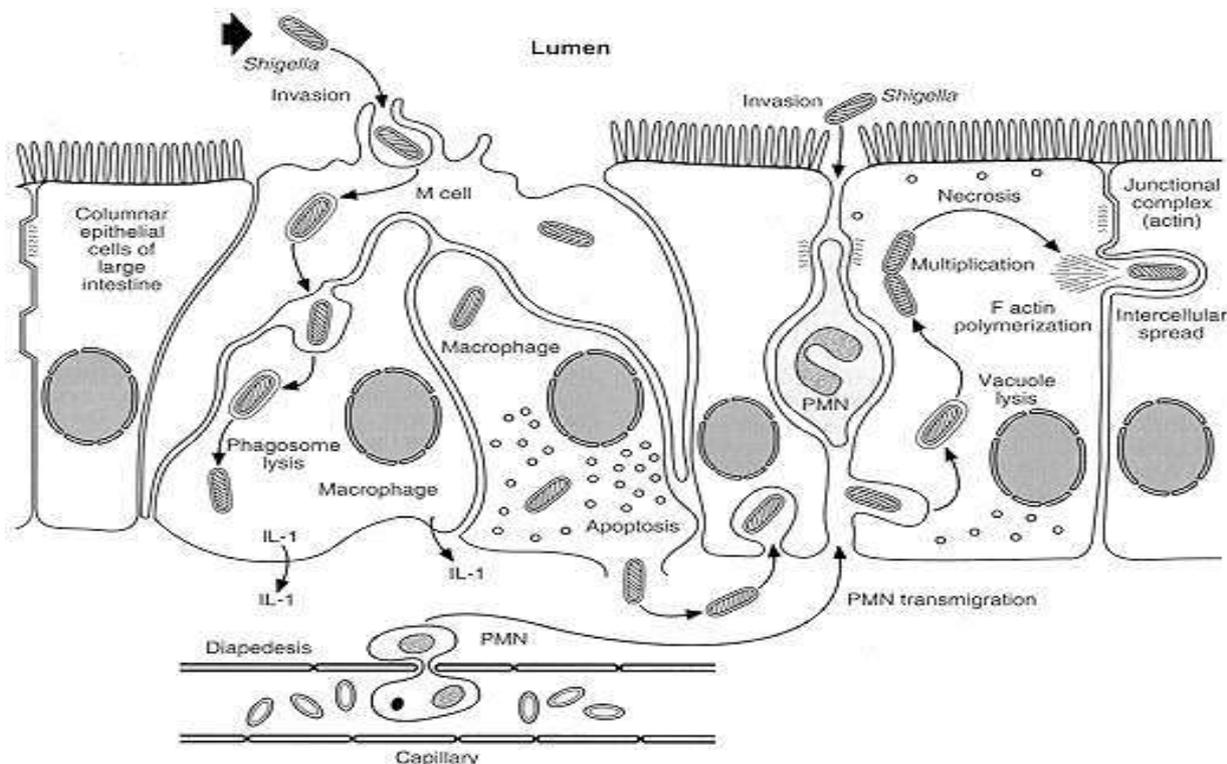
ci sono alcuni fagociti che inglobano il microorganismo, non lo distruggono e quando il fagocita arriva nei tessuti viene ucciso dal microorganismo che si era intanto moltiplicato

- × Per distruggere i tessuti i batteri usano degli enzimi (proteine):

1. collagenase

2. hyaluronidase

questi enzimi sono prodotti dal metabolismo microbico



4. **Invasione dei tessuti** (che è la capacità di superare le difese corporee)

- Il complesso meccanismo di invasione è sotto il controllo di diverse **isole di patogenicità**
 - **Le isole di patogenicità (disegno sopra)** sono quelle strutture protagoniste di quel momento in cui si ha l'ingresso del microorganismo nella cellula di rivestimento. L'ingresso del microorganismo attiva un processo immunitario che coinvolge macrofagi ed altre cellule del sistema immunitario fino ad arrivare al processo infiammatorio seguito dalla fuoriuscita del microorganismo dalla cellula di rivestimento verso i vasi linfatici e i capillari del sistema circolatorio: **invasione**.
- Batteri che non hanno il meccanismo di invasione, non penetrano dentro la cellula e quindi non riescono a superare la barriera cellulare di rivestimento. Ovviamente questo fa sì che non riescano ad arrivare alle vie di trasmissione linfatiche e il torrente circolatorio

5. **Diffusione**

- La cosa più importante, prodromica alla diffusione è **L'INFIAMMAZIONE**
INFIAMMAZIONE:

Serie di reazioni che portano cellule e molecole del sistema immunitario al sito di infezione o al sito dove c'è danno tissutale.

Comporta

- iperemia (afflusso eccessivo di sangue in un organo o tessuto),
- aumentata permeabilità vascolare
- incremento della migrazione trans-endoteliale dei leucociti

L'infiammazione è un'azione biologica di prima risposta al contatto con l'agente esterno (antigene)

6. **Danno**

→ **Azione patogena dei batteri mediata da prodotti del metabolismo:**

- Danno tissutale aspecifico da prodotti del metabolismo:

Quando il metabolismo batterico, specialmente la fermentazione, produce acidi, gas

e prodotti tossici per i tessuti

→ Azione patogena dei batteri mediata da fattori di virulenza:

- Danno tissutale da enzimi degradativi
- Produzione di tossine (esotossine endotossine)
- Superantigeni

- Possiamo avere un'infezione localizzata alla superficie (infezione da una ferita), ci possono essere però situazioni dove si ha penetrazione e diffusione dell'agente infettante nei tessuti dell'ospite: ci sono dei fattori che aiutano la diffusione del microorganismo da una sede localizzata a una generalizzata.

A seconda del microorganismo si possono avere meccanismi diversi di adesione; di penetrazione; e poi di invasione.

(Ad esempio la Salmonella typhi; la Salmonella enteritidis e il vibrio colere agiscono praticamente nello stesso modo:

- aderiscono
- invadono l'epitelio
- vanno nel torrente circolatorio

- Una delle discriminanti che determina **l'infezione** è, la **DOSE INFETTANTE** cioè la quantità sufficiente di agenti patogeni tale da permettere loro di moltiplicarsi (infettare).

(infezione non vuol dire necessariamente malattia! (si può essere infetti ma non malati)

Infezione= l'instaurazione di un nuovo rapporto tra l'ospite e il patogeno).

- Per **malattia infettiva** si intende malattie sostenute da agenti eziologici (causali) trasmissibili da un portatore (sano in senso stretto o malato) ad un ospite sano.

- L'infezione dipende anche dalle **caratteristiche oggettive** o **fattori propri dell'ospite** che sono:

1. Caratteristiche fisiologiche
2. Caratteristiche generali del nostro star bene (con implicazioni anche psicologiche)
3. Comportamentali (abitudini non corrette)
 - * scarsa igiene personale (trasmissione di malattie enteriche da mani sporche)
 - * scarsa conoscenza delle norme igieniche (nelle cucine: tossinfezioni aliment.)
 - * abitudini sessuali a rischio (infezioni trasmesse per via sessuale)

- L'infezione può essere di 2 tipi:

1. ACUTA
(quando il **periodo di incubazione** è breve)
2. LATENTE e CRONICA
(quando il **periodo di incubazione** è lungo)

➤ **Periodo di incubazione:** è il periodo di tempo che passa tra il momento della penetrazione dell'agente infettivo e la malattia per quell'infezione

➤ Dall'infezione, si può arrivare alla malattia

Malattia= espressione biologica dell'infezione

→ Possiamo dire allora che le condizioni dell'ospite sono fondamentali rispetto all'espressione dell'attività patogena dei singoli microrganismi (malattia)

- **CARATTERISTICHE CHE CONDIZIONANO IL PASSAGGIO DA INFEZIONE A MALATTIA**

✓ **Fattori propri del microrganismo**

1. Virulenza

Capacità di dare manifestazioni cliniche di diverse gravità (aggressività del germe).

È, in generale, la misura del grado di patogenicità.

- (I batteri che possiedono la capsula, sono più virulenti: **la capsula e il limo sono fattori di virulenza**)

2. Infettività

Quantità minima di germi richiesta per dare la malattia

3. Resistenza

Capacità del microrganismo di resistere anche fuori dall'ospite, nell'ambiente esterno.

4. Carica batterica e dose infettante

✓ **Fattori propri dell'ospite o caratteristiche oggettive (fisiologiche e generali)**

1. Suscettibilità o refrattarietà

(può dipendere dalla specie o dalla razza dell'ospite in questione)

2. Razza, sesso, età costituzione

3. Alimentazione, stress

4. Malattie croniche e terapie associate

(terapie immuno soppressive o antitumorali)

✓ **Fattori dell'ambiente esterno**

1. Climatici

(i climi caldi favoriscono le infezioni gastro intestinali)

2. Sociali

(malattie tipiche della condizione di scarsa igiene)

● **TRASMISSIONE DELLE MALATTIE INFETTIVE**

Perchè avvenga la trasmissione delle malattie infettive, quindi l'infezione seguita eventualmente dalla malattia, si necessita di 3 elementi:

1. **SORGENTE o SERBATOIO DI INFEZIONE**

(SORGENTE: uomo o animale che alberga un microrganismo patogeno e lo può trasmettere ad altri soggetti ricettivi della sua stessa specie o di specie diversa.

SERBATOIO DI INFEZIONE: può essere un substrato inanimato; una specie animale o una specie vegetale, in cui il patogeno trovi il suo habitat naturale e da cui esso possa essere trasmesso ad ospiti recettivi)

2. **VEICOLO o VETTORE**

mezzo attraverso il quale si hanno le **trasmissioni indirette** di malattie infettive.

VEICOLO: struttura inanimata

VETTORE: essere vivente diverso dall'uomo (*mosche*)

ci sono poi esseri viventi che oltre ad essere veicoli sono anche ospiti intermedi di un ciclo biologico (zanzare)

➤ I veicoli più importanti sono:

1. *H2O*

(è un importante veicolo di infezione per malattie a trasmissione oro fecale)

2. *Aria e polvere*

(è un importante veicolo di trasmissione delle infezioni per goccioline di secrezione e altro materiale biologico che serve per la trasmissione a distanza.)

3. *Alimenti*

(alcuni alimenti possono costituire un substrato inerte oppure possono favorire la moltiplicazione dei batteri)

○ Favorenti

Favoriscono la moltiplicazione dei batteri
(torte; panini; formaggi; cozze; ecc)

○ Indifferenti

Non favoriscono la moltiplicazione dei batteri ma ne consentono la sopravvivenza
(frutta; pane; ecc)

○ Ostacolanti

Non permettono la sopravvivenza dei batteri
(marmellata (è una soluzione ipertonica!); aceto; sale)

4. *Oggetti di uso comune*

5. *Substrati vari*

3. SOGGETTO SANO

● INFEZIONI ESOGENE, ENDOGENE E NOSOCOMIALI

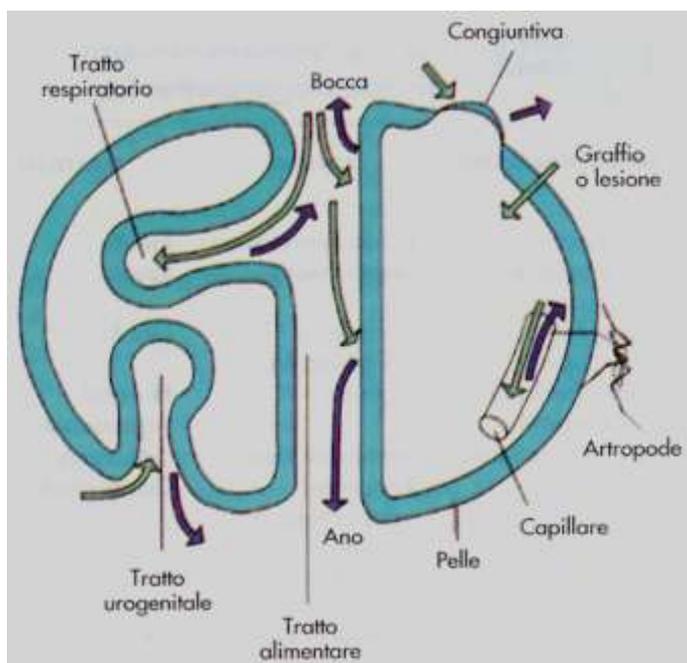
Più in generale l'infezione può essere esogena; endogena; nosocomiali (o ospedaliere)

1. Infezioni esogene: il microrganismo agente eziologico (patogeno obbligato) proviene dall'esterno direttamente o indirettamente attraverso veicoli inanimati (cibo o H₂O) o vettori animati (zanzara o mosca, cane o gatto)
 - ✓ ingestione di cibi o bevande contaminate (un microrganismo può provocare uno stato morboso anche senza vita parassitaria attraverso la produzione di sostanze tossiche che contaminano gli alimenti)
 - ✓ inoculazione diretta (punture di insetti, morsi di animali, trasfusioni) o penetrazione traumatica (ferite)
 - ✓ via aerea (goccioline di saliva)
 - ✓ via sessuale
 - ✓ trasmissione verticale (da madre a feto)
2. Infezioni endogene: il microrganismo agente eziologico (patogeno opportunista) non è normalmente patogeno, o lo è molto poco, ma riesce a provocare malattia solo se:
 - le difese dell'organismo sono malfunzionanti (immuno depressione, immuno

- soppressione, età dell'ospite);
 - per spostamento dei microrganismi della popolazione microbica normale ad altre sedi dell'organismo, in seguito a traumi, ferite, ecc.
(es. infezioni delle vie urinarie causate da batteri o miceti intestinali)
- 3. **Infezioni nosocomiali (o ospedaliere):** sostenute da patogeni opportunisti sia esogeni sia endogeni, spesso antibiotico-resistenti;
possibili condizioni predisponenti:
 1. terapie immunosoppressive,
 2. manovre strumentali (cateteri, endoscopie, ecc.)
 3. trasfusioni, ecc.

● **VIE DI TRASMISSIONE DELLE MALATTIE INFETTIVE E MODALITA' DI TRASMISSIONE**

- Le principali **vie di trasmissione** delle malattie infettive sono 5:
 1. **VIA RESPIRATORIA**
(goccioline di saliva)
 2. **VIA DIGERENTE**
 3. **VIA GENITO-URINARIA**
(rapporti sessuali e introduzione di cateteri vescicali)
 4. **VIA CONGIUNTIVALE**
 5. **ATTRAVERSO LA CUTE LESA**
(infezioni da ferita chirurgica)
- Le **modalità di trasmissione** sono 2:
 1. **TRASMISSIONE DIRETTA** (manca il veicolo e/o il vettore)
 - *Per contatto diretto tra malato e sano*
 - *Attraverso le goccioline infettive inalate da un soggetto vicino (parola, starnuto; tosse).*
 - *È tipica delle malattie veneree sostenute da microrganismi poco resistenti in ambiente esterno (sono microrganismi che vivono a contatto con il nostro corpo: se prima di infettare venissero disperse nell'ambiente morirebbero in brevissimo tempo.)*
 2. **TRASMISSIONE INDIRETTA**
 - *Avviene attraverso **veicoli o vettori intermedi***
- Le **modalità di trasmissione** dipendono da 4 fattori:
 1. **VIE DI INGRESSO E DI USCITA** (ad esempio circuito oro fecale)



VIA	ESEMPI
Ingestione	<i>Salmonella species</i> , <i>Shigella species</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Escherichia coli</i> enterotossico, <i>Vibrio species</i> , <i>Campylobacter species</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria species</i> , <i>Brucella species</i>
Inalazione	<i>Mycobacterium species</i> , <i>Nocardia species</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Legionella species</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Chlamydia psittaci</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i>
Penetrazione diretta	
Trauma	<i>Clostridium tetani</i>
Aghi da iniezione	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas species</i>
Punture d'artropode	<i>Rickettsia species</i> , <i>Ehrlichia species</i> , <i>Coxiella species</i> , <i>Francisella species</i> , <i>Borrelia species</i> , <i>Yersinia pestis</i>
Trasmissione sessuale	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Treponema pallidum</i>
Transplacentare	<i>Treponema pallidum</i>

2. RESISTENZA NELL'AMBIENTE ESTERNO

(Ad esempio alcuni microrganismi sono più suscettibili di altri ai cambiamenti di temperatura o ai cambiamenti di umidità; altri invece, a causa degli stessi fattori, si rafforzano!)

3. STATO DEL SINGOLO MICRORGANISMO

(Il *Clostridium Tetanii*, assume uno spato sporigeno.

Le sue spore rimangono attive per un lunghissimo periodo di tempo nell'ambiente esterno, anche in condizioni molto difficili.)

4. FATTORI INDIVIDUALI

● PORTATORI SANI IN SENSO STRETTO E PORTATORI MALATI

● **Portatore:**

Soggetto che non ha manifestazioni cliniche evidenti della malattia

● **Portatore sano in senso stretto:**

Soggetto che si è infettato con il patogeno; la sua infezione si è manifestata biologicamente (si è ammalato) e poi non ha più nessuna sintomatologia né evidente né nascosta, ma continuerà ad espellere l'agente patogeno.

◆ *Ho avuto la salmonella (batterio dell'intestino);*

Ho fatto la diarrea (manifestazione biologica dell'infezione);

Adesso sto bene: sono guarito;

Il fatto è che per 10 settimane continuerò ad eliminare nelle feci la salmonella.

● **Portatore malato:**

Soggetto concettualmente portatore sano ma che non lo è perché la sua infezione esprime una manifestazione anche se asintomaticamente.

È un soggetto che, quindi, non ha un'espressione EVIDENTE della sua malattia.

Il soggetto, anche se in una condizione asintomatica, non può definirsi guarito: la sua condizione di benessere può, infatti, essere solo temporanea: passare cioè da una fase di

cronicità ad una fase di acuzia (con sintomatologia).

- ◆ *Mi sono infettato con l'HIV;
L'HIV esprime la sua attività patogena, rendendo malato il soggetto pur
senza sintomatologie;
Poi arriverà la fase acuta con sintomatologia (febbre; infezioni
opportunistiche)*

● **MECCANISMI DI DIFESA**

Il microrganismo deve interagire con i meccanismi di difesa dell'ospite (*il primo meccanismo è l'infiammazione*)

Suddividiamo le barriere di difesa contro le infezioni in 2 grandi gruppi:

1. **1° BARRIERA (barriera naturale)**

comprende le parti del corpo in comunicazione con l'ambiente esterno.

● **Apparato tegumentario: PELLE**

bisogna prestare attenzione a:

1. mantenimento dell'integrità cutanea
2. possibilità di desquamazione
3. secrezione delle ghiandole sudoripare e sebacee
4. presenza di microrganismi commensali

● **Mucose:**

Tutti i pertugi di cui il nostro organismo è fornito, sono rivestiti da mucosa perchè essa serve proprio come meccanismo di difesa.

1. *Apparato digerente*: saliva; linfonodi; ghiandole; succhi gastrici
(la saliva è un ottimo antibatterico)
2. *Apparato respiratorio*: secrezioni mucose; ciglia vibratili
(le ciglia vibratili servono a riportare all'esterno il pulviscolo
che può contenere i microrganismi)
3. *Apparato urogenitale*: secrezioni mucose; flora saprofita; PH
acido; deflusso dell'urina
(il PH acide della mucosa vaginale nella donna fertile
impedisce la moltiplicazione dei microrganismi)
4. *Apparato oculare*: lacrime; movimenti di detersione.

POTENZIALE VIA D'INGRESSO	FATTORI CHE IMPEDISCONO L'INGRESSO MICROBICO	FATTORI CHE FAVORISCONO L'INGRESSO MICROBICO
Cute e mucose	Azione di lavaggio delle lacrime; lisozima nei secreti; secrezione sebacea	Abrasioni e ferite dovute a lesioni, punture di insetti o morsi di animali
Tratto respiratorio	Rivestimento mucociliare; fagociti tra gli alveoli; vibrisse nelle coane nasali	Perdita del rivestimento mucociliare per pregresse infezioni o condizioni morbose di natura non infettiva
Tratto intestinale	Superficie epiteliale cheratinizzata; muco nel cavo orale; acidità gastrica; sali biliari ed enzimi enterici; movimenti peristaltici; IgA secretorie; microflora enterica	Condizioni che riducono l'entità della microflora enterica (terapia antibiotica); condizioni che incrementano il pH locale
Tratto urogenitale	Azione di lavaggio dell'urina; ambiente acido in sede vaginale	Ostruzione del tratto urinario; abrasioni da inserimento di catetere o da rapporti sessuali

2. 2° BARRIERA (difese immunitarie)

comprende l'immunità specifica e quindi la produzione di anticorpi e di cellule immunitarie: linfociti.

- Sistema di difesa specifico
E' il sistema immunitario
- Sistema di difesa aspecifico
La FAGOCITOSI:

La FAGOCITOSI è la capacità del GLOBULI BIANCHI di introiettare dentro di loro il microrganismo e di distruggerlo.

• LE BASI DELLA PREVENZIONE DELLE MALATTIE INFETTIVE

- Scoprire e rendere inattive le sorgenti e i serbatoi di infezione
- Interrompere la catena di trasmissione
- Modificare le condizioni ambientali che favoriscono la persistenza e la diffusione dell'infezione
- Modificare la recettività della popolazione aumentando le resistenze con la vaccinazione

I microrganismi penetrano continuamente nelle case portati dalle persone, dal cibo, dagli animali, dagli insetti, con l'aria e a volte con l'acqua (stagnante). Eliminare le fonti è perciò impossibile. Individuare i serbatoi e i siti contaminati (**fattori di rischio**), così come valutare la loro importanza nella diffusione della malattia (**probabilità del rischio**) è indispensabile per un intervento di rimozione specifico ed efficace.

L'aumento dell'igiene e della decontaminazione microbica a livello domestico contribuisce a ridurre la trasmissione delle malattie infettive e il pericolo di resistenza agli antibiotici.

Gli interventi devono riguardare la pulizia generale quotidiana, le misure per impedire la diffusione delle infezioni tramite alimenti, l'igiene personale e l'igiene dei gruppi di persone vulnerabili (bambini, anziani, immunodepressi)

• POSTULATI DI KOCH (1800)

Molte malattie sono causate da infezioni virali, batteriche, fungine e protozoarie. Per tutte le tipologie di malattie infettive sono validi i postulati di Koch.

I postulati di Koch sono 4. Vengono utilizzati per determinare il legame che esiste tra una malattia ed il microrganismo che si sospetta ne sia la causa: **sono delle regole imprescindibili per trovare la relazione tra malattia ad agente eziologico.**

1. L'agente causale deve essere presente in tutti i casi della malattia di cui è ritenuto responsabile e deve essere invece assente negli individui sani.
(si deve sempre e costantemente isolare il virus nei soggetti malati)
2. L'agente causale deve essere isolato dall'individuo affetto e, posto in coltura, deve dare origine ad una popolazione cellulare omogenea (una sola specie)
(ci possono essere infezioni supportate da microrganismi diversi contemporaneamente. Separati i microrganismi, essi devono però dare la stessa patologia. In caso contrario si deduce che uno dei microrganismi isolati non ne era responsabile.)
3. L'inoculo di una coltura pura dell'agente causale in individui sani deve dare luogo alla comparsa della malattia di cui si ritiene responsabile.
(un microrganismo, se introdotto in un individuo sano, deve far esternare sempre una stessa sintomatologia)
4. L'agente causale deve essere re isolato dall'individuo infettato sperimentalmente.

Riassumendo, i postulati di Koch dicono che per trovare una relazione univoca tra malattia e microrganismo devo:

1. isolare il microrganismo
2. identificare la specie del microrganismo
3. una volta introdotto il microrganismo in un individuo sano, il microrganismo deve dare la stessa sintomatologia
4. devo poter reisolare lo stesso microrganismo nell'individuo che ho infettato.

• DIAGNOSI MICROBIOLOGICA

1. Diagnostica diretta per la ricerca dell'agente infettante

- Trova e identifica l'agente **Isolandolo e identificandolo** dimostrando (coltivandolo in terreni di cultura) la presenza di suoi prodotti specifici
 - .1 Tossine
 - .2 Antigeni
 - .3 Acidi nucleici
- Prevede un prelievo (che non è una cosa banale, per una corretta diagnosi devo avere un campione rappresentativo)
 - Il prelievo da fare, per una diagnosi di polmonite, è un escreato e un campione di sangue
 - Il prelievo da fare, per una diagnosi di infezione alle vie urinarie è un campione di urine. Se però la cistite è accompagnata da febbre farò anche un campione di sangue perchè, dalla vescica, può darsi che il mio microrganismo si sia diffuso nel torrente circolatorio.
 - **In generale quando si ha febbre, va sempre fatta un'emocoltura**

- * Campioni oro-faringei
- * Liquido pleurico
- * Sangue
- * Urine
- * Campioni ostetrici (tampone vaginale, biopsia uterina ecc ecc)
- * Escreato o lavaggio bronchiale
- * Liquido peritoneale
- * Liquido cefalo rachidiano

2. Diagnostica indiretta per la ricerca dell'agente infettante (diagnosi da HiV)

La uso per quelle infezioni per cui l'esame culturale si dimostra poco efficace perchè magari troppo indaginoso.

Non cerco il microorganismo o una delle sue componenti ma cerco le prove di una risposta immunitaria specifica in atto provocata da quel microorganismo

- Aumento del titolo anticorpale verso antigeni specifici dell'agente causale
- Reperto di anticorpi ad alto titolo
- Reperto di anticorpi della classe IgM, o di anticorpi sIgA, o a bassa avidità

● TAPPE PER LA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA

1. Esame diretto (microscopio: colorazione di gram)
2. Isolamento e coltura (per vedere la forma delle colonie)
3. Saggi biochimici per l'identificazione (quando devo studiare il metabolismo del microorganismo)
4. Antibiogramma (per saggiare i test degli antibiotici in vitro)

I batteri cambiano il loro comportamento in funzione del contatto con antibiotici attraverso mutazione oppure attraverso l'acquisizione di plasmidi

Ogni volta che si isola un microorganismo **patogeno**, (non viene fatto l'antibiogramma per microrganismi commensali abituali o non patogeni) bisogna fare il test **antibiogramma**.

serve proprio a scoprire eventuali resistenze e, di conseguenza, ad aggiustare la terapia; buona prassi sarebbe quella di effettuare il prelievo prima di iniziare la terapia.

Due sono i modi di fare il test dell'antibiogramma:

- **test di tipo qualitativo:** verificare se il microorganismo sia sensibile o resistente in una coltura (mettere una serie di pastiglie di antibiotici diversi per verificare la reazione dei batteri);

Metodi di Agar (diffusione di kili Bhaawersi da un giudizio o sensibile o resistente):

si prende una colonia isolata e identificata; la si mette in un terreno liquido poi la si sospende in una provetta.

Si creerà una certa densità nella sospensione del microorganismo nel liquido.

A questo punto si prende un tampone e si semina la superficie di una piastra di terreno di coltura; vengono messi diversi dischetti che contengono una certa quantità di antibiotico; si mette ad incubare ad una temperatura di 35 - 37 gradi e le colonie cominciano a svilupparsi.

A questo punto possiamo osservare la reazione: a contatto di alcuni antibiotici non abbiamo una reazione specifica (**batteri resistenti**), mentre in altri abbiamo

un'area circolare dove i batteri non sono presenti (è presente **l'inibizione** prodotta dal farmaco più o meno espressa).

Vengono quindi valutati e calcolati i diametri dei dischetti dei differenti agenti, che si sono formati attorno all'antibiotico e, messi a confronto con quelli standard, si valuta il grado di sensibilizzazione del dato microorganismo al specifico farmaco.

Non è detto però, anche se fosse avvenuta l'inibizione, che questa risulti sufficiente per l'utilizzo di quel determinato farmaco (**bisogna che il diametro superi una certa misura**). Più grande, comunque, risulterà l'alone e meno sarà la dose di antibiotico necessaria per allontanare i microorganismi; l'antibiotico sarà più concentrato attorno alla pastiglia e sempre meno man mano che ci allontaniamo dal farmaco (si instaurerà quindi un gradiente di concentrazione).



Per ogni patogeno isolato ci sono dei pannelli standard di antibiotici da saggiare.

C'è una scheda di valutazione dove si scriverà se il patogeno è sensibile o resistente (in riferimento ad un indice che riporta un valore intermedio)

Considerando il fatto che tutti i farmaci hanno un grado di tossicità, a parità di efficacia tenderò ad usare farmaci con la tossicità minore. Dovrò, infatti, valutare caso per caso quale farmaco sia più utile somministrare in base agli effetti alla tossicità

- **test di tipo quantitativo**: misurare la **concentrazione minima inibente** (la concentrazione più bassa del composto in esame necessaria per inibire la crescita di un dato organismo) e lo sviluppo del microorganismo.
- **La concentrazione ematica alla base terapeutica**: è la concentrazione di antibiotico nel sangue e si misura normalmente in micro grammi su cm cubo per litri di sangue. (Max Effetto terapeutico e il Min. Effetto tossico)

Questa concentrazione dura un certo periodo di tempo, quindi devo fare molta attenzione alla dose da fornire (dato che i farmaci sono studiati in un determinato modo). Dovrò, infatti, garantire che sia sempre mantenuta la concentrazione ematica (dove ottengo il **Max Effetto terapeutico e il Min. Effetto tossico**) regolare e costante per un certo periodo di tempo.

Ad una concentrazione ematica più alta, corrisponde una tossicità elevatissima

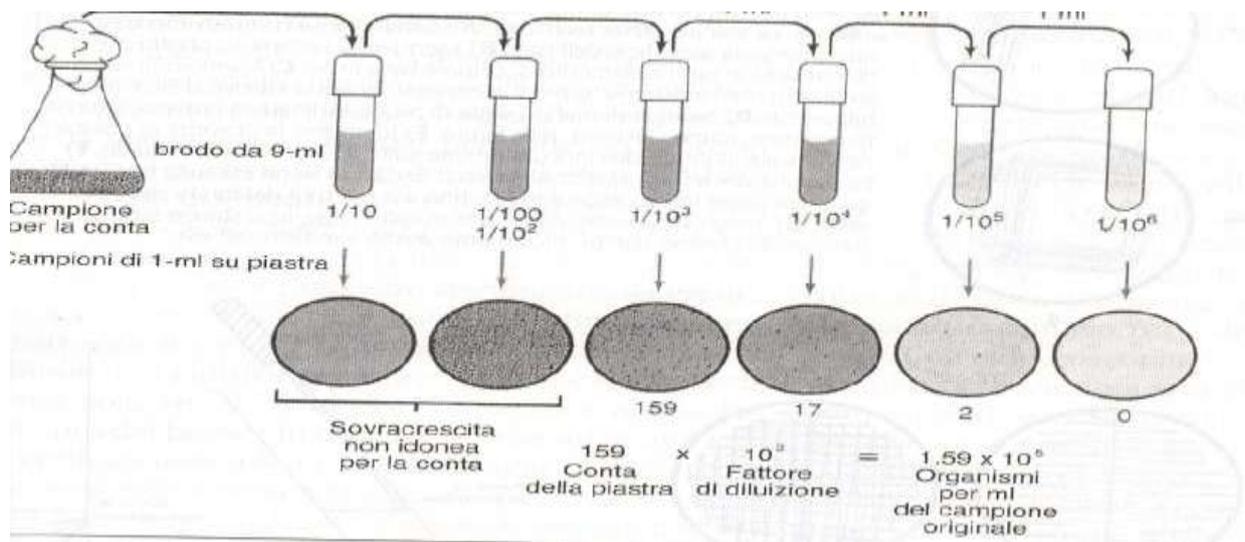
- **Dose terapeutica** è il valore che esprime la concentrazione ematica max possibile, con il min effetto tossico).

C'è un rapporto tra dose terapeutica e concentrazione ematica e quest'ultima è di riferimento per fare il test in vitro.

Metodo della diluizione o del calcolo della minima concentrazione

C'è un metodo più fine che permette di calcolare la concentrazione del farmaco utile per uccidere i microorganismi, oppure per inibirne gli effetti. In una serie di provette con all'interno del brodo, pratico delle diluizioni scalari del farmaco (16

microgrammi per cm cubo (8-4-2-1mic x litro-0,5-0,12)) Poi, in ognuna di queste provette aggiungo il mio microorganismo e vedo cosa succede.



Riscontrerò, che in alcune di queste provette si formerà una certa torbidità (sviluppo di batteri) e in altre invece rimarrà una condizione di limpidezza (dove non c'è sviluppo di batteri).

Poniamo il caso che **1 micro grammo per litro sia la concentrazione min che mi permette di uccidere i batteri**. A questo punto dovrò verificare, quale sia la concentrazione ematica di quel farmaco alla dose terapeutica. Supponiamo che la concentrazione ematica alla dose terapeutica sia 4: in questo caso significa che il farmaco preso in considerazione andrà benissimo perchè raggiungo circa 4 volte di più l'effetto di cui ho bisogno.

Se invece la concentrazione ematica alla dose terapeutica fosse stata di 0,5, non avrei potuto utilizzare quel farmaco: a questa concentrazione ematica (0,5) i batteri avrebbero continuato a svilupparsi (i batteri sarebbero stati resistenti a quel farmaco proprio perchè a 0,5 che la max dose terapeutica, il farmaco non avrebbe dato nessun effetto).

Quindi la tecnica per il calcolo della minima concentrazione, fornisce i valori di sensibilità e di resistenza e anche della concentrazione di farmaco per uccidere (mic)

Adotto questa tecnica quantitativa quando devo somministrare dei farmaci tossici e quindi posso graduare in base alle situazioni di tossicità e sensibilità la quantità di farmaco da somministrare (**oggi sempre più in uso nei laboratori proprio perchè, oltre alla risposta di tipo qualitativo, fornisce anche una risposta di tipo quantitativo, sfruttando al meglio lo strumento della dose terapeutica**).

La sensibilità del microorganismo in funzione dell'antibiotico è espressa come la più alta diluizione cioè la più bassa concentrazione di antibiotico capace di inibire la crescita del microorganismo.

5. Ricerca anticorpale (se voglio fare la diagnosi indiretta)

6. Rivalutazione della malattia (dopo la scelta anticorpale)

- La tecnica, comunque, più certa per individuare un microrganismo è quella di mappare il suo acido nucleico

Una volta trovato il batterio bisogna sempre saggiarlo agli antibiotici perchè i microrganismi cambiano la loro sensibilità agli antibiotici a seconda delle condizioni in cui si vengono a trovare. Quindi si è costretti, a ogni isolamento di patogeno, fare un ANTIBIOGRAMMA (*che è un test per l'individuazione degli antibiotici nei confronti dei quali il nostro isolato è sensibile e/o resistente*)

Intanto che aspetto l'esito dell'antibiogramma agisco con una terapia standard sul microrganismo del batterio che sospetto sia l'agente eziologico della mia infezione: **approccio standard**

Possiamo avere dei farmaci che non uccidono i microrganismi ma ne impediscono la moltiplicazione, oppure possiamo avere dei farmaci che oltre a bloccarne la proliferazione eliminano anche tutti i batteri.

Due considerazioni da fare, sugli antibiotici:

- ✓ **la minima concentrazione inibente (MIC):** la concentrazione più bassa del composto in esame necessaria per inibire la crescita di un dato organismo.
- ✓ **la minima concentrazione battericida (MCB):** la concentrazione più bassa di un composto, necessaria per provocare la morte di più del 99,99% di un dato microorganismo.

• TEST PER LA RICERCA DI ANTICORPI

C'è una specificità antigene – anticorpo.

Conseguentemente a questa relazione, per ricercare **anticorpi sconosciuti** dovremo **avere antigeni conosciuti**, e viceversa.

Se abbiamo **anticorpi conosciuti**, invece, li useremo per cercare antigeni che non si conoscono (approfittando, appunto, della specificità antigene - anticorpo).

Supponiamo di cercare un' **antigene sconosciuto**.

Ad esempio, esaminando una cellula, vogliamo scoprire se questa contiene un virus (antigene sconosciuto).

Posso coltivare il virus di cui nutro il sospetto di presenza,

oppure posso procedere facendo un' indagine indiretta (agendo, cioè, con gli anticorpi specifici nei confronti di quel virus).

Così facendo posso mettere in evidenza l'eventuale unione antigene anticorpo che può avvenire all'interno di questa cellula solo se l'antigene fosse presente.

L'anticorpo specifico, infatti, si legherà alla cellula solo se questa conterrà degli antigeni specifici per quell'anticorpo (solo se c'è la specificità); in caso contrario l'unione antigene-anticorpo non potrà avvenire.

L'anticorpo ha una parte più specifica una parte più strutturale.

Un antigene della serie delle meningitidis si legherà solo anticorpi specifici della serie meningitidis.

Abbiamo visto che un microrganismo presenta diverse componenti:

la parete, la membrana, i flagelli, ecc.

Perciò esiste più di un anticorpo per uno stesso microrganismo: c'è ne sono tanti quanti sono le diverse strutture antigeniche del microorganismo (quelle che vengono chiamati antigeni)

Un batterio non ha solo un antigene ma ne ha più di uno e quindi avrà anticorpi specifici, contro tutti questi diversi antigeni.

Gli antigeni più evidenti sono gli antigeni della parete, che sono nella struttura esterna

Si possono, quindi, avere degli **anticorpi specifici** per quell'antigene che si legano alla parete.

Si pone ora il problema di evidenziare questa benedetta reazione antigene-anticorpo: dal punto di vista fisico, infatti, se si osserva al microscopio il batterio, non si vedono gli anticorpi che potrebbero essere attaccarsi alla sua parete.

Per visualizzare questa reazione ,si attacca un colorante alla parte non specifica dell'anticorpo con un metodo chimico.

Il microrganismo, quindi, si colorerà solo nel caso in cui dovesse avvenire la reazione di specificità con il suo anticorpo specifico (colorato precedentemente) che gli rimarrà attaccato.

Se questa reazione non dovesse avvenire, la cellula batterica rimarrebbe incolore, a significare il fatto che non c'è stato nessun legame con l'anticorpo specifico.

quindi: se cerco anticorpi sconosciuti, dovrò usare un antigene noto, se invece possiedo anticorpi noti cercherò un'antigene sconosciuto

Ecco un esempio di metodologia per trovare anticorpi sconosciuti:

1. Prendo una coltura della serie meningitidis
2. quindi coltivo il batterio e lo identifico
3. rompo la colonia attraverso un metodo ad ultrasuoni
4. faccio una pappeta di antigeni,
5. uso delle tecniche che separano i vari antigeni ed arrivo ad avere, per esempio, l'antigene di parete della serie meningitidis isolato.
6. Essendo questo un antigene noto, prendo del siero di sangue da un paziente, lo metto a contatto con l'antigene noto per vedere se contiene anticorpi contro la serie meningitidis

Se cerco anticorpi sconosciuti (che quindi non sono colorati da me ovviamente!) avrò un antigene conosciuto.

Prendo il siero del paziente e vedo se avviene l'unione tra antigene e anticorpo: però fisicamente la cellula non si colora perchè non uso un anticorpo colorato.

Prendo allora un **antianticorpo colorato**.

Questo antianticorpo si attacca all'anticorpo e lo colora: ovviamente colorerà solo l'anticorpo che ha avuto un legame specifico con l'antigene.

L'antianticorpo

Un antigene è qualsiasi sostanza chimica che è in grado di stimolare il sistema immunitario.

Se prendo un pezzo di parete del batterio (antigene), e lo metto in un coniglio, il coniglio provocherà, con il suo sistema immunitario, degli anticorpi contro quel pezzo di parete.

Se io prendo degli anticorpi umani contenuti nel siero umano e questo siero con gli anticorpi umani lo inietto nel coniglio (che li riconoscerà come antigene), il coniglio farà degli anticorpi anti globuline umane perchè gli anticorpi dell'uomo si comportano come antigeni nei confronti del coniglio.

Ecco che questi anti anticorpi sono immunoglobuline di coniglio contro le immunoglobuline umane

- **ESEMPI DI PATOGENESI**

1. **MENINGITE:**

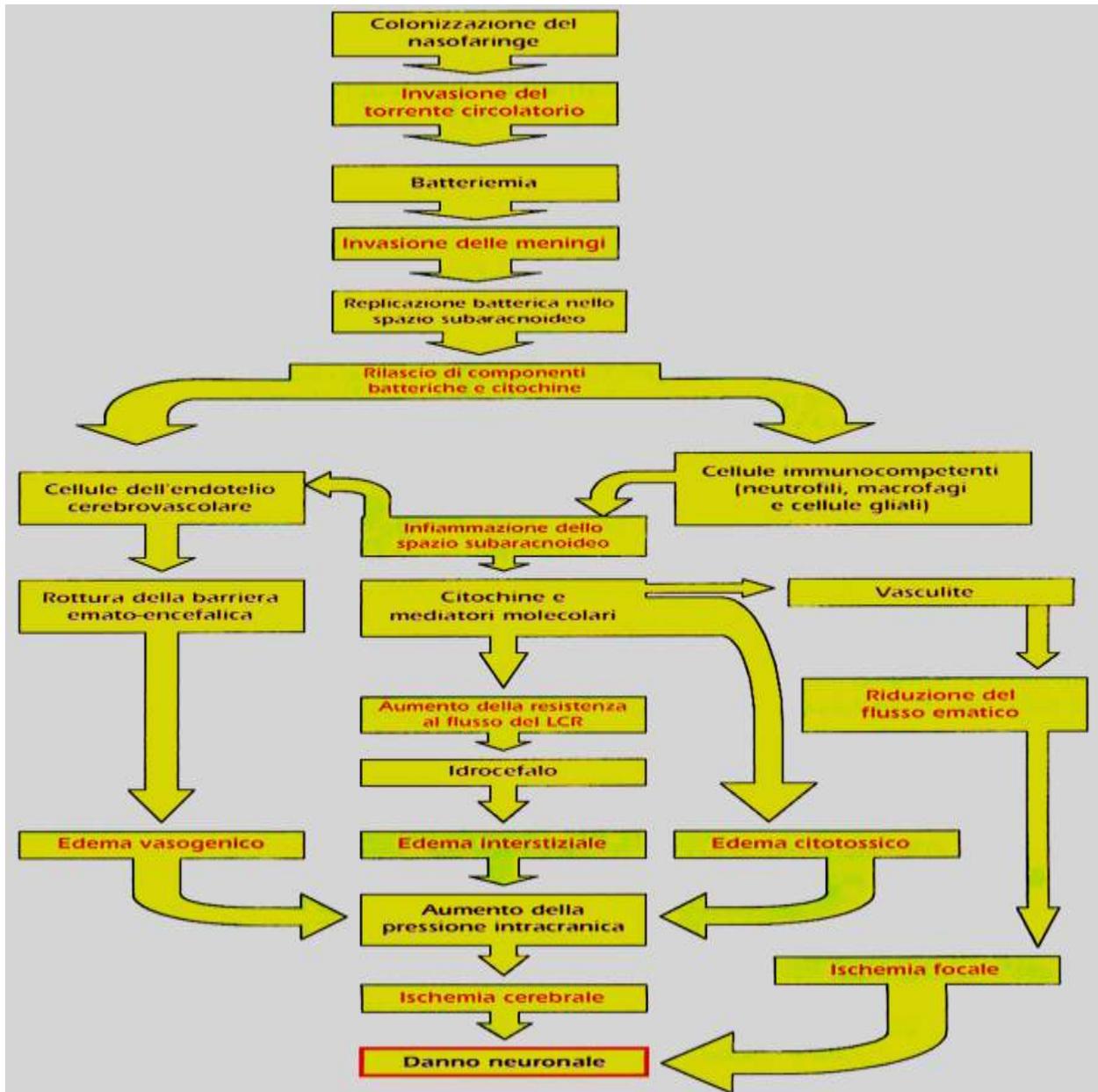
infezione da forte risposta infiammatoria localizzata nello spazio sub-aracnoideo

ETÀ	AGENTE
Neonati (<1 mese)	Streptococchi Gruppo B e <i>Escherichia coli</i> ; <i>Listeria monocytogenes</i> ; <i>Klebsiella</i> sp; altri batteri Gram-negativi
Bambini	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b; <i>Neisseria meningitidis</i> ; <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Adulti	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ; <i>Neisseria meningitidis</i>
CONDIZIONI PARTICOLARI	
Meningite o ascessi intracranici associati a traumi, interventi chirurgici o presenza di corpi estranei	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Streptococcus pneumoniae</i> ; batteri anaerobi Gram-negativi e Gram-positivi; <i>Pseudomonas</i> sp.
Ascessi intracranici non associati con traumi o interventi chirurgici	Streptococchi microaerofili e anaerobi; batteri anaerobi Gram-negativi (spesso batteri aerobi e anaerobi delle vie aeree superiori)

DIFFERENTI
PATOGENI A
SECONDA
DELL'ETA'

2. BRONCHITI

infiammazione mucosa bronchiale (le vie aeree superiori sono normalmente colonizzate da microrganismi normali; dalla laringe in giù normalmente l'albero respiratorio è sterile)
Possono arrivare microrganismi attraverso la via respiratoria; attraverso goccioline di saliva



da soggetti che li eliminano dai loro bronchi e polmoni; attraverso il torrente circolatorio; o per complicanze dopo una setticemia (o, viceversa, una bronchite può trasformarsi in bronco polmonite e dare una setticemia generalizzata a partenza polmonare)

I microrganismi maggiormente responsabili delle bronchiti sono:

- *Bordetella pertussis*
- *Haemophilus influenzae*
- *Moraxella catharralis*
- *Streptococcus pneumoniae*

3. POLMONITI

infezione parenchima polmonare (che è diverso da quello dei bronchi) che si instaura in

poche ore o giorni. Riempimento alveoli con liquido essudatizio e cellule infiammatorie
Ci sono polmoniti acute e **croniche** (può durare settimane o mesi. Distruzione del parenchima con formazione di ascessi o cavità: tipico esempio *Mycobacterium tuberculosis* oppure *Cryptococcus neoformans* (fungo))

Il prelievo da fare, per una diagnosi di polmonite, è un escreato e un campione di sangue

4. APPARATO GASTRO ENTERICO

1. **Ulcera peptica e gastrite cronica:** (*Helicobacter pylori*)
2. **Diarrea:** (*Vibrio cholerae*, *EPEC*, *ETEC*, *Salmonella spp.*)
3. **Sindrome dissenterica:** (*Shigella spp.*, *EIEC*, *EHEC*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*)
4. **Febbre enterica o tifoide:** (*Salmonella typhi*)
5. **Sindrome simil-tifoide:** (*Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter*)

5. INFEZIONI DEL CUORE

Endocardite infettiva: infezione a strutture endocardiche sia valvolari (con colonizzazione delle valvole) che murali. Rispettivamente ai lembi valvolari (nei soggetti con valvulopatie) e alle pareti delle cavità cardiache in soggetti particolarmente predisposti.

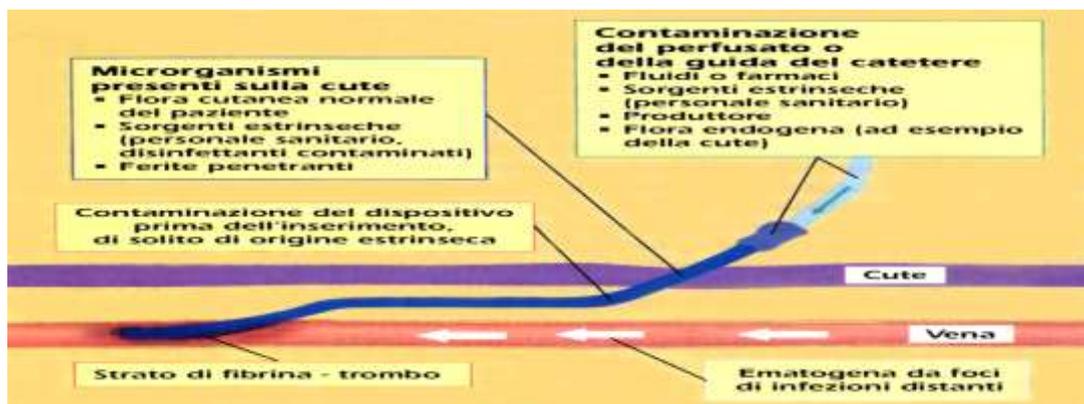
Partenza dal torrente circolatorio

Cocchi gram positivi:

S. aureus, *S. epidermidis*, *streptococchi viridanti* e *enterococchi*

6. INFEZIONI RIGUARDANTI CATETERI VENOSI (o INTRAVASALI)

Cateteri che posizionano per un periodo di tempo lungo e per i motivi più diversi nella cute e che si possono infettare.



7. INFEZIONI DELL'APPARATO GENITO URINARIO

infezioni endogene che originano da batteri dello stesso paziente

Il prelievo da fare, per una diagnosi di infezione alle vie urinarie è un campione di urine. Se però la cistite è accompagnata da febbre farò anche un campione di sangue perchè, dalla vescica, può darsi che il mio microorganismo si sia diffuso nel torrente circolatorio.

1. Actinomyces
2. Bacteroides fragilis
3. Enterococcus
4. **E. coli (in particolare)**

L'E.Coli è contenuto nell'intestino; si genera un'infiammazione dell'intestino; quindi una permeabilità dell'E.Coli nel sistema linfatico; da qui arriva alla vescica; colonizza la vescica e dà un'infezione urinaria

5. Klebsiella pneumoniae

6. Morganelle
7. Proteus mirabilis
8. Pseudomonas aeruginosa
9. Staphylococcus saprophyticus

- **VIRUS**

- I virus sono associazioni organizzate di acidi nucleici che trasportano il materiale per la replicazione dentro una *parete protettiva costituita da proteine (CAPSIDE)*.
- I virus possono essere visti come *oggetti biologici* e sono considerati come un **COMPLESSO BIOCHIMICO INERTE** *perchè non possono replicarsi fuori da una cellula vivente.*
- Una volta entrati nella cellula vivente (**cellula ospite o cellula competente**) sono capaci di utilizzarla per sintetizzare nuove particelle di virus dette **VIRIONI**
- la tassonomia dei batteri prevede:
 1. batteriofagi (virus dei batteri)
(responsabili del trasporto dei plasmidi),
 2. virus degli eucarioti: animali e virus delle piante.
- Come per i batteri non sono sufficienti le colorazioni o la morfologia, ma successivamente devono essere effettuati dei test, come esame di coltura e immunologico per poter riconoscere i virus
- i virus, come i batteri (genere escherichia, specie coli), hanno una loro tassonomia: ordine, famiglia, genere
In base al loro rivestimento, a come i capsidi si dispongono fra di loro e se il genoma è a DNA, o ad RNA i virus si classificano in famiglia e genere, o gruppi di specie con caratteristiche comuni, che li differenziano da altri generi della stessa famiglia (ebola: famiglia... , genere ..., ordine). ù
- I virus possono poi avere delle altre suddivisioni: in siero **tipi e genotipi**, fino ad arrivare al **ceppo**.
Ad esempio il virus dell'influenza A non è sempre uguale a se stesso ma può avere delle ulteriori modificazioni con sierotipi o genotipi diversi, fino ad arrivare al ceppo
- I virus sono agenti infettivi sia con caratteristiche di organismi viventi sia con caratteristiche di oggetti non viventi:

➤ *caratteristiche che vengono attribuite ad organismi viventi:*

1. **RIESCONO A REPLICARE LORO STESSI** (replicano **l'acido nucleico virale**; **il capsido che è l'involucro che lo contiene** (cioè replicano quelle proteine o quelle strutture chimiche che costituiscono il capsido) e **l'envelope** (se ne sono provvisti))

il genoma codifica solo per le proteine necessarie alla replicazione:

➤ *Proteine funzionali non strutturali:*

(polimerasi dell'acido nucleico)

➤ *Proteine strutturali*

(quelle che cioè vengono incorporate e formano una parte del virione)

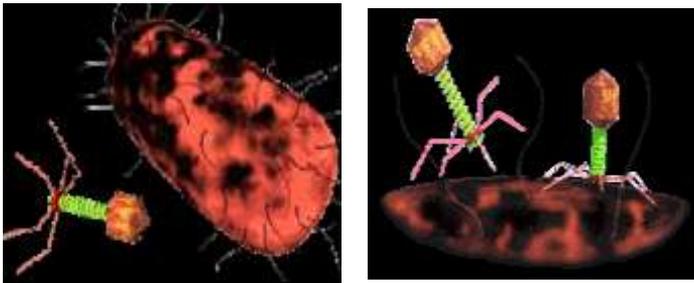
Queste proteine vengono assemblate secondo un principio architettonico per formare il CAPSIDE che proteggerà l'acido nucleico; il capsido potrà avere forma icosaedrica; a spirale; o avere forma più complessa.

2. POSSONO MUTARE

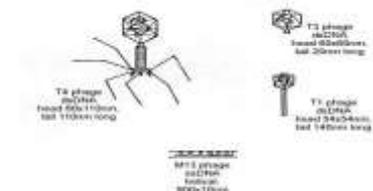
➤ *caratteristiche che vengono attribuite ad oggetti non viventi:*

1. NON HANNO UN LORO METABOLISMO (sono privi di ribosomi e di mitocondri)
2. SONO ACELLULARI (non contengono né citoplasma né organelli, né membrana nucleare e non hanno un vero e proprio nucleo)
3. NON SI DIVIDONO (non si dividono né per replicazione sessuata e né per replicazione asessuata)
4. SI REPLICANO UTILIZZANDO I SISTEMI METABOLICI DELLA CELLULA OSPITE (i virus non possono replicarsi fuori dalla cellula ospite, perché sono privi di quegli organelli che originerebbero i meccanismi atti a produrre l'energia essenziale per lo sviluppo dei processi biochimici cellulari.)
Per replicarsi hanno quindi bisogno della cellula ospite: durante questa attività possono creare danno.
5. CONTENGONO O DNA O RNA, NON ENTRAMBI GLI ACIDI NUCLEICI
Il fatto che i virus non contengano entrambi gli acidi nucleici ma solamente DNA o RNA, fa sì che questi agenti infettanti, possano essere suddivisi in
 1. VIRUS A DNA
 2. VIRUS A RNA

- I virus non sono mobili: per quanto riguarda il loro movimento, sono dipendenti da fattori fisici esterni. Si spostano per infettare altre cellule suscettibili.
- I virus sono PARASSITI INTRACELLULARI OBBLIGATI (totalmente dipendenti da una cellula vivente per moltiplicarsi)
- I virus possono infettare
 1. Cellule animali (uomo compreso)
 2. Le piante (*ad esempio il virus del mosaico del tabacco*)
 3. I microrganismi (ci sono virus che infettano:



- batteri (*batteriofago o fago*)
- funghi (*micofagi*)



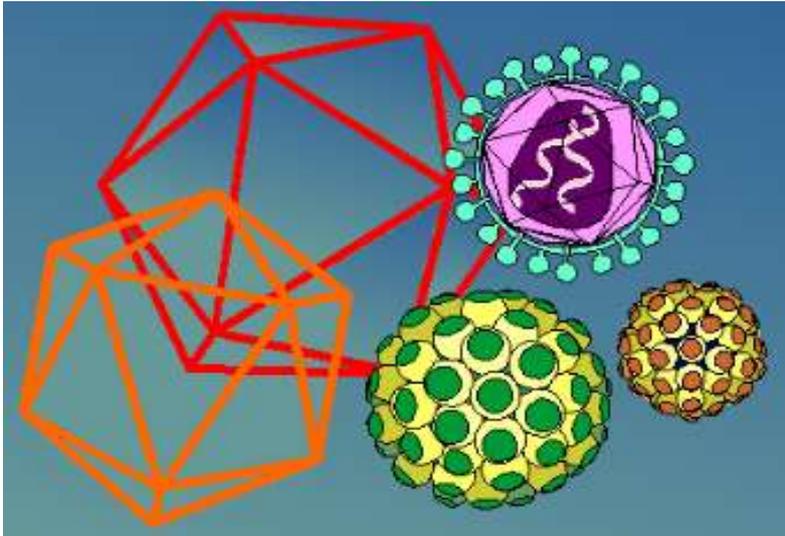
C'è un rapporto di specificità complesso tra virus e ospite:

- Specificità tra virus e ospite
- Specificità, all'interno dell'ospite, tra virus e cellule costituenti l'ospite.

(es: *il virus dell'epatite, non infetterà mai cellule del nostro organismo che*

non siano le cellule epatiche)

- I virus sono molto piccoli in dimensioni: 20-300 nanometri si vedono solo con il microscopio elettronico
- abbiamo detto che possono contenere solo DNA o solo RNA.



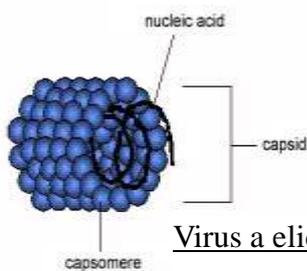
- I virus hanno delle strutture che si chiamano CAPSIDE ed ENVELOPE che delimitano il virus e hanno la caratteristica di riconoscere la cellula suscettibile.

➤ CAPSIDE

Il capsid è una struttura proteica e ha la funzione di contenere il genoma dei virus che è di norma costituito da una catena di acido nucleico, che può essere DNA o RNA, a seconda del tipo di virus. Il capsid proteico può avere diverse forme: elicoidale, icosaedrico, o più complessa: dà una forma al virus. Quando il virus è *nudo*, il capsid è l'unico rivestimento della particella. In questo caso presenta le proteine necessarie per il riconoscimento recettoriale indispensabile per l'infezione (spikes o spicole).

Il Capsid è formato da CAPSOMERI (unità fondamentali del capsid)

E' la forma più piccola individuabile al microscopio elettronico, formata dall'interazione di più **protomeri** (che possono essere formati in pentoni o esoni a seconda di come si strutturano e che sono le singole proteine che formano il capsid)

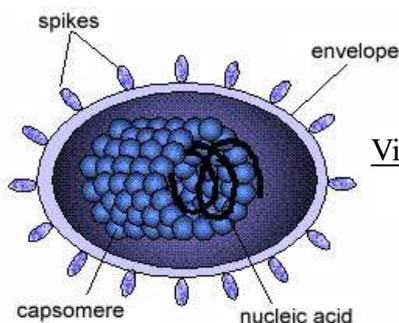
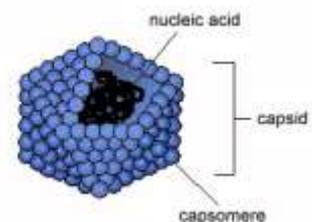


Virus a elica:

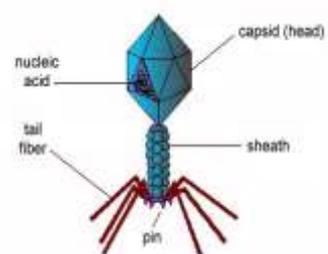
capsid a struttura elicoidale

Virus poliedrico:

capsid a icosaedro



Virus con envelope:



➤ **ENVELOPE (o PERICAPSIDE)**

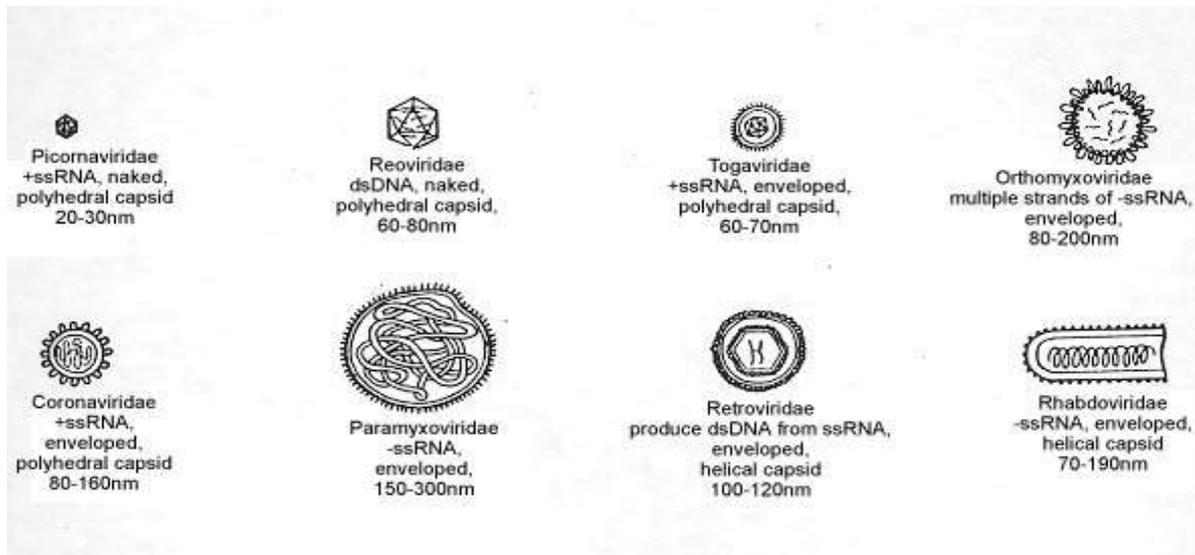
Molti virus hanno un secondo rivestimento, proveniente dalla membrana cellulare della cellula ospite, e formato da fosfolipidi. Questo secondo rivestimento è chiamato *envelope*, su cui sono evidenti le spikes necessarie per l'infezione, che non fanno parte del capsido ma che sono vere e proprie proteine di membrana, spesso glicoproteine.

La struttura dell'envelope deriva dalla membrana cellulare della Virus complesso: cellula infettata composta sempre di proteine simili alla cellula ma con l'aggiunta di alcune caratteristiche chimiche (proteine) del virus stesso, che lo rendono riconoscibile al sistema immunitario. Quindi la struttura è simile a quella della membrana cellulare (doppio strato lipidico), ma le componenti chimiche sono differenti (glicoproteine virali)

Possiamo dire che il concetto che fa riferimento alla forma dei batteri è molto simile a quello che fa riferimento alla forma dei virus:

I batteri devono la propria morfologia alla parete cellulare, i virus la devono al capsido o, se presente, all'envelop

● **Dimensione e forma dei virus da 5 a 300 nanometri**



- le strutture del **capside**, **dell'acido nucleico** e **dell'envelop** (dove esiste) si dicono **STRUTTURE ANTIGENICHE**

Sono cioè in grado di stimolare la formazione di anticorpi specifici.

- **CLASSIFICAZIONE DEI VIRUS A DNA**

1. A singola elica, capsido poliedrico.
Parvovirus
* parvovirus B19
2. A doppia elica, capsido poliedrico.
Adenovirus
* infezioni respiratorie
3. A doppia elica, capsido complesso, con envelop

Virus del vaiolo

4. A doppia elica, capsid poliedrico; con envelop

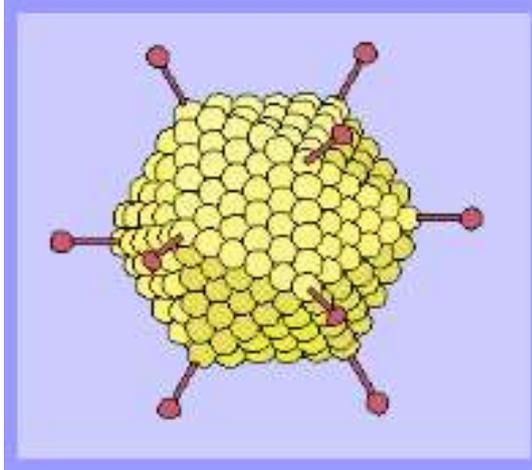
Varicelle-Zoster;

Citomegalovirus;

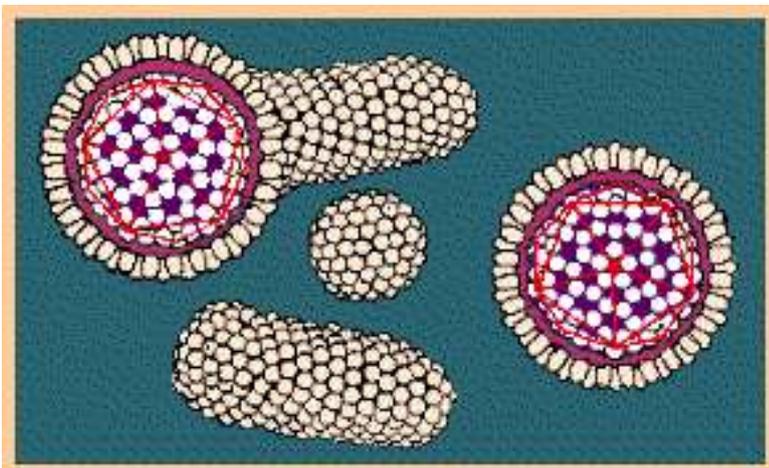
Virus di Epstein-Barr;

Virus dell'Epatite B;

Herpes Simplex 1 (labbiale) e 2 (genitale)



Virus a DNA: *adenovirus*



Virus a DNA: *epatite B*

• **CLASSIFICAZIONE DEI VIRUS A RNA**

1. A singola elica, capsid poliedrico

Enterovirus;

× virus della Poliomelite

Virus del raffreddore;

Virus dell'epatite A.

2. A singola elica con envelope
Virus della Rosolia;
Epatite C.
3. A singola elica, capsidale elicoidale con envelope
Virus della Rabbia;
Ebola;
Morbillo.
4. A elica multipla con envelope
Virus dell'Influenza. (questo virus può presentarsi in forma sferica o allungata)

- **CLASSIFICAZIONE DEI RETROVIRUS**

I retrovirus, sono virus che producono DNA da una elica di RNA usando la trascrittasi inversa. Sono dotati di capsidale poliedrico ed envelope.

Il tipico esempio di un retrovirus è il virus dell'AIDS.

L'HIV è un virus a RNA: ha l'RNA virale, un capsidale e un pericapsidale o envelope. Si ha un linfocita il CD4, si ha un sito di riconoscimento e l'introduzione del capsidale virale l'RNA virale dentro la cellula con la soluzione del taglio e incolla dell'envelope con la membrana della cellula (non per endocitosi e/o continuità della cellula) si l'eliminazione del capsidale e l'iberazione dell'RNA virale. L'HIV è un retrovirus, perchè da un RNA si ottiene un DNA (codifica), attraverso un DNA sintetasi e un RNA dipendente, entrando nel nucleo della cellula e integrandosi nel DNA della cellula stessa (**da RNAvirale a DNAvirale**).

Qui il virus una volta insediato può rimanervi in latenza o silente, anche per lunghi periodi. Questa interazione con il nucleo virale impedisce al sistema immunitario di agire in modo efficace. Quando il **DNA o RNA dipendente virale** riprende le sue funzioni, codificando per il RNA messaggero virale, il quale a sua volta codifica le proteine del capsidale e successivamente si ha la fuoriuscita del virus dell'HIV completo uguale a quello che lo aveva infettato.

La caratteristica quindi è la seguente: **RNAvirale in DNAvirale, che si integra per un po di tempo con il DNA del nucleo della cellula infettata.**

Il virus dell'HIV una volta uscito dalla cellula può essere diverso rispetto a quello che l'ha infettato.

I linfociti CD4 sono i regolatori del sistema immunitario.

I linfociti sono prodotti dal midollo e non possono riprodurre se stessi (è una cellula stabile), ha un periodo di vita dopo di che viene sostituito da altri linfociti.

HIV può infettare nel periodo di latenza senza dare espressione della stessa, perchè si avrà l'**espressione della malattia** solo quando il numero di linfociti CD4 (1000 per mm cubo) varcheranno la soglia dei 200 per mm cubo provocando la sindrome chiamata AIDS, e questo periodo può essere molto lungo (anche diversi anni).

- **FUNZIONAMENTO DEL VIRUS DELL'HIV**

Normalmente è sempre il DNA che codifica per un RNA; l'unica eccezione, dove accade l'inverso, è data dai RETROVIRUS (HIV).

Il virus dell'HIV è un virus a RNA che ha un capsidale e un envelope.

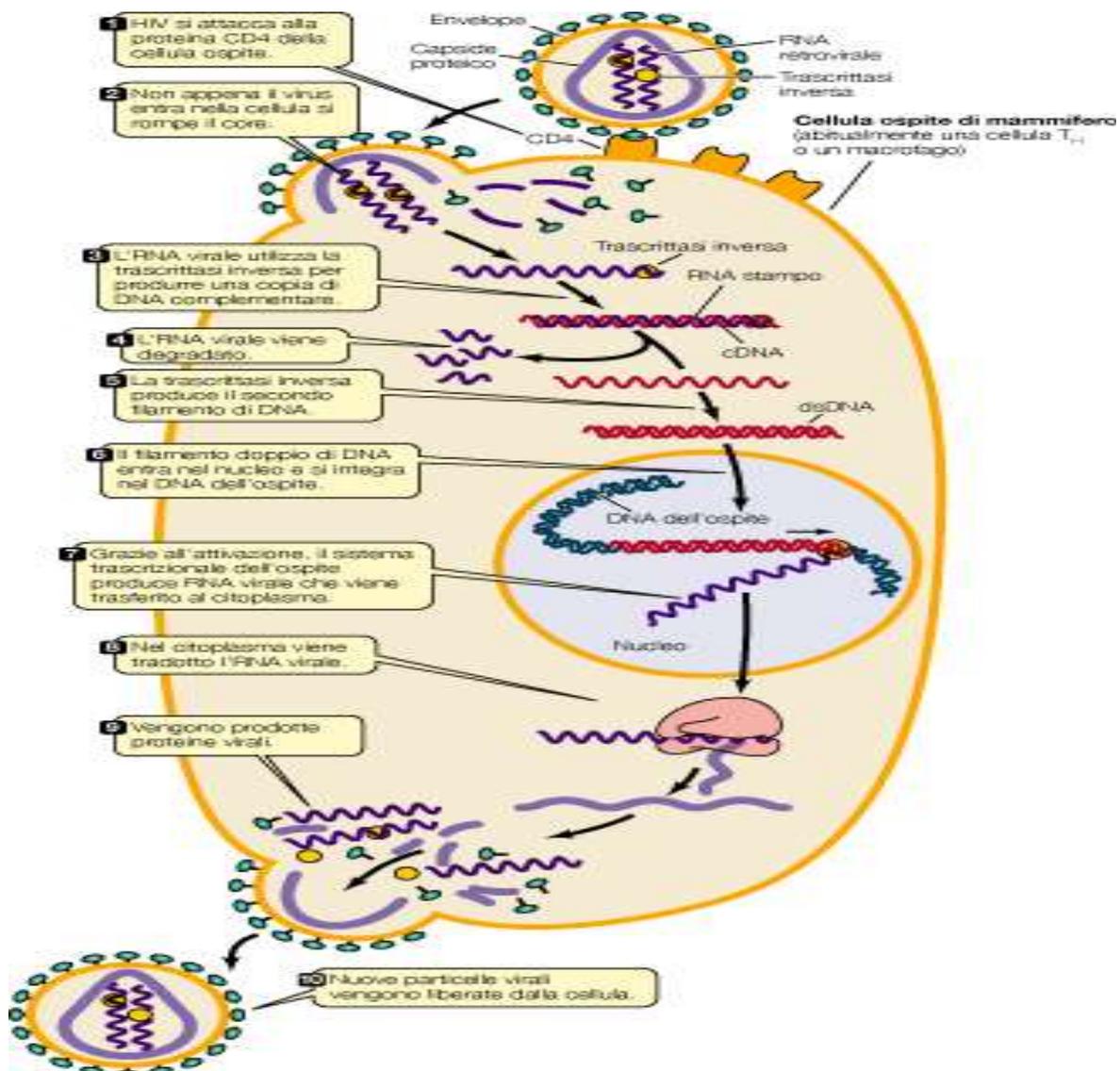
C'è il RICONOSCIMENTO DELLA CELLULA (come al solito.) ma la differenza sta nel fatto che questo virus è in grado di codificare una proteina, che è un enzima: la TRASCRIPTASI INVERSA.

Questa proteina è in grado di trasformare dell'RNA in DNA.

Questo DNA viene inglobato nell'acido nucleico della cellula ospite (che sono i linfociti) e li può rimanere silente per un lungo periodo di tempo. Il virus dell'HIV è un'infezione molto lenta (perché il numero di linfociti eliminati dal virus arriva ad essere significativo dopo un bel periodo di tempo, anche anni.)

Poi si attiva. Questo DNA virale, che parte da un virus a RNA, comincia a codificare per un RNA virale; proteine precoci e proteine tardive, fino a dare, in una serie di assemblaggi, un virus di HIV uguale a quello che l'ha generato.

Le infezioni opportunistiche, che sono l'espressione dell'infezione da virus da HIV, si manifestano anche dopo anni dalla prima infezione. La presenza, invece, del virus infettante si può scoprire anche dopo 5-8 settimane (comparsa degli anticorpi) dall'avvenuto contatto con il virus stesso.



- **RIPRODUZIONE VIRALE (RICONOSCIMENTO, ASSORBIMENTO, PENETRAZIONE)**

→ Fanno copia di loro stessi, attraverso una prima **fase di adesione** o di **RICONOSCIMENTO** alla cellula competente, **grazie ad una specificità tra virus e cellula** (il virus dell'epatite infetta le cellule epatiche e non le cellule nervose). Seguirà poi

l'ingresso del virus all'interno della cellula e poi all'interno della cellula possiamo avere:

1. un **ciclo abortivo**, cioè inizia la replicazione ma poi non si ha la produzione virale e il virus viene eliminato una volta entrato nella cellula.
2. oppure rimanere all'interno della cellula e rimanervi per un certo periodo di tempo (**ciclo lisogeno**),
3. oppure un **ciclo produttivo litico** con una grande replicazione all'interno della cellula, questa muore e si ha l'eliminazione dei virus pronti ad infettare nuovamente altre cellule (ciclo lento e ciclo rapido).

Una delle attività dei virus è anche di tipi **cancerogeno**:

(il papilloma virus è responsabile del tumore della cervice uterina. In questo caso il virus si integra con l'acido nucleico della cellula competente e la trasforma in cellula tumorale)

● **GENI TARDIVI E GENI PRECOCI VIRALI**

L'espressione del virus nella cellula, oltre al danno che può provocare, è data dalla capacità del virus di fare copia di se stesso: deve fare

1. una copia dell'acido nucleico virale
2. una copia delle proteine del capsido
3. una copia delle proteine dell'envelop (se ce l'ha)

I virus, per moltiplicarsi, non fanno contemporaneamente copia delle tre cose sopra elencate. Per questo motivo si usa dire che ci sono dei geni precoci virali e dei geni tardivi virali:

1. Geni precoci: da regioni genomiche; E. Proteine di regolazione.

Un paio d'ore dopo l'entrata del virus

2. Geni tardivi strutturali. da regioni genomiche L.

Sintetizzati dopo la duplicazione del DNA

1. I geni codificano per delle proteine; queste proteine, spesso, sono degli enzimi che servono per la costruzione delle diverse parti del virus.

Il fatto di avere dei geni che esprimono da subito la loro attività con delle proteine particolari (geni precoci) è molto utile quando si vuole fare una diagnosi di infezione virale perchè si cercano le proteine precoci che sono a loro volta generate da geni precoci.

Se si volesse vedere in modo precoce se una cellula sia infettata da un virus, prendo degli anticorpi contro le proteine precoci che esprime questo virus.

Coloro gli anticorpi contro le proteine precoci del virus, e li metterò in contatto con la cellula e, se la cellula è infettata, vedrò che il nucleo si colora perchè dentro di se contiene queste proteine.

2. Le proteine tardive sono quelle dell'envelope o del capsido ma sono quelle che si formano più tardi: sono espressioni tardive dell'acido nucleico virale.

Se, allora, voglio fare una diagnosi che non sia solo precoce ma che sia completa posso farla utilizzando sia anticorpi contro le proteine precoci sia contro le proteine tardive.

Le proteine tardive, spesso, sono quelle che si inseriscono nella membrana cellulare prima che il virus fuoriesca per gemmazione dalla cellula. (tipico comportamento dei virus con envelop)

- Le cellule che permettono la progenie virale sono le **cellule Permissive**.

Queste sono cellule che riconoscono il virus e permettono la sua intrusione e la sua moltiplicazione, a differenza delle **cellule suscettibili** che permettono l'infezione (l'ingresso del virus), ma non la moltiplicazione virale.

- La capacità da parte dei virus di riconoscere le cellule (come ad es. il virus epatite che riconosce le cellule epatiche) è detta **tropismo** o **specificità tissutale**.
- **ASSORBIMENTO**: interazione dapprima casuale e poi ad alta affinità con la cellula competente.
 - Avviene tra recettori cellulare e da anti-recettore virale;
 - Si trova sulla superficie virale (del capsido oppure dell'envelope);
 - interagisce con il recettore con meccanismo a chiave/serratura (tipo incastro).
 - Il recettore viene sfruttato dal virus anche se non è la sua funzione (la funzione del recettore è solo quella di riconoscimento).
- L'anti-recettore virale della cellula può essere di due tipi a seconda se si uniscono insieme: si ha la **trasfezione** attraverso il by-pass del legame al recettore (il recettore permette il riconoscimento, ma ci deve essere anche il meccanismo di assorbimento, (quindi di introduzione del virus, dentro la cellula)).

• **PENETRAZIONE VIRALE**

- ◆ Avviene dopo l'assorbimento
 - ◆ La penetrazione può avvenire mediante **endocitosi** o mediante **fusione** della membrana plasmatica.
1. Il primo meccanismo per **endocitosi**: si ha la penetrazione (attraverso una invaginazione della membrana), abbiamo un taglio e cucì e il virus entra nella cellula formando un vacuolo con all'interno l'acido nucleico, successivamente si avrà una lisi della membrana attraverso degli enzimi e la successiva fuori uscita dell'acido nucleico all'interno della cellula (virus dell'influenza);
 2. Il secondo meccanismo è la **fusione**: La penetrazione all'interno della cellula avviene da parte del virus con la sua membrana cellulare (envelope) e non tramite vacuolo, formata dalla continuità della membrana cellulare di fosfolipidi. Tutti e due i meccanismi lasciano integra la cellula, e così facendo, il virus può utilizzare il suo metabolismo, prima di distruggerla.

Alcuni virus si replicano dentro il nucleo della cellula: hanno un meccanismo di doppia penetrazione, dove la prima penetrazione avviene nella membrana cellulare e la seconda penetrazione avviene all'interno del nucleo, nella membrana nucleare. L'acido nucleico del virus entra dentro il nucleo e si moltiplica creando copie di se stesso e copie delle proteine, che servono per il capsido. Questo meccanismo avviene attraverso un enzima DNA sintetasi virale e le basi purine e pirimidine, che nel nucleo si occupano del metabolismo del virus.

Gli enzimi che rompono il capsido sono quelli che codificano l'acido nucleico virale, che uscirà dal nucleo e solo quando sarà fuori uscito dalla cellula, per gemmazione, il virus ricomporrà l'envelope con la continuazione della membrana cellulare.

In questo caso non abbiamo la lisi della cellula e il danno sarà quello di inibire il metabolismo della cellula, perdendo a poco a poco le sue caratteristiche.

All'inizio la cellula ospite non morirà, ma a poco a poco perdendo via via le proprie caratteristiche non si riprodurrà o si riprodurrà malamente (una trasformazione in alcuni casi abbiamo il tumore).

- **SISTEMA INTERFERONI NELLE INFEZIONI VIRALI**

Abbiamo delle difese contro le infezioni:

1. **PRIMA LINEA (impediscono o rallentano o non creano l'ambiente adatto per la crescita)**
 - E' detta anche innata perchè non si modifica con l'incontro con l'agente infettivo.
 - Non dà luogo a memoria
 - è rapida: agisce da subito a entro poche ore

- riconoscimento solo di strutture antigeniche (cioè sufficientemente complesse) attraverso recettori normalmente già presenti nel DNA germinale.
- barriere chimiche (pH (stomaco, mucosa vaginale in età fertile); Salinità)
- fisiche (Cute; Mucose)
- competizione microbica (nell'intestino e vie genitali)

2. SECONDA LINEA

- IMMUNITA' ASPECIFICA o INNATA
 - primitiva e agisce contro qualsiasi microbo dopo attivazione (Natural Killer; Cellule dendritiche; Macrofagi; Mediatori infiammazione; Complemento)
- IMMUNITA' ACQUISITA
 - immunità che si acquisisce in modo specifico nei confronti di un determinato agente infettivo.
 - È mediata dai linfociti B e T.
 - E' estremamente specifica (è molto utile a livello di diagnosi: diagnosi indiretta e diretta. (Nella ricerca di anticorpi, il margine di errore tra specificità anticorpo antigene è vicino allo 0))
 - Può essere di natura attiva (vaccinazione)
 - Indotta da infezione da patogeni naturali
 - Dura spesso tutta la vita
 - Può essere di natura passiva (sieroprofilassi: iniettare anticorpi specifici per un determinato agente eziologico solo su soggetti in cui si sospetta l'infezione)
 - La sieroprofilassi ha un tempo molto breve perchè poi le proteine inoculate verranno espulse dal nostro organismo)
 - Anticorpi materni
 - Dura da settimane a mesi (il latte materno contiene tante immunoglobuline che aiutano il bambino)
- IMMUNITA' SPECIFICA (anticorpi)
 - Agisce solo contro microbo attivatore; Crea una memoria; Discrimina il self dal non-self (Linfociti T e B)

Gli anticorpi sono l'espressione più tipica dell'immunità specifica.

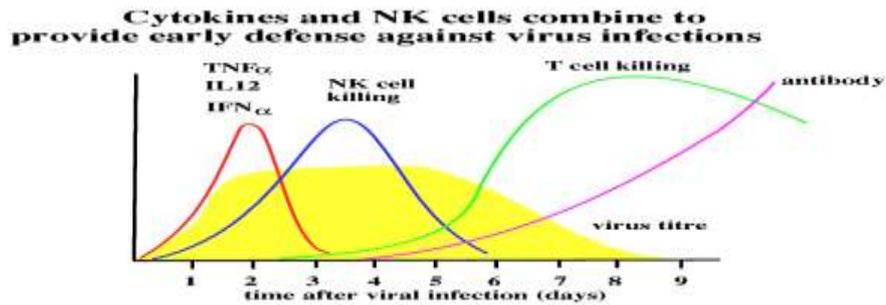
Ma gli anticorpi non agiscono subito, cominciano a svilupparsi dopo un certo periodo

- **Gli effettori del sistema immunitario immunitario: (Linfociti B e T)**

1. Sono circa il 20-25% delle cellule del sangue ma il 100% delle cellule della linfa

<u>RISPOSTA UMORALE</u>	<u>RISPOSTA CELLULO MEDIATA</u>
LINFOCITI B	LINFOCITI T
Recettore: immunoglobulina di superficie	Recettore: TCR o (T-cell receptor)
Antigene: proteina nativa , anche in fase fluida	Antigene: peptide proteico nel contesto dell'MHC

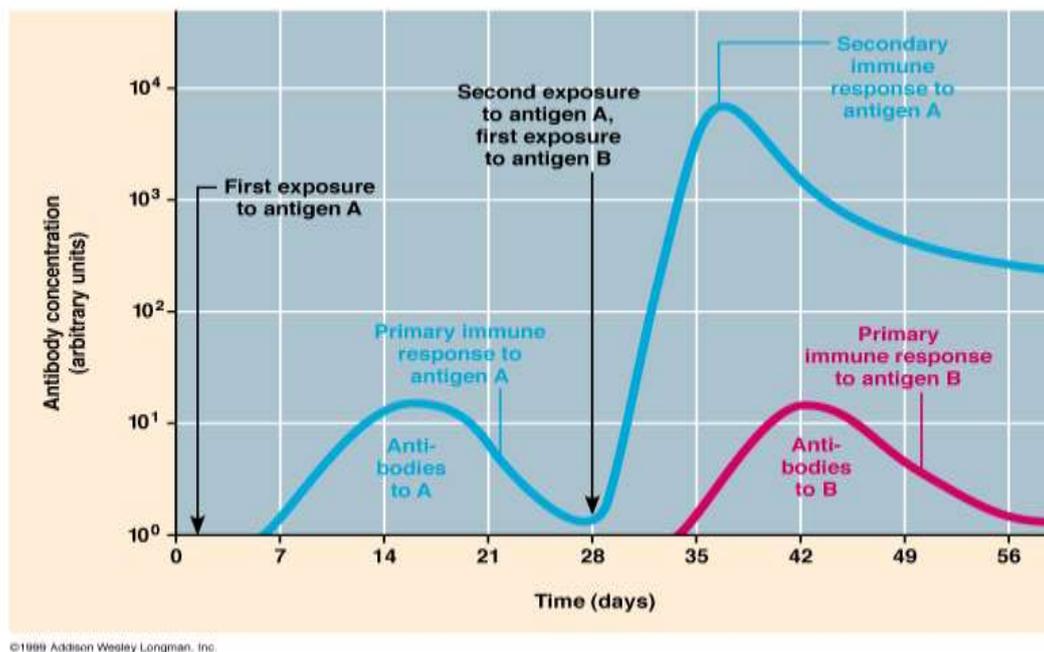
- Cinetica di intervento delle varie difese contro una infezione virale al primo contatto di infezione



Dal grafico si vede come gli anticorpi cominciano a svilupparsi dopo un certo periodo di tempo (curva fuxia). Prima intervengono altri sistemi di difesa immunitaria aspecifica che agiscono nei confronti sia dei virus che dei batteri: (polimorfonucleati, macrofagi) (curva blu). Gli anticorpi invece sono un sistema di difesa specifica perchè si sviluppano in modo preciso contro quel determinato virus: per un virus in particolare abbiamo anticorpi contro gli antigeni precoci, contro gli antigeni tardivi ecc.

Il microrganismo non contiene un solo antigene ma ne contiene diversi.

- Cinetica di intervento delle varie difese contro una infezione virale al secondo contatto di infezione



la risposta secondaria è la risposta dopo un secondo stimolo immunitario dello stesso antigene.

Il modo di rispondere è molto più rapido rispetto alla risposta primaria.

La differenza è che nella risposta primaria abbiamo le immunoglobuline di classe M, mentre nella risposta secondaria si ha la presenza di immunoglobuline di classe G.

Questa differenza di immunoglobuline (che sono specifiche) mi permette di capire se è una prima infezione oppure se è una infezione recente.

	<u>PRIMARIA</u>	<u>SECONDARIA</u>
<u>ISOTIPO PREVALENTE</u>	IgM	IgG (siero); IgA (mucose)
<u>DURATA</u>	Settimane – mesi	Mesi – Anni - Sempre
<u>PICCO DI CONCENTRAZIONE ANTICORPALE</u>	7 – 20 giorni	10 giorni
<u>AFFINITA' ALL'ANTIGENE</u>	Bassa	Alta

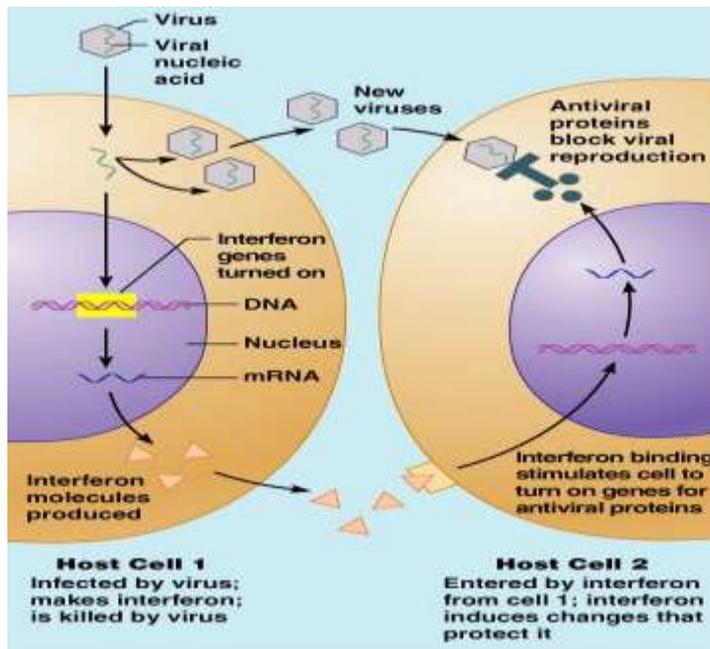
Tra l'immunità aspecifica, molto importante è l'azione dell'**interferone** nelle infezioni virali. (curva rossa)

Gli interferoni sono di diversi tipi ma hanno delle caratteristiche comuni:

1. Sono proteine
2. Agiscono tramite recettori tipo-specifici. (agiscono ad esempio, come gli ormoni)
3. Agiscono attraverso l'attivazione di geni specifici

- **Interferone**

- × Fa parte dell'immunità aspecifica.
- × È una delle prime misure di sicurezza ad agire della immunità aspecifica.
- × E' un sistema che **permette l'inibizione della moltiplicazione virale** all'interno delle cellule con una sostanza che si chiama INTERFERONE (alfa e beta) che è, a sua volta, prodotto dalle cellule stesse preventivamente infettate.
- **Ecco come avviene il meccanismo dell'infezione virale con rilascio di interferone**
 1. Infezione virale
 2. Produzione di RNA
 3. Produzione e rilascio di INTERFERONE (gli interferoni sono delle proteine)
 4. Captazione da parte di cellule sane (recettori superficiali specie-specifici)
 5. Attivazione di produzione di proteine “antivirali”
 6. Blocco della trascrizione dell'mRNA e della sintesi proteica.
 7. Attivazione delle cellule NK.



Commento alla foto:

1. abbiamo il virus che possiede l'acido nucleico virale
2. il virus fa ciò per cui è stato creato! Fa copia dell'acido nucleico; costruzione delle proteine del capsido; fuoriuscita di nuovi virus. (moltiplicazione virale)
3. Il virus uscito andrà poi ad attaccare un'altra cellula: e quindi normalmente dovrebbe entrare nella nuova cellula (cell2), moltiplicarsi ecc ecc.
4. tutte e due le cellule (cell1 e cell2) hanno la possibilità di essere competenti per quel determinato virus.
5. Succede che per solo una si infetta mentre l'altra no.
6. Questo succede perchè il virus nella cell1 è in grado di attivare la produzione di alcuni geni (in seguito all'infezione virale) in grado di modificare per un RNAm che a sua volta produrrà delle proteine specifiche: le molecole di interferone.
7. Le molecole di interferone, fuoriescono dalla cellula e saranno dirette verso cellule che avranno un sito di riconoscimento per cellule simili, in grado di legarsi a quelle molecole. Queste proteine di interferone saranno in grado di attivare la produzione di molecole di interferone nella cellula nuova generando un DNA che produrrà RNAm che produrrà interferone!
8. L'interferone attivato nella cell2 blocca la replicazione virale.
9. Quindi la cell1 (infettata) aiuta la cell2 (**che si infetta ma che non subisce replicazione virale**)
10. il virus nella cell2, non moltiplicandosi, viene eliminato con gli enzimi cellulari mentre la cell1 muore.

● **UN PO DI TERMINOLOGIA**

1. **Siero**
Parte liquida del sangue dopo la coagulazione (contiene gli anticorpi)
2. **Plasma**
Siero in cui non è avvenuto il fenomeno della coagulazione (contiene gli anticorpi)
3. **AntiSiero**
contenente anticorpi *contro un antigene specifico*
4. **Sierologia**
Studio delle reazioni fra antigeni e anticorpi (fare la sierologia dell'HIV vuol dire cercare

anticorpi contro l'HIV)

5. Gamma o immunoglobuline o anticorpi

Frazione di proteine seriche addette al legame con antigeni (per lo più microbici)

• VACCINI

Le strutture che danno patogenicità sono chiamate ANTIGENI. Gli antigeni attivano il sistema immunitario e ci permettono di avere una risposta di difesa.

Quando queste parti (antigeni) sono introdotte nel nostro organismo staccate dal corpo batterico o dalla cellula batterica vivente, diventano le parti fondamentali di quelle sostanze che chiamiamo vaccini.

I vaccini non sono altro che degli antigeni che servono a stimolare il sistema immunitario senza creare danno

Abolita:	vaccinazione anti vaiolosa (1888-1977), per la eradicazione dell'infezione
Obbligatorie nella prima infanzia:	poliomielite, tetano, difterite, HBV
Consigliate nella prima infanzia:	morbillo, pertosse, parotite, <i>Haemophilus influenzae di tipo b</i> (meningite) e rosolia (soggetti di sesso femminile in età prepuberale)
Previste per alcune categorie di lavoratori e/o soggetti esposti:	tifo, meningococco, tubercolosi (BCG), rabbia, varicella pneumococco, leptospirosi
Utili in particolari circostanze:	influenza (alla comparsa di varianti antigeniche significative e nei soggetti anziani, cardiopatici, etc.), epatite A, febbre gialla, colera, rabbia (viaggiatori in Paesi con infezione endemica)

- Preparazione che contiene un agente patogeno modificato
- Inoculato, induce una risposta immune protettiva contro la malattia indotta dal patogeno
- Si somministrano a persone sane a SCOPO PREVENTIVO
- La loro efficacia è dovuta all'immunità ACQUISITA
- ci sono vaccini con patogeni *Vivi attenuati*

Tramite colture successive in condizioni diverse da quella naturale

Derivati da ceppi "wild"

MANTENGONO LA LORO ATTIVITA' ANTIGENICA MA...HANNO PERSO IL POTERE PATOGENO (ATTENUATI)

- Es: antiPolio di Sabin
- ci sono vaccini con patogeni *Morti*
 - Tramite procedimento che conserva l'antigenicità
 - Non si replicano
 - Richiedono richiami periodici
- ci possono essere vari tipi di vaccini:
 1. PURIFICATI
 - Una porzione dell'agente è purificata da preparazioni industriali dell'agente stesso.
 - Haemophilus Influenzae
 2. RICOMBINANTI
 - Alcuni vaccini sono prodotti da **ricombinazione genica** (gli antigeni si sono ottenuti in laboratorio non partendo direttamente dal virus.)
 - Questo ha una grande potenzialità: questi antigeni non sono mai infettivi perchè non provocheranno mai la malattia: HBV. Sono solo antigenici e non infettivi.

• **OBBIETTIVI DELLA DIAGNOSI DA INFEZIONE VIRALE**

Gli obbiettivi sono comuni a quelli della diagnosi da infezioni batteriche e sono:

1. Stabilire una terapia, se possibile (herpes, epatite B e C)
2. Stabilire conseguenti procedure preventive (aborto in caso di rosolia, vaccinazioni)
3. Stabilire misure di sicurezza
4. Fini epidemiologici

Come per le diagnosi da batteri anche qui abbiamo 2 tipi di diagnosi:

1. DIRETTA:
 - ricerca di proteine o altri componenti (=antigeni) del virus
2. INDIRETTA:
 - ricerca di anticorpi specifici per il virus d'interesse

La DIAGNOSI DIRETTA prevede i seguenti metodi:

1. Isolamento (e identificazione con anticorpi)
2. ELISA
3. IMMUNOFLUORESCENZA IFA
 - E' una delle tecniche più sensibili (fino a 1000 molecole antigeniche se localizzate).
 - Serve sia per rilevare anticorpi (si adoperano antigeni noti) MA SOPRATTUTTO per rilevare antigeni (si adoperano anticorpi noti).
 - Permette di:
 1. visualizzare la localizzazione di un antigene (citoplasmatica, di membrana, nucleare).
 2. determinare più antigeni o marcatori sulla stessa cellula, utilizzando fluorocromi diversi
 - una volta fissate in un vetrino con acetone metanolo il mio materiale biologico posso:
 1. utilizzare degli anticorpi specifici già con il colorante attaccato
 2. utilizzare anticorpi specifici non marcati, poi prendo degli anti anticorpi marcati e li visualizzo al microscopio (doppio sandwich)
4. Microscopia elettronica IEM

La DIAGNOSI INDIRETTA prevede i seguenti metodi:

sono tutti metodi che ricercano gli anticorpi specifici (SIERODIAGNOSI)

Per la ricerca delle IGC occorrono campioni appaiati:

- A 7 gg dalla comparsa dei sintomi IN FASE ACUTA
- A 1-2 settimane dal primo IN CONVALESCENZA
- E' considerato indicativo di infezione virale un titolo almeno 4 volte maggiore nel secondo campione

Per la ricerca delle IgM basta un campione solo.

- Compaiono nei primi giorni
- Il picco è dopo 7-10 gg
- Scompaiono nei mesi successivi. SONO QUINDI INDICATORI DI INFEZIONE ACUTA
- Ricompaiono durante le infezioni ricorrenti e riacutizzazioni (es: HCV)
- Determinate nel sangue cordale, indicano infezione neonatale

1. Neutralizzazione
2. Fissazione del complemento
3. Inibizione dell'emagglutinazione
4. ELISA

la domanda è: ho anticorpi contro quel determinato virus?

- E' una tecnica fra le più usate: Semplice, sensibile, veloce (2 ore alla risposta), economica, reagenti stabili.
 - CATTURA DI ANTICORPO per diagnosi indiretta
 - L'antigene è legato a supporto solido (fondo di una micropiastre in plastica o biglia), poi ci metto il siero (che è la parte liquida del nostro sangue dopo che è avvenuta la coagulazione)
 - se ci sono gli anticorpi specifici ci sarà l'unione antigene anticorpo
 - ma al microscopio non è visibile l'immuno complesso
 - prenderò allora degli anticorpi umani marcati con un enzima che diventeranno anti-anticorpi umani per vedere se la reazione tra antigene anticorpo era avvenuta.
 - Per rendere visibile il tutto, (perchè non era ancora visibile nulla) devo dare al sistema il substrato nel quale l'enzima, che ho attaccato agli anticorpi-anti-anticorpi umani, agisce.
 - Sappiamo che gli enzimi agiscono su diversi substrati: uso un enzima che agisce su un substrato che senza l'enzima assumerà un certo colore mentre in presenza dell'enzima, cambia di colore.
 - Supponiamo che questo substrato sia rosso. Nel momento in cui lo metto a contatto con il sistema se diventa giallo, vuol dire che l'enzima ha trasformato la sostanza che compone il sistema rivelatore, se rimane del colore iniziale vuol dire che l'enzima non ha agito perchè è stato asportato dal sistema dopo il lavaggio con fisiologica.
5. Western blot

• Scelta del metodo diagnostico:

DIAGNOSI DIRETTA: maggiore specificità ma...

(far moltiplicare in vitro i virus, non è così semplice)

DIAGNOSI INDIRETTA: generalmente meno costosa, e più accessibile

• La scelta dipende da:

1. FASE DELLA MALATTIA

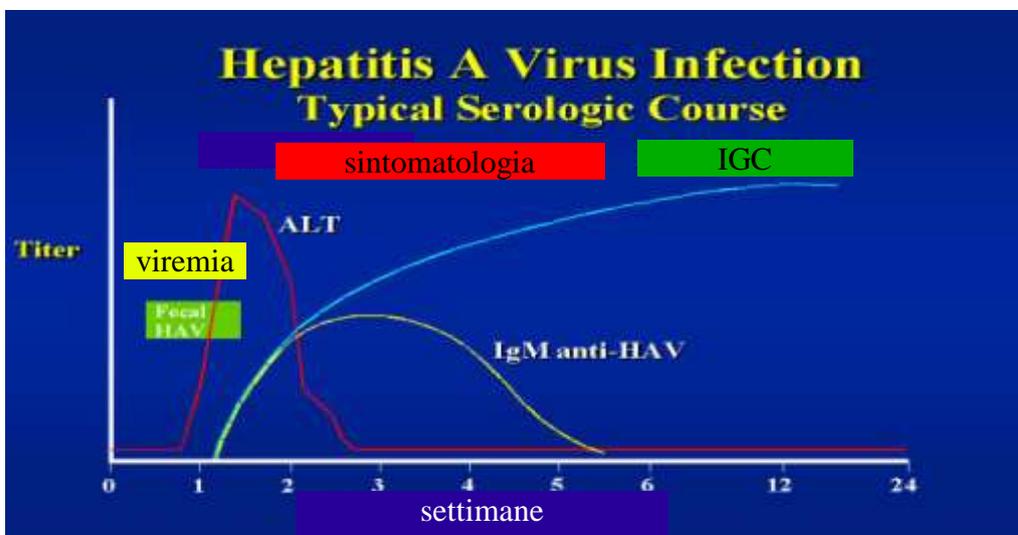
Il virus o gli anticorpi devono essere presenti nel campione da analizzare

(se so che determinati anticorpi si sviluppano dopo delle settimane, è inutile che io li cerchi dopo pochi giorni. Posso anticipare i tempi con la ricerca delle proteine precoci)

2. CARATTERISTICHE VIRALI

- alcuni virus si coltivano facilmente in vitro, altri no.
3. VALORE DIAGNOSTICO DI UN EVENTUALE TITOLO ANTICORPALE
Gli Ac devono, se presenti, voler dire qualcosa...
(ogni tanto non basta sapere se ci sono degli anticorpi ma bisogna anche sapere quanti o di che classe)
 4. TIPO DI TEST
(per cosa mi serve: Screening, test su caso sospetto e conferma?)

Esempio Infezione da epatite A



N.B.

(il grafico originario delle slides del prof non sono riuscito a copiarlo, ci potrebbero essere delle incongruenze tra quello riportato (che comunque ho cercato di riadattare) e le spiegazioni sotto... il grafico è indicativo, fidatevi delle spiegazioni sotto!)

- ◆ Questa nel grafico è un'infezione da virus dell'epatite A.
 - ◆ L'epatite A si prende quando si mangiano sostanze infette. Questo virus dà una gastroenterite e anche un'epatite
 - ◆ Sull'asse delle ascisse, viene riportato il tempo dal contatto con il virus
 - ◆ sull'asse delle ordinate, è riportato invece la risposta del titolo virale
 - ◆ sappiamo che l'infezione è diversa dalla malattia: la malattia si ha solo quando compaiono i sintomi
- In particolare per quanto riguarda l'infezione da HAV, abbiamo:
1. infezione, sintomi;
 2. la viremia (presenza di virus nel sangue),

3. il virus nelle feci; (*nel grafico il rettangolo verde con scritto Fecal HAV*)
 4. l'andamento degli anticorpi;
 5. transaminasi (che sono gli enzimi che vengono rivelati dalle cellule epatiche. Quando il dato delle transaminasi supera un certo valore, è sinonimo di patologia e sta a significare che le cellule del fegato sono state distrutte (quanto meno una quota parte) dal virus; motivo, appunto, per cui aumentano gli enzimi delle transaminasi)
- ◆ se dovessimo monitorare l'infezione dal virus dell'epatite A con le transaminasi vedremmo che, da un valore normale, esse aumenterebbero abbastanza precocemente, concomitanti alla presenza del virus nel sangue (nel grafico si immagina che, all'incirca, l'andamento delle transaminasi sia presso che simile all'andamento della **viremia** (curva rossa))
 - ◆ Notiamo che però abbiamo la presenza delle immunoglobuline di classe M (curva gialla), molto prima che comincino i sintomi (**MODIFICA NEL GRAFICO: immaginatevi che la stessa identica curva gialla parta, ad esempio, dal valore 0,8 sulle ascisse: cioè spostate la sua partenza antecedente a quella delle IGC (infatti entrano in gioco prima delle IGC) ma lasciatela comunque partire dopo l'inizio di salita della curva rossa**)
 - ◆ quando compaiono i sintomi, abbiamo:
 1. una transaminasi che sta salendo,
 2. la presenza di virus nel sangue (prima -il riferimento è l'asse delle x-)
 3. la presenza di virus nelle feci (poi -il riferimento è l'asse delle x-)
 - ◆ Però la ricerca del virus nelle feci e nel sangue è piuttosto complicato, e quindi si preferisce fare la ricerca di anticorpi, in particolare quelli di classe M
 - ◆ gli anticorpi di classe G compaiono invece un po' più tardi, si mantengono elevati nel tempo (tanto che danno immunità) mentre quelli di classe M tendono a scomparire nel tempo.
 - ◆ Se, all'inizio dei sintomi, dovessi avere una forte quantità di IGC, vorrà dire che non sarà un'infezione da epatite A ma sarà qualcos'altro.
Questo perché un significativo titolo di IGC, all'inizio dei sintomi, non ci potrebbe essere in una prima infezione da virus HAV; ci starebbe, al massimo, in una reinfezione (ma se avessi effettivamente una reinfezione, non avrei la sintomatologia)
 - ◆ il virus compare prima nel sangue e poi nelle feci.
Il virus viene introdotto con il cibo,
supera la barriera intestinale
va nel sangue
dal sangue, va nel fegato
e poi torna nelle feci e da lì viene eliminato (infatti si trasmette ingerendo cibi contaminati)
 - ◆ La DIAGNOSI DIRETTA si fa nell'arco di tempo in cui posso cercare il virus nel sangue o nelle feci
 - ◆ La DIAGNOSI INDIRETTA può durare un tempo più lungo
 - ◆ si sceglierà la diagnosi meno dispendiosa e che mi darà uguale risposta: LA RICERCA DELLE IMMUNOGLOBULINE DI CLASSE M (indiretta) ABBINATA ALLA TRANSAMINASI (ricerca di tipo biochimico di questi enzimi nel sangue)
- **SCELTA DEL CAMPIONE DA ANALIZZARE (nella diagnosi diretta)**

La scelta del campione da analizzare è importante rispetto all'ipotesi diagnostica. Il prelievo per una scelta di diagnostica diretta va fatto tenendo conto di:

- quale agente si sospetta essere il responsabile dell'infezione
- dove si ritiene che il virus si trovi al momento del prelievo (riallacciandosi all'esempio dell'epatite A, se penso di essere all'inizio dell'infezione, cercherò il virus nel sangue e non nelle feci)

<u>VIRUS</u>	<u>PORTA D'ENTRATA</u>	<u>VIA DI DIFFUSIONE</u>	<u>ORGANO BERSAGLIO</u>	<u>ESCREZIONE</u>
--------------	------------------------	--------------------------	-------------------------	-------------------

<u>Poliomielite, Epatite A</u>	alimentare	sangue	SNC (polio) fegato (epatit A)	feci
<u>Morbillo, Rosolia</u>	Faringe, tratto respiratorio	sangue	pelle	Vie respiratorie
<u>HSV 1 (acuta)</u>	Vie respiratorie Pelle, mucose	Nervi, leucociti	molti	Vie respiratorie, epitelio
<u>HSV 1 (ricorrente)</u>	Gangli	Nervi	Pelle, occhio	Pelle, occhio
<u>HSV 2</u>	Vie genitali	Nervi	Vie genitali	Vie genitali
<u>rabbia</u>	Sottocutanea	Nervi	SNC	saliva
<u>Epatite B, C</u>	Discontinuità della pelle	Sangue	Fegato	Sangue

- Il materiale che utilizzo per il prelievo può essere diverso a seconda di dove si può trovare il virus.
 - Nella ricerca virale, è importante sapere se il campione che prelevo sia normalmente sterile (*sangue, plasma, siero, polimorfonucleati, emazie, liquido encefalorachidiano sono materiali biologici che normalmente sono sterili*)
 - ci sono campioni che invece possono contenere batteri (urina, feci, bronco lavaggi, biopsie)
I virus vengono coltivati in cellule competenti: se metto delle cellule o del liquido biologico che contiene anche batteri, nel giro di 24-48 ore le stesse cellule o liquido verrebbero distrutti... sarebbe inutile.
 - Prima di essere iniettati materiali biologici che contengono batteri, questi devono essere trattati in modo tale che si eliminino i batteri con degli antibiotici.
- ➔ Parlando sempre di diagnosi diretta, oltre che coltivare i virus, posso riconoscere la presenza del virus già nelle cellule che sono contenute nel campione biologico che andrei ad utilizzare per fare la mia diagnosi.
 - ➔ Si prendono le cellule (esempio: polimorfonucleati),
 - ➔ una volta che ho separato i globuli bianchi dai rossi, li striscio in un vetrino e uso degli anticorpi (colorati) contro quel determinato virus
 - ➔ le cellule infettate le vedo colorare e sono sicuro di non sbagliarmi perchè c'è un'altissima specificità tra antigene e anticorpo
 - ➔ posso utilizzare anticorpi contro le proteine tardive o precoci perchè non so a che punto sono dell'infezione. (quindi farò 2 strisci con i 2 tipi di anticorpi)
L'esito sarà:
 1. colorate le precoci e non colorate le tardive
 2. non colorate le precoci e colorate le tardive
 3. nessuno dei due si colora (quelle cellule non sono infettate da quel virus)

● **FUNGHI o MICETI**

- Hanno struttura cellulare eucariote.
- Hanno un volume 20-50 volte maggiore di quello dei batteri.
- All'esterno della membrana citoplasmatica posseggono una parete rigida: la TUNICA.

- Il corpo di questi organismi è detto TALLO.
- La loro riproduzione può avvenire per via
 1. ASESSUATA
 2. SESSUATA (ricombinazione genetica)
 3. GEMMAZIONE
- Possono produrre spore con funzione di resistenza.
- Sono **eterotrofi**
(cioè necessitano di sostanze organiche preformate)
- **Miceti che interessano la patologia umana**
- I miceti sono organismi **opportunisti** presenti come **commensali** sulla nostra cute aggrediscono solo quando le difese della nostra cute vengono a mancare
- Alcuni esempi:
 1. Lieviti (costituiti da un'unica cellula)
 - * Candida Albicans (responsabile del Mugghetto in gola)
 - * Criptococcus Neofornonas
 - * Pneumocystis Carinii
 2. Muffe
 - * Dermatofiti (costituiti da più di una cellula)
 3. Funghi Dimorfi (assumono morfologie diverse)
 - * Hystoplasma Copsulatum (responsabile di meningiti e infezioni polmonari)
 - * Coccidioides Immitis
- Dalle infezioni funginee, di solito, si guarisce facilmente fatta eccezione per quei soggetti in cui grava uno stato di immuno incompetenza.
- Giocano un ruolo importante nel riciclare i nutrienti e sono usati per produrre sostanze utili per l'uomo come alcuni anticorpi.
Provocano, tuttavia, danni economici indesiderati perchè attaccano frutti, semi, ortaggi, legno e pelli.

• **PROTOZOI**

- Sono organismi unicellulari eucarioti.
- Alcuni protozoi sono importanti per la patologia umana:
 1. *Plasmodio della malaria*
- Mancano di parete cellulare.
- Appartengono al regno dei protisti, insieme ai batteri.
- Il loro CICLO BIOLOGICO è composto da 2 forme:
 1. **forma vegetativa** detta TROFOZOITA
 - I TROFOZOITI sono i protozoi in forma attiva di moltiplicazione (la loro replicazione è normalmente per mitosi).
Vengono chiamati TROFOZOITI per distinguerli dalla forma cistica.
 2. **forma di protezione** detta CISTI che ha la funzione di consentire la sopravvivenza del protozoo fuori dall'ospite.
 - La forma cistica è una forma silente in cui il microorganismo non si moltiplica
 - ***parentesi sull'AMEBA***
L'ameba è il parassita che dà l'AMEBIASI.
L'AMEBA HISTOLYTICA è un protozoo che si moltiplica attivamente

nell'intestino quando è nella sua forma vegetativa.

Quando, invece, viene eliminato con le feci nell'ambiente esterno, passerà alla fase cistica trasformandosi in una vera e propria ciste.

La forma cistica di questi protozoi è una forma di protezione che permette loro una sopravvivenza in un ambiente difficile per un lungo periodo di tempo senza subire il ben che minimo danno.

Nel caso dell'ameba, quando viene reintrodotta nell'intestino attraverso i cibi, dalla fase cistica ritornerà alla fase vegetativa che è quella che consente al protozoo di fare il danno

- I protozoi si riproducono in maniera ALESSUATA per:
 1. *fissione*
 2. *schizogonia*
 3. *gemmazione*
- In qualche caso, si riproducono in maniera SESSUATA per
 1. *fusione di gameti*
(Es: plasmodio della malaria)
Il plasmodio ha bisogno di 2 ospiti per compiere il suo ciclo biologico: la zanzara e l'uomo.
- I protozoi si diversificano molto per la loro forma e per la loro attività patogena
- Il loro movimento, a seconda del protozoo, è permesso da:
 1. *pseudopodi* (estroflessioni mobili di citoplasma)
(*Ameba Histolytica*)
 2. *ciglia*
 3. *flagelli*
(*Trichomonas Vaginalis*,
responsabile di infezioni alla vagina)

- **PRIONI**

- Sono strutture ancora più semplici dei virus e danno patologie molto importanti: malattie neuro degenerative trasmissibili anche ereditariamente.
- Sono rari
- Sono forme modificate di proteine normali codificate da un gene che ha subito mutazioni
- L'ingresso di un prione altera la conformazione di una normale struttura proteica e quindi è infettante