

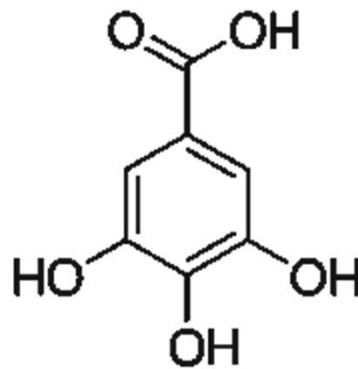
I koala mangiano solo foglie di eucalipto ricche di sostanze indigeribili e di sostanze tossiche (terpeni e fenoli)

I tannini (polifenoli) si complessano con le proteine (T-PC) rendendole insolubili

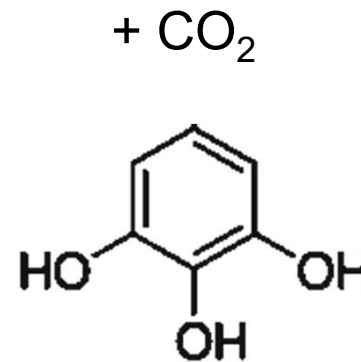
Per poter recuperare l'azoto e assorbirlo attraverso il ceco, è necessario che i T-PC siano degradati da batteri (T-PCD)

Streptococcus gallolyticus

Lonepinella koalarum
(*Pasteurellaceae*)



acido gallico →

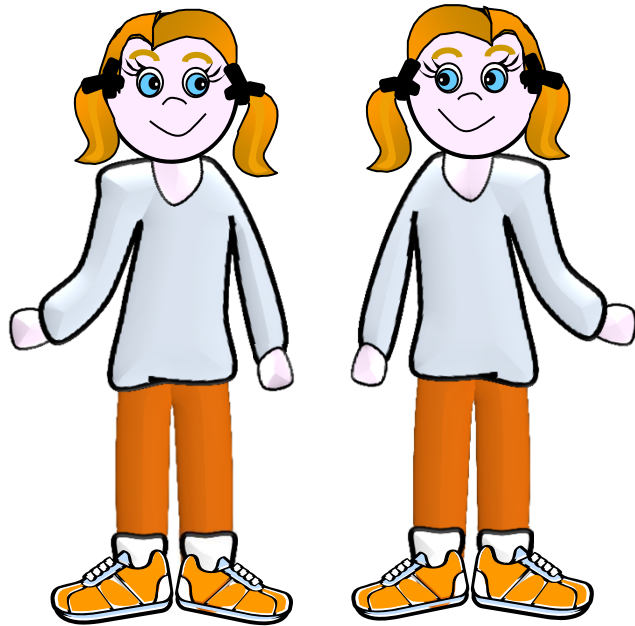


pirogallolo

tannini →

Gli studi sull'influsso della genetica sono stati esplorati con diversi approcci

Studi su gemelli umani



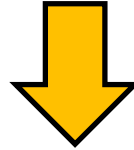
Studi su linee murine
Trattate per minimizzare
l'effetto materno



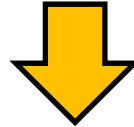
Hanno permesso di capire che in condizioni NORMALI l'effetto genetico è estremamente difficile da apprezzare

analisi QTL : Quantitative Trait Loci

utilizzata per studiare la co-segregazione di caratteri quantitativi legati a marcatori genomici



13 regioni genomiche importanti nel topo



cinque QTL

variazione genetica
dell'ospite



abbondanze relative
di 64 taxon

almeno uno per ognuno dei 4 Phylum principali - Bacteroidetes,
Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria

Il controllo genico influisce sulla cima dell'albero (genere o
specie) in particolare per i Bacteroidetes e Firmicutes

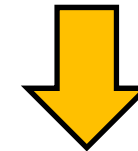
Analisi di alcune situazioni patologiche



legame diretto tra alcuni geni e la
composizione del microbiota

MEFV → Febbre Mediterranea Familiare → minore ricchezza del microbiota
negli individui affetti

Mutazioni in NOD2 → forte rischio morbo di Crohn → alterazioni microbiota:



maggior carico di Firmicutes e Bacteroidetes
soprattutto Dorea e Subdoligranulum (XIVa)

Mutazioni in HLA (MHC) → forte rischio celiachia→
limitate ma significative differenze nell'abbondanza di alcuni gruppi
(Bacteroides spp-Prevotella)

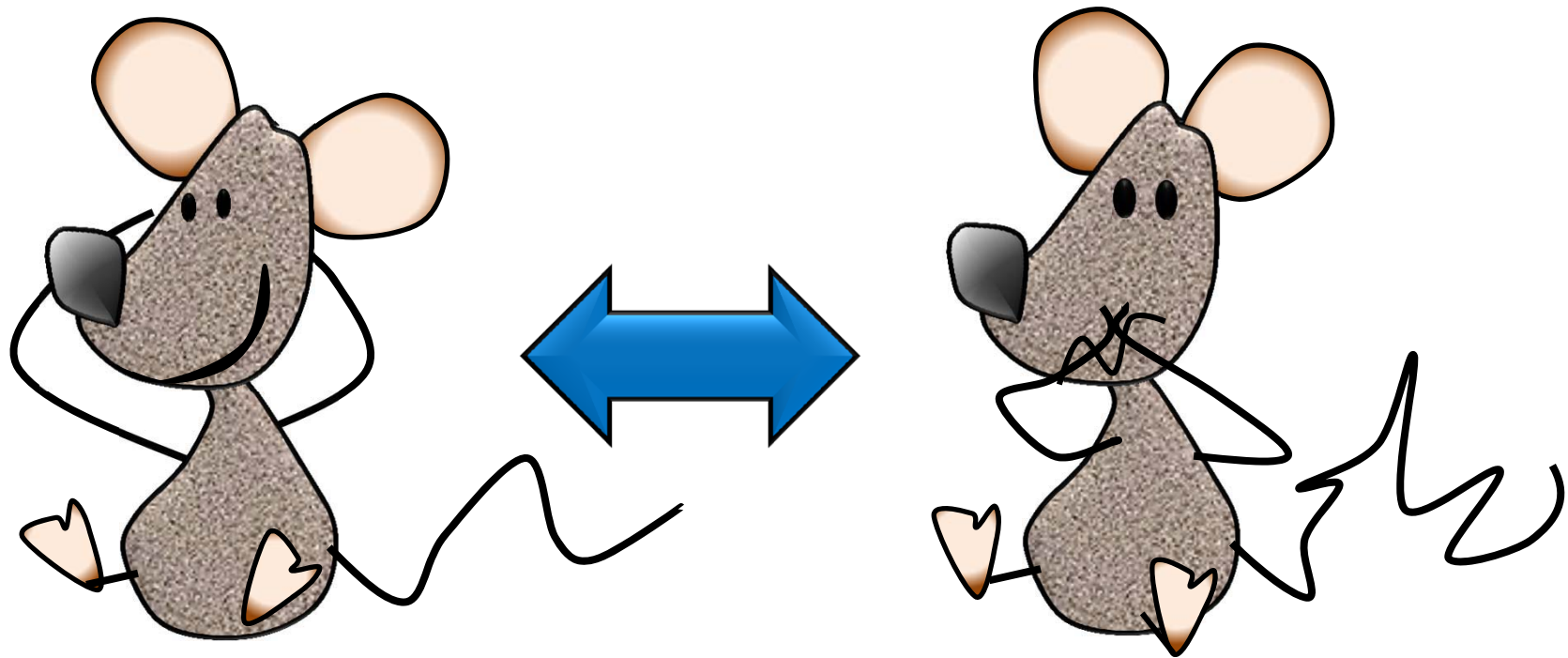
L'importanza di geni metabolici dell'ospite è stata messa in evidenza in pazienti
obesi, con un'alterazione del rapporto tra Firmicutes e Bacteroidetes

Geni coinvolti nell'immunità (innata o adattativa) alterano il rapporto
microbiota/ospite e sono implicati nelle malattie infiammatorie croniche

Normal gut microbiota modulates brain development and behavior

Rochellys Diaz Heijtz^{a,b,1}, Shugui Wang^c, Farhana Anuar^d, Yu Qian^{a,b}, Britta Björkholm^d, Annika Samuelsson^d, Martin L. Hibberd^c, Hans Forssberg^{b,e}, and Sven Pettersson^{c,d,1}

Esperimenti condotti su topi *Germ-free* suggeriscono un possibile ruolo del microbioma nello sviluppo del controllo motorio e dei comportamenti ansiosi



Gli autori ritengono che questo approccio potrebbe avere implicazioni importanti anche nello studio dei disordini psichiatrici umani



In un domani potremmo dire:

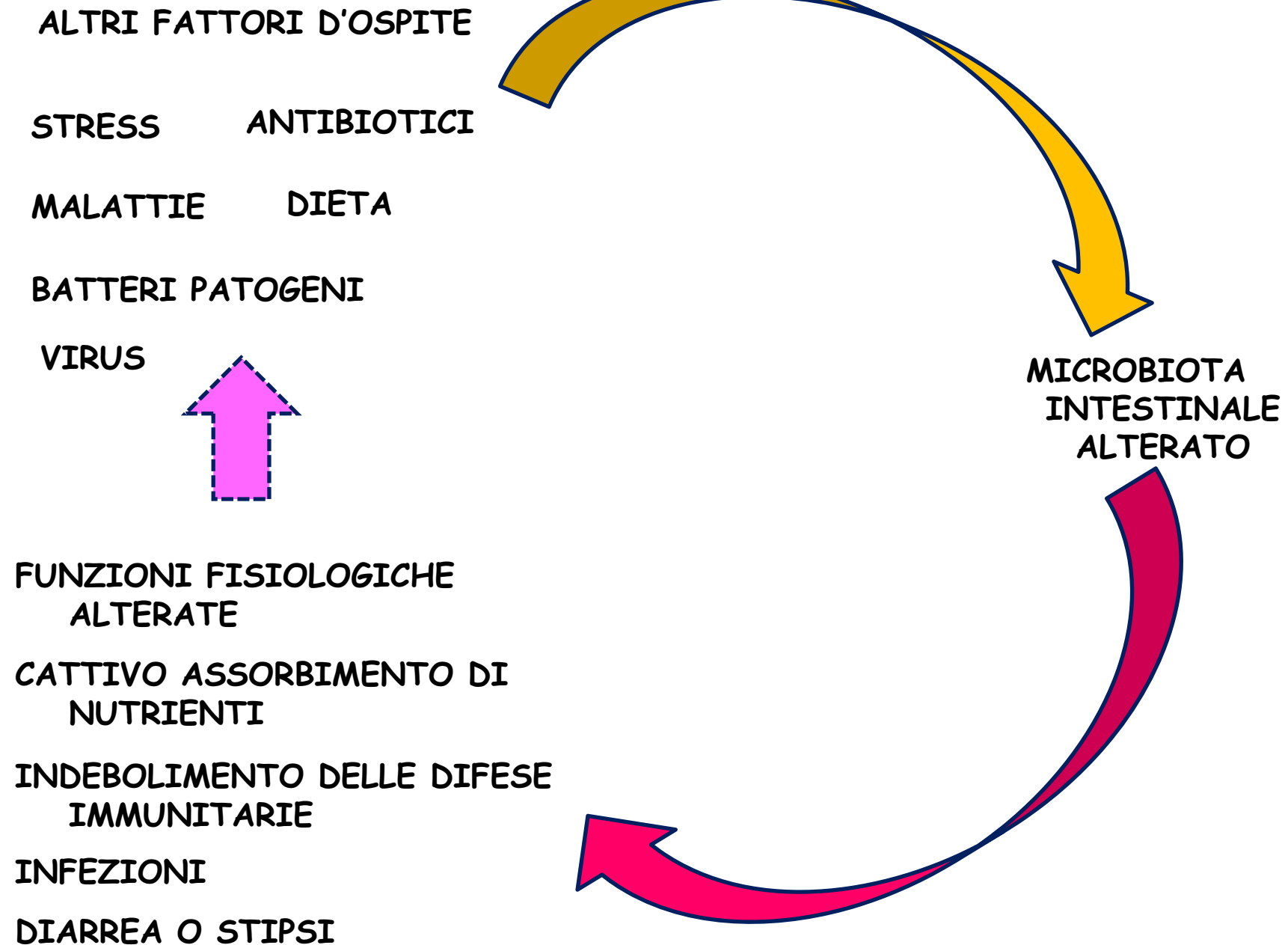
Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour

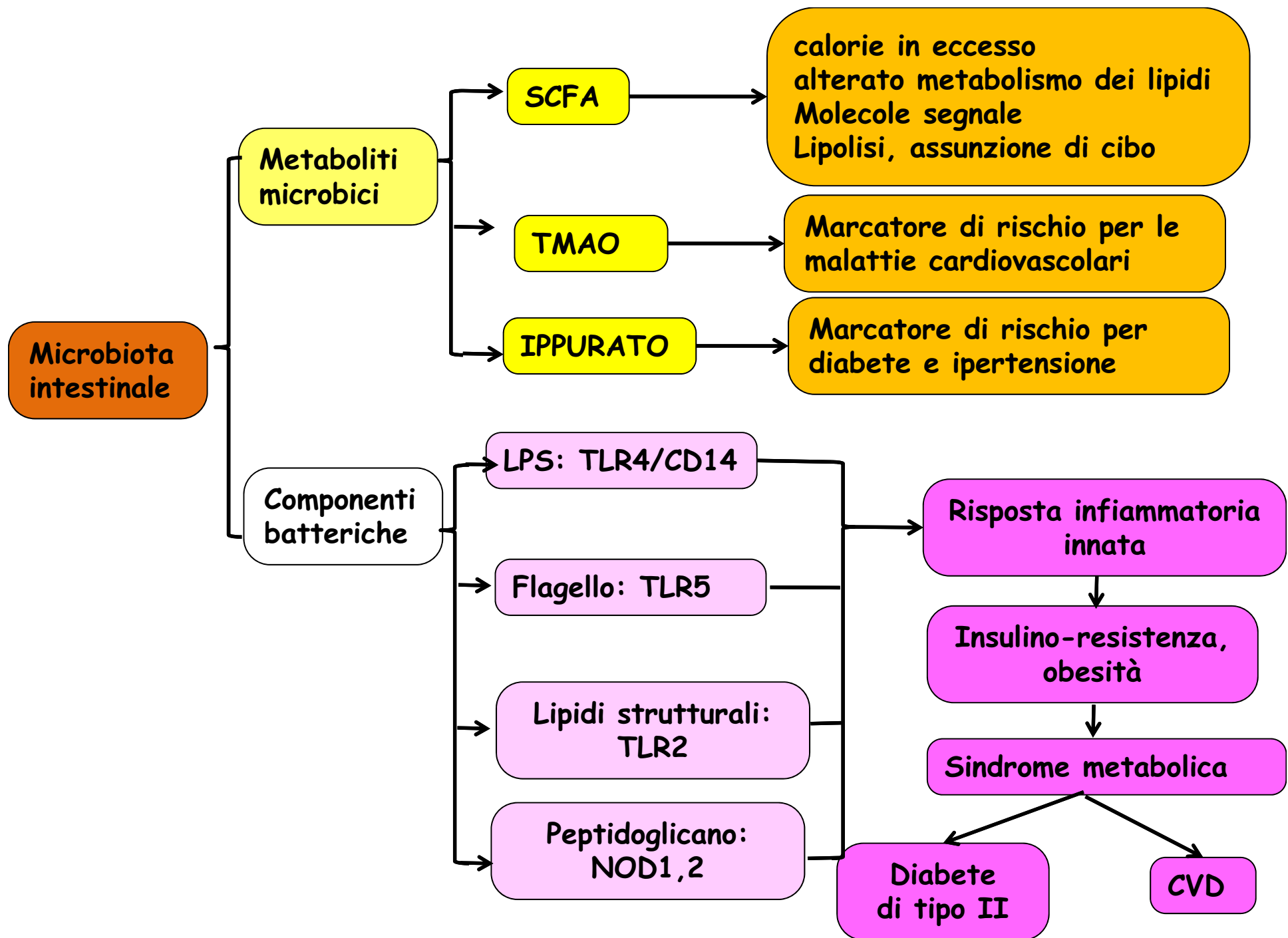
John F. Cryan^{1,2} and Timothy G. Dinan^{1,3}

NATURE REVIEWS | **NEUROSCIENCE**

VOLUME 13 | OCTOBER 2012 | 701

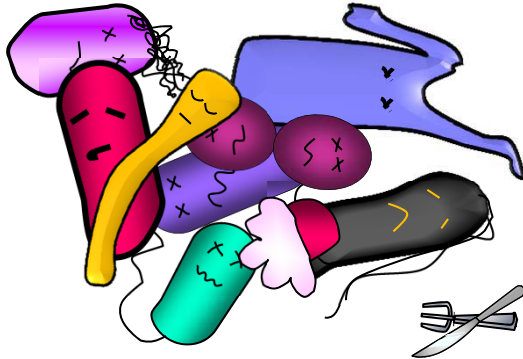




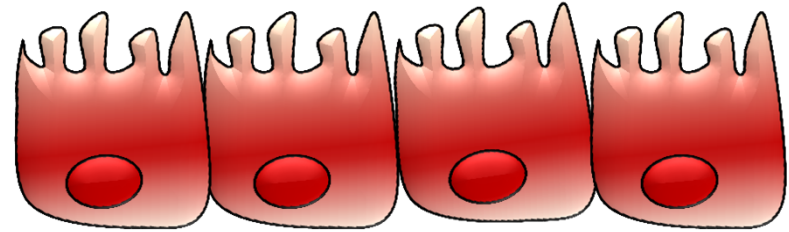


ALTERAZIONI DELL'EQUILIBRIO

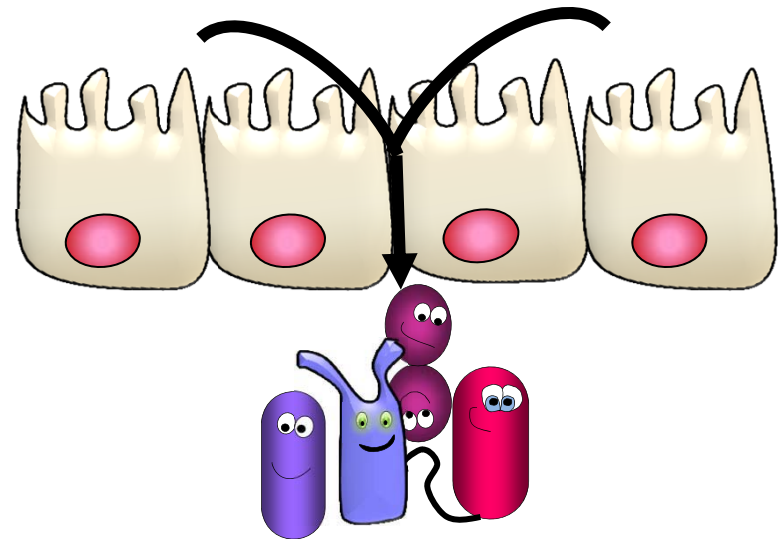
DISMICROBISMI



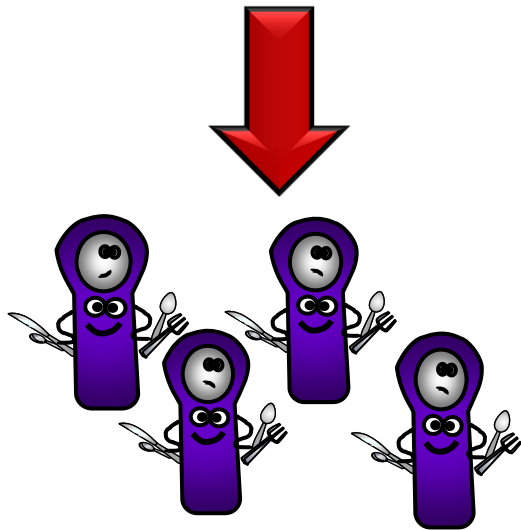
RISPOSTA ALTERATA



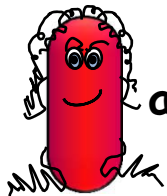
PERMEABILITA' ALTERATA



MALATTIA

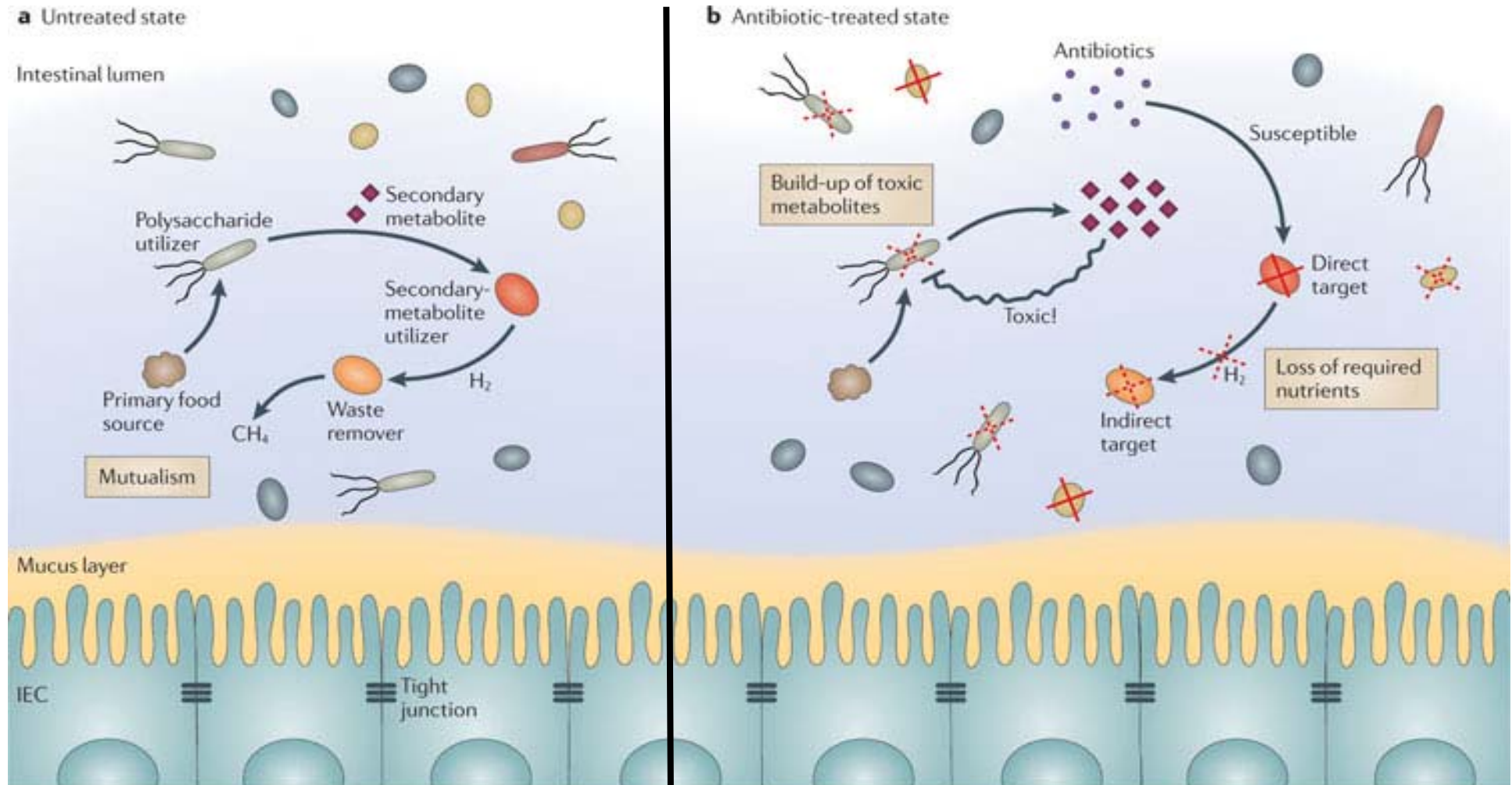


Possibile prevalenza o
attecchimento di specie dannose



Possibile "invasione di campo"
da parte di commensali

Gli antibiotici alterano anche in modo inapparente i rapporti tra le componenti del microbioma intestinale



Colite pseudomembranosa

Clindamicina Lincomicina

Attive sugli anaerobi

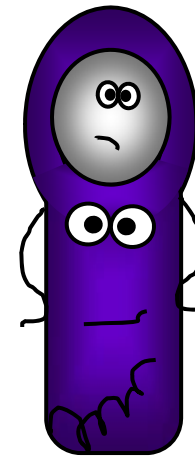
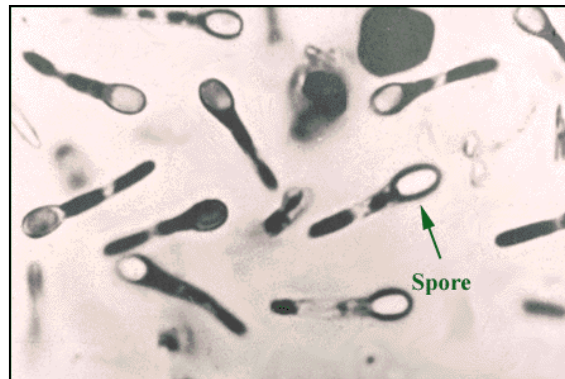
Cefalosporine di III
generazione

Largo spettro, molto attive

antitumorali (metatressato)

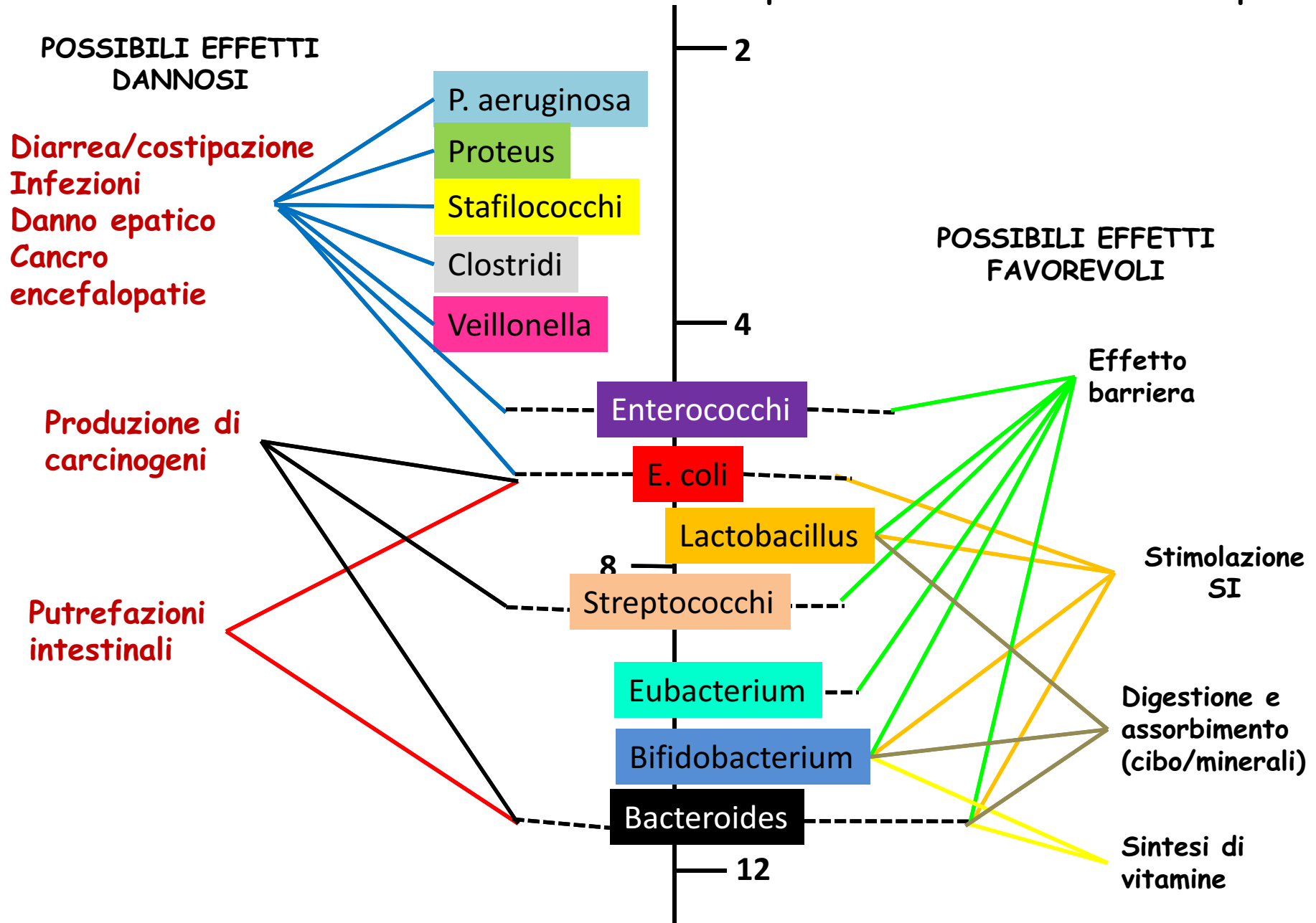
Modificazioni del microbiota

Espansione di *C. difficile*



sottile, con spore grandi ovali sub-terminali,
estremamente sensibile all'ossigeno, poco rappresentato
ma presente (~40%) nel microbiota intestinale

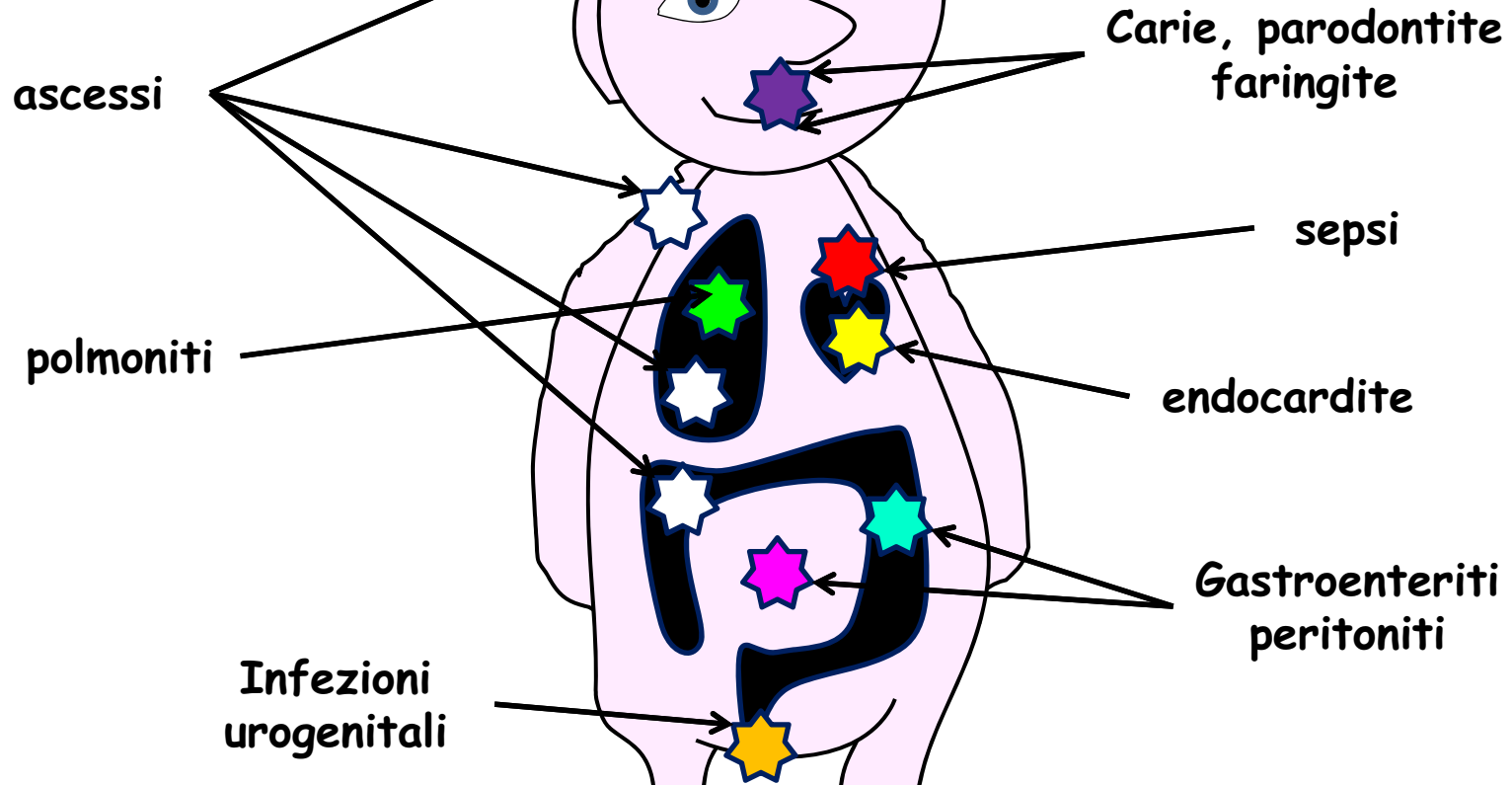
Non tutti nel microbiota hanno lo stesso comportamento nei confronti dell'ospite



Anche se le quantità relative sono a favore dei batteri specializzati

<i>E. coli</i> virotipi <i>Salmonella</i> <i>Campylobacter</i> <i>Yersinia</i> <i>Candida</i>		2	< 10^4 , < 0,01% Patogeni (tossine, infezioni, danno cellulare..)
Streptococchi Enterococchi <i>Lactobacillus</i> <i>Clostridium</i> <i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i> Stafilococchi	4	< 10^5 - 10^8 < 1% Specie satelliti (tossine)
<i>Eubacterium</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Bacteroides</i>		8	10^9 - 10^{10} > 90% Specie stanziali (acidi grassi, acido lattico..)
		12	

Possibili problemi da rottura dell'equilibrio con i commensali



In questi casi i commensali si comportano da patogeni opportunisti

La patogenicità può evolvere a partire da un ancestrale commensale o persino ambientale

PROBIOTICI

Metchnikov
(1882)

> LATTOBACILLI

> SALUTE E
LONGEVITÀ

Lilly e Stillwell
(1965)

PROBIOTICO : sostanza o microrganismo che contribuisca
all'equilibrio del microbiota intestinale

Salminen
(1998)

PROBIOTICO : microrganismo vivo e presenti nei cibi
con effetto positivo per la salute

Bifidobatteri:

- *Bifidobacterium longum*
- *Bifidobacterium bifidum*
- *Bifidobacterium breve*
- *Bifidobacterium infantis*
- *Bifidobacterium animalis*
- *Bifidobacterium lactis*

Altri (per casi particolari)

- *Enterococcus faecium*
- *Propionibacterium spp.*
- *Saccharomyces boulardi*
- *Bacillus clausii*

Batteri lattici

- aggregato *Lactobacillus acidophilus*:

Lactobacillus gasseri

Lactobacillus crispatus

Lactobacillus amylovorus

Lactobacillus gallinarum

Lactobacillus johnsonii

- aggregato *Lactobacillus casei*:

Lactobacillus paracasei

Lactobacillus rhamnosus

- *Lactobacillus reuteri*

- *Lactobacillus salivarius*

- *Lactobacillus plantarum*

- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

- *Streptococcus thermophilus*

Un probiotico che si rispetti deve essere:

un normale componente del microbiota intestinale sano;

del tutto sicuro anche per ospiti debilitati o immunocompromessi;

attivo e vitale nelle condizioni dell'ambiente intestinale

resistente al pH acido, al succo gastrico, alla bile, al succo pancreatico;

in grado di persistere, almeno temporaneamente, nell'intestino

In grado di proteggere la mucosa intestinale

In grado di antagonizzare i patogeni

In casi particolari (es *B. clausii*, enterococchi)
in grado di resistere durante terapie antibiotiche

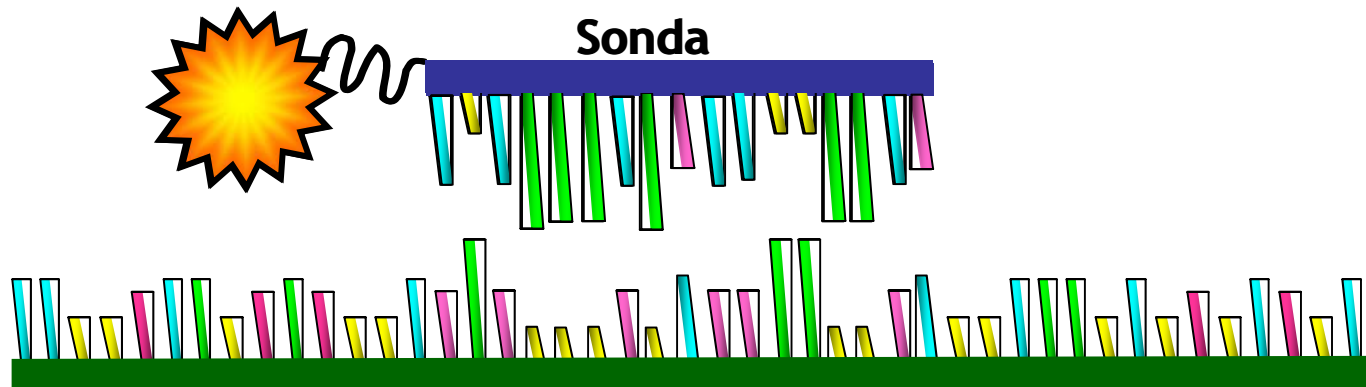
Lo studio del microbioma è un argomento
di grande attualità

Reso possibile da nuove Tecniche molecolari
per lo studio delle comunità microbiche

RICERCA DI GRUPPI PARTICOLARI

FISH una sonda specifica marcata con un fluorocromo permette di
individuare le cellule bersaglio anche tra molte altre

SONDA → MARCATURA → DENATURAZIONE CAMPIONI E SONDA →
IBRIDAZIONE → LAVAGGI → MICROSCOPIO A FLUORESCENZA



É possibile anche usare sonde multiple, marcate con fluorocromi di colori
differenti per determinare i rapporti numerici e spaziali tra gruppi diversi

CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition)

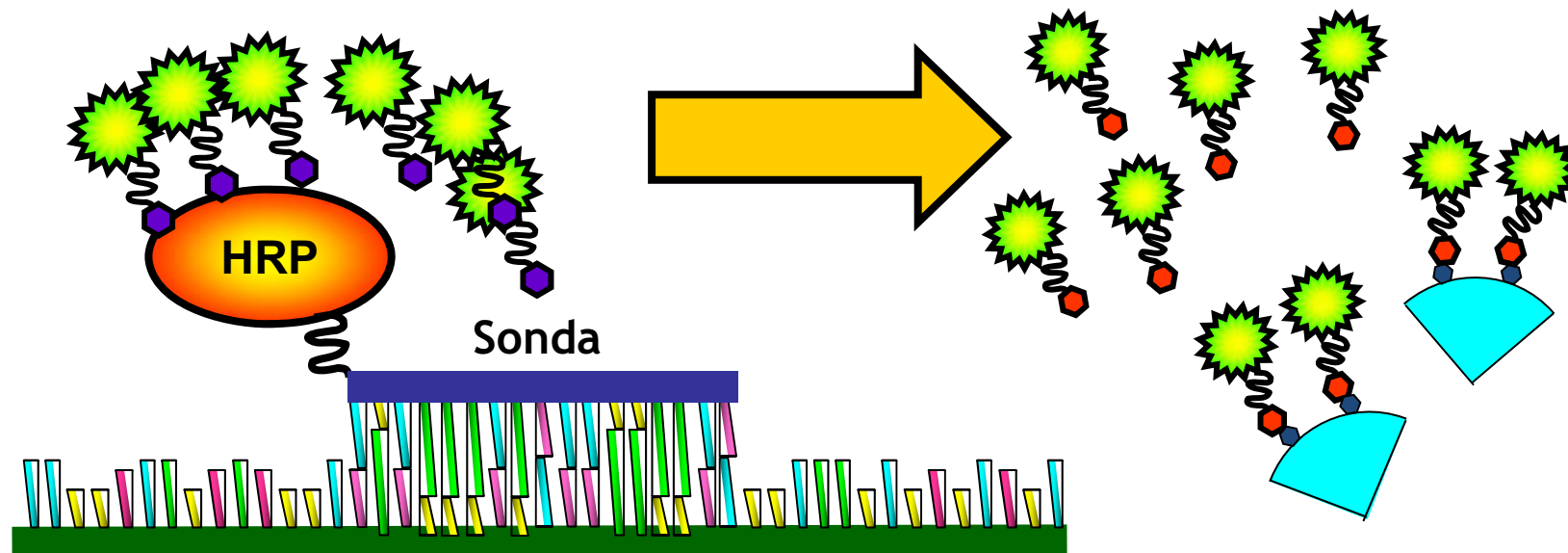
Tyramine Signal Amplification

Sonda + Horse Radish Peroxidase + tirammide marcata con fluorocromo

Una volta attivata dalla HRP, la tirammide (composto fenolico) si lega alle proteine della parete batterica (residuo di tirosina)

Dimerizzazione improbabile
(bassa concentrazione)

Intermedi reattivi reagiscono con aa
delle molecole adiacenti alla sonda

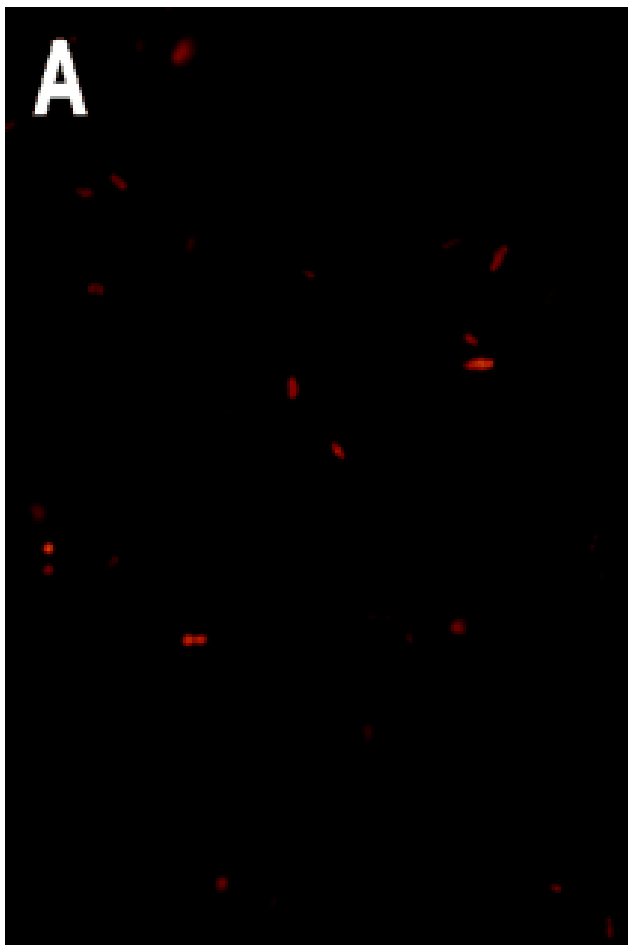


Limite: passaggio sonda di grandi dimensioni
(permeabilizzazione con Lisozima)

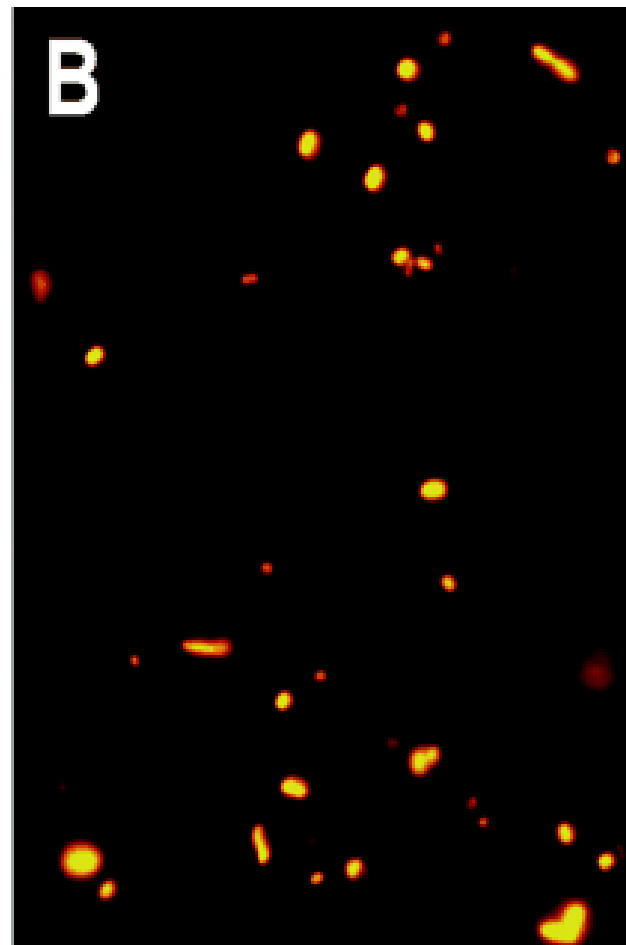
Possibile interferenza perossidasi
batteriche: inattivazione con H₂O₂

La CARD-FISH può amplificare il segnale anche
1000x rispetto alla FISH

FISH



CARD-FISH



STRUTTURA DI COMUNITA'
Librerie 16S

