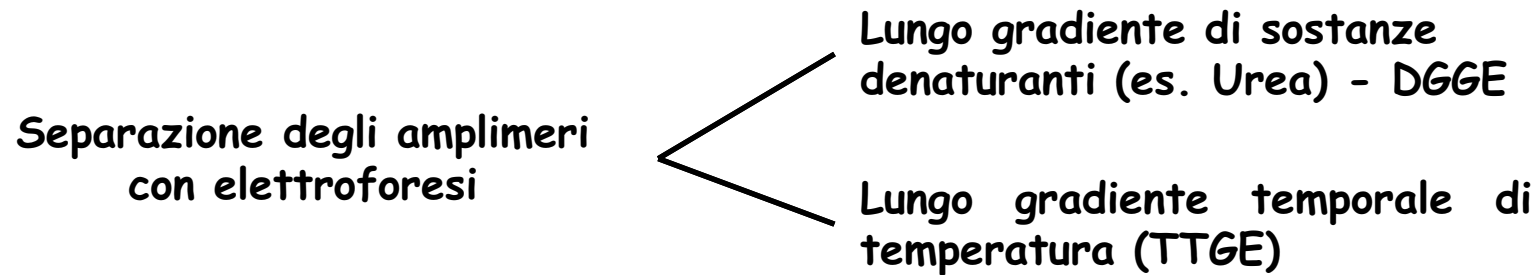


DGGE/TTGE

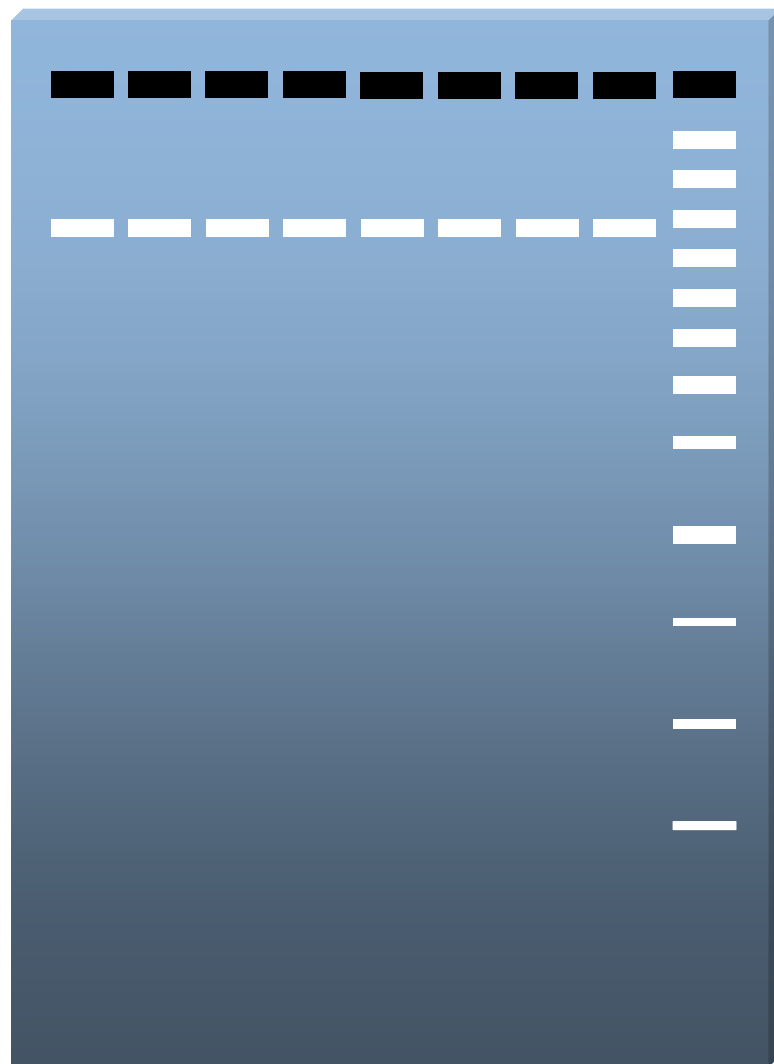


Le differenze nel punto di denaturazione, chimica o termica,
dipendono dalla sequenza nucleotidica

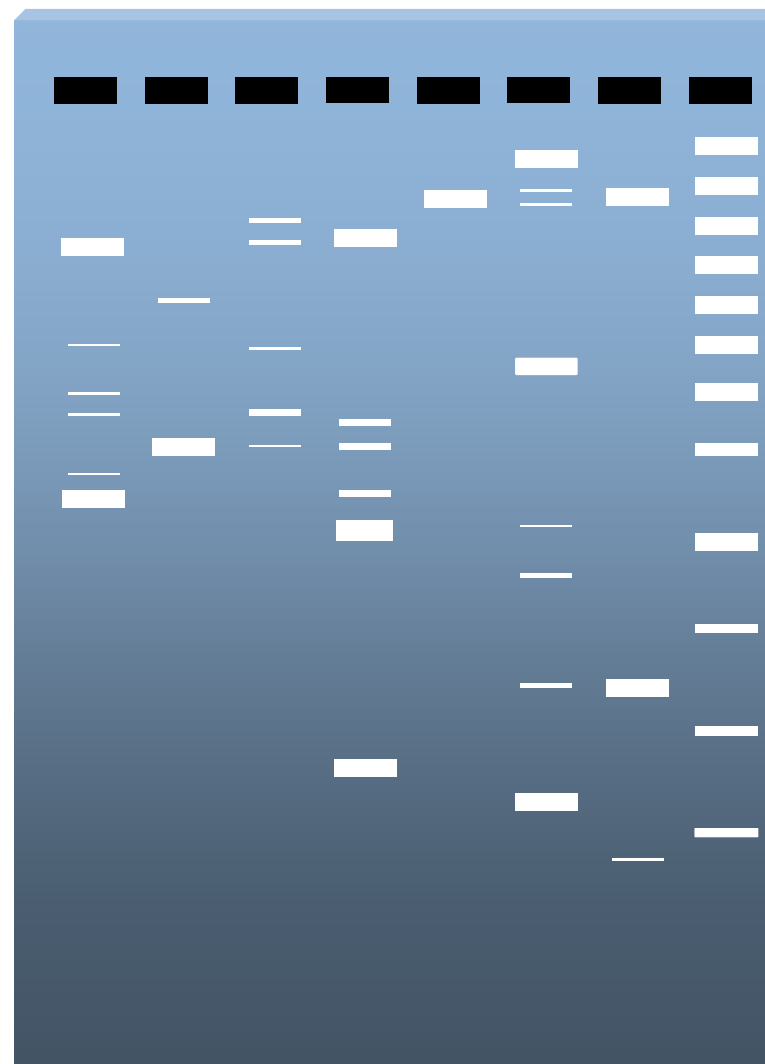
le bande possono essere purificate
da gel e sequenziate

DGGE: necessità di primer con aggiunte
di GC al 5', anche piuttosto lunghe

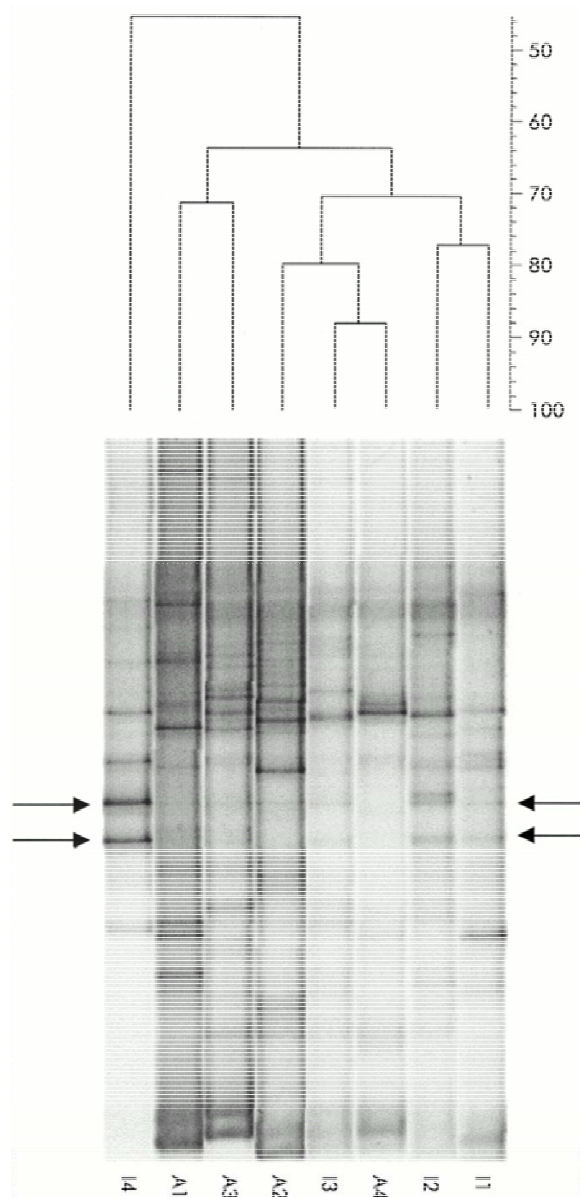
**Corsa elettroforetica
convenzionale**



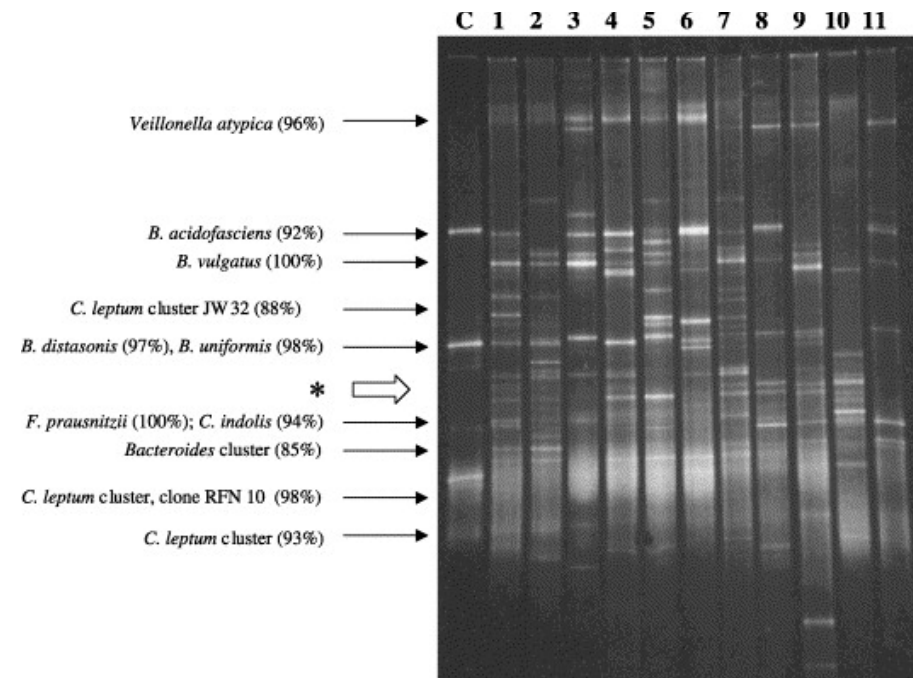
DGGE (TTGE)



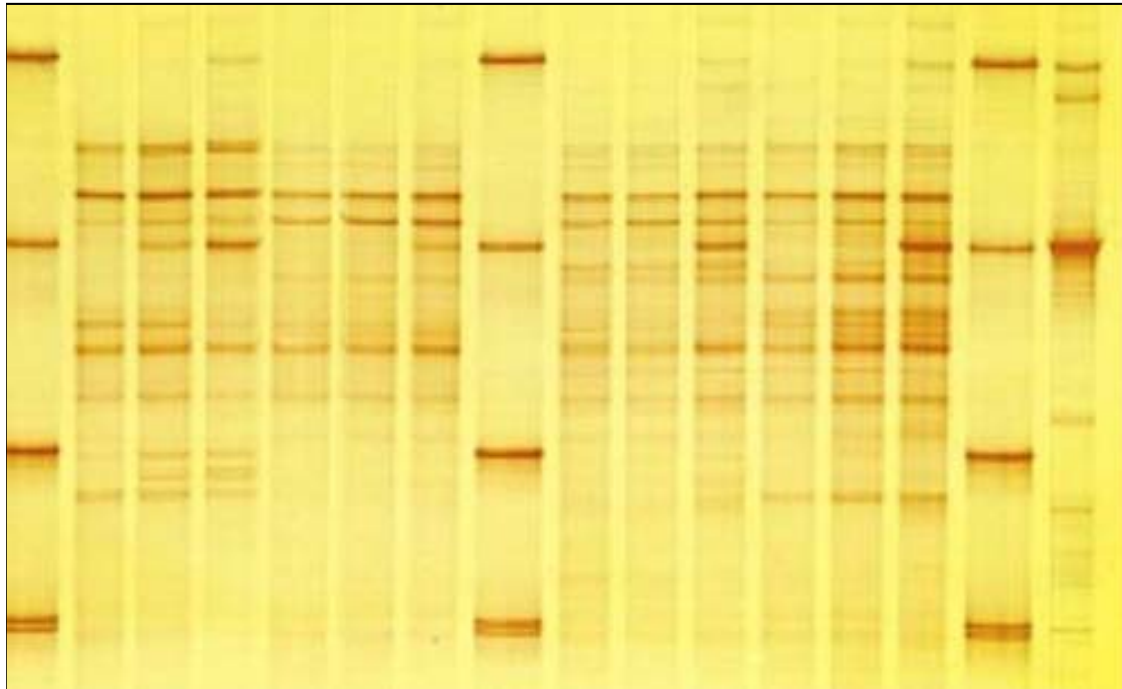
Analisi in TTGE microbiota fecale di individui con morbo di Crohn attivo e inattivo



Analisi in DGGE su microbiota fecale di pazienti ospedalizzati



SSCP-Single strand conformation Polimorphism



Estrazione metagenoma
Amplificazione regione 16S
rDNA; uno dei primer è
fosforilato al 5'

Rimozione enzimatica (esonucleasi
di λ) del filamento fosforilato

Corsa su gel di acrilamide

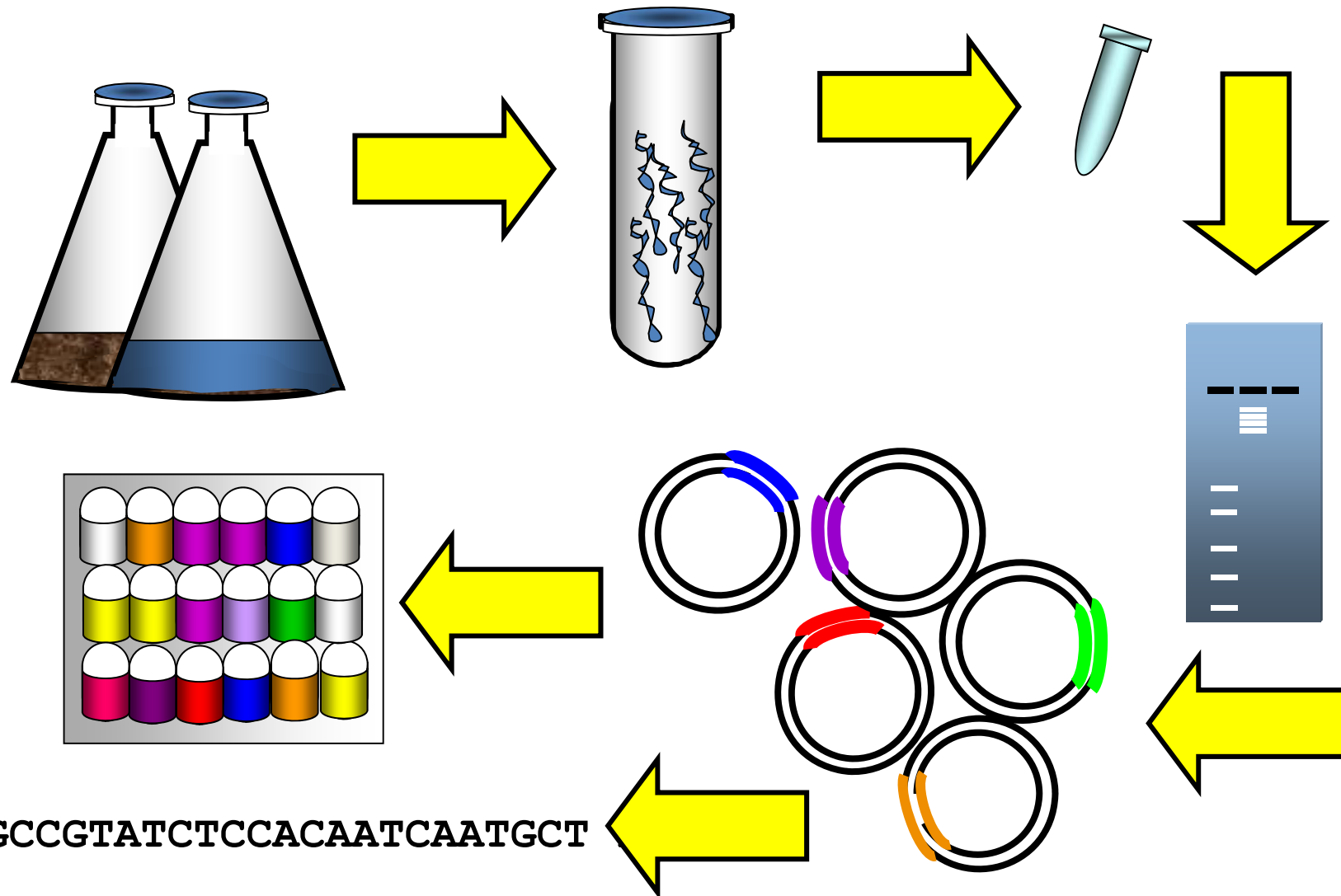
Escissione delle bande

Ricostituzione del doppio
filamento

Riamplicazione

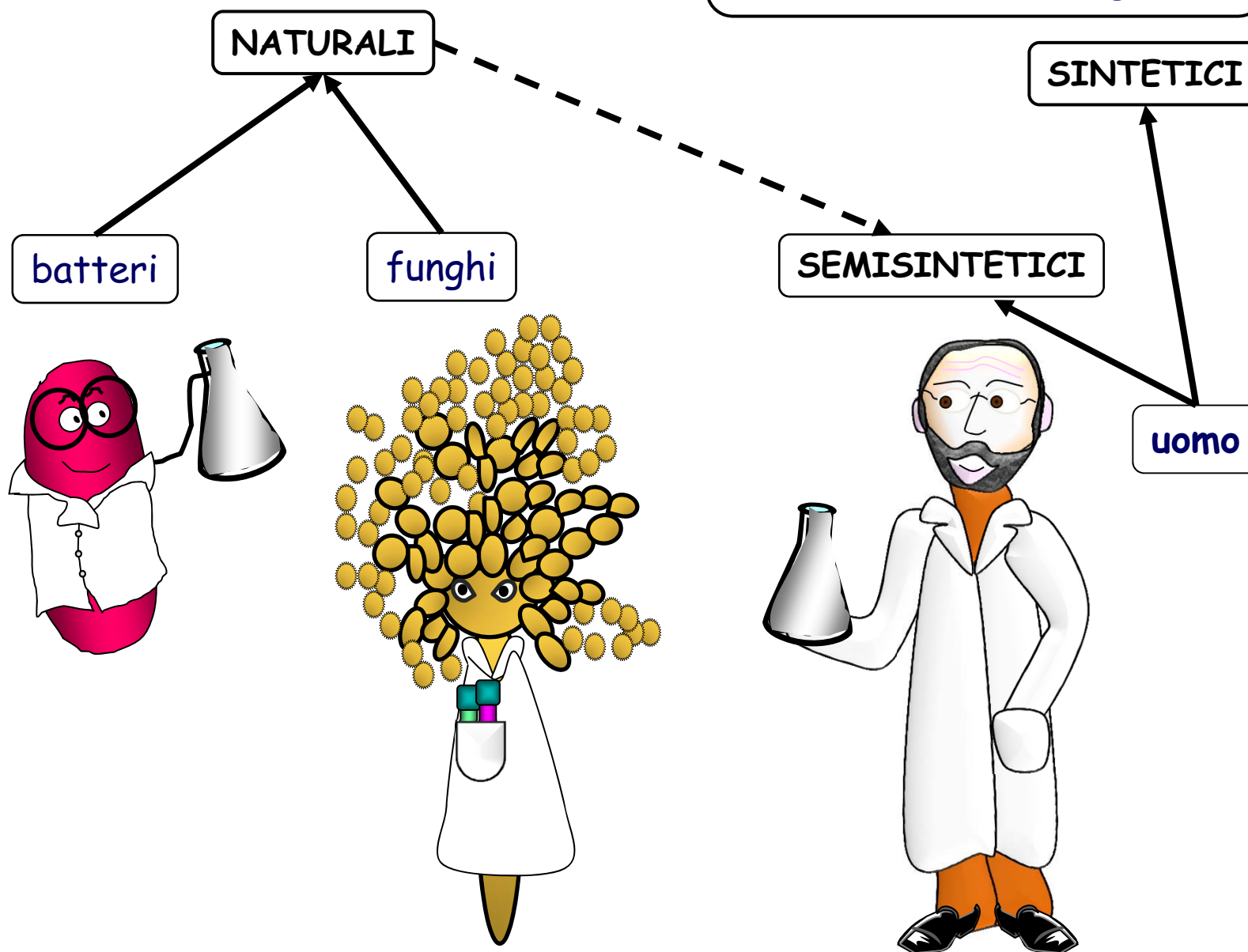
Sequenziamento

Librerie metagenomiche (attività particolari)

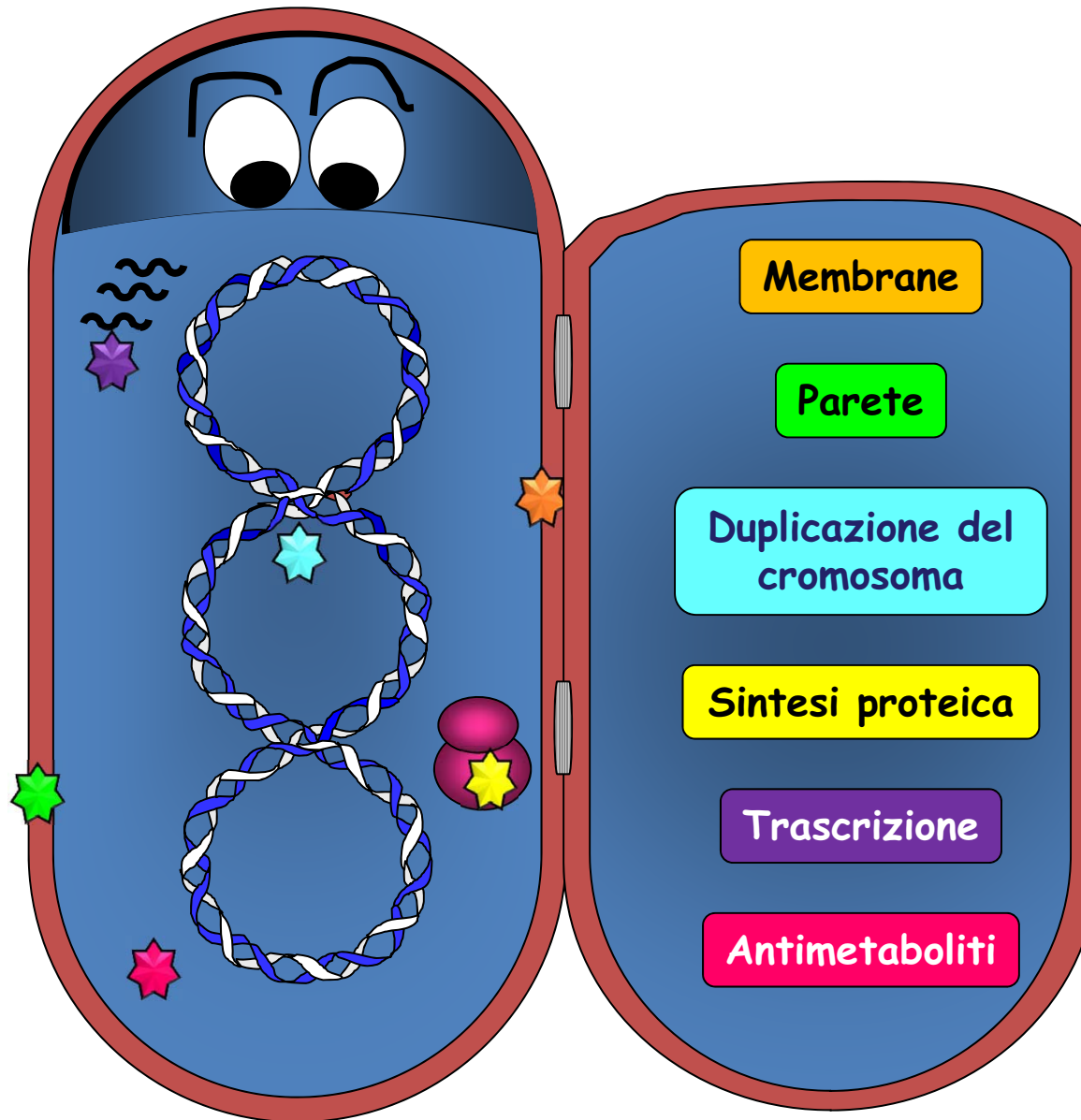


ANTIBIOTICI: SOSTANZE CHIMICHE

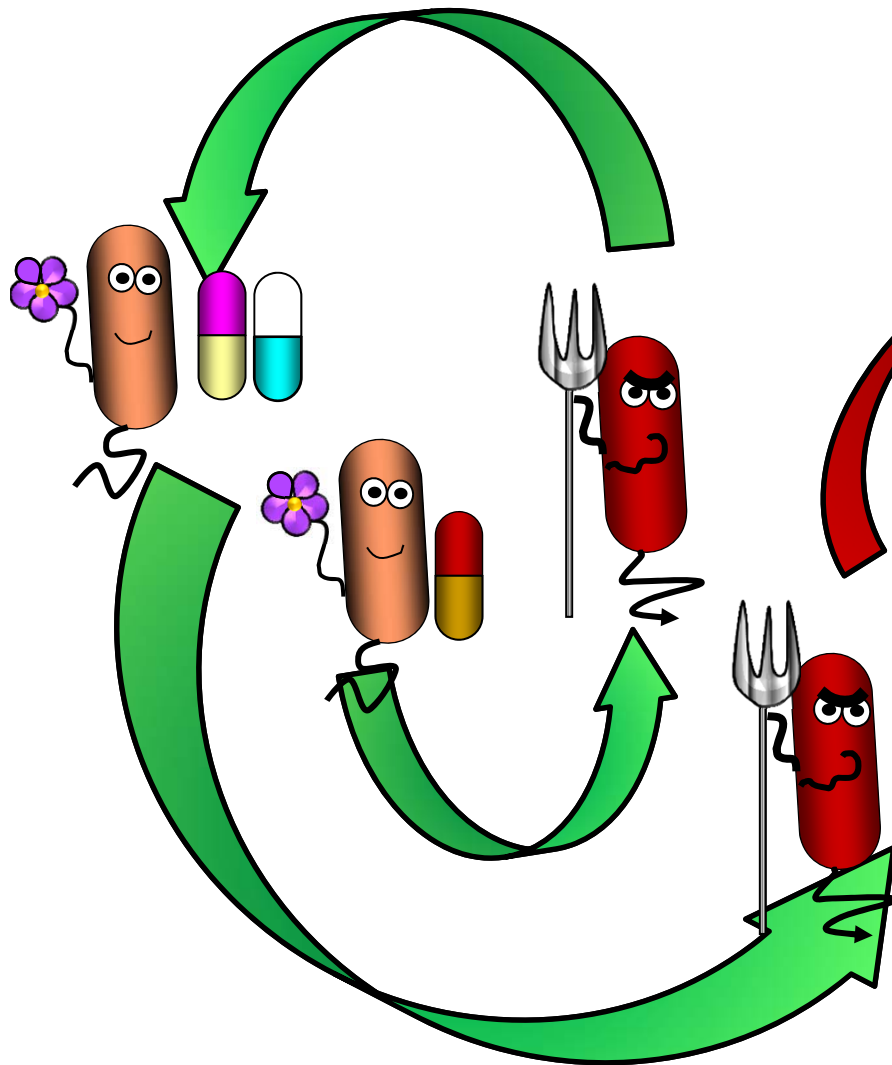
A dosi relativamente elevate
interferiscono con
con la vita dei microrganismi



GLI ANTIBIOTICI COLPISCONO STRUTTURE O PROCESSI CARATTERISTICI DEI PROCARIOTI

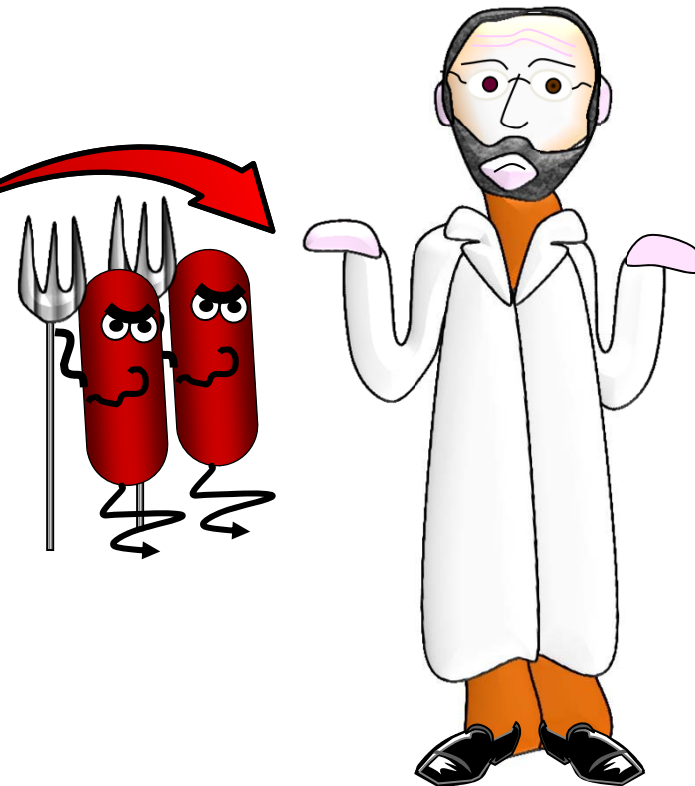


introduzione degli antibiotici in
terapia (circa 60 anni)



Diminuzione
efficacia

Mancanza di
molecole nuove



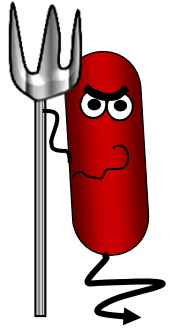
Comprendere l'evoluzione della
resistenza per poterla prevenire

ANTIBIOTICO RESISTENZA = PROCESSO EVOLUTIVO

L'unico che possa essere seguito mentre si svolge

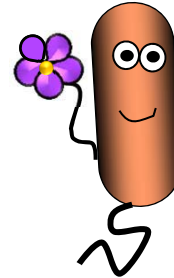
NEI CONFRONTI DI UN ANTIBIOTICO, UNA SPECIE BATTERICA PUÒ ESSERE

naturalmente resistente



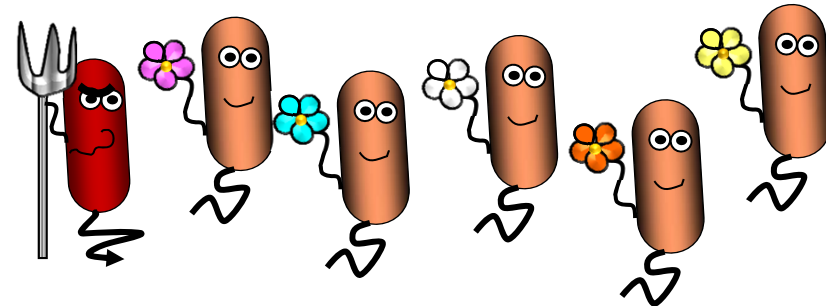
Se tutti ceppi della specie sono resistenti

sensibile

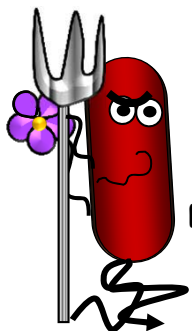


Se tutti o gran parte dei ceppi della specie sono sensibili

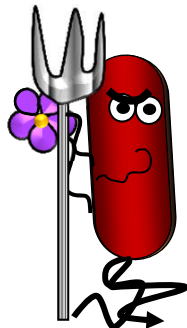
In una specie sensibile possono essere presenti anche ceppi resistenti



IL processo evolutivo può procedere attraverso



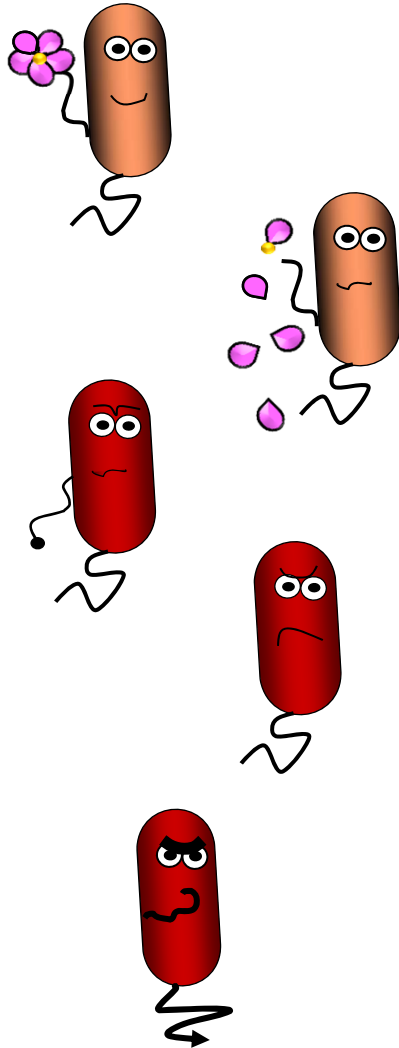
mutazione



Per trasferimento orizzontale

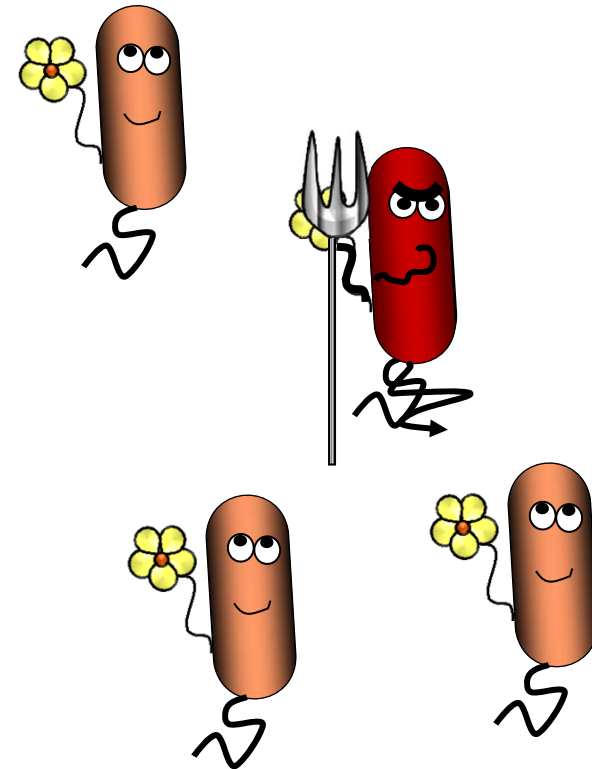
I due meccanismi sono coinvolti in **DIFFERENTI** modelli di **EVOLUZIONE**, che dipendono dai batteri e dalle condizioni ambientali

MUTAZIONE



L'EVOLUZIONE E'
LENTA E CASUALE

TRASFERIMENTO GENICO
ORIZZONTALE (TGO)



Acquisizione di geni preformati,
evoluti in altri microrganismi

L'EVOLUZIONE È RAPIDA
(necessari contatto e compatibilità)

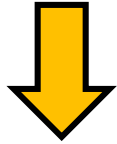
SELEZIONE



L'evoluzione dell'antibiotico resistenza
si è svolta in due fasi

I FASE:

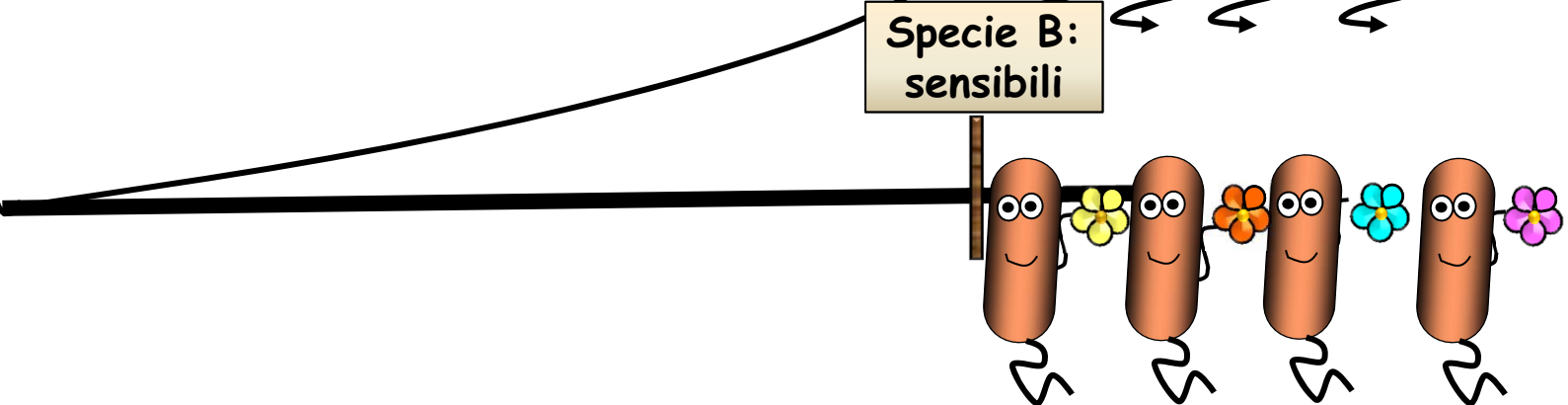
pressioni selettive
natural, di diverso tipo



EVOLUZIONE LUNGA +
SELEZIONE "RILASSATA"

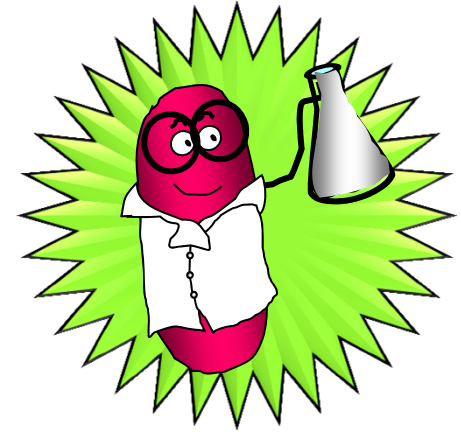


INSORGENZA DI RESISTENZE
NATURALI

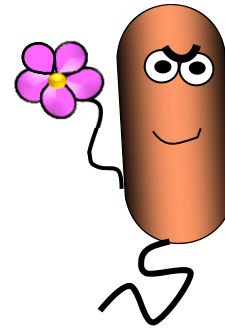


sostanze
tossiche

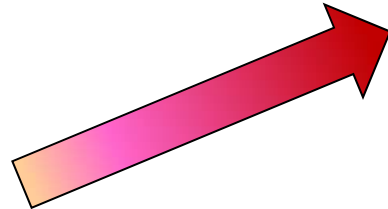
Antibiotici naturali



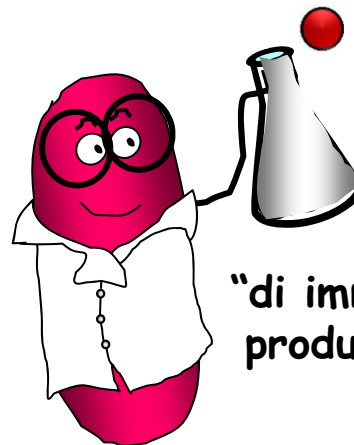
Prima dell'avvento degli antibiotici la maggior parte dei patogeni umani era suscettibile



i "nuovi" geni che determinano la resistenza

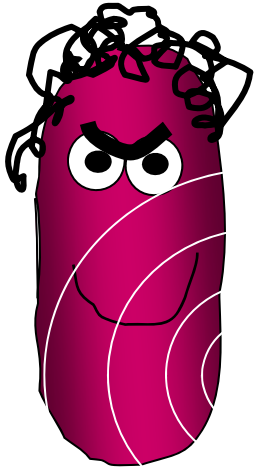


si sono evoluti in batteri non patogeni



geni
"di immunità" dei batteri
produttori di antibiotici

LA RESISTENZA INTRINSECA (NATURALE) PUÒ ESSERE DOVUTA

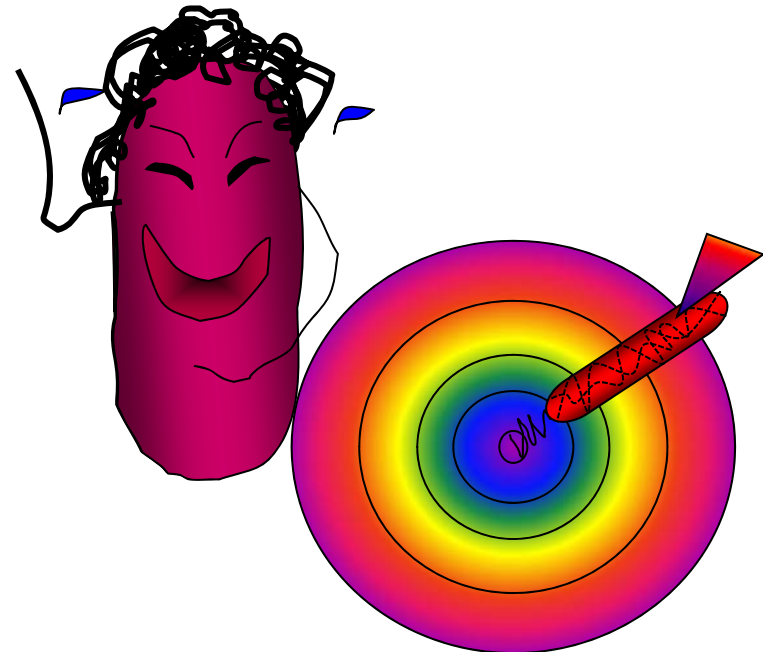


alla mancanza del bersaglio

Es. i micoplasmi, che non hanno parete, e le
clamidie, che non hanno peptidoglicano,
sono intrinsecamente resistenti agli antibiotici
che attaccano questi bersagli

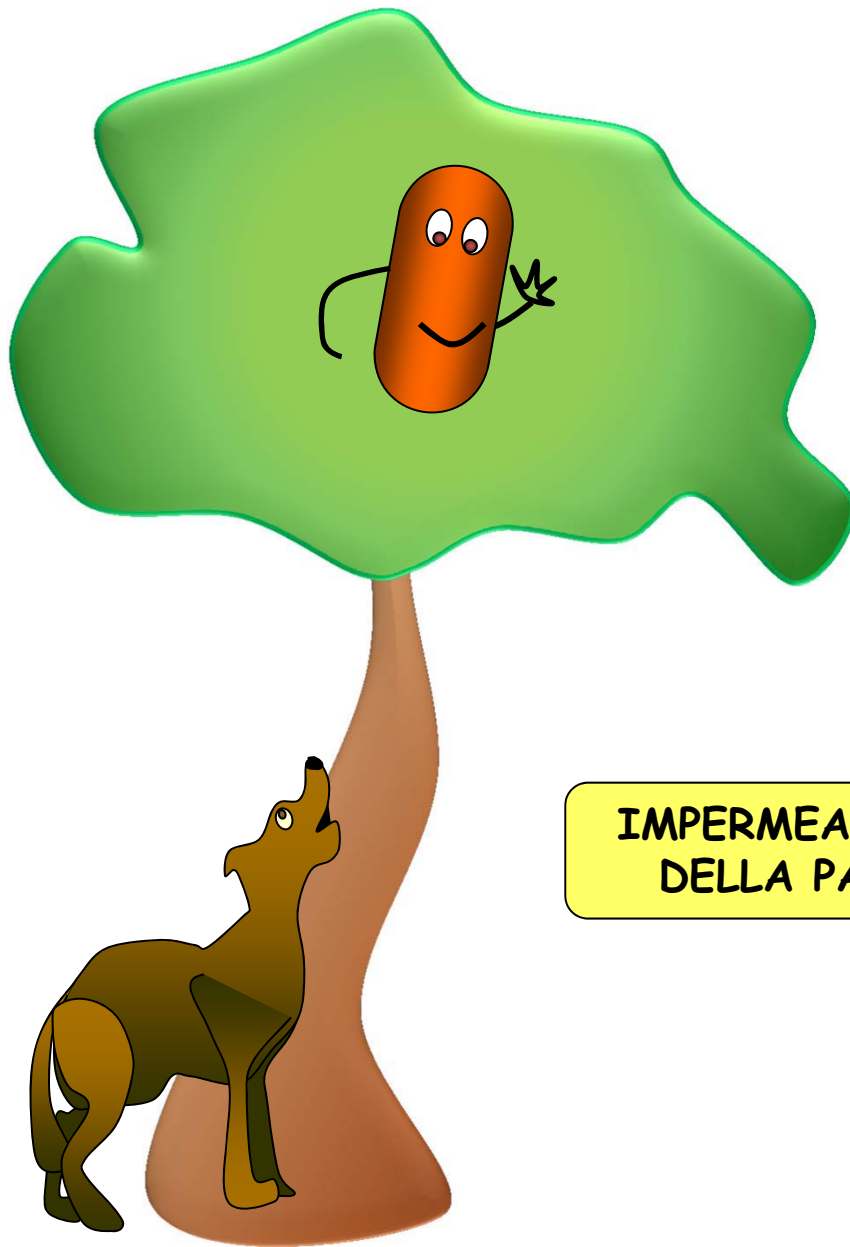
o alla sua conformazione...

Le PBP di alcuni enterococchi non
legano le cefalosporine
Le RNA-polimerasi dei micoplasmi
non sono sensibili alle rifamicine



IL BERSAGLIO PUÒ ESSERE NATURALMENTE INACCESSIBILE

Es. Gli antibiotici che non passano la membrana esterna non sono attivi sui batteri Gram-negativi..



**IMPERMEABILITA'
DELLA PARETE**

Resistenza intrinseca a
GLICOPEPTIDI e MACROLIDI
nei batteri Gram-negativi

Resistenza intrinseca a molti
farmaci nei micobatteri

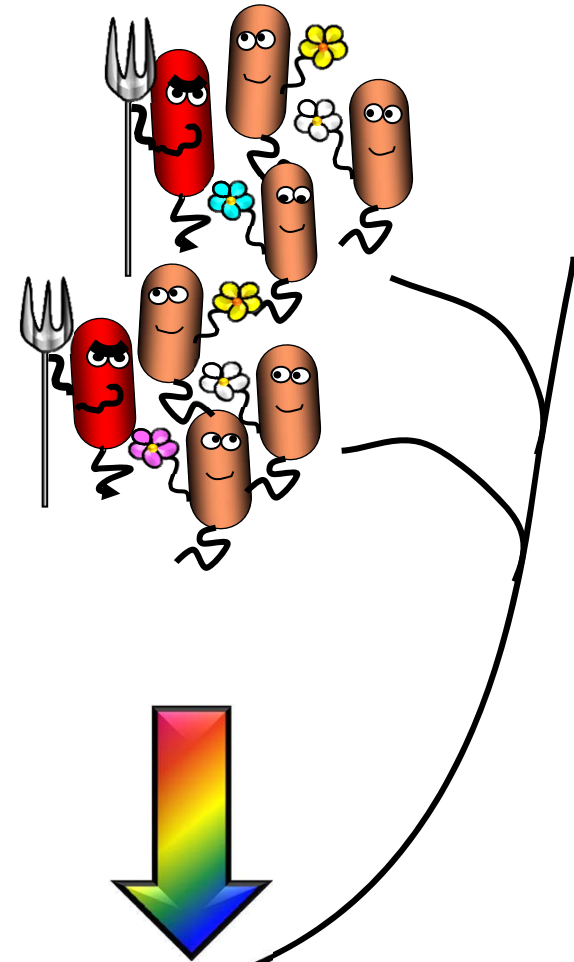
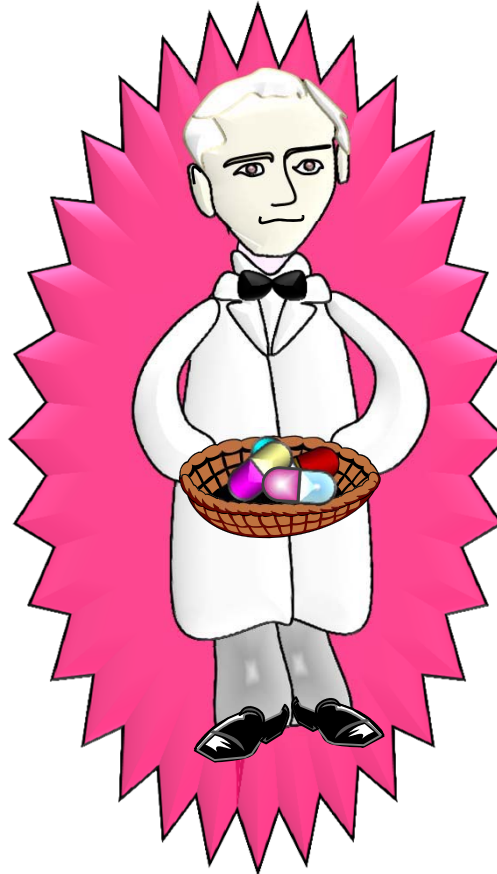
SECONDA FASE

Processo rapido iniziato
nelle ultime poche decadi

Gli agenti selettivi: antibiotici
di derivazione umana

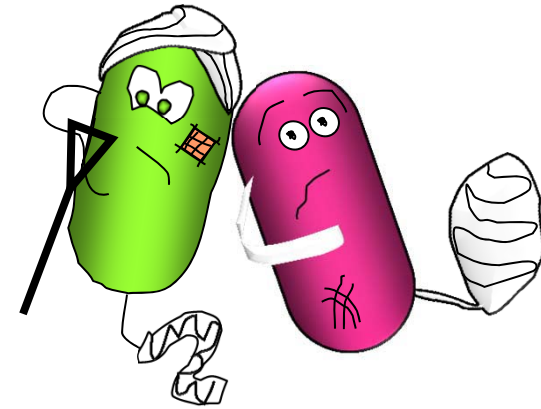
Nell'ospite

Negli ambienti
antropizzati



L'uso umano impiega concentrazioni più alte di
quelle possibili negli ambienti naturali

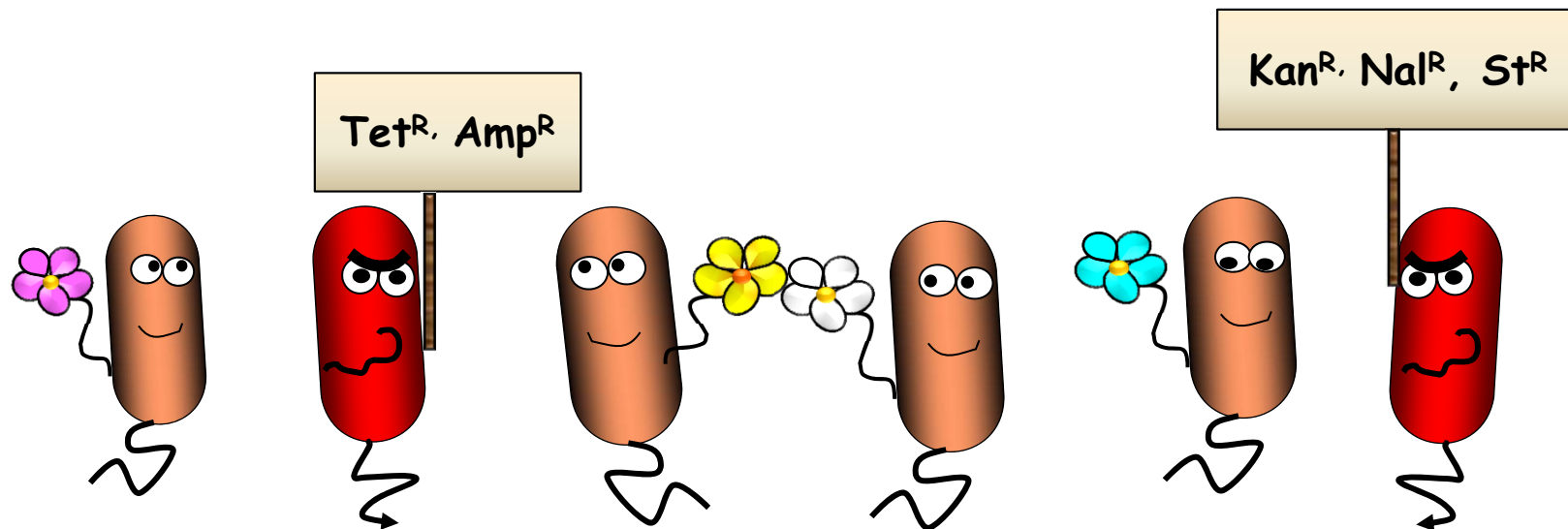
Sufficienti a danneggiare o
uccidere le cellule batteriche



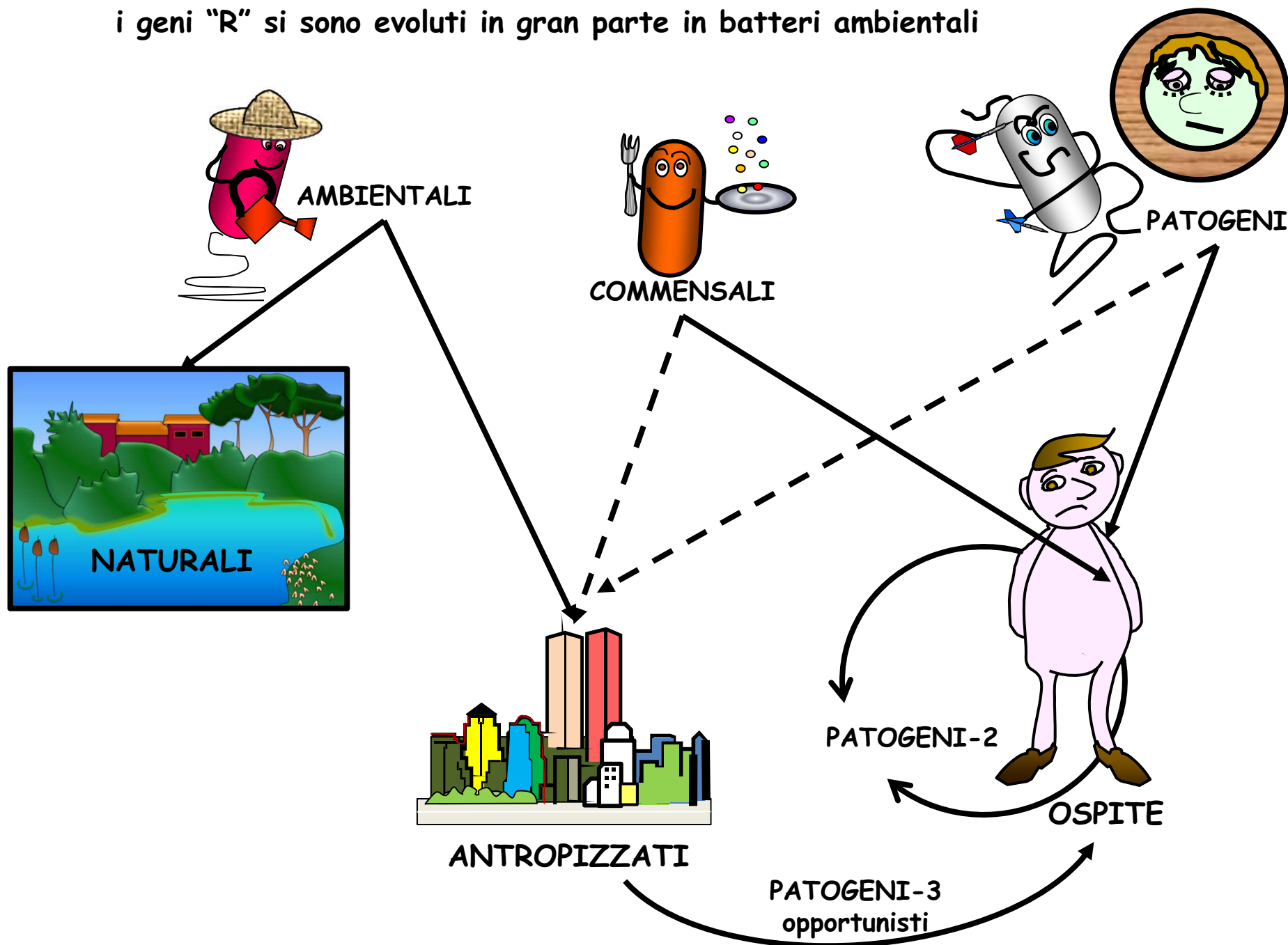
Il TGO è più frequente

All'interno di una specie naturalmente sensibile

SI TROVANO CEPPI CON PROFILI DI RESISTENZA DIVERSI



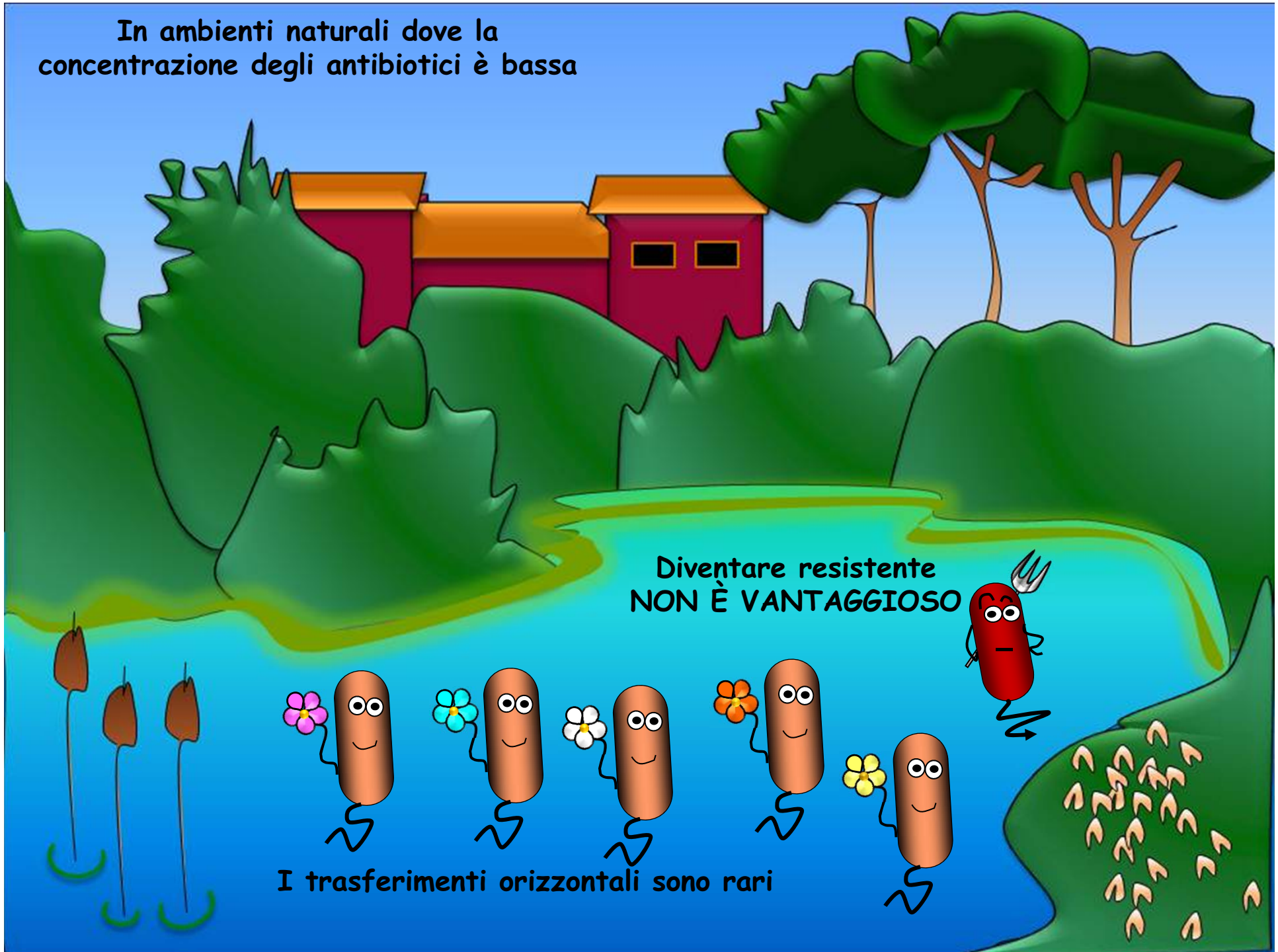
i geni "R" si sono evoluti in gran parte in batteri ambientali



In ambienti naturali dove la
concentrazione degli antibiotici è bassa

Diventare resistente
NON È VANTAGGIOSO

I trasferimenti orizzontali sono rari

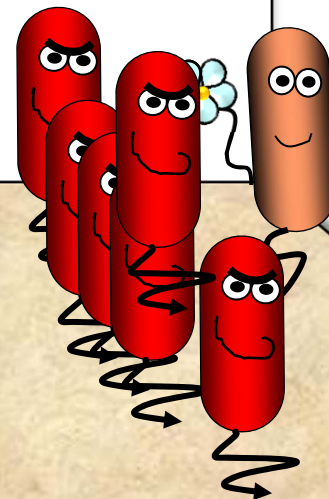
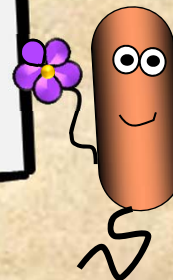
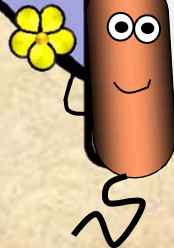
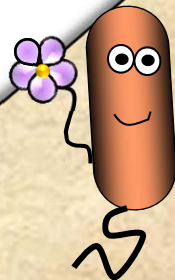
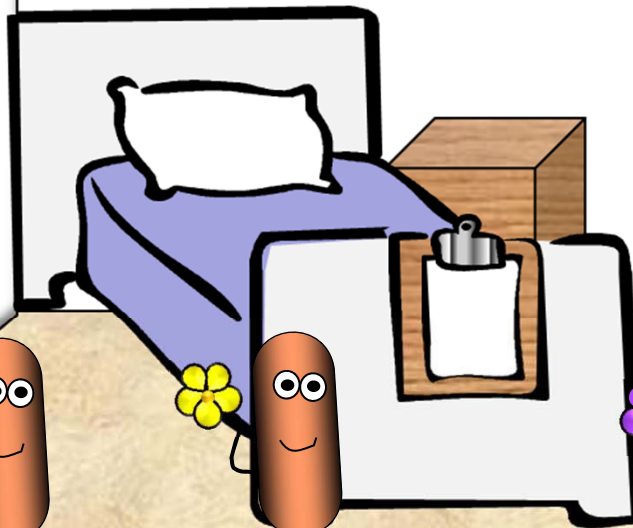
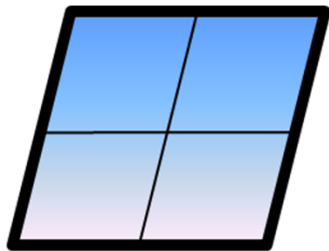


Ma dove gli antibiotici sono abbastanza
concentrati da uccidere i batteri sensibili



**ACQUISIRE LA RESISTENZA
È UN VANTAGGIO**

le probabilità di disseminazione
dei resistenti aumentano



PAESI INDUSTRIALIZZATI



PAESI IN VIA DI SVILUPPO

RESISTENZA



politiche di somministrazione non ben regolate

peggiori condizioni igieniche

Peggiori pratiche di controllo delle infezioni



PRATICHE AGRICOLE E ZOOTECHNICHE

