

POTERE PATOGENO E VIRULENZA

Qualunque sia il tipo di interazione responsabile del danno, una specie microbica che abbia evoluto strategie di adattamento volte a parassitare un ospite, viene definita patogena. La capacità di essere patogena (potere patogeno) è un attributo della specie, e viene definita dalla precisazione dell'ospite, o degli ospiti che costituiscono il secondo elemento della interazione: *Vibrio cholerae* è patogeno "per l'uomo"; *Aeromonas salmonicida* è patogeno "per i pesci"; *Salmonella* è patogena "per uomo e animali" etc... La forza della capacità di provocare



danno, in un ceppo, appartenente a una specie patogena, si definisce virulenza. All'interno della specie *Yersinia pestis*, che è patogena per l'uomo, il ceppo "1177" è praticamente inoffensivo mentre il ceppo "Shasta" è molto virulento e provoca un'elevata mortalità.

Anche quando è del tutto avirulento, un ceppo che parte da una specie patogena continua ad essere considerato patogeno (sarebbe sufficiente un trasferimento orizzontale per

fargli riacquistare virulenza). Con il nome di "fattori di virulenza" si indicano tutte le caratteristiche intrinseche di un microrganismo che possano in qualche modo favorire l'espressione della sua patogenicità: sono fattori di virulenza non solo i prodotti che causano direttamente danno all'ospite (come per esempio le tossine) ma anche i geni che li codificano (geni di virulenza) i regolatori trascrizionali che modulano l'espressione dei "geni di virulenza" e tutti quei fattori genericamente deputati a garantire uno stile di vita "da patogeno" (per esempio quelli coinvolti nella colonizzazione, o nello sfuggire alle difese dell'ospite).

FATTORI DI ADERENZA E COLONIZZAZIONE

La prima necessità, per un microrganismo patogeno, è quella di evitare di essere allontanato meccanicamente dai normali meccanismi di detersione dei tessuti dell'ospite (muco, liquidi) o dall'esfoliazione fisiologica. Il ricambio delle cellule epiteliali è di circa 48 ore, e questo significa che un patogeno deve essere in grado di attaccarsi e replicarsi con velocità sufficiente a non essere spazzato via. Le cellule batteriche hanno una carica superficiale negativa come quelle dell'ospite ma la repulsione che ne deriva viene superata da interazioni

idrofobiche (più alta l'idrofobicità della superficie batterica più facile l'attacco) e da interazioni specifiche tra macromolecole di superficie (fimbrie, pili) che si legano a componenti specifici (recettori) di tessuti dell'ospite. Molti dei microrganismi che aderiscono alle mucose sono in grado di permanervi stabilmente formando biofilm. Alcuni eventi di adesione sono specie o ceppo-specifici; altri hanno un tropismo per tessuti particolari, come *Streptococcus mutans* (presente sulla superficie dei denti ma non su quella della lingua).

CAPSULE E COMPONENTI SUPERFICIALI

Per evitare la fagocitosi, molti patogeni hanno componenti superficiali che prevengono l'attacco e la fagocitosi da parte di macrofagi o altre cellule immunocompetenti. Queste difese possono essere formate da proteine legate alla membrana, da capsule o "slime" polisaccaridici, o da molecole dell'ospite che vengono attaccate alla superficie del patogeno. *Treponema pallidum*, l' agente della sifilide, per esempio, attacca sulla propria membrana esterna la fibronectina dell'ospite, mentre gli stafilococchi ne coagulano intorno a sé il plasma (enzima: coagulasi). Anche molti antigeni possono impedire la fagocitosi.

ALTRE DIFESE DALLA FAGOCITOSI

Alcuni microrganismi possono secernere enzimi litici che provocano l'esplosione delle vescicole lisosomiali all'interno del citoplasma dei granulociti neutrofili (streptococchi e stafilococchi patogeni) altre specie possono bloccare la sintesi proteica nei fagociti uccidendoli (*P. aeruginosa*-esotossina A).

SIDEROFORI

Un patogeno che riesce a penetrare in un ospite, deve anche poi riuscire a moltiplicarsi e questo significa che deve poter ottenere il proprio nutrimento a spese dell'ospite stesso. Per i microrganismi patogeni il primo problema a questo riguardo è la disponibilità di ferro, che, nei tessuti vivi, è strettamente legato a eme, ferritina, transferrina o lattoferrina. Il ferro può rappresentare il fattore limitante in un'infezione. Molti microrganismi patogeni rispondono a questa situazione producendo siderofori con affinità tanto elevata (es. aerobactina) da riuscire a strappare il ferro persino alle specializzate transferrine eucariotiche. Ceppi di *Salmonella* privati della possibilità di sintetizzare i siderofori perdono la virulenza.

TOSSINE LIPOLISACCARIDICHE (ENDOTOSSINE).

Caratteristiche dei batteri didermi, sono tossiche per la maggior parte dei mammiferi e possono essere letali se rilasciate in concentrazioni elevate. Corrispondono al lipopolisaccaride

(LPS) della membrana esterna, composto di tre frazioni: il lipide tossico (lipide A) ancorato alla membrana esterna; un polisaccaride immunogeno e una serie di antigeni somatici (antigeni O) oligosaccaridici, esposti sulla superficie esterna. A differenza delle esotossine, completamente proteiche, antigeniche e con meccanismo d'azione individuale, le endotossine hanno tutte un effetto simile: provocano febbre e uno stato infiammatorio generalizzato, che in alcuni casi può arrivare anche allo shock emorragico. Questi effetti sono mediati dal Lipide A, rilasciato solo quando le cellule lisano. Si ritiene che l'LPS venga legato da proteine particolari (LPS-binding proteins) e che il complesso interagisca con cellule epiteliali, monociti e macrofagi. Le endotossine sono molto meno tossiche delle esotossine. La loro tossicità è misurata nell'ordine di grandezza dei milligrammi, contro i microgrammi con cui si misura la tossicità delle esotossine. Essendo componenti strutturali della cellula, le endotossine possono essere rilasciate da popolazioni in crescita attiva oppure da cellule che lisano come risultato di azioni di difesa dell'ospite (es. lisozima) o di antibiotici (penicillina streptomicina).

PATOGENI TOSSINOGENICI

Oltre a quelli descritti, altri fattori di virulenza sono caratteristici della strategia (tossinogenesi o invasività). con cui il patogeno provoca malattia I patogeni tossinogenici restano localizzati nel distretto di ingresso e svolgono la propria azione attraverso tossine proteiche; i patogeni invasivi provocano malattia grazie alla loro capacità di moltiplicarsi e diffondere nell'organismo e, in alcuni casi, anche all'interno delle cellule.

TOSSINE PROTEICHE (ESOTOSSINE)

Le esotossine sono proteine solubili prodotte da batteri vivi nel corso della fase esponenziale di crescita. Le specie batteriche che producono esotossine causano in genere malattie in cui la tossina ha un ruolo importante (solo *Clostridium tetani* produce la tossina tetanica; solo *Corynebacterium diphtheriae*, produce tossina difterica..) e i ceppi che non producono la tossina sono in genere avirulenti. Le tossine proteiche batteriche sono per l'uomo i veleni più potenti che si conoscano: a titolo di esempio, in esperimenti condotti su topi, la tossina botulinica ha dimostrato di essere un veleno più potente di quello di serpente (300.000 volte) della stricnina (3 milioni di volte) e delle endotossine (30 milioni di volte).

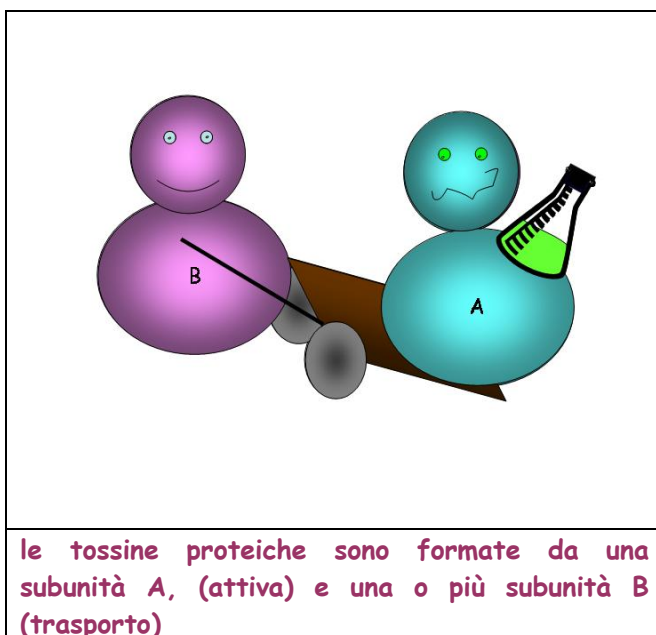
Le esotossine sono denaturate dal caldo, dall'acidità, da enzimi proteolitici, hanno un'attività biologica (in genere catalitica) e un'azione specifica su bersagli definiti.

Termini come enterotossina, neurotossina, leucocidina, emolisina, si riferiscono al bersaglio delle singole tossine. In alcuni casi l'attività citotossica è limitata (le tossine tetanica e botulinica attaccano solo le cellule nervose) in altri la varietà dei tipi cellulari attaccati è vasta e si ha necrosi tissutale (la tossina difterica blocca la respirazione in tipi di cellule diverse; le tossine con attività fosfolipasica uccidono molte cellule danneggiando le membrane). Le tossine proteiche sono fortemente antigeniche tanto che anticorpi specifici (antitossine) possono bloccarne l'attività; tendono anche a essere instabili nel tempo e a perdere la propria attività tossica. In questo caso si dice che diventano tossoidi. I tossoidi mantengono le proprietà antigeniche e possono essere quindi usati come vaccini per ottenere un'immunità attiva. La formazione di tossoidi può essere controllata e accelerata con trattamenti artificiali a base di formalina o altre sostanze (in questo caso vengono definiti anatossine). Il vaccini antitetanico e antidifterico, per esempio, sono vaccini anatossici.

ARRANGIAMENTO IN SUBUNITÀ (A,B).

Le tossine proteiche che agiscono all'interno della cellula ospite consistono in genere di due componenti: il primo (subunità A) è responsabile dell'attività biologica della tossina e il secondo (subunità B) è deputato a riconoscere e legare il recettore sulla cellula ospite, e a trasferire la subunità A all'interno di essa.

La componente biologica della tossina resta inattiva fino a che non si libera dalla tossina



nativa. La subunità A può essere attiva ma incapace di entrare nella cellula, la subunità B può entrare nella cellula ma non è tossica. Le subunità di una tossina proteica possono essere arrangiate in molti modi che vengono indicati con notazioni convenzionali.

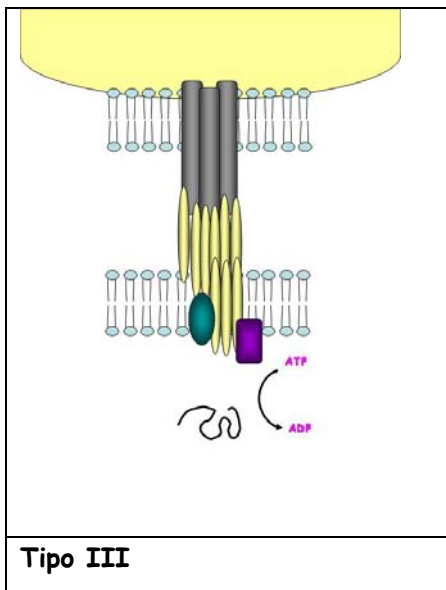
A+B : la tossina viene sintetizzata e secreta come due subunità indipendenti che interagiscono tra di loro direttamente sulla superficie della cellula bersaglio (*Bacillus anthracis*).

A-B : le due subunità sono sintetizzate separatamente ma si associano con legami non covalenti durante la secrezione e il legame al loro bersaglio. All'interno del modello A-B, una

notazione del tipo A-5B indica la quantità di subunità identiche che costituiscono il dominio di legame della tossina (es. molte tossine, tra cui quella del colera, hanno 5 subunità di legame che circondano la subunità A).

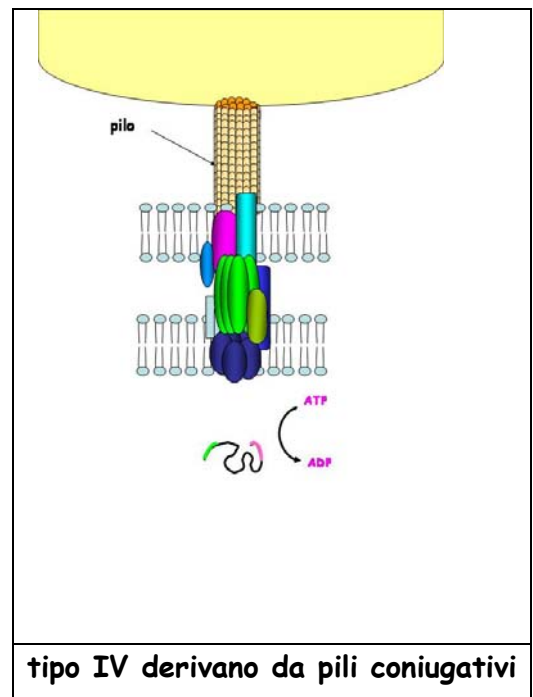
A/B :la tossina è sintetizzata come un singolo polipeptide, in cui coesistono il dominio A e il dominio B, che possono venire separati grazie al taglio di una proteasi (le tossine tetanica e botulinica; la tossina difterica, sono di questo tipo).

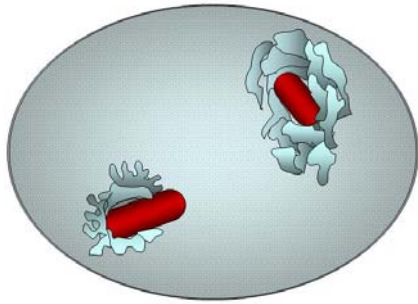
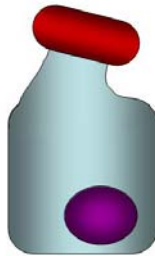
SISTEMI DI SECREZIONE DI TIPO III E IV



Per portare le tossine fuori dalla cellula, i batteri impiegano i normali sistemi di secrezione che trasferiscono le proteine destinate allo spazio periplasmico o a essere liberate nell'ambiente [sistema I e sistema II *cnfr periplasma*]. Esistono però altri sistemi di secrezione, strettamente associati con la patogenicità di microrganismi didermi, che portano tossine, effettori o anche DNA direttamente dall'interno della cellula batterica all'interno della cellula ospite: i sistemi di secrezione di tipo III (TTSS) o di tipo IV.

I sistemi di secrezione di tipo III sono formati da proteine strutturali e proteine effettrici, codificate da gruppi di geni localizzati all'interno di isole di patogenicità (particolari regioni del cromosoma in cui sono riuniti geni correlati alla virulenza). Le proteine strutturali si assemblano a formare un ago macromolecolare, le proteine effettrici vengono prodotte nel citoplasma batterico e passano, attraverso l'ago, nel citoplasma della cellula ospite. Gli effettori hanno azioni diverse, tipiche della patogenicità delle varie specie. Caratteristiche comuni sono: la mancanza della sequenza segnale per *sec*; l'assistenza da parte di proteine "chaperone" nel citoplasma batterico, prima del trasferimento, l'importanza del contatto con la cellula dell'ospite per avviare il trasferimento.



	
nel "ruffling" il citoscheletro si apre per far entrare Salmonella	I ceppi EPEC formano il piedistallo disorganizzando il citoscheletro

Le alterazioni del citoscheletro causate da molti patogeni enterici (per esempio il "pedistallo" che i ceppi enteropatogeni di *E. coli* formano negli enterociti; il "ruffling" che permette l'ingresso delle salmonelle nelle stesse cellule), sono causate da proteine traslocate attraverso sistemi di tipo III.

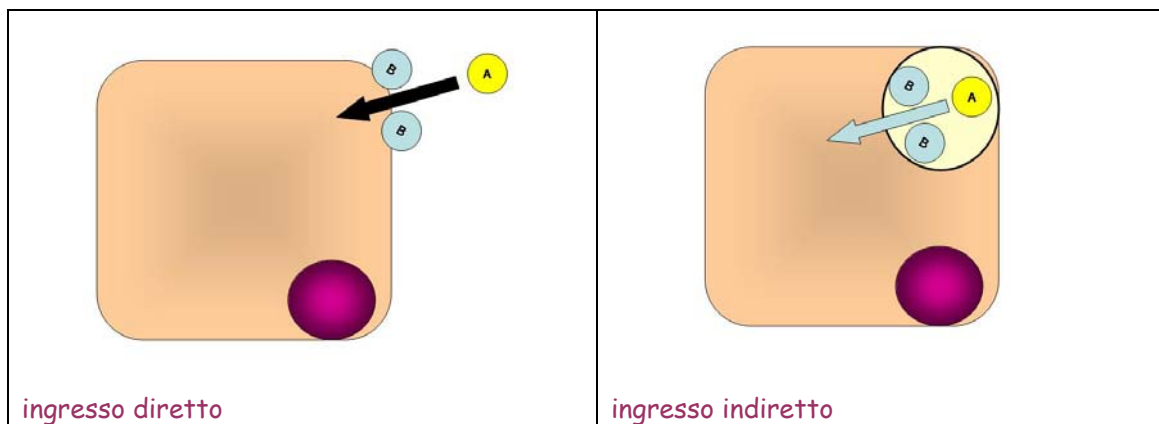
Le esotossine secrete attraverso il sistema di tipo IV (*Helicobacter pylori*) hanno una sequenza segnale N-terminale che permette al sistema *sec* di traslocarle nel periplasma; attraversano poi la membrana esterna grazie alla conformazione della propria estremità C-terminale (che viene poi tagliata via da proteasi) e vengono inoculate direttamente nella cellula dell'ospite attraverso un pilo. I sistemi di tipo IV derivano probabilmente da sistemi per la coniugazione e possono essere usati anche per esportare DNA, come accade nel caso di *Agrobacterium tumefaciens*.

Nei batteri Gram-negativi esistono anche proteine che si esportano da sole (auto-trasportatrici) queste proteine sono composte di tre domini: la sequenza segnale amino-terminale, la proteina matura e la porzione carbossi-terminale (beta) che forma un poro attraverso il quale viene secreto il secondo dominio. Molte delle proteine esportate in questo modo sono implicate nella virulenza; alcuni autori le raggruppano sotto il nome di sistema di secrezione di tipo V.

INGRESSO DELLE TOSSINE NELLA CELLULA OSPITE

Le tossine che agiscono all'interno della cellula ospite devono penetrarvi: questo può succedere per entrata diretta o indiretta.

Nel caso dell'entrata diretta la subunità B della tossina nativa si lega al recettore (in genere glicoproteine) e induce la formazione di un poro attraverso cui la subunità A entra nel



citoplasma della cellula ospite (es: colera, pertosse). Un meccanismo alternativo (entrata indiretta) prevede che la tossina nativa si leghi alla cellula ospite e venga portata nella cellula da un endosoma. Ioni H^+ entrano nell'endosoma e abbassano il pH, causando la separazione delle subunità A e B. La subunità B interagisce con la membrana dell'endosoma e provoca il rilascio della subunità A nel citoplasma della cellula (es. antrace). Poche tossine (es difterica) possono utilizzare entrambi i meccanismi di ingresso.

Ogni esotossina ha un meccanismo d'azione particolare e provoca una sintomatologia caratteristica.

La tossina di *Bacillus anthracis* (A+B) è formata da tre elementi: il fattore protettivo (PA) si lega alla membrana della cellula dell'ospite; lega il fattore dell'edema (EF) oppure il fattore letale (LF). I complessi (PL o PE) vengono internalizzati nella cellula dove il fattore protettivo si stacca rilasciando LF o EF che svolgono la propria azione tossica. EF causa la perdita di elettroliti e liquidi; LF blocca le kinasi attivate dalla mitosi (MAP-kinasi) alterando il metabolismo cellulare fino a uccidere la cellula.

La tossina difterica, prodotta da *Corynebacterium diphtheriae*, l'agente della difterite, agisce all'interno delle cellule eucariotiche, bloccando la sintesi proteica. Il precursore dell'esotossina difterica è inattivo (A/B) e contiene due ponti disolfuro.

La rottura di uno dei ponti, con l'idrolisi di un legame peptidico, porta alla formazione di due frammenti: il frammento A, termostabile e tossico, e il frammento B, termolabile, necessario per l'ingresso della tossina nelle cellule. Il frammento A catalizza una reazione tra NAD ed un fattore di allungamento implicato nella sintesi proteica (EF-2), e lo blocca legandovi una

molecola di ADP-ribosio. Per questo motivo la sua azione viene definita ADP-ribosilante. Una molecola della subunità A è sufficiente ad uccidere una cellula (ne vengono prodotte circa 5000/h per cellula batterica). L'informazione genetica per la produzione di tossina è portata da un profago, presente nei ceppi virulenti di *C. diphtheriae*. La produzione di tossina è stimolata da una bassa concentrazione di ferro.

I clostridi (sporigeni anaerobi) vivono abitualmente nel suolo e alcuni di loro possono provocare patologie legate alla produzione di esotossine (A/B). *Clostridium tetani* può penetrare nell'organismo umano attraverso ferite profonde. Se nella ferita manca l'ossigeno, i batteri possono crescere e produrre tossina; *C. botulinum* invece non si moltiplica in tessuti animali ma lo può fare in alimenti preparati in maniera impropria, dove elabora la tossina. Se l'alimento non viene cotto abbastanza da inattivare la tossina, la sua ingestione può provocare un episodio di botulismo. La tossina tetanica e la tossina botulinica, sono metallo-proteasi, che agiscono in modo specifico sul processo di trasmissione del segnale nervoso, e possono essere letali. La tossina tetanica entra nei neuroni inibitori dove degrada una proteina (sinaptobrevina) necessaria per il rilascio dei neurotrasmettitori. La contrazione muscolare diventa irreversibile e provoca una paralisi spastica; la tossina botulinica si lega invece alla placca motrice nervosa e blocca il rilascio di acetilcolina a livello delle sinapsi e delle giunzioni neuromuscolari, prevenendo la contrazione muscolare e causando una paralisi flaccida acuta.

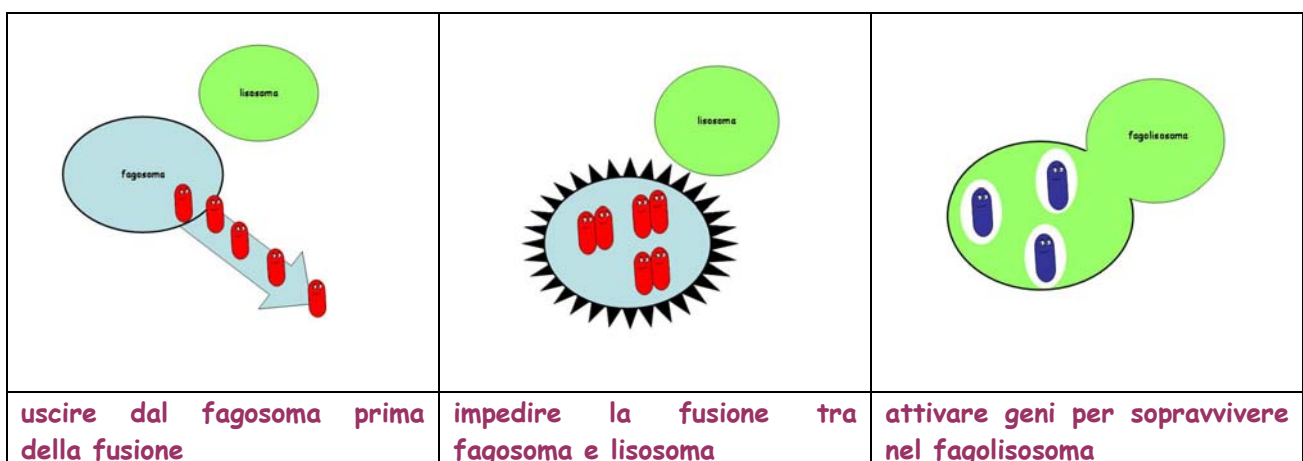
Le enterotossine sono esotossine secrete nell'intestino tenue da diversi microrganismi. Provocano diarrea causando la perdita di fluidi durante il transito intestinale (diarrea secretoria). In alcuni casi i geni che le codificano possono essere localizzati su plasmidi. Il "modello" delle enterotossine è l'enterotossina colerica (A-5B), composta da cinque subunità "B" che riconoscono il recettore sugli enterociti, e di una subunità "A1" che viene iniettata dalle subunità B nella cellula, dove produce i suoi effetti tossici attivando l'enzima adenil-ciclasi, che sintetizza AMP ciclico (cAMP). L'accumulo di cAMP dirige la cellula verso la secrezione di ioni, seguita dalla secrezione di acqua.

PATOGENI INVASIVI

Il termine "invasività" indica la capacità di un microrganismo a diffondere nei tessuti o nelle cellule dell'ospite. Se viene usato in riferimento ai tessuti, o all'intero organismo, indica un patogeno che si replica attivamente e rapidamente e provoca malattia grazie a questa caratteristica. In questo caso si definiscono invasive quelle proteine, dotate di attività

enzimatica, che agiscono all'esterno della cellula batterica, superando le difese locali dell'ospite e facilitando la diffusione del patogeno. Esistono molti tipi di enzimi correlati a questo tipo di invasività: alcuni sono in grado di dissolvere tessuti consistenti come il connettivo (es. ialuronidasi e collagenasi) altri causano la lisi delle cellule dell'ospite aprendo fori nelle membrane (lecitinasi o fosfolipasi); molti microrganismi che provocano la formazione di pus secernono enzimi che degradano il DNA (altamente viscoso). Il termine "invasività", con riferimento alle cellule dell'ospite, invece, definisce un particolare sottoinsieme dei patogeni invasivi: quello dei patogeni intracellulari.

I patogeni invasivi intracellulari possono entrare all'interno delle cellule e moltiplicarvisi al riparo dei sistemi di difesa e in presenza di nutrienti abbondanti e disponibili. Esistono patogeni intracellulari obbligati (incapaci di replicarsi fuori dalle cellule dell'ospite) o facoltativi (che entrano nella cellula solo quando ciò rappresenti un vantaggio). In molti casi il patogeno produce fattori di virulenza che interagiscono con la membrana della cellula ospite inducendola a invaginarsi e a portare i microrganismi al suo interno nel vacuolo endocitico;. Alcune specie (*Listeria*, *Shigella*, *Rickettsia*) possono intervenire poi sui filamenti di actina dell'ospite e farsene "spingere" da una cellula all'altra. Una volta penetrati nella cellula ospite, i batteri possono restare all'interno di un vacuolo, oppure possono essere liberati nel citoplasma dalla lisi della membrana del vacuolo. Anche le proteine che permettono ai patogeni intracellulari di penetrare nelle cellule e di passare da una cellula all'altra, vengono chiamate invasine, anche se hanno un senso diverso da quelle descritte in precedenza.



I patogeni intracellulari che sopravvivono nei leucociti sono dotati di sistemi che bloccano l'azione battericida di queste cellule e che possono consistere nell'uscire rapidamente dal fagosoma (con l'azione delle fosfolipasi) nell'evitare la fusione tra fagosoma (in cui si trovano i

batteri) e lisosoma (in cui si trovano gli enzimi battericidi); in alternativa alcuni microrganismi (*es. Salmonella, Mycobacterium*) sono in grado di attivare molto rapidamente set di geni che permettono loro di sopravvivere nelle condizioni di ambiente estreme che si instaurano nel fagolisosoma. In un caso particolare (*Coxiella burnetii*) il patogeno si è adattato all'ambiente acido del fagolisosoma, tanto da averne bisogno.

CONTROLLO DEI MICRORGANISMI

Per quanto alcune pratiche empiriche, basate sull'osservazione, fossero in uso già nell'antichità, l'uso ragionato di composti idonei a contrastare la crescita microbica è iniziato molto dopo la scoperta dell'esistenza dei microrganismi. La responsabilità dei microbi come causa di malattia provocata da contaminazione fu intuata (1841) da Ignaz Semmelweis, che intraprese la strada della pulizia accurata, ottenendo buoni risultati nella prevenzione del contagio, ma scarso seguito.

Ignaz Semmelweis	intuisce la responsabilità di "agenti invisibili" nella trasmissione della febbre puerperale, e del ruolo della pulizia nella prevenzione	1841
Louis Pasteur	dimostra in modo scientifico l'infondatezza della teoria della generazione spontanea	1859
Joseph Lister	introduce la disinfezione	1865
Robert Koch	dimostra l'eziologia batterica di malattie infettive, formula i postulati	1882-1890
Paul Ehrlich	formula la teoria della tossicità selettiva (pallottola magica)	1900
Gerhard Domagk	scopre i sulfamidici	1930
Alexander Fleming	scopre la penicillina	1929
Howard Florey	inizia la ricerca applicativa e farmaceutica sugli antibiotici, che porterà all'introduzione della penicillina G in terapia, verso la fine della II guerra mondiale	1939-1941

Sulla base delle teorie di Semmelweis e degli esperimenti con cui Pasteur, nel 1859, provò definitivamente l'infondatezza della teoria della generazione spontanea, indicando nell'aria il veicolo dei germi, il chirurgo inglese Joseph Lister ebbe l'idea di impedire il passaggio dei germi dall'aria alle ferite, usando soluzioni diluite di acido fenico.

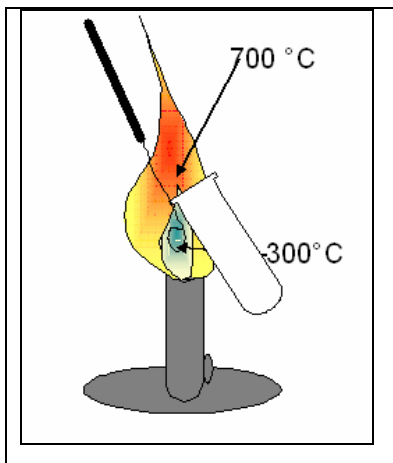
Nasceva così la pratica della disinfezione (1865) che avrebbe salvato un incredibile numero di vite, e da cui sarebbe poi originata quella della sterilizzazione.

Nei primi tempi si pensava che lo scopo delle pratiche di disinfezione e sterilizzazione dovesse essere quello di impedire la contaminazione di ferite aperte con microrganismi veicolati dall'aria esterna; i microrganismi erano considerati come causa accidentale di infezione: la dimostrazione scientifica della correlazione tra microbi e malattie infettive venne solo più tardi, con gli studi di Koch e aprì la strada della ricerca di composti che potessero curare le malattie infettive.

Nei primi anni del 1900 Paul Ehrlich suggerì che i composti da cercare dovessero essere dotati di tossicità selettiva (una "pallottola magica"), ma solo nel 1930 Gerhard Domagk scoprì i sulfamidici, creando i presupposti per l'era della chemioterapia antimicrobica. La scoperta della penicillina (Alexander Fleming, 1929) aprì la strada per le ricerche estese sugli antibiotici, iniziate con gli studi (1939-1941) di Howard Florey e dei suoi collaboratori che si occuparono della purificazione e produzione su vasta scala della penicillina, riuscendo a renderla disponibile verso la fine della seconda guerra mondiale.

DISINFEZIONE: La disinfezione è il procedimento con cui vengono eliminati i microrganismi patogeni nell'ambiente. La disinfezione si ottiene con composti chimici che uccidono i microrganismi, e che possono essere usati solo esternamente sull'uomo, perché tossici. I meccanismi principali sono la denaturazione delle proteine (ioni di metalli pesanti), l'ossidazione dei gruppi sulfidrilici (acqua ossigenata) la solubilizzazione delle membrane (disinfettanti tensioattivi).

STERILIZZAZIONE: la sterilizzazione è il processo con cui vengono distrutte tutte i batteri (cellule vegetative o spore) e i virus presenti nell'oggetto che si intende sterilizzare. La sterilizzazione si ottiene con mezzi fisici come la filtrazione (con filtri che escludono particelle superiori a $0,2\mu\text{m}$) non adatta a eliminare i virus; o con radiazioni UV o ionizzanti, ma soprattutto attraverso l'uso del calore, che può essere usato direttamente (fiamma diretta-becco Bunsen) per sterilizzare l'ansa con cui si prelevano i batteri e l'imboccatura di provette e beute, o indirettamente, attraverso l'uso di dispositivi in cui il calore è ceduto all'oggetto da sterilizzare dall'aria (calore secco) o dal vapore acqueo (calore umido).



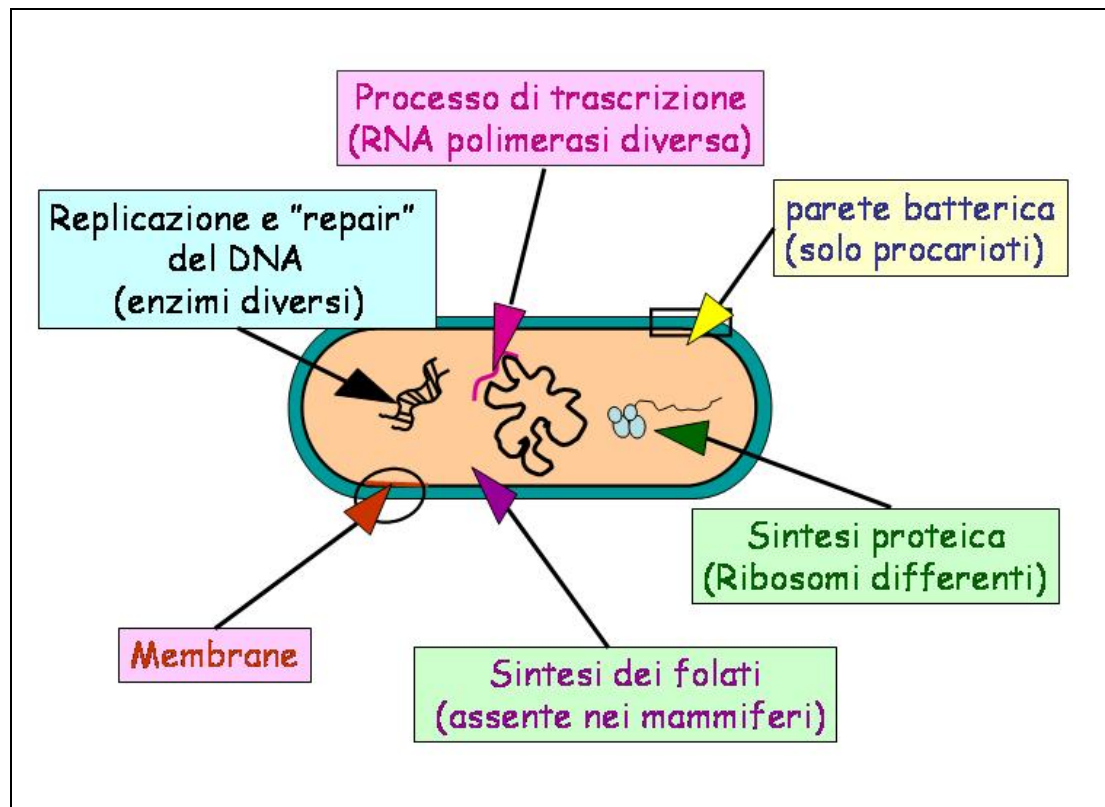
CALORE SECCO: il calore secco viene usato per sterilizzare la vetreria nelle stufe (Forni Pasteur) a 160°C per 2-3 ore circa. Il tempo prolungato e la temperatura elevata sono resi necessari dalla relativa inefficienza dell'aria (in confronto al vapore acqueo) nel trasmettere il calore. Il calore secco tuttavia ha i suoi vantaggi: non corrode gli oggetti metallici, può essere usato per sterilizzare le polveri, non lascia umidità nella vetreria.

CALORE UMIDO: è molto più efficace e si usa per sterilizzare i terreni di coltura. L'esposizione alla temperatura di ebollizione

dell'acqua, prolungata per circa 10 minuti, uccide qualunque cellula vegetativa, ma non distrugge le endospore. Per eliminare anche queste è necessario arrivare a temperature superiori, il che si può ottenere alzando la pressione, in apparecchi che si chiamano autoclavi. Nell'autoclave si produce vapore acqueo che viene fatto accumulare nella camera interna, finché non abbia completamente sostituito l'aria presente. L'autoclave viene chiusa ermeticamente e la pressione inizia a salire. Una pressione di 1 atmosfera in più della normale pressione atmosferica corrisponde a una temperatura di 121°C che, mantenuta per circa 15 minuti, uccide anche le endospore. Il corretto funzionamento di un'autoclave viene periodicamente controllato sottoponendo alla procedura di sterilizzazione una provetta contenente spore di *Bacillus steroترمophilus* e verificando che non siano più in grado di germinare. Un procedimento particolare, che si applica quando il terreno da sterilizzare non possa sopportare temperature superiori a 80-100°C, è la "tyndalizzazione", un processo che consiste nel sottoporre il materiale a temperature tra 80 e 100°C, per trenta minuti, ripetendo il trattamento per tre giorni consecutivi. Il trattamento al calore induce le endospore a germinare: le spore si trasformano quindi in cellule vegetative, che verranno distrutte dalla seconda applicazione di calore. Il terzo trattamento garantisce il raggiungimento della sterilità.

ANTIBIOTICI

Gli antibiotici sono sostanze chimiche ricavate da organismi viventi (batteri o funghi) che interferiscono con la vita dei microrganismi. Un antibiotico può essere batteriostatico (ferma la moltiplicazione batterica, permettendo alle difese dell'ospite di reagire, ma non uccide le cellule) o battericida (uccide i microrganismi).



Diverse strutture o vie metaboliche sono caratteristici dei procarioti, e rappresentano quindi buoni bersagli per gli antibiotici: la parete batterica è una struttura tipicamente procariotica; le RNA polimerasi e le topoisomerasi batteriche hanno una struttura diversa da quelle eucariotiche; i ribosomi sono abbastanza diversi da costituire un bersaglio specifico; i mammiferi, a differenza dei procarioti, non hanno vie biosintetiche per i folati.

ANTIBIOTICI DIRETTI CONTRO LE STRUTTURE ESTERNE:

Gli involucri esterni sono critici nei batteri. La membrana esterna, tipica dei batteri Gram-negativi, delimita la cellula batterica impedendo l'accesso a molti composti; la membrana interna è il luogo in cui si svolgono i processi della respirazione, il trasporto di protoni, il

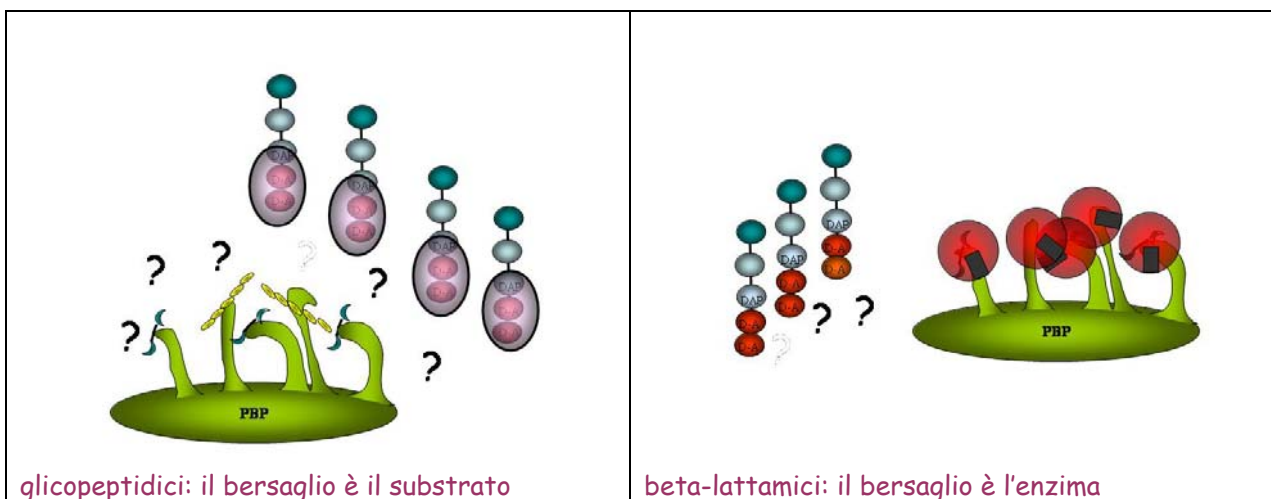


trasporto dei nutrienti. Gli antibiotici che colpiscono le strutture esterne sono le polimixine e le diverse classi di antibiotici che interferiscono con la sintesi della parete (beta-lattamici e glicopeptidici quelli maggiormente usati). La membrana citoplasmatica batterica ha una composizione simile a quella delle membrane degli eucarioti, gli antibiotici che la danneggiano, quindi, hanno una certa tossicità anche

per le cellule dell'ospite.

Le **polimixine** interferiscono con le strutture esterne in modi diversi a seconda della dose: a basse dosi disorganizzano la membrana esterna dei batteri Gram negativi, rendendoli indifesi nei confronti di altri antibiotici o delle difese dell'ospite. A dosi elevate, invece, le polimixine provocano il collasso della membrana interna, distruggendone le funzioni fisiologiche di produzione di energia e trasporto di nutrienti e provocando la morte della cellula batterica. La caratteristica peculiare delle polimixine è quella di interferire con una struttura, piuttosto che con una via biosintetica e di essere quindi attive anche nei confronti di cellule batteriche non necessariamente attive dal punto di vista metabolico.

Gli antibiotici che interferiscono con la sintesi del peptidoglicano sono molti e agiscono in tappe diverse della via biosintetica; le due classi più note e vaste sono: quella degli antibiotici **beta-lattamici** (caratterizzati da un anello β -lattamico: penicilline e cefalosporine), e quella degli antibiotici **glicopeptidici** (vancomicina e teicoplanina).



Gli antibiotici beta-lattamici agiscono come pseudosubstrato per le PBP (enzimi che intervengono nella sintesi della parete) a cui si legano in maniera covalente, acilandone il sito attivo. Una volta legate alla molecola antibiotica, le PBP si deacilano con estrema lentezza e risultano inattivate; la reazione di transpeptidazione non può avvenire e il peptidoglicano risulta debole e inadatto ad impedire la lisi osmotica della cellula batterica. Il bersaglio colpito dagli antibiotici beta-lattamici quindi, è l'enzima che svolge la reazione di transpeptidazione. Gli antibiotici **glicopeptidici** bloccano la medesima reazione ma con un altro meccanismo: si legano al dipeptide D-alanil-D-alanina che è il substrato fisiologico per le PBP; impediscono così che le PBP riconoscano il proprio substrato e la reazione non può avvenire per quanto gli enzimi mantengano la propria funzionalità. Anche se antibiotici beta-lattamici e

antibiotici glicopeptidici impediscono la medesima reazione enzimatica, il fatto che interagiscano con bersagli diversi (l'enzima e il substrato) ne permette l'uso combinato, che risulta sinergico.

ANTIBIOTICI CHE BLOCCANO LA SINTESI DI ACIDI NUCLEICI



sintesi di DNA: I **chinoloni** sono farmaci di sintesi che bloccano la sintesi del cromosoma batterico, legandosi agli enzimi responsabili della separazione dei cromosomi neoformati (topoisomerasi IV) e della superspiralizzazione topoisomerasi-II (DNA-girasi).

sintesi di RNA : le **Rifamicine** (rifamicina e rifampicina) si legano alla subunità beta delle RNA-polimerasi batteriche e impediscono in

questo modo che avvenga la trascrizione genica.

ANTIBIOTICI CHE BLOCCANO LA SINTESI DEI FOLATI:

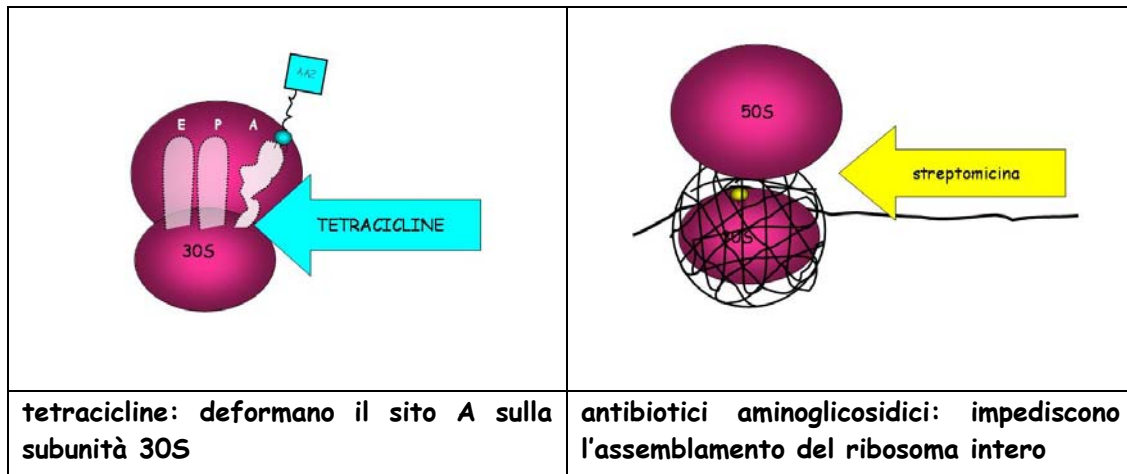
l'acido folico è un composto essenziale per la sintesi di aminoacidi (glicina e metionina) e di basi azotate (purine e timidina). A differenza degli eucarioti, che devono assumere l'acido folico con la dieta, i batteri sono in grado di sintetizzarlo, a partire all'acido para-amino-benzoico (PABA). Le vie metaboliche che portano alla sintesi dei folati sono quindi un bersaglio ottimale. Gli antibiotici che interferiscono con la sintesi dei folati sono i **sulfamidici** e il **trimetoprim**. Il meccanismo d'azione si basa sulla somiglianza, rispettivamente, dei sulfamidici con il PABA (e in questo caso la sintesi bloccata è quella dell'acido folico) e del trimethoprim con l'acido folico (e si bloccano quindi le sintesi successive, dei componenti di acidi nucleici e di proteine).

ANTIBIOTICI CHE BLOCCANO LA SINTESI PROTEICA:

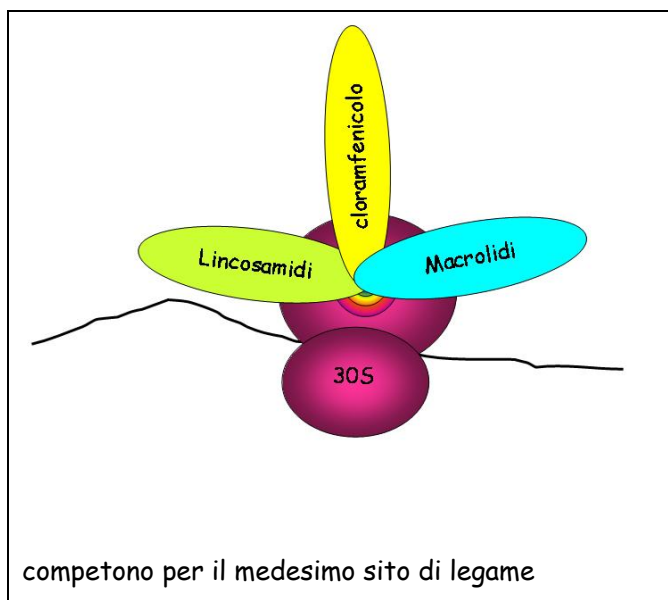
I ribosomi batterici sono formati da una subunità 50s (34 proteine e due molecole di RNA, 23s e 5s) e una subunità 30S (21 proteine e una molecola di RNA 16s). L'RNA 16S della subunità 30S si lega al sito di legame (Ribosome Binding Site) presente sul mRNA e lega il primo tRNA (formil-metionil-tRNA); la subunità 50S si associa a questo complesso di inizio, il ribosoma assemblato (70S) scorre sul mRNA, "leggendolo" e la traduzione comincia. Nel ribosoma assemblato, soprattutto sulla subunità 50S, tre siti sono coinvolti nella sintesi del peptide: il sito "A", il sito "P" e il sito "E". Il sito "A" accoglie i nuovi aa-tRNA che sono

aggiunti al peptide nascente dalla peptidil-transferasi che forma i legami peptidici. Il peptide nascente si sposta nel sito "P" mentre il ribosoma si sposta (si trasloca) sul codone seguente. Il sito "E" ospita i tRNA vuoti prima che lascino il ribosoma. Le diverse tappe della sintesi proteica sono bersaglio di varie classi di antibiotici:

Le **tetracicline** si legano alla subunità 30s; deformano il sito "A" e impediscono il corretto alloggiamento degli aa-tRNA.



Anche gli antibiotici **aminoglicosidici** (es. streptomicina) si legano alla subunità 30s, bloccando



il complesso di inizio e impediscono che avvenga il legame con la subunità 50s (e quindi l'assemblaggio del ribosoma completo e la lettura del messaggero). Gli antibiotici aminoglicosidici possono interferire con il processo anche quando la sintesi e' gia' iniziata. Possono infatti rendere "permissivo" il sito "A", che quindi può accogliere anche AA-tRNA che non corrispondono ai codoni che si trovano sul messaggero. Questo effetto provoca la

sintesi di proteine in cui si accumulano mutazioni che possono renderle non funzionali.

CLORAMFENICOLO, MACROLIDI, LINCOSAMIDI

si legano alla subunità 50S, e condividono il medesimo sito di legame (non possono quindi essere usati in associazione). Il **Cloramfenicolo** interferisce con l'azione della peptidil-

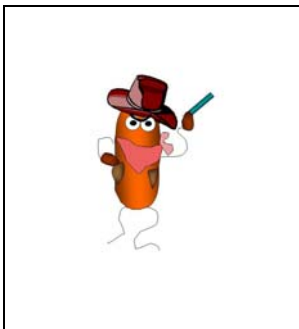
transferasi e blocca l'allungamento della catena del peptide nascente; Macrolidi(es. eritromicina) e Lincosamidi (es. clindamicina) che hanno il medesimo meccanismo d'azione anche se la loro struttura è molto diversa, condividono il meccanismo del cloramfenicolo e possono anche bloccare lo scorrimento del ribosoma sul mRNA.

I BATTERI E L'ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Quello dell'antibiotico resistenza è un problema molto sentito al giorno d'oggi: la vita media di un farmaco, dopo l'introduzione in commercio tende ad abbassarsi sempre di più. La causa della comparsa di resistenze è legata sia all'uso eccessivo di antibiotici nella pratica medica, sia all'uso non medico che ne è stato fatto per lungo tempo nel settore dell'allevamento (come stimolatori di crescita) e che, in alcuni paesi è ancora diffuso. Diversi studi hanno dimostrato che all'allontanamento dell'antibiotico non corrisponde immediatamente una diminuzione dei ceppi resistenti nell'intestino e che la trasmissione delle resistenze tramite elementi mobili è pericolo reale quanto attuale.

I meccanismi dell'antibiotico-resistenza batterica sono principalmente tre:

INATTIVAZIONE ENZIMATICA DELL'ANTIBIOTICO



Un caso classico è quello dell'inattivazione idrolitica dell'anello beta-lattamico nelle penicilline e nelle cefalosporine, effettuata attraverso la produzione di beta-lattamasi da parte dei batteri resistenti. La struttura che interferisce con le PBP, bloccandole in modo praticamente irreversibile, è l'anello beta-lattamico; l'anello idrolizzato, aperto, di acido penicilloico, risulta inefficace come

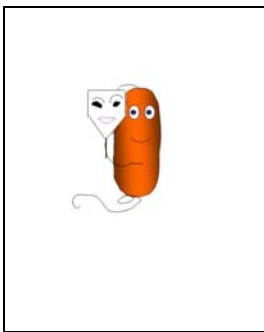
pseudosubstrato per le PBP e inutile come antibiotico. I batteri che producono beta-lattamasi le secernono nel periplasma e distruggono la molecola dell'antibiotico prima che possa raggiungere il suo bersaglio (PBP) nella membrana citoplasmica. Alcuni tipi di beta-lattamasi derivano da PBP modificate, che hanno "imparato" a liberarsi dall'antibiotico, acquisendo un'attività enzimatica e scindendolo.

Un'altra classe di antibiotici, gli aminoglicosidi, non ha gruppi così facilmente attaccabili per idrolisi. Questi inibitori della sintesi proteica sono spesso eliminati dai microrganismi attraverso l'azione di enzimi inattivanti ma, in questo caso, la molecola dell'antibiotico viene "decorata" dal microrganismo con tre diversi tipi di sostituenti chimici, ognuno dei quali impedisce all'aminoglicoside di legarsi all'RNA bersaglio nel ribosoma. Gli enzimi inattivanti

possono essere adenil-transferasi (aggiungono AMP), fosforil transferasi (aggiungono un gruppo PO_3^-) o, infine, acetil-transferasi (acetilano l'aminogruppo dell'antibiotico). La maggior parte degli enzimi che degradano gli antibiotici è inducibile: per essere inattivato, quindi, un antibiotico deve essere non solo un buon substrato per l'enzima, ma anche un buon induttore per il gene che lo codifica.

Per esempio, i batteri che possiedono la beta-lattamasi cromosomica AmpC (inducibile) sono resistenti all'ampicillina, che induce il gene e viene degradata dall'enzima, ma non alla carbenicillina (che sarebbe degradata dall'enzima ma non induce il gene) o dai carbapenemi (che inducono il gene ma non sono degradati dall'enzima).

MODIFICAZIONI DEL BERSAGLIO

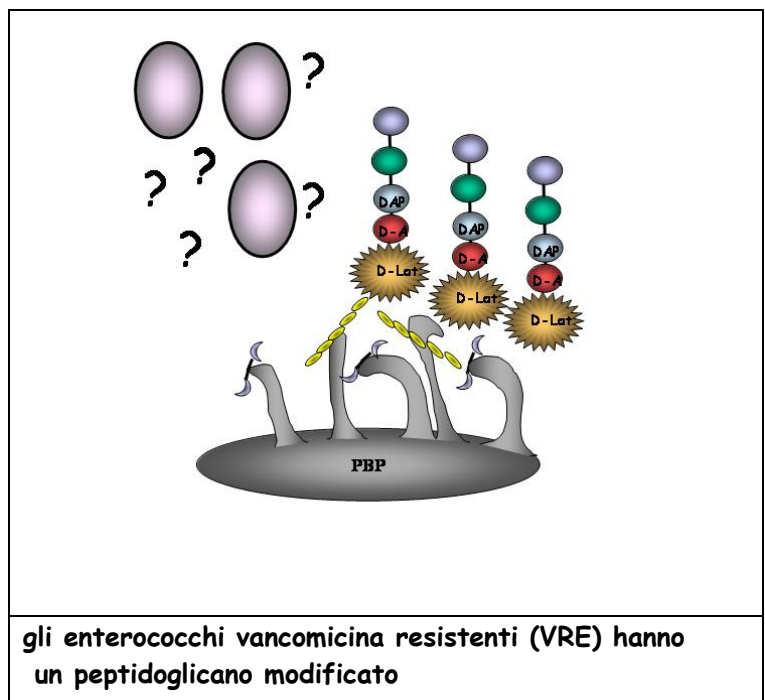


Una seconda strategia si focalizza non sulla rimozione o sulla distruzione dell'antibiotico, ma sulla riprogrammazione o sul camuffamento della struttura bersaglio. Alcuni microrganismi sono diventati resistenti ad alte dosi di macrolidi, metilando uno specifico residuo di adenina nel componente 23S del ribosoma. La modificazione è effettuata da una metiltransferasi (Erm) e non ostacola la sintesi proteica, ma abbassa

l'affinità di tutti i macrolidi per l'RNA.

Un altro esempio di strategia di riprogrammazione è quello adottato dai ceppi di enterococco resistenti alla vancomicina (glicopeptide).

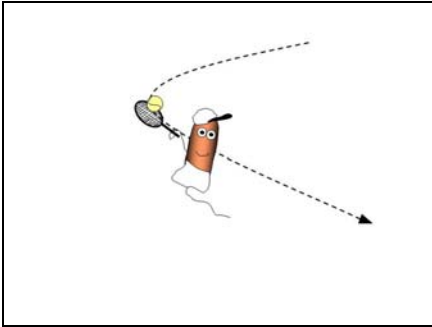
Questi ceppi sintetizzano D-lattato, che assemblano con la D-alanina, nel peptidoglicano. Il bersaglio degli antibiotici glicopeptidici (D-alanil-D-alanina) è quindi modificato e garantisce la sintesi del peptidoglicano rendendo il ceppo resistente a dosi di vancomicina 100



volte maggiori. Un ultimo esempio è rappresentato dalla mutazione delle PBP verso forme con affinità più bassa per la penicillina (stafilococchi meticillino-resistenti).

POMPARE FUORI L'ANTIBIOTICO:

Perché un antibiotico sia efficace, deve necessariamente raggiungere il proprio bersaglio

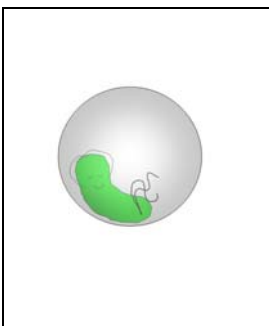


a una concentrazione sufficiente per poter agire in un tempo ragionevolmente breve. Per esempio, dal momento che l'apparato per la sintesi delle proteine è situato nel citoplasma, gli antibiotici che lo colpiscono devono poter passare attraverso le membrane batteriche e accumularsi all'interno della cellula a concentrazioni sufficientemente alte

da bloccare la particolare suscettibilità del passo della sintesi proteica che viene inibito. Una delle possibili strategie di resistenza è quindi per l'appunto quella di impedire all'antibiotico di concentrarsi all'interno della cellula a sufficienza da agire. La maggior parte dei microrganismi resistenti alla tetraciclina per esempio, iperproducono alcune proteine di membrana che agiscono come pompa di efflusso per l'antibiotico, eliminandolo dalla cellula più velocemente di quanto esso entri: la concentrazione intracellulare dell'antibiotico risulta quindi troppo bassa ed inefficace per bloccare la sintesi proteica, che procede in larga parte indisturbata. Queste pompe di efflusso sono varianti delle pompe di membrana comuni a tutti i microrganismi, che servono normalmente per muovere, attraverso le membrane, molecole anfipatiche o lipofile. Alcuni di questi sistemi sono specializzati, ma altri espellono molti antibiotici e anche altri composti, come disinfettanti o intercalanti (coloranti che danneggiano il DNA legandosi tra le basi).

IMPEDITO ACCESSO AL BERSAGLIO:

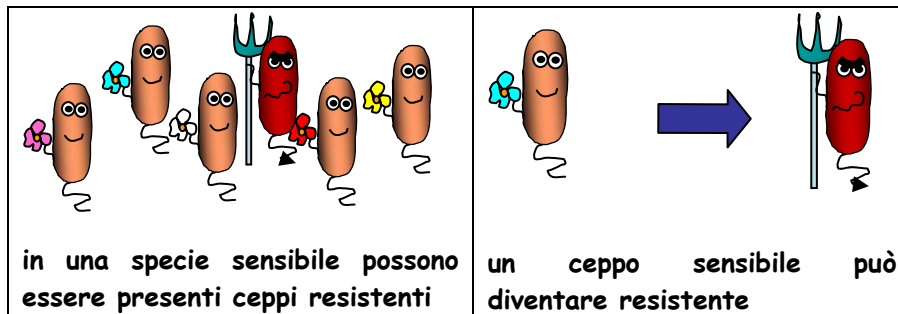
un'ultima strategia è quella di impedire all'antibiotico di raggiungere il proprio bersaglio.



Questo scopo viene spesso raggiunto grazie alla impermeabilità della membrana esterna. In qualche caso la perdita di una porina deputata all'ingresso di un antibiotico (come accade spesso nei mutanti di permeabilità di *P. aeruginosa*, resistenti ai carbapenemi) può rendere un ceppo resistente. Un altro modo di rendersi globalmente inaccessibili senza modificare il proprio spettro di sensibilità agli antibiotici è quello di

crescere in biofilm; in questo caso la resistenza è legata alla permanenza nel biofilm e cessa quando la crescita torna planctonica. Grazie a uno o più dei meccanismi appena descritti, una specie batterica può essere "naturalmente resistente" nei confronti di un antibiotico (se tutti

i ceppi della specie sono resistenti); o sensibile (se tutti o gran parte dei ceppi della specie sono sensibili).



In una specie sensibile possono essere presenti anche ceppi resistenti, che vengono selezionati dalla presenza dell'antibiotico.

La pressione selettiva che

porta alcuni ceppi microbici a produrre antibiotici e altri ceppi a intraprendere strategie di resistenza, è comune e costante nell'ambiente. Specie a lenta crescita (es. actinomiceti) possono garantirsi spazio vitale grazie alla produzione di antimicrobici. Che questo meccanismo sia diffuso è dimostrato da alcune interessanti e recenti osservazioni: alcune specie batteriche producono sostanze antimicrobiche solo quando i loro sensori biochimici le avvertono dell'affollamento dell'habitat (troppi individui, poco cibo) altre specie ancora si sono specializzate con maggior raffinatezza e ricorrono alla guerra chimica solo quando avvertono che l'affollamento è causato da una specie diversa da quella a cui essi stessi appartengono.

Le molecole antimicrobiche (batteriocine o antibiotici) diffondono nell'ambiente circostante e la loro concentrazione diminuisce progressivamente, permettendo a cellule sensibili, che si trovino in presenza di dosi molto basse di antibiotico, di sviluppare meccanismi di resistenza. Ceppi sensibili possono diventare resistenti in seguito a mutazioni o all'acquisizione di elementi genici per trasmissione orizzontale.