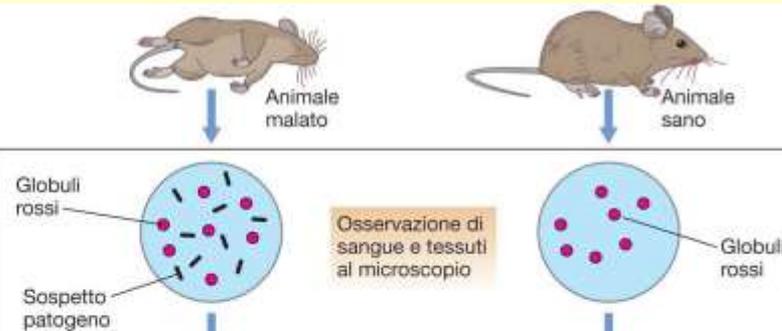


POSTULATI DI KOCH:

Riconoscimento della relazione fra microorganismi e malattia

POSTULATI DI KOCH:

1. L'organismo sospetto patogeno deve ritrovarsi in *tutti* i casi di malattia ed essere assente in animali sani.



2. L'organismo sospetto deve poter crescere come coltura pura.



3. Cellule da una coltura pura dell'organismo sospetto devono indurre la malattia in animali sani.



Prelievo di sangue o di un campione di tessuto e osservazione al microscopio

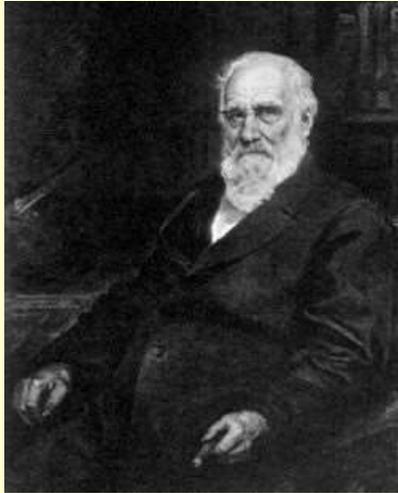
4. L'organismo deve poter essere nuovamente isolato e se ne deve poter dimostrare l'identità con l'originale.



A metà dell'800 non era chiaro come si sviluppassero le malattie infettive (vedi ad es. teoria della generazione spontanea e Pasteur). Koch formulò dei postulati che contribuirono enormemente al concetto di “causa” nelle malattie infettive.

Il fondamento di questi postulati è valido ancora oggi, per malattie identificate di recente (es. Legionellosi nel 1977, AIDS negli anni '80)

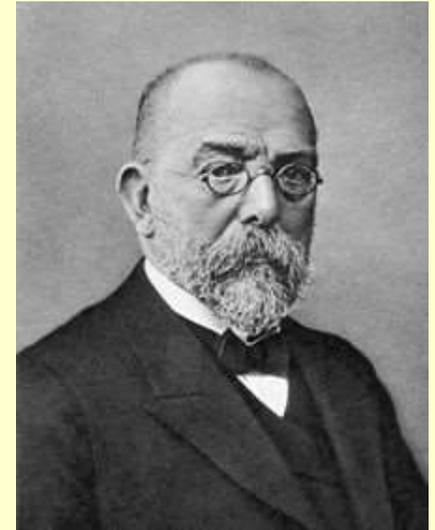
Il lavoro di Koch fu accompagnato da molte resistenze e critiche, e servirono anni perché fosse accettato.



von Pettenkofer



Vibrio cholerae



Koch

Secondo il celebre medico e chimico bavarese Max von Pettenkofer, il colera non era causato dal vibrione isolato da Koch, ma era dovuto a "miasmi". Il bacillo era insufficiente a causare da solo la malattia, ed era necessaria un'interazione tra batterio ed ambiente, con l'intervento di vari fattori. L'epidemia era causata dai "miasmi", che si formavano quando il batterio, in suoli asciutti e porosi, durante periodi di siccità, arrivava in contatto con feci in decomposizione o altre forme di degrado ambientale. Quindi il contagio non si trasmetteva per semplice contatto tra individui o per ingestione di sostanze infette (ad es. l'acqua). In assenza di condizioni opportune, il batterio non era in grado di maturare e di formare i miasmi. Ciò implicava che misure come la quarantena o come la bollitura e il filtraggio dell'acqua fossero considerate da Pettenkofer perfettamente inutili ad arrestare l'epidemia.

Nel 1892, von Pettenkofer chiese a Robert Koch, che riteneva il vibrione (isolato per la prima volta in Italia circa 30 anni prima) responsabile della malattia, di inviargli un campione delle sue colture di vibrione. Qualche giorno dopo, pubblicamente Pettenkofer prima neutralizza l'acidità gastrica con bicarbonato (per evitare l'obiezione che il batterio venisse digerito), poi beve un bicchiere di coltura. Sviluppo' solo una diarrea molto lieve (che durò circa 1 settimana!), e scrisse a Koch: *“Il Dottor Pettenkofer offre al Dottor Professor Koch i propri rallegramenti e lo ringrazia per la fiala contenente i cosiddetti vibrioni del colera, che egli è stato così gentile da inviargli. Il Dottor Pettenkofer ne ha bevuto l'intero contenuto ed è lieto di informare il Dottor Professor Koch che egli rimane nella consueta ottima salute”*.

NB. Probabilmente sviluppò una forma lieve, forse per la presenza di qualche forma di immunità indotta da infezioni subcliniche precedenti (??)

I p. di Koch non hanno validità assoluta:

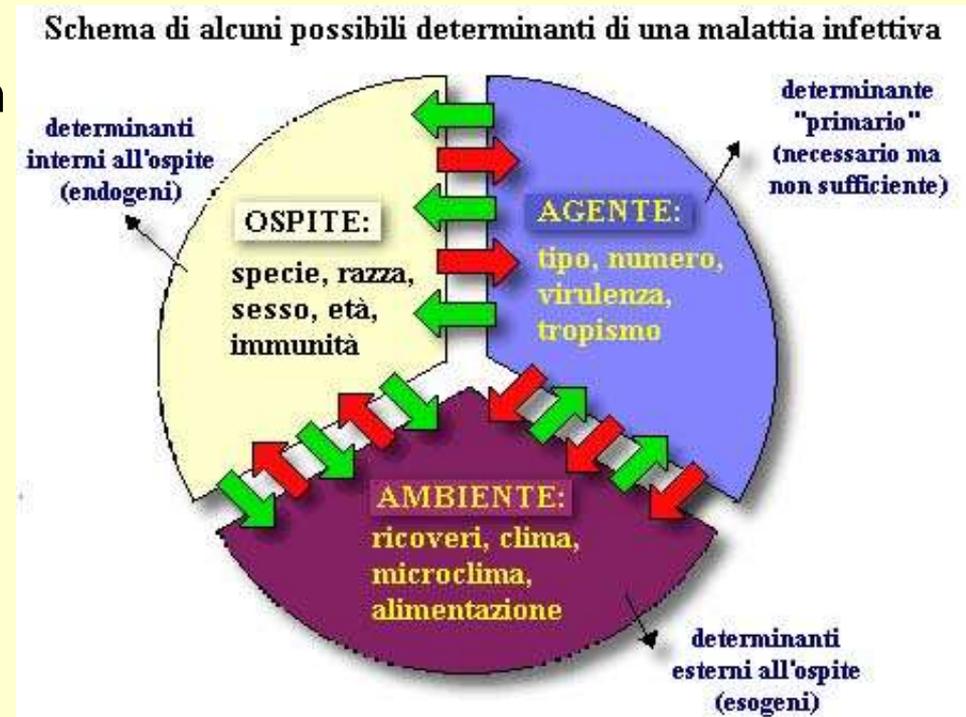
- Max vonPettenkofer bevve una coltura pura di *V. cholerae* e sviluppò solo lieve diarrea
- es. *treponema*, HCV non crescono in vitro
- poliovirus causa paralisi solo in alcuni soggetti



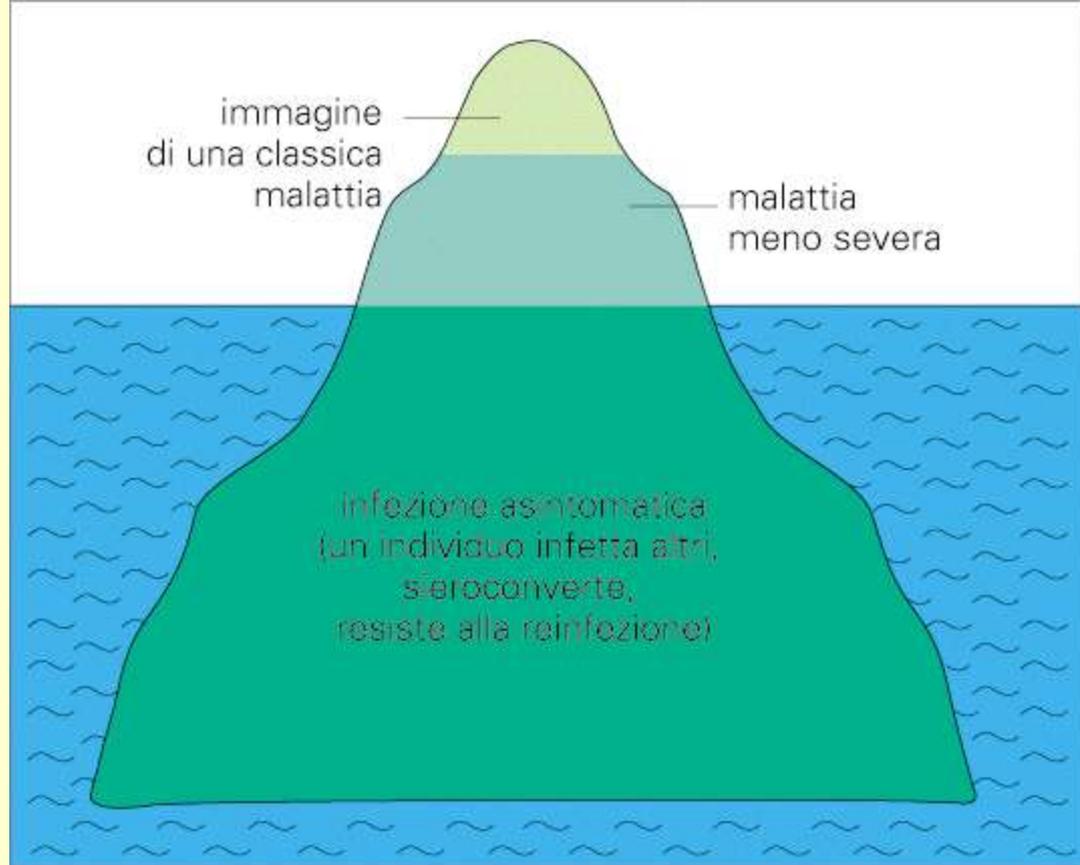
Oggi si tratta di una visione limitata, che è stata molto utile ma è superata, soprattutto per le infezioni virali.

- Non tutti gli individui suscettibili in una popolazione vengono infettati,
- non tutti i soggetti infettati sviluppano malattia,
- la malattia può avere presentazione e complicazioni diverse.

La malattia deriva dalle interazioni fra diversi determinanti

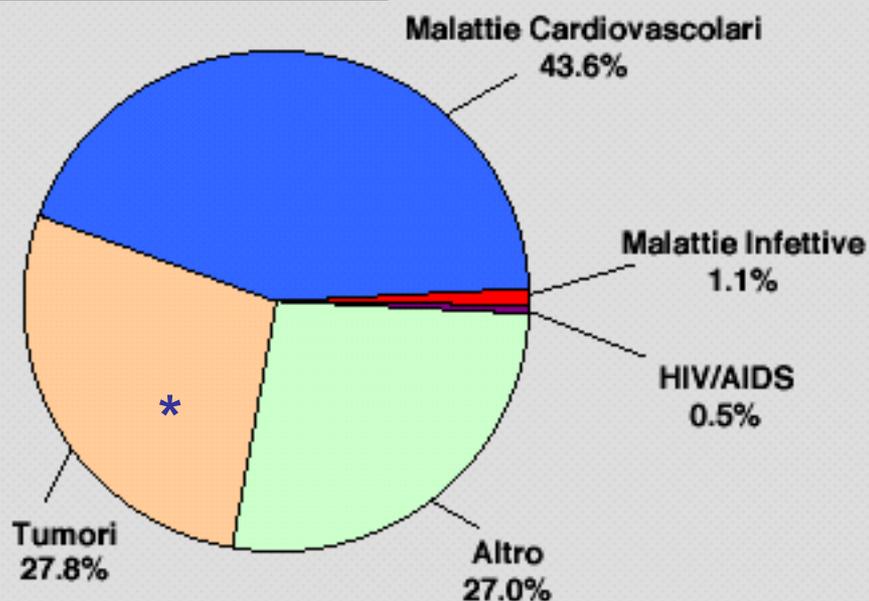


FREQUENZA DI MALATTIA CLINICAMENTE EVIDENTE	
infezione	% con malattia clinicamente evidente*
<i>Pneumocystis jiroveci</i> **	0
Poliomielite (bambini)	0.1–1.0
Virus di Epstein–Barr (bambino di 1-5 anni)	1.0 [†]
rosolia	50
influenza (giovane adulto)	60
pertosse tifo malaria antrace	} >90
gonorrea (maschio adulto) morbillo	} 99
rabbia HIV (?)	} 100
*infezione primaria **precedentemente <i>P. carinii</i> [†] 30-75% nei giovani adulti	

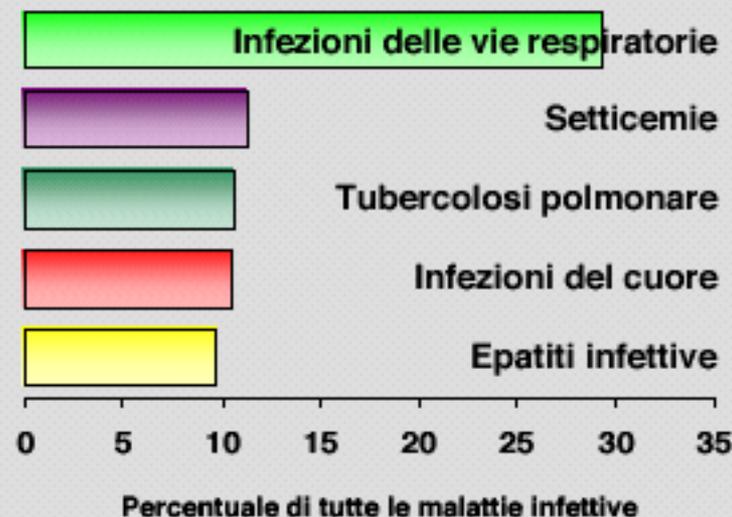


Il concetto di “iceberg” della malattia infettiva.

1990-99 Tutti



Cinque gruppi nosologici più frequenti



Dati di mortalità in Italia

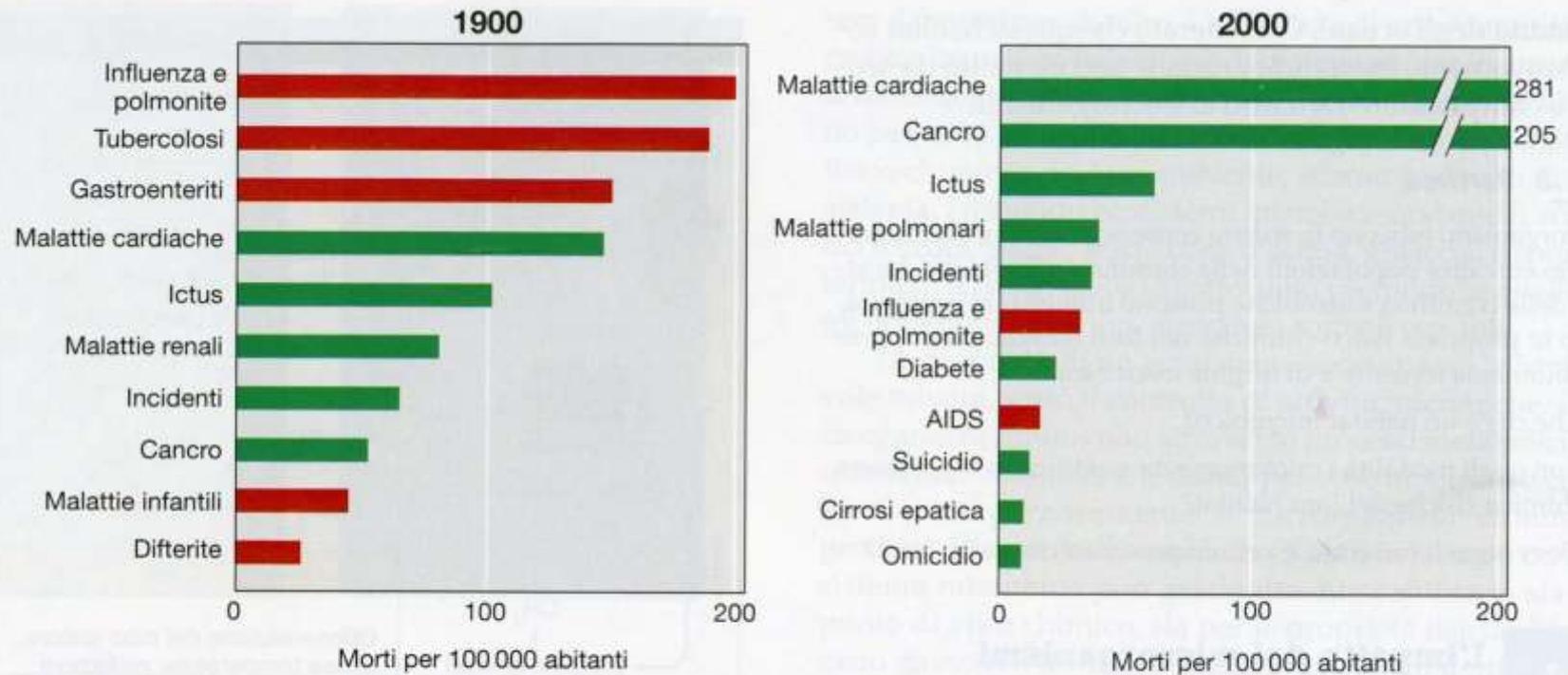
(Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani”, 2004)

Le malattie infettive sono in aumento. In Italia le morti da infezione sono passate da 11/100.000 nel 1980 a 25/100.000 nel 2003 (situazione simile in tutti i Paesi industrializzati).

A livello globale causano il 25% di *tutte* le morti.

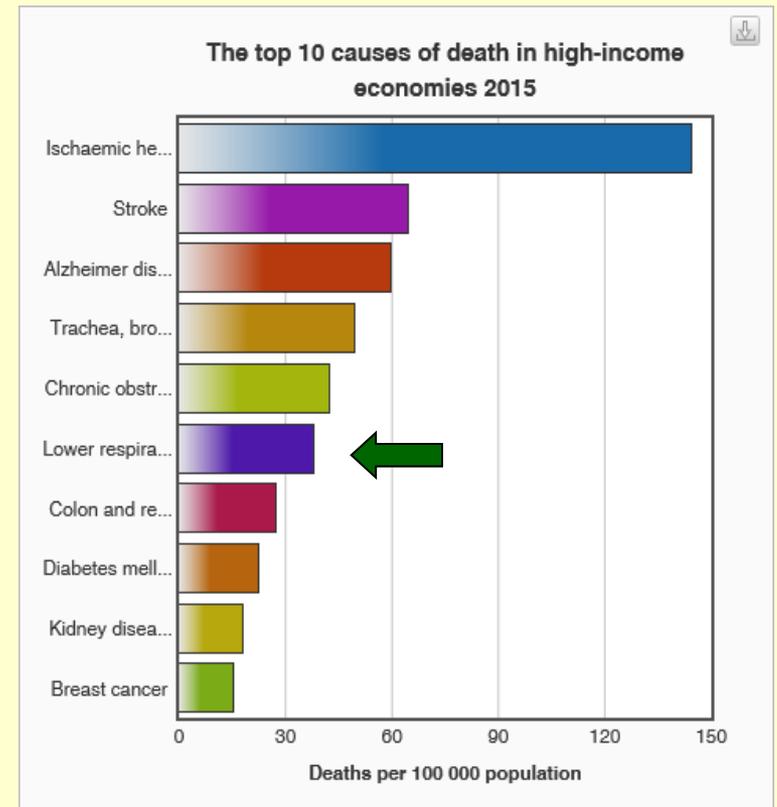
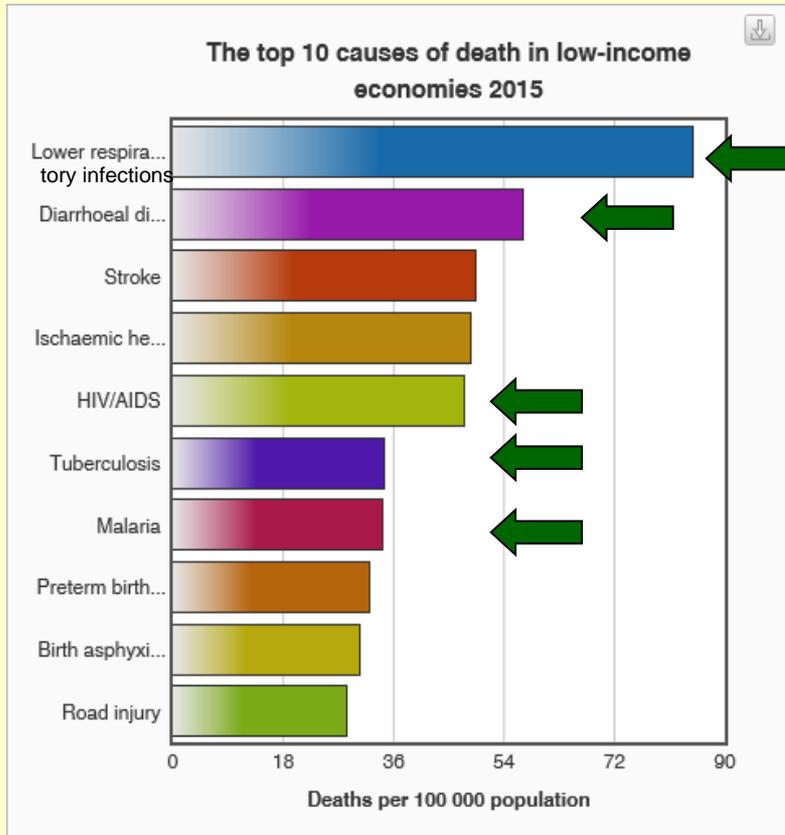
*** NB: si stima che circa il 10% di tutti i tumori siano causati da infezione**

Microorganismi come agenti di malattia nell'uomo



• **Figura 1.7 Tasso di mortalità relativo alle prime 10 cause di morte negli Stati Uniti negli anni 1900 e 2000.** Nel 1900 le malattie infettive erano la prima causa di morte, mentre oggi rappresentano un problema minore. Le malattie infettive sono evidenziate in rosso, quelle non infettive in verde. I dati riportati sono quelli elaborati dall'United States National Center for Health Statistics.

Nei Paesi industrializzati, la mortalità per malattie infettive è diminuita drasticamente, grazie alla conoscenza delle infezioni, pratiche sanitarie, uso di agenti antimicrobici



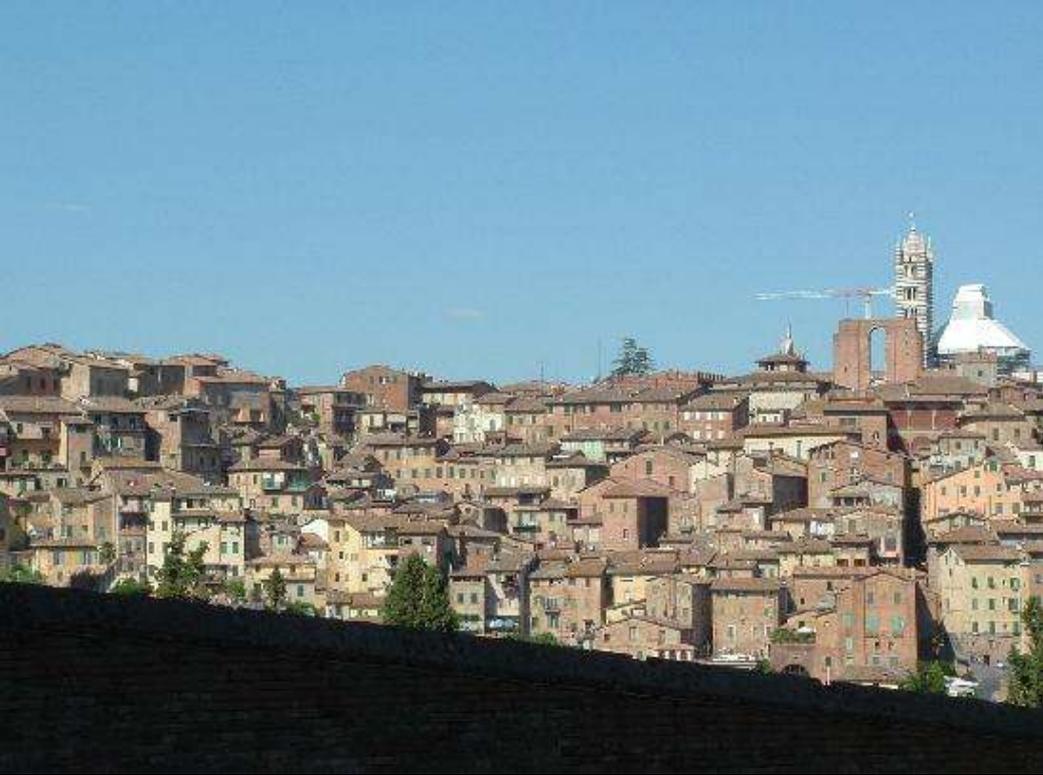
Microorganismi PATOGENI causano le malattie infettive, drasticamente ridotte nei Paesi ricchi, ancora devastanti nei Paesi in via di sviluppo.

Le malattie infettive costituiscono 5/10 cause di morte nei paesi a reddito medio-basso, 1/10 in quelli ad alto reddito

Impatto dei microorganismi sulla vita

Agenti di Malattia

Le infezioni nel passato hanno determinato la storia umana

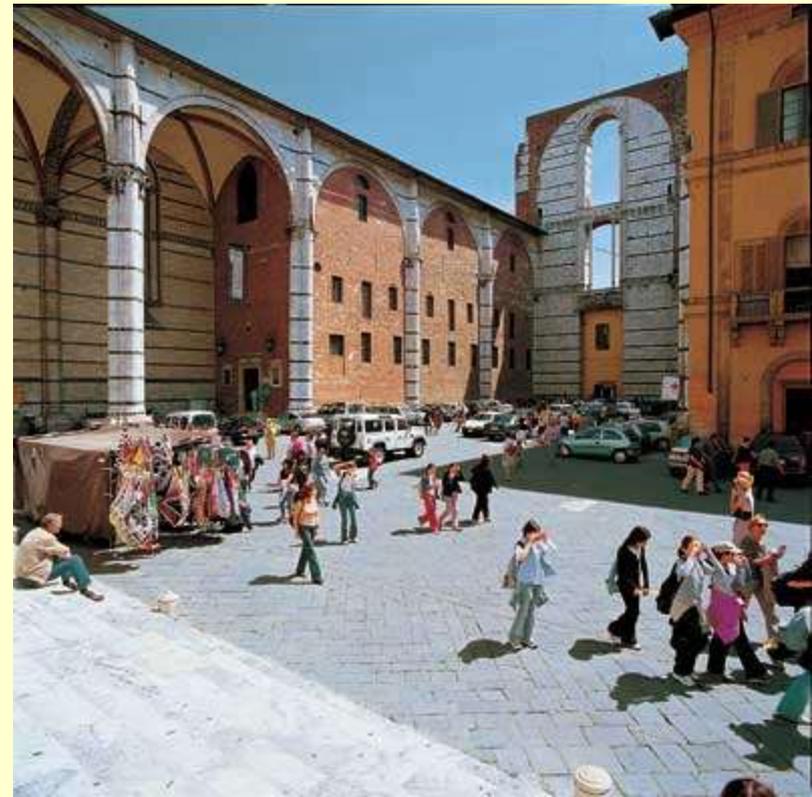


Siena, 1348, Peste Nera: su
45.000 abitanti ne rimasero in vita
meno di 15.000

Iniziò la decadenza di Siena

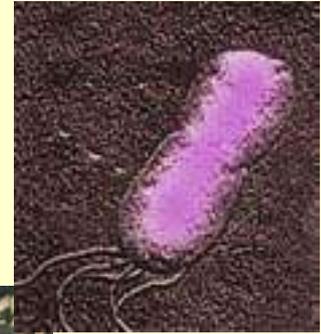
Il Facciatone

A causa di vari imprevisti e,
soprattutto, la Peste del 1348,
si interruppero i lavori, che
sono rimasti incompiuti a
tutt'oggi



Napoleone, la Campagna di Russia e Bartonella/Rickettsia

In June 1812, the *Grande Armée* of 500,000 men crossed the Nieman River into Poland to attack Russia. Within days, soldiers, who had been in close contact with louse-infested civilians, began to develop fevers and rashes. The outmanned Russian Army of the Czar retreated before Napoleon's forces, giving up land but setting fires to everything behind it and drawing the French forces deeper into Russia. One month into the campaign, Napoleon had lost 80,000 soldiers to typhus and dysentery, and by August he had lost 105,000 men. One month after seizing Moscow, with his remaining 100,000 tired men, Napoleon ordered a withdrawal from the typhus-ravaged city. By December, the *Grande Armée* had again crossed the Nieman River, but with <40,000 louse-infested soldiers. These stragglers and the advancing Russian Army spread typhus throughout Eastern Europe. Although Napoleon blamed the decimation of his troops on the Russian winter, this military disaster illustrates the incredible power of infectious disease epidemics under the right conditions [84].



Background. Many soldiers in Napoleon's Grand Army died of infectious diseases during its retreat from Russia. Because soldiers were commonly infested with body lice, it has been speculated that louse-borne infectious diseases, such as epidemic typhus (caused by *Rickettsia prowazekii*), were common.

Methods. We investigated this possibility during recent excavations of a mass grave of Napoleon's soldiers in Vilnius, Lithuania. Segments of 5 body lice, identified morphologically and by polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing, were found in earth from the grave that also contained fragments of soldiers' uniforms.

Results. DNA of *Bartonella quintana* (the agent of trench fever) was identified by PCR and sequencing in 3 of the lice. Similarly, PCR and sequencing of dental pulp from the remains of 35 soldiers revealed DNA of *B. quintana* in 7 soldiers and DNA of *R. prowazekii* in 3 other soldiers.

Conclusions. Our results show that louse-borne infectious diseases affected nearly one-third of Napoleon's soldiers buried in Vilnius and indicate that these diseases might have been a major factor in the French retreat from Russia.

Classificazione dei Batteri

Studi recenti hanno mostrato che ciò che chiamiamo “procarioti” sono fra loro molto diversi. I procarioti sono divisi in due maggiori gruppi tassonomici, i **BATTERI** o **EUBACTERIA** e gli **ARCHAEA** o **ARCHAEBACTERIA**, che sono fra loro così diversi tanto quanto lo sono dagli eucarioti (es. Archea non hanno peptidoglicano, i loro ribosomi sono più simili a quelli eucariotici che a quelli batterici, le loro membrane hanno molecole diverse sia dai Batteri che dagli Eucarioti)

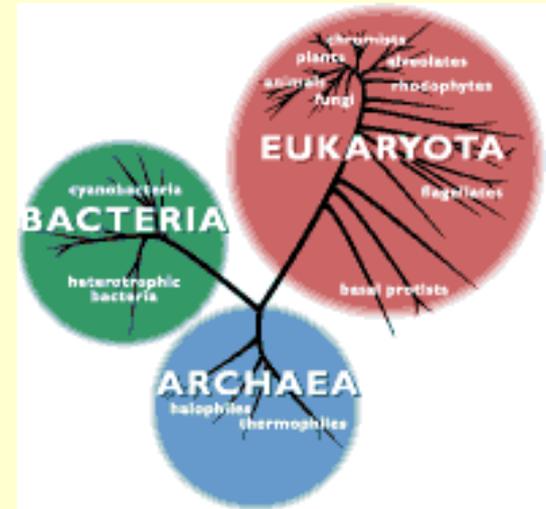


TABLE 10.1 Some Characteristics of Archaea, Bacteria, and Eukarya			
	Archaea	Bacteria	Eukarya
	 <p><i>Methanosarcina</i> SEM 10 μm</p>	 <p><i>E. coli</i> SEM 1 μm</p>	 <p><i>Amoeba</i> SEM 10 μm</p>
Cell Type	Prokaryotic	Prokaryotic	Eukaryotic
Cell Wall	Varies in composition; contains no peptidoglycan	Contains peptidoglycan	Varies in composition; contains carbohydrates
Membrane Lipids	Composed of branched carbon chains attached to glycerol by ether linkage	Composed of straight carbon chains attached to glycerol by ester linkage	Composed of straight carbon chains attached to glycerol by ester linkage
First Amino Acid in Protein Synthesis	Methionine	Formylmethionine	Methionine

Gli Eubatteri sono la forma più comunemente conosciuta, ma da quando è stata riconosciuta l'esistenza degli Archaea, questi sono stati identificati in migliaia di ambienti, per cui non si può dire quali siano i batteri più numerosi.

Gli archaea sono stati riconosciuti come diversi dai batteri per la prima volta attorno al 1980, e sono ancora molto poco conosciuti.

Gli Archaea sono ubiquitari. Alcuni di loro sono estremofili, si trovano in ambienti estremi (sorgenti di acqua calda a 100°C, fondi oceanici a pressioni elevatissime e temp di 110°C, acqua satura di sale, zolfo o altre sostanze, temperature di -10°C, ecc). Possono metabolizzare metano, zolfo, idrogeno gassoso.

AL MOMENTO non si conoscono archaea sicuramente patogeni, anche se sono una componente normale del microbioma umano e sono spesso ritrovati in pazienti con periodontopatie, o malattie intestinali (es Methanoberebacter oralis, M, smithii

La loro origine e la relazione con gli Eubatteri e con gli Eucarioti sono sconosciute. Le indagini filogenetiche dimostrano che sono linee evolutive separate

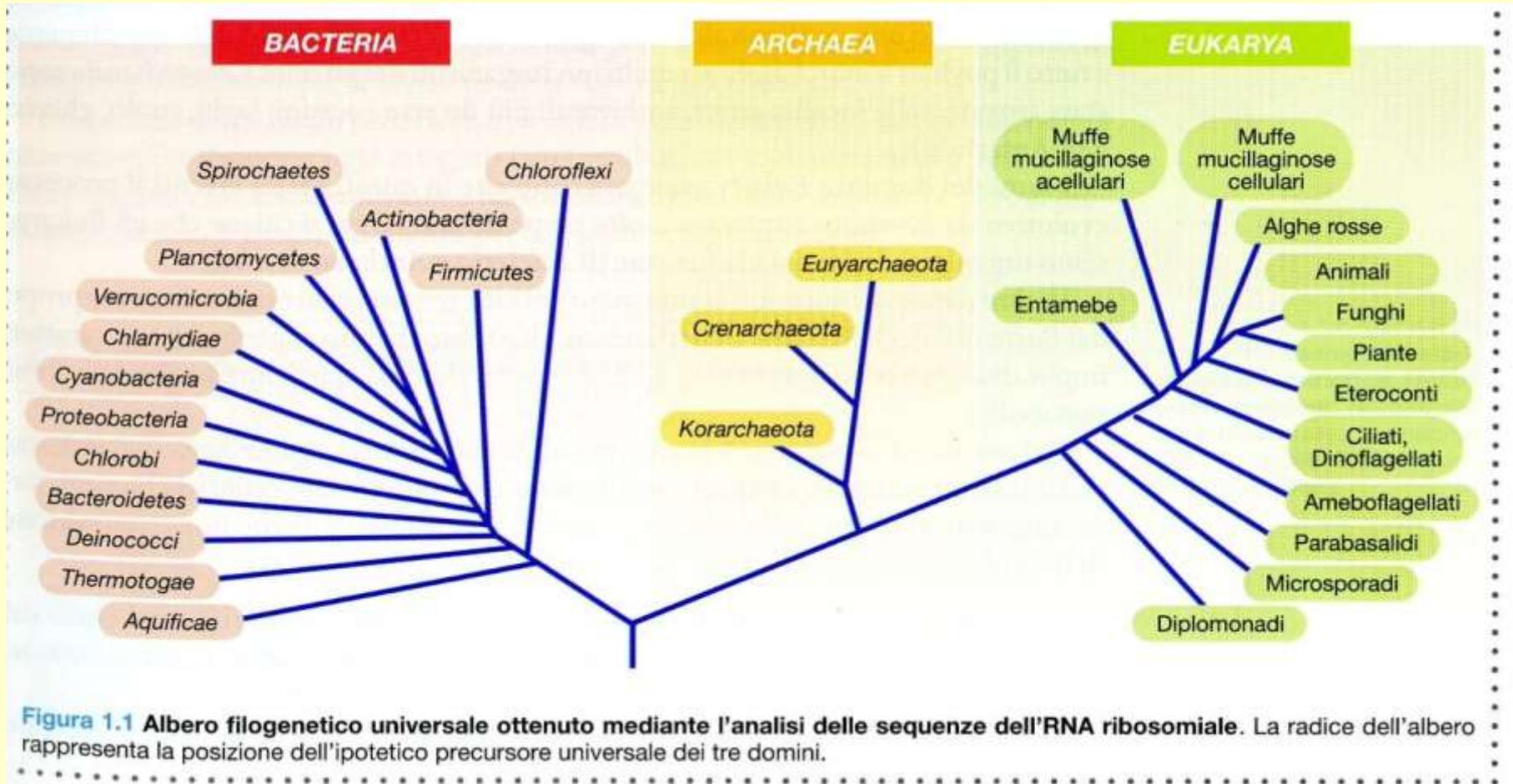
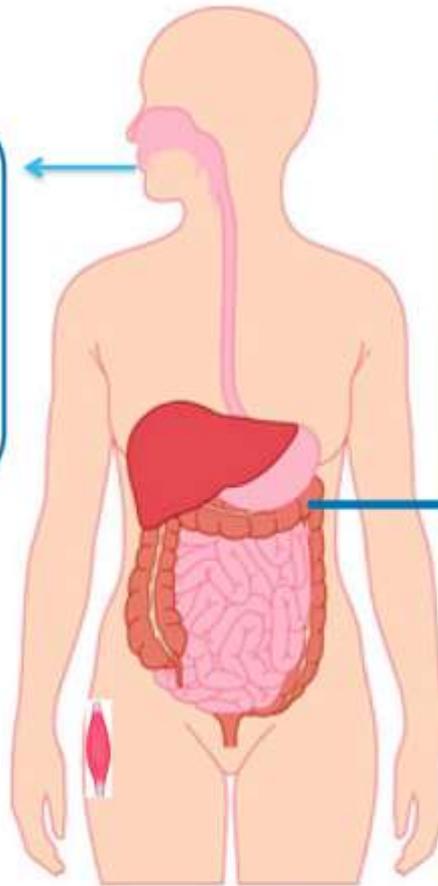


Figura 1.1 Albero filogenetico universale ottenuto mediante l'analisi delle sequenze dell'RNA ribosomiale. La radice dell'albero rappresenta la posizione dell'ipotetico precursore universale dei tre domini.

Human gastrointestinal tract Archaea

Oral cavity

Methanobrevibacter oralis
Methanobrevibacter smithii
Methanobrevibacter massiliense
Methanosarcinia mazei
Methanobacterium congolense
Methanoculleus bourgensis
Candidatus Nitrososphaera evergladensis
Methanomassilicoccus luminyensis



Microbiota

Methanogens

Methanobreviacter smithii
Methanosphaera stadtmanae
Methanomassilicoccus luminyensis
Methanobrevibacter arboriphilicus
Methanobrevibacter oralis
Methanobrevibacter millerae
Methanocellus chikugoensis
Candidatus Methanomassilococcus intestinalis
Candidatus Methanomethylophilus alvus

Halophilic archaea

Haloferax massiliense
Haloferax alexandrinus
Halorubrum koreense
Halorubrum alimentarium
Halococcus morrhuae
Halorubrum saccharovororum
Halorubrum sp.
Halorubrum norisence
Halorubrum orientale
Halorubrum kribbense
Halosimplex carlsbadense
Halococcus sp.
Natrorubrum sp.

Crenarchaeota

Sulfobolus spp.

Traumarchaeota

Nitrosphaera spp.

Archea si trovano anche normalmente nel tratto respiratorio (naso, polmoni) e pelle

Tabella 1.1 Proprietà differenziali degli organismi dei domini *Bacteria*, *Archaea* ed *Eukarya*.

<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Eukarya</i>
Unicellulari	Unicellulari	Unicellulari e multicellulari
Assenza di nucleo circondato da membrana	Assenza di nucleo circondato da membrana	Nucleo avvolto dalla membrana nucleare
Cromosoma circolare	Cromosoma circolare	Cromosoma lineare
Presenza di plasmidi come genoma accessorio	Presenza di plasmidi come genoma accessorio	Assenza di plasmidi
Assenza di proteine associate al cromosoma	Istoni associati al cromosoma	Istoni associati al cromosoma
Lipidi della membrana: glicerolo legato ad acidi grassi lineari	Lipidi della membrana: glicerolo legato ad acidi grassi ramificati	Lipidi della membrana: glicerolo legato ad acidi grassi lineari e presenza di steroli
Peptidoglicano nella parete cellulare	Assenza di peptidoglicano nella parete cellulare	Assenza di peptidoglicano. Quando presente, la parete è formata da chitina (funghi) o da cellulosa (piante)
Inizio della traduzione: formilmetionina	Inizio della traduzione: metionina	Inizio della traduzione: metionina
Habitat ubiquitario	Habitat ubiquitario inclusi gli ambienti estremi	Habitat ubiquitario

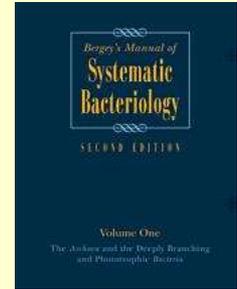
Tassonomia:

Eubatteri

Tab. 3.1. Ranghi tassonomici.

Rango formale	Esempio
Regno	Procarioti
Divisione	Gracilicutes
Classe	Scotobatteri
Ordine	Eubacteriales
Famiglia	Enterobacteriaceae
Genere	<i>Escherichia</i>
Specie	<i>coli</i>

Riferimento
Internazionale:



Il concetto di specie, fondamentale nelle filogenie eucariotiche, ha un significato *particolare* in batteriologia:

Specie eucariotica: gruppo biologico in grado di incrociarsi e di produrre una progenie fertile

Specie batterica: gruppo “ecobiologico” di microorganismi che possiedono distinti caratteri tipici in comune

Il concetto di specie batterica ha un significato abbastanza sfumato: è facile distinguere batteri molto diversi, ma come si devono considerare batteri identici dal punto di vista antigenico, di cui uno è patogeno e l'altro no? Sono due specie diverse o la stessa specie?

Nomenclatura Ufficiale:

L'iniziale del genere è maiuscola, il nome della specie minuscola, tutto in corsivo:

Escherichia coli: *E. coli* Stafilococco Aureo: *S. Aureus*

Vibrione del colera: *V. cholerae*

I batteri possono essere classificati mediante caratteristiche:

Fenotipiche:

Morfologia (Forma, Gram, Colonie, Motilità, ecc.), Biotipizzazione (test biochimici di metabolismo, capacità fermentative, ecc.), Antigenicità (reattività con anticorpi specifici), Tipizzazione fagica (sensibilità a specifici ceppi di batteriofagi)

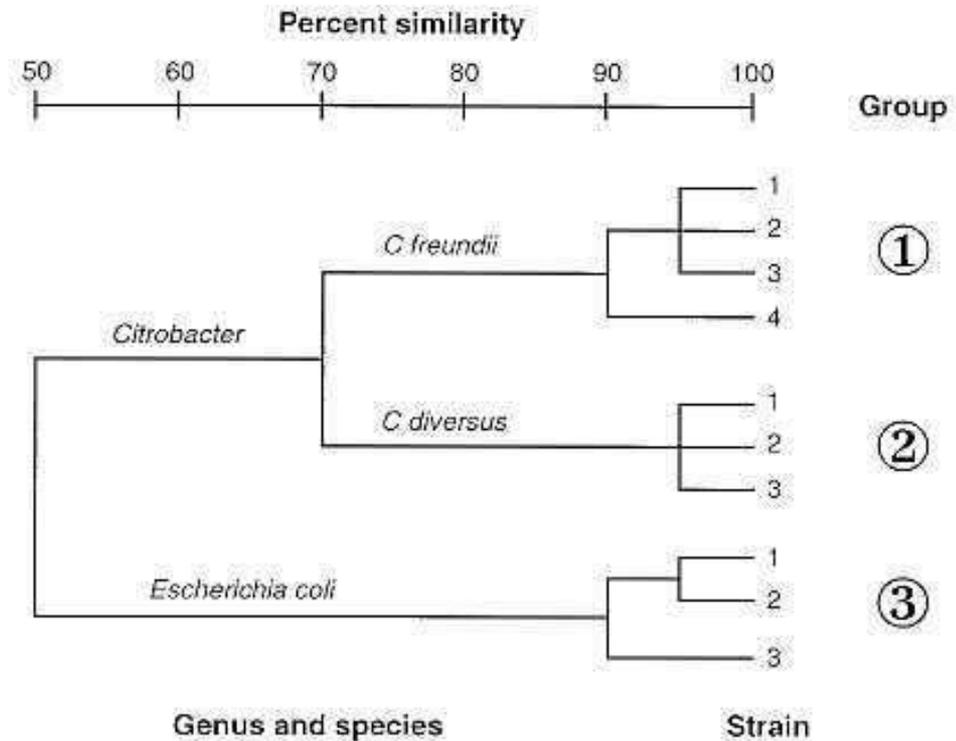
Genotipiche:

Da qualche anno si utilizza il sequenziamento del DNA.

Una regione genomica molto utilizzata sono i geni che codificano gli RNA ribosomiali - alcuni sono conservati nella Famiglia, altri sono specie o sottospecie specifici

2. The function of ribosomal RNA is essential and has not changed over time: thus the gene has a highly conserved sequence overall

human	...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGCTGCAGTTAA
yeast	...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAA
corn	...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAA
<i>Escherichia coli</i>	...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA



Esempio di albero filogenetico, costruito basandosi sulla omologia delle sequenze di DNA. Misura la distanza fra organismi, ed identifica il vicino più prossimo Si ottiene paragonando le differenze in molti ceppi di organismi potenzialmente correlati fra loro. Ogni divisione nell'albero è un "nodo", cioè il presunto antenato degli organismi alla sua destra. La radice (all'estrema sinistra) indica il presunto antenato di tutti gli altri organismi

In una specie batterica si possono identificare sottopopolazioni con caratteristiche fra loro distinte.

Un **CEPPO** (inglese strain) è una sottopopolazione nell'ambito della stessa specie.

I ceppi di una stessa specie possono essere fra loro lievemente differenti in modi diversi:

- *biovar* sono ceppi che differiscono per caratteristiche biologiche o fisiologiche
- *morphovar* differiscono per la morfologia
- *serovar* differiscono per le proprietà antigeniche.

Suggerimento per lo studio della parte Speciale di Batteriologia:

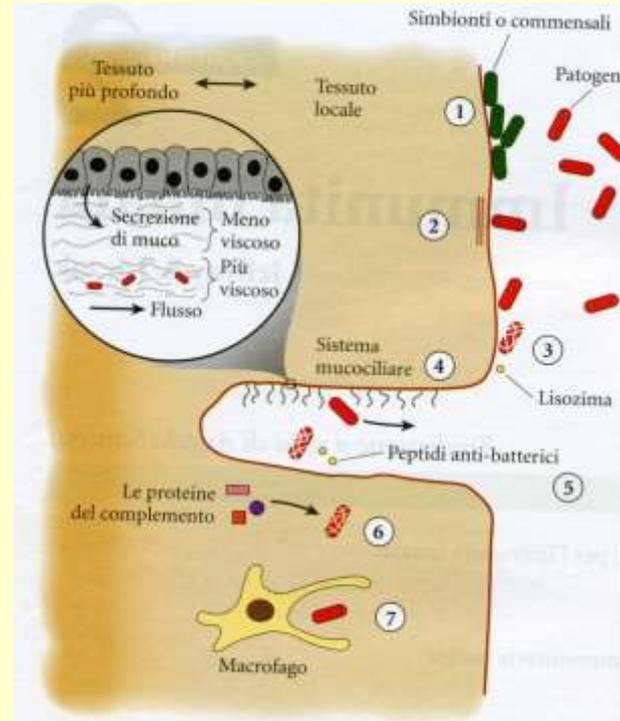
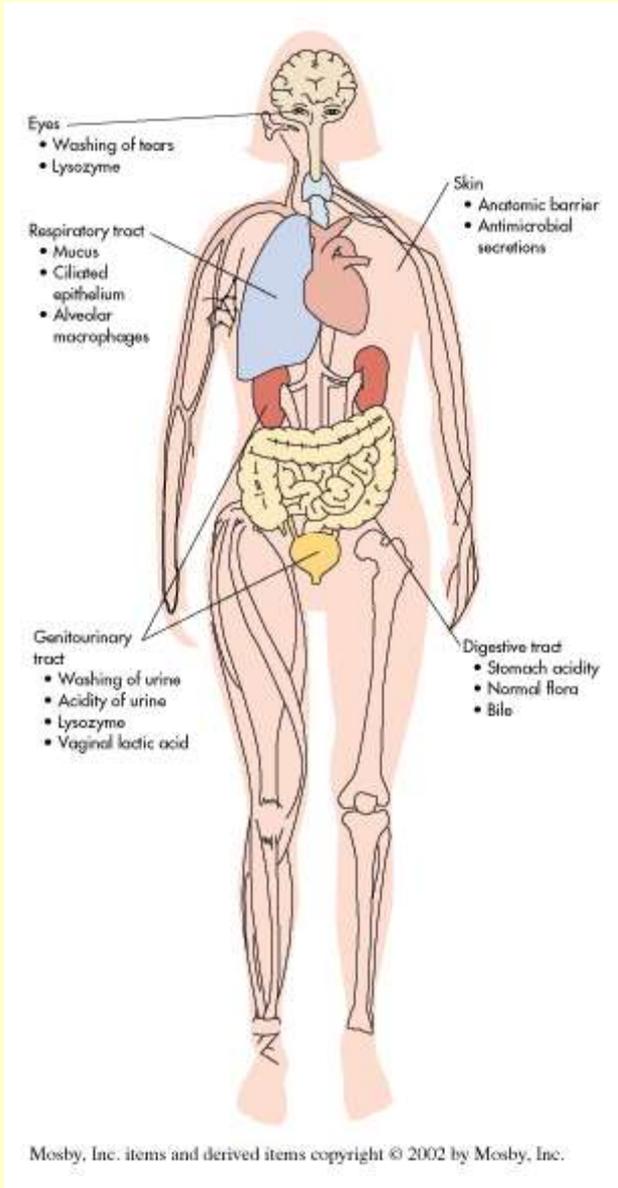
NON imparare a memoria la classificazione e tutte le caratteristiche di un batterio, ma focalizzarsi sulle caratteristiche che lo distinguono dagli altri e lo rendono importante per la patogenesi.

A volte si possono dedurre informazioni utili considerando anche solo la morfologia: un cocco è Gram + (solo Neisserie sono Gram-), asporigeno, (solo bacilli e clostridi producono spore), immobile ((solo alcuni enterococchi hanno flagelli), non produce endotossine (prodotte solo da Gram-), e quindi molto probabilmente produrrà esotossine.

es: Tutti i batteri di interesse medico sono generalmente aerobi/anaerobi facoltativi (tranne Brucelle – aerobi obbligati) e pochi gruppi anaerobi obbligati (es. Clostridi)

es: Tutti i batteri hanno una parete con peptidoglicano, tranne Micoplasmii (senza parete) e Clamidio (parete proteica)

Difese innate non adattative contro le infezioni batteriche



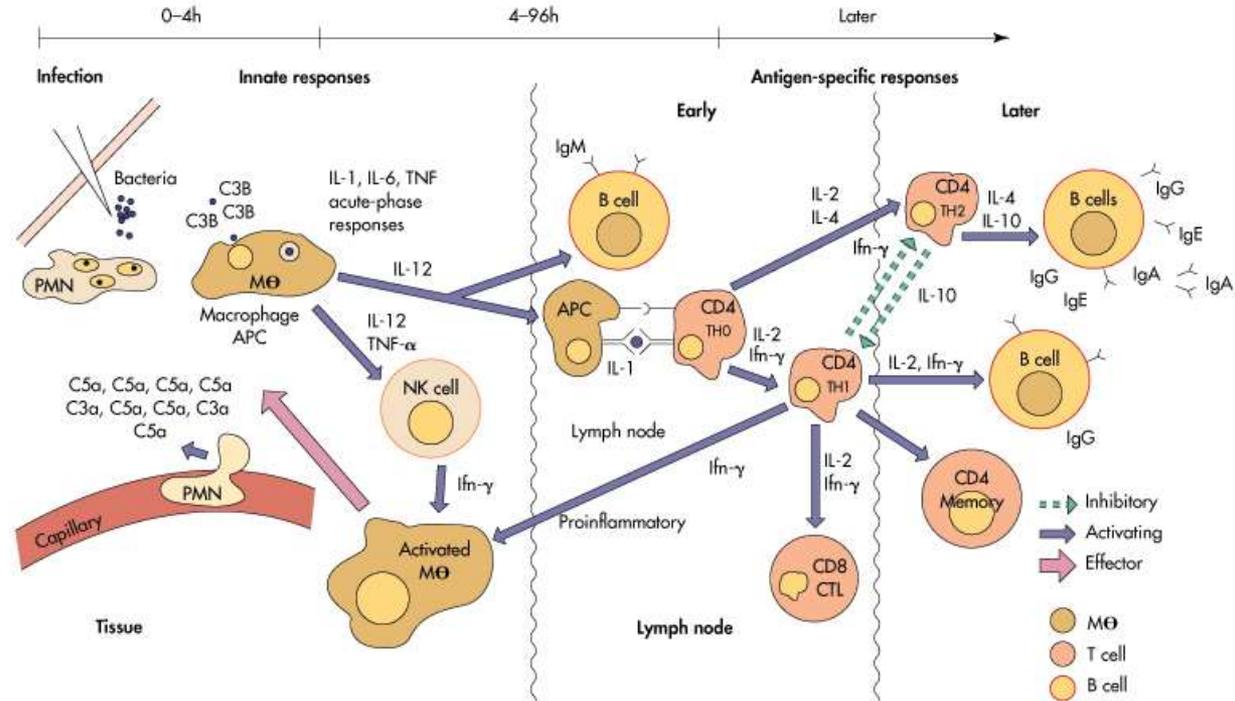
Meccanismi di immunità innata verso batteri a livello di cute e mucose.

- 1) competizione da commensali (saturazione siti di attacco, uso nutrienti)**
- 2) Se i patogeni si attaccano, la crescita viene ritardata da basso pH, ac lattico, sebo, ecc.**
- 3) le secrezioni contengono enzimi lesivi (es lisozima) ed altre sostanze antibatteriche**
- 4) il tratto respiratorio ha la “scala mobile” mucociliare, che spinge i batteri all’esterno**
- 5) secrezioni di tratto respiratorio e digestivo contengono peptidi ad azione antimicrobica (“defensine”)**
- 6-7) distruzione del patogeno da parte del complemento o per fagocitosi**

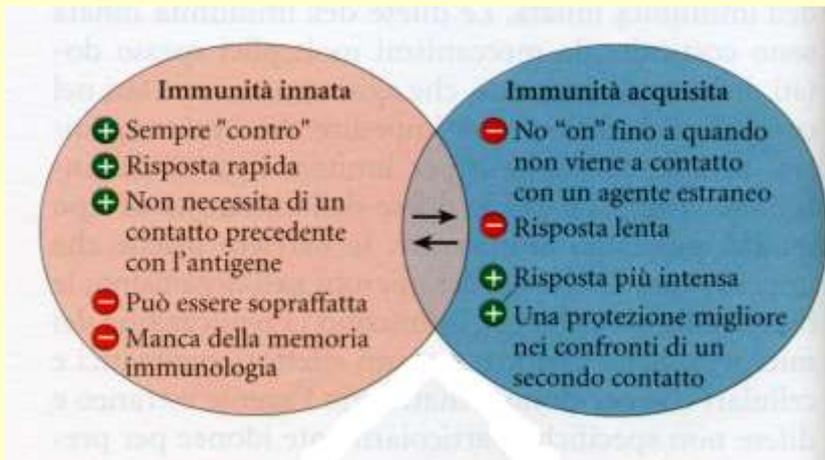
Barriere difensive del corpo

Risposte antibatteriche

Prima le risposte innate non antigene specifiche attraggono e promuovono le risposte dei neutrofili polimorfonucleati (PMN) e dei macrofagi (Mo). Le cellule presentanti l'antigene (APCs) e l'antigene raggiungono il linfonodo ed attivano le risposte immuni precoci (TH1 e IgM). Poi si sviluppano le risposte anticorpali sistemiche TH2 e cellule memoria



Mosby, Inc. items and derived items copyright © 2002 by Mosby, Inc.



Confronto fra immunità innata ed immunità acquisita. Le due componenti si regolano reciprocamente.

Difese innate contro le infezioni batteriche

Tabella 18.1 Effettori dell'immunità innata che mediano la resistenza alle infezioni batteriche

Tipi di meccanismi ed esempi

Barriere fisiche e fisiologiche

Pelle, sebo, cellule della mucosa epiteliale, muco e flusso del muco

Effettori enzimatici e proteici

Lisozima, proteasi, peptidi antimicrobici, proteine che sequestrano il ferro, complemento

Riconoscimento del PAMP

TLR

TLR2 e peptidoglicano e glicopeptidi

TLR4 e LPS

TLR5 e flagelli batterici

TLR9 e CpG DNA

Molecole di riconoscimento del pattern endocitico

(riconoscimento dei motivi)

Recettore per il mannosio/proteine spazzino

CR3

Collettine solubili

Conglutinine

Lectina legante il mannosio

Proteine A e D surfactanti

PAMPs = Pathogen Associated Molecular Pattern

TLR = Toll-like Receptors

Molecole di riconoscimento del pattern endocitico : presenti sulla superficie di macrofagi, promuovono l'attacco dei microorganismi ai fagociti (es recettori per il mannosio, presente spesso nelle glicoproteine batteriche ma scarsamente in quelle umane; CR3 lega il complemento C3B complessato all'antigene promuovendo l'opsonizzazione

Collettine : riconoscono molecole presenti sulla superficie dei batteri, e promuovono fagocitosi, produzione citochine proinfiammatorie, attivano il complemento, ecc.

Difese contro le infezioni batteriche

Tabella 2.2 TLR e loro ligandi

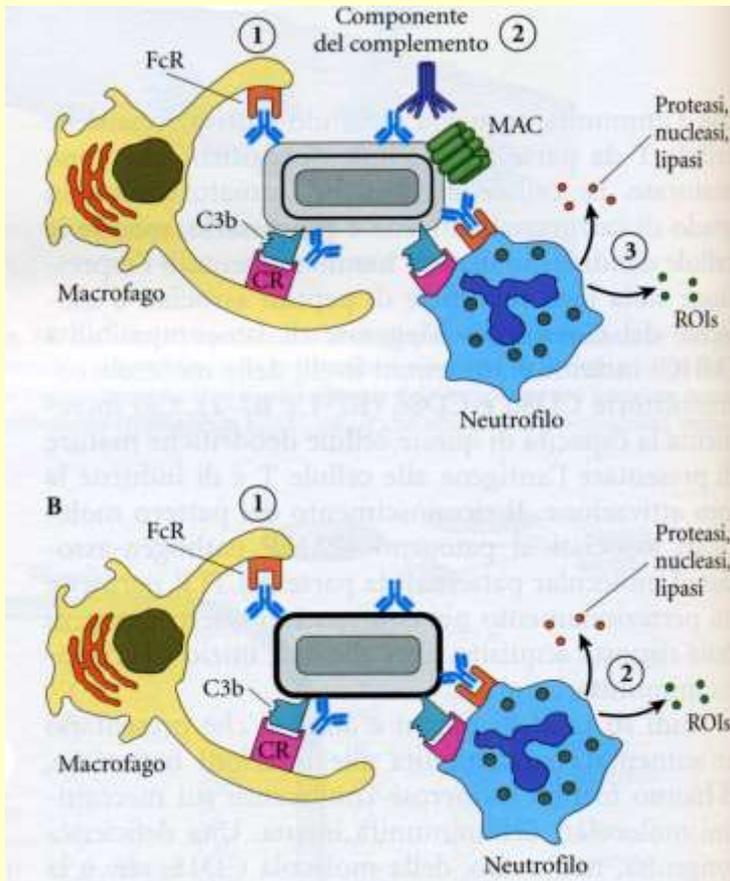
Recettore	Ligando (interno/esterno)
TLR 1	Regola il TLR 2
TLR 2	Lipoarabinomannano (micobatteri) Acido lipoteicoico (batteri-positivi) Peptidoglicano (batteri gram-positivi)
TLR 3	Doppia elica di RNA
TLR 4	LPS (batteri gram-negativi)
TLR 5	Flagellina (numerosi batteri)
TLR 6	Regola il TLR 2
TLR 7	Singola elica di RNA
TLR 8	Singola elica di RNA
TLR9	Sequenze specializzate CpG del DNA ^a
TLR 10	?

^a Frammento del DNA, nel quale una citosina è seguita da una guanina. GT/ACGTT è la sequenza del DNA ottimale riconosciuta dal TLR 9

L'attivazione dei TLRs ha molti diversi effetti:

Produzione di citochine proinfiammatorie, attivazione cellule NK, promozione della presentazione dell'antigene alle cellule T CD4, inibizione sintesi proteica, induzione apoptosi, produzione di interferon,

Immunità mediata da anticorpi verso batteri extracellulari

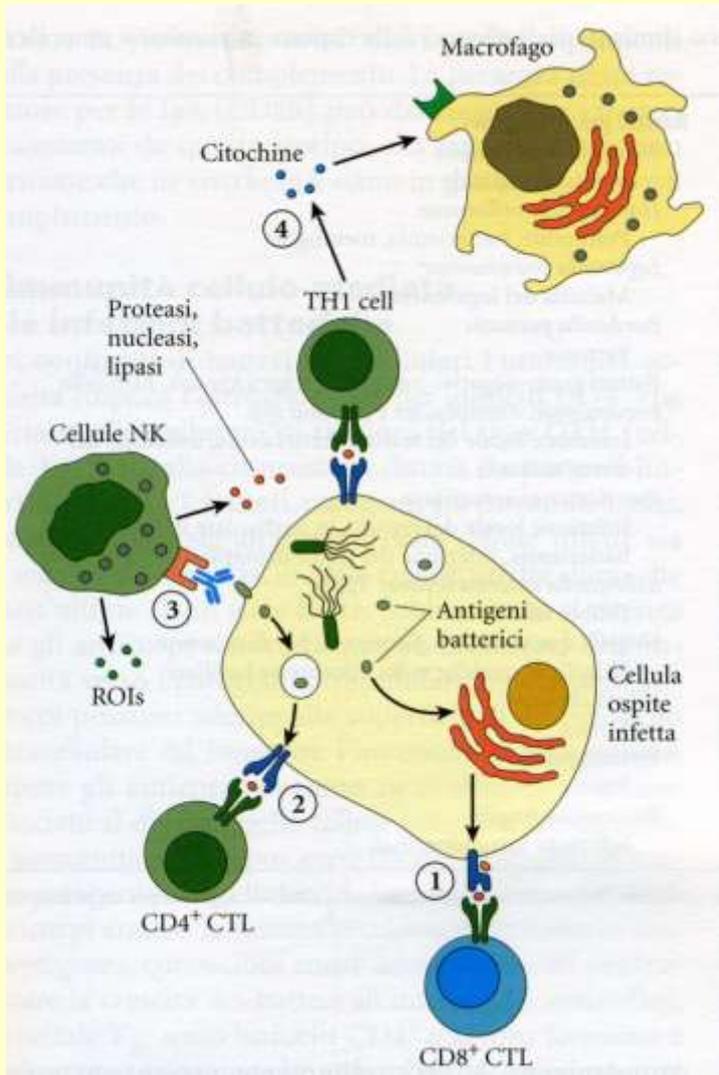


A) Per i batteri Gram – 1) il legame di anticorpi e complemento da' luogo alla opsonizzazione attraverso i recettori Fc o CR espressi su macrofagi e neutrofili; 2) Gli anticorpi attivano il complemento, si forma il complesso di attacco alla membrana (MAC) e l'opsonizzazione; 3) si può avere anche attivazione di citotossicità cellulare anticorpo mediata (ADCC), e rilascio da parte dei neutrofili di lipasi, nucleasi, proteasi e intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI)

B) Per i batteri Gram + la formazione del MAC non è efficace nel killing dei batteri (assenza membrana esterna, parete spessa), ma sono efficaci opsonizzazione e ADCC

MAC : diverse proteine del complemento si attaccano alle membrane batteriche, formando un tunnel che consente la libera diffusione delle molecole con conseguente alterazione dell'omeostasi cellulare e morte del batterio

Immunità cellulo mediata verso batteri intracellulari



- 1) Gli antigeni batterici presenti nel citoplasma di una cellula infetta possono essere processati e, associati a molecole MHC I, essere presentati ai linfociti CTL CD8⁺
- 2) Gli Ag batterici presenti negli endosomi possono essere processati, associati a MHC II, e presentati a CTL CD4⁺
- 3) Gli Ag batterici presenti alla superficie cellulare possono essere legati da anticorpi ed essere bersaglio per il killing da parte di cellule NK
- 4) Linfociti TH1 avviano reazioni che attivano i macrofagi, che possono uccidere sia i batteri che le cellule infette.