

I lezione Prof. Romano.

La medicina di laboratorio e ,nel caso specifico la microbiologia clinica, è un insegnamenti che serve a confermare un sospetto di diagnosi clinica. Vicino all'ammalato è fondamentale per il medico avere un sospetto diagnostico. Il laboratorio sia esso di biochimica sia esso di microbiologia , fa da supporto alla pratica clinica perché serve a confermare quello che è il sospetto diagnostico.

Un es. banale: mi trovo di fronte ad un ammalato che mi dà determinati imput cosicché io medico posso sospettare un tifo addominale. Sapete che il tifo è supportato da un agente eziologico che è la Salmonella Tlphy .Per poter dire che si tratti di tifo bisogna partire da indagini meno invasive per quanto riguarda l'ammalato e meno costose per quanto riguarda il rapporto economico facendo una scelta e prendendo in considerazione quelli che sono i costi

La microbiologia clinica serve per mettere in evidenza le infezioni cercando di focalizzare l'agente eziologico che determina la patologia .Ricordiamoci che la patologia delle infezioni non è una dizione che vale per tutte le stagioni perché quelli che noi una volta chiamavamo “ non patogeni” e che venivano considerati opportunisti , oggi possono determinare patologia . Quindi è da rivedere il concetto di “patogeni “.Per es. prendendo il soggetto immunocompromesso (non dobbiamo pensare solo al malato di HIV ma a tutte le malattie che possono inibire il sist. Immunitario come il cancro durante il periodo della chemioterapia) è chiaro che ci troviamo di fronte ad un soggetto esposto a qualsiasi tipo di infezione e qualsiasi tipo di aggressione sia da germi classici patogeni sia da germi opportunisti che normalmente non determinano infezione.

## LA CELLULA BATTERICA (RICHIAMI)

E' una cellula procariotica che si presenta con determinate strutture che interagiscono con l'ospite determinando quella che è una reazione nell'ospite stesso. Dobbiamo ricordare com'è fatta yba cellula batterica :

- massa citoplasmatica dove sono immerse le strutture lisosomiali e il DNA
- membrana citoplasmatica che racchiude il citosol con il DNA

La cosa che differenzia la cellula procariotica da quella eucariota è l'assenza del nucleo separato dalla massa citoplasmatica.

Poi abbiamo le strutture caratteristiche :

- la parete cellulare ,involucro che avvolge la cellula batterica (il cosiddetti cell wall degli anglosassoni)
- strutture di aggressione che possiamo trovare in alcuni batteri come ad es. la capsula e le strutture appendicolari che sono strutture che fuoriescono dalla cellula come i flagelli o ciglia
- strutture minori dal punto di vista dimensionale come le fimbrie o pili che assolvono ad una funzione di adesione .

C'è qualche fimbria che serve per il passaggio del materiale nucleare da una cellula batterica all'altra

Ognuna di queste strutture ha un'interazione con l'ospite ed è un'interazione aggressiva; l'ospite dal canto suo reagisce all'agente esterno in modo da conservare la sua individualità.

La cellula estranea deve superare le difese dell'ospite cercando di bypassarle in modo da crearsi un ambiente permanente nell'ospite ...Come fa? Con la capsula batterica in modo da vincere il processo di fagocitosi oppure cercando di usare le fimbrie ,strutture di aderenza del microrganismo. Voi sapete che perché si crei il meccanismo di aggressione , è necessaria la permanenza del microrganismo nell'ospite . Perché? Perché il microrganismo può essere eliminato con i movimenti passivi; pensiamo ad es. ad un microrganismo dell'apparato respiratorio, esso può essere eliminato con l'espettorato ; oppure ad un microrganismo dell'apparato urinario , lo eliminiamo con le urine . Quindi ci sono dei meccanismi che l'ospite presenta per eliminare strutture esterne : ecco perché c'è un'interazione attiva.

Pensate ad una fimbria F .Essa serve per il passaggio di materiale nucleare e per il passaggio di plasmidi della resistenza dei batteri.

Sapete che i batteri si sono costruiti con il tempo dei meccanismi di resistenza nei confronti delle sostanze di attacco : pensiamo ad es. all'antibiotico resistenza per il quale un microrganismo diventa resistente nei confronti a quel determinato antibiotico .Questa diventa un carattere genetico del microrganismo anche se non è legato all'interno della

circularizzazione del DNA . E' un dato acquisito che riesce a trasmettere alle generazione successiva mediante la trasmissione di materiale genetico e questo materiale riesce a passare attraverso strutture particolare quali le fimbrie e attraverso questo ,passa il processo di resistenza.In effetti è il plasmide.. (??)

I batteri sono una vecchia conoscenza dell ' uomo solo che non si vedevano.Un mercante creò poi un sistema di lenti che erano in grado di vedere strutture fino a quel momento invisibili osservando del materiale biologico(van Leeuwenhoek). In questo materiale c'erano strutture che si muovevano e osservò che che non erano tutti della stessa forma . Così' nel 1665 parte lo studio della microbiologia .

Una delle interazioni fondamentali è quella che si viene a creare tra la struttura del microorganismo e l'ospite stesso . Perché parliamo di questo? Perché ricordatevi che quando mi torvo di fronte ad un soggetto ammalato con infezione batterica, io posso fare una ricerca per trovare il microorganismo o posso ricercare l'interazione tra microorganismo e ospite.

Andiamo a dividere i batteri in Gram negativi e Gram positivi e ci rendiamo conto che la presentazione clinica è diversa.

La parete cellulare è molto piu' complessa nei Gram negativi che nei positivi: i Gram negativi infatti possiedono l'LPS che determina endotossiemia e shock endotossico .Esempi di Gram positivi invece sono gli streptococchi , gli stafilococchi e i corinebatteri. Il fatto che ci troviamo di fronte a Gram positivi non significa che ci troviamo di fronte a batteri meno aggressivi , significa che il microorganismo attacca l'ospite in maniera diversa , ma sono ugualmente aggressivi e possono portare a morte il paziente.Essi possono portare endocardite e malattia reumatica. Perché si chiamano Gram positivi? Perché alla colorazione li possiamo trovare colorati in rosso o in violetto e questo significa che hanno una parete semplice quindi si tratta di un Gram positivo.

I Gram negativi sono le Neisserie e le Enterobacteriaceae .La Neisseria meningitidis è un un Gram negativo. Perché?Perchè presenta una parete cellulare con una composizione specifica ; quando aggiungo il colorante si formano composti di passaggio : se viene trattenuto il cristal violetto io vedo il microorganismo in cristal violetto , se viene trattenuto solo il rosso è un Gram negativo

Allora noi studiamo i batteri perché questi aggrediscono l'ospite. Ricordiamo per prima cosa che le superfici cutanee e mucose sono colonizzate da numerosi ceppi batterici. Ovviamente ciascun microorg. Si va a localizzare in quella zona che più gli è propria. Per es. se parlo di enterobatteri, parlo del distretto gastroenterico, se parlo di cocchi, parlo delle strutture mucose. Il corynebacterium ad es. si va a localizzare a livello di gola e stomaco perché ha la capacità di interagire con quei recettori. Quindi i batteri hanno un loro tropismo per cui si vanno a localizzare nella zona che gli è più congeniale.

FIGURA. I batteri si vanno a localizzare in strutture diverse a livello del cuoio capelluto, dell'occhio, della bocca, dell'apparato genitourinario. A seconda del distretto che andiamo ad analizzare, le cariche microbiche sono diverse: se siamo di fronte ad un distretto che comunica con l'esterno le cariche microbiche sono maggiori per es. nell'apparato genitourinario troviamo 10 alla sesta /settimana batteri; nell'apparato gastroenterico troviamo dieci alla nona colonie.

Se il distretto non comunica con l'esterno il numero di batteri è ridotto come accade all'apparato respiratorio profondo oppure nello stomaco dove ci sono condizioni ambientali che rendono difficile la permanenza dei batteri,

Perché è importante sapere che l'organismo si presenta colonizzato da batteri? Perché questa massa microbica si viene a trovare in equilibrio con l'ospite con un rapporto di mutua collaborazione. Basti pensare che alcune vitamine vengono elaborate grazie alla presenza di alcuni batteri.

La flora batterica endogena è importante soprattutto perché rende difficile la penetrazione di microrganismi patogeni dall'esterno.

Facciamo un esempio: se entro in quest'aula e trovo un banco occupato, non mi vado a sedere lì, mi devo sedere dove c'è spazio disponibile. Se sono virulenta non mi vado a sedere al secondo banco occupato, mi vado a sedere in un altro distretto. La stessa cosa fanno i batteri: se trovano l'ambiente occupato da microrganismi endogeni, vengono più facilmente eliminati perché non hanno la possibilità di andare a cercare il recettore sulla membrana in modo da interagire con l'ospite e elaborare le sostanze che servono per la distruzione dell'ospite. Quindi la flora batterica residente è importante perché determina l'equilibrio dell'ospite. Parliamo ad es. del *Mycobacterium Tuberculosis*: se questo riesce ad attecchire

all'epitelio bronchiale , mette in vita una serie di sostanze che distruggono l'epitelio dell'ospite stesso. Pensate a tutte le reazioni eso-endotossiche , pensiamo a tutte le strutture del bacillo, alla famosa parete cellulare ... per cui alla fine questo batterio forma il tubercolosa nell'apparato respiratorio.

Ricordare : la flora commensale impedisce a batteri esogeni di poter trovare il loro sito recettoriale, aggredire l'ospite e elaborare sostanze che esplicano funzione di danno. Questo è il motivo per cui si dice , parlando dei bambini i "Igiene si , ma non troppa"!Il bambino deve avere la sua flora microbica che deve entrare in simbiosi con l'ospite.

Certamente quando l'ospite viene ad essere invaso dall'esterno mette in atto tutta una serie di meccanismi di difesa . Vediamo quali sono:

- barriere epiteliali cutanee e mucose
- sistema chimico di reazione capace di distruggere l'aggressione che viene ricordata come risposta immunologia.
- Movimento passivo.

Parlando della rabbia, questa è trasmessa all'uomo dal morso del cane , ma non è solo il morso:

Il morso determina la lesione della barriera epiteliale . (se l'uomo presentà già una ferita o delle semplici lesioni di continuità non c'è bisogno nemmeno del morso , basta la saliva e il virus riesce a penetrare!)

L'ospite puo' eliminare l'aggressore coinvolgendo il sistema cellulare con una risposta SPECIFICA O ASPECIFICA

R.SPECIFICA: è diretta verso quel determinato microrganismo. È certamente meglio di quella aspecifica ma è piu' tardiva .

R:ASPECIFICA: è il primo momento di difesa ed è una risposta diretta verso qualsiasi tipo di microrganismo.

I sistemi aspecifici sono : → FAGOCITOSI

→ COMPLEMENTO

→PROTEINA SIERICA

→RISPOSTA UMORALE E CELLULARE

E' chiaro che quando c'è la compromissione delle barriere epiteliali cutanee e mucose come nel caso si ustioni, trumi, chirurgia,manovre

invasive , si determinano dei deficit e si determina patologia dell'ospite stesso.

Ricordatevi che quando state a contatto con l'ospite , dovete partire dalle manovre meno invasive a quelle piu' invasive . Questo non solo per un rapporto di costo che puo' aggravare l'azienda nella quale lavorate, ma anche per l'integrità dell'ospite cioè per cercare di apportare il minor danno possibile

Il danno possiamo anche procurarcelo da soli per es. alterando quelle sono le strutture del nostro organismo : l'epitelio ciliato respiratorio lo alteriamo con il fumo di sigaretta, cioè con il catrame che va a bloccare le ciglia vibratili e impediscono il movimento passivo per cui i batteri possono penetrare dall'esterno. Si crea così l'alternativa e il danno.

Pensiamo adesso ad un'alterazione che non possiamo controllare ad es. pensiamo ad un'alterazione della flora microbica endogena per chemioterapia, radioterapia, o in soggetti che abusano di alcool o con alterato metabolismo ad es diabetici . E' evidente che anche in tutti questi casi il meccanismo è compromesso per quello che riguarda la risposta dell'ospite a quel determinato patogeno.

Esiste poi la risposta attiva cioè la risposta immunologia. La prima risp. Immunologia è la fagocitosi.

Questa risposta a specifica che significa?

Significa che alcune cellule del sangue del sistema reticolo endoteliale , quando sentono la presenza di sostanze estranee , cercano di accorrere nel sito di infezione e cercando di circoscrivere e limitare la reazione.

La fagocitosi è dovuta ai neutrofili, cellule del sangue che si vedono benissimo al microscopio , cellule bianche del sangue che assumono un aspetto diverso, con nucleo trilobato . Mentre le cellule monocitarie del sangue hanno nucleo compatto , queste hanno nucleo trilobato e sono piu' grandi.

Questi neutrofili vanno a difendere il sito di aggressione . E' chiaro che se ci troviamo di fronte a un soggetto con neutropenia in cui il numero dei neutrofili è ridotto (per cause diverse) ci sarà una ridotta fagocitosi così come ci sarà una ridotta chemiotassi , che è la attivazione di movimento che i neutrofili presentano nei confronti di un microrganismo. ( Per poter esercitare la propria azione , i neutrofili si devono dirigere nel sito in cui è presente quel determinato patogeno in modo da poter aggredirlo).La

chemiotassi consente al neutrofilo di prendere la strada giusta per poter andare a riconoscere l'aggressione ed eliminarla.

Se la chemiotassi è ridotta, per motivi congeniti o acquisiti, ci troviamo di fronte ad una ridotta fagocitosi così come quando ci troviamo di fronte a ridotto inglobamento.

Il neutrofilo deve riconoscere e creare l'interazione tra se stesso e microorganismo e questa interazione è permessa grazie ad un meccanismo recettoriale che permette al microorganismo di "agganciarsi" ai neutrofili. Il neutrofilo poi lo deve portare all'interno in modo che si mettono in atto tutta una serie di meccanismi che servono alla distruzione del microorganismo stesso.

Ci sono situazioni in cui la capacità di inglobare il microorganismo è ridotta: Diabete, soggetto che assume farmaci. In tali casi, il microorganismo rimane all'esterno dei neutrofili e non subisce il processo di lisi come avviene normalmente.

**Un difetto di inglobamento significa ridotta fagocitosi e ridotta difesa a specifica nei confronti degli aggressori.**

E poi abbiamo ridotta .. (??) :significa che quando il microorganismo è stato inglobato nel neutrofilo, quest'ultimo deve attivare un sistema di enzimi lisosomiali che determinano la lisi del microorganismo in modo da ucciderlo e liberare prodotti di rifiuto.

E' evidente quindi che il meccanismo di fagocitosi è un rapporto attivo tra il microorganismo e i poteri di difesa dell'ospite., nel caso specifico i neutrofili

Un meccanismo diverso però può provocare soffocamento del metabolismo e morte cellulare ed è il caso in cui il microorganismo non viene ad essere bloccato perché presenta la capacità di moltiplicarsi intracellularmente. Il neutrofilo in tal caso, da potere di difesa che era, diventa potere che si associa al potenziale negativo del microorganismo perché il neutrofilo porta i batteri in circolo determinando un processo di disseminazione e quindi aggravando l'aggressione.

Questo non funziona solo per i neutrofili, ma anche per i monociti e macrofagi: anche questi sono circolanti e sono coinvolti nella risposta aspecifica.

Abbiamo quindi batteri intracellulari ed extracellulari, che significa?

**BATTERI EXTRACELL** : Stafilococchi e Streptococchi . Vivono benissimo al di fuori delle

### Strutture cellulari

**BATTERI INTRACELL** : Bacillo delle TBC , Clamidia , Brucella . Hanno bisogno di un ambiente protetto in modo da proteggersi dai meccanismi di difesa dell'ospite.

Quindi il microrganismo che si era localizzato nell'apparato respiratorio , ora ve lo trovate a livello dell' apparato cardiocircolatorio. Pensiamo alla Clamidia che è stata ritrovata nella placca aterosclerotica a livello delle coronarie

Un altro elemento che dobbiamo considerare nella nostra risposta è il complemento .

Se il complemento è attivo , aumenta il potere di difesa . Perché? Perché il complemento è un insieme di 11 proteine sieriche che una volta attivate danno come evento finale la lisi della struttura bersaglio.

Se il complemento si lega allo Stafilococco e alla Salmonella con meccanismi diversi , si ha come momento finale comunque la lisi dello Stafilococco e delle Salmonella.

Se il meccanismo del complemento è compromesso , il potere immunologico è compromesso. Pensate ad es. a tutti i bambini che presentano alterazioni a livello complementare.

Queste sono per lo più CONGENITE e comportano che il bambino diventa preda di aggressioni continue e permanenti .

Altre alterazioni possono essere a carico della risposta immunologia SPECIFICA cioè a carico di immunità umorale e cellulo mediata.

Nell'immunità umorale prendiamo in considerazione gli umori e tra questi quello più importante è il sangue . In questi umori sono presenti caratteristiche strutture che servono nei confronti dell'aggressione.

Pensiamo all'aggressione anticorpale ; è anche questa una risposta umorale perché gli anticorpi si trovano nel sangue. Una ridotta risposta umorale è evidente che provoca una riduzione dei poteri di difesa.

Allo stesso modo ci può essere alterazione della risposta cellulo mediata.

L'immunità cellulo mediata è una risposta immunologia protettiva che viene chiamata in causa per per i batteri intracellulari. Ad es. mentre per lo Stafilococco e per Streptococco è necessaria una risposta umorale, per il Mycobacterium Tuberculosis la risposta anticorpale non è protettiva.

**La risposta protettiva nei confronti dei batteri intracellulari è la risposta cellulare detta anche risposta delle cellule linfocitarie e in particolare dei Linfociti T.**

Il micobatterio invade prima i macrofagi . Questi devono elaborare tutt'una serie di sostanze che determinano la morte del microrganismo

Abbiamo detto che l'ospite cerca di difendersi dall'aggressione esterna perché possiede una flora intrinseca. Abbiamo poi imparato che è ricoperto dai batteri indigeni.

Se il microbiota è in equilibrio , non permette ai batteri esterni di penetrare . Se è alterata invece , penetrano i batteri esterni perché hanno la capacità di andare ad occupare i recettori disponibili.

E' chiaro che il disequilibrio della flora endogena , provoca infezione e quindi puo' portare ad un ascesso.

Il disequilibrio però non è ancora malattia, significa solo rapporto batterio / ospite.

L'ascesso lo possiamo trovare a

- livello cerebrale
- nelle fasce muscolari
- nel polmone.

Cosicché anche l'infezione la possiamo trovare a livello cardiologico, gastroenterico, urogenitale.

I batteri che penetrano , cosa determinano?

Ricordatevi innanzi tutto che non possiamo parlare di patogeni in senso assoluto perché anche i batteri commensali e opportunisti, in determinate condizioni, possono determinare danno.

E' chiaro che lo stafilococco Epidermidis presenta una virulenza minore rispetto allo stafilococco aureo perché tutti e due possono esprimere patogenicità solo che lo stafilococco aureo presenta fattori di virulenza

maggior rispetto *S. Epidermidis*. preferisco differenziare i due concetti: i batteri che portano fattori di virulenza esprimono patogenicità diverse e viceversa abbiamo patogenicità diverse a seconda dei fattori di virulenza che il micro organismo presenta.

Quali sono i meccanismi di virulenza dei batteri?

Le ADESINE: sono fattori di aderenza che il microorganismo utilizza per interagire con la cellula dell'ospite. Una volta che il microorganismo interagisce con la cellula ospite può ancorarsi e elaborare altri fattori di virulenza.

Quali sono i fattori di aderenza. Le FINBRIE: strutture chimiche che hanno la funzione di esprimere ganci. Nei batteri Gram positivi ad esempio nello streptococco beta emolitico non abbiamo le Fibre classiche ma strutture chimiche che hanno la stessa funzione come l'acido lipoteicoico e la proteina M.

Le INVASINE: sono esotossine batteriche che servono ad esercitare danno.

L'infezione è un'insieme di fasi: contaminazione, colonizzazione, moltiplicazione, invasione e persistenza dell'agente patogeno sulla superficie e quindi nell'organismo.

La curva di crescita batterica che voi avete studiato è fondamentale. A cosa serve? Stabilisce quello che è il periodo di incubazione della malattia il quale può essere differente a seconda del microorganismo che consideriamo e a seconda anche dei fattori che il microorganismo elabora. La fase di incubazione può essere più o meno lunga; la fase di latenza è invece dal momento dell'inoculo al momento della moltiplicazione ed è il tempo necessario perché il batterio si moltiplichi e venga visto macroscopicamente dall'uomo.

Quando ci troviamo di fronte all'invasione batterica di quel determinato distretto, ci troviamo di fronte ad una infezione; Se si esprime danno si può parlare di malattia.

L'indagine clinica è fondamentale e vi dà il sospetto clinico, il laboratorio vi dà la conferma. Ovviamente di fronte ad un sospetto clinico, dobbiamo considerare la fonte, la modalità di trasmissione e il danno che quel micro organismo può arrecare nei confronti dell'ospite.