MASTER COPY
Tel. 050 8312126
Cell. 388 9837745

Microbiologia

5 marzo 2015

La ***microbiologia*** è la scienza che studia i più piccoli organismi viventi (è detta anche scienza dell'invisibile), i microbi (dal greco ***micros*** piccolo e ***bios*** vuol dire vita), invisibili all'occhio umano. Queste sono delle forme di vita che incidono tantissimo nei nostri giorni, noi ci occuperemo di microbiologia medica, e quindi di quei microorganismi che hanno una rilevanza nelle malattie dell'uomo, le cosiddette ***malattie infettive***, in quanto sono dovute ad agenti infettivi, che infettano e che passano da un soggetto all'altro, ovvero si trasmettono. Ci sono ovviamente anche altri campi: animale, ambientale, biotecnologie.
La microbiologia è una scienza abbastanza recente ma il sospetto che esistessero organismi estremamente piccoli ed invisibili si aveva da tempi antichissimi. Vi era un solo problema: una limitazione tecnologica, perché non c'erano gli strumenti necessari per vedere qualcosa di così piccolo.
Inizialmente la microbiologia era una ***scienza applicativa***, perché sin dall'antichità l'uomo ha imparato a fare i conti con la presenza dei microbi anche se non ne poteva dimostrare l'esistenza (*salatura, essiccamento, fermentazione, trasmissione delle malattie*).

La varietà del mondo microbico:

I microrganismi sono un gruppo molto eterogeneo di organismi viventi comprendenti ***metazoi, protozoi, alghe, funghi batteri*** e ***virus***.
I microorganismi più piccoli sono i virus (in particolare il virus della poliomielite e il virus del vaiolo), in quanto per poterli osservare è necessario l'utilizzo del microscopio elettronico, che ha un potere di risoluzione altissimo. I batteri ed i protozoi sono un po' più grandi e possono essere osservati con un microscopio ottico, che ingrandisce un centinaio di volte.
Di solito i microrganismi sono unicellulari, ma talvolta si possono formare aggregati pluricellulari in cui tutte le cellule sono equivalenti. Quindi sono sicuramente molto meno complessi e solo occasionalmente possono presentare cellule o gruppi di cellule morfologicamente e funzionalmente differenziate.

Classificazione dei microrganismi:

Data la grande varietà del mondo microbico è necessario classificare i microorganismi, per far questo possiamo utilizzare numerosi criteri. La ***tassonomia degli organismi viventi*** è quella parte della scienza che si occupa di ordinare e denominare in maniera univoca gli organismi biologici. Gli organismi viventi sono classificati in tre domini: Bacteria, Archea e Eukarya. All'interno di ogni dominio si definiscono in ordine gerarchico una serie di raggruppamenti stabiliti sulla base di caratteri fenotipici e genotipici: phylum, classe, ordine, famiglia, genere e specie. La specie è un insieme coerente di organismi che possiedono un elevato grado di omologia. Quindi per definire una specie è necessario utilizzare dati fenotipici e genotipici. In ogni specie vi possono essere varianti diverse.

- Classificazione in base alla complessità strutturale:

- ***Struttura acellulare:*** hanno questa organizzazione cellulare soltanto i ***virus*** che sono talmente semplici da aver perso la capacità di riprodursi autonomamente. Sono tutti parassiti endocellulari obbligati, perché non sono in grado di svolgere le loro attività autonomamente ma devono parassitare una cellula superiore ed utilizzarne il metabolismo.

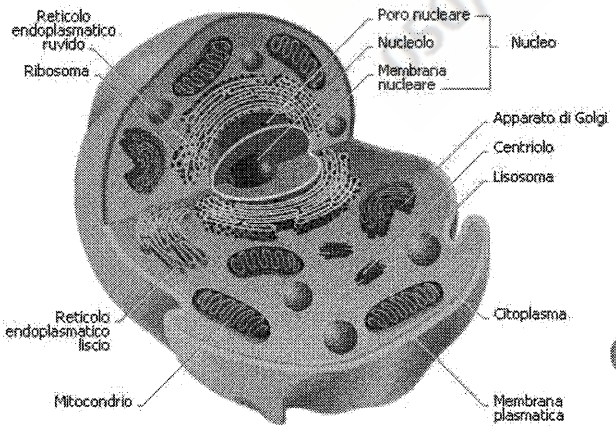
MASTER COPY
Tel. 050 8312126
Cell. 388 9837745

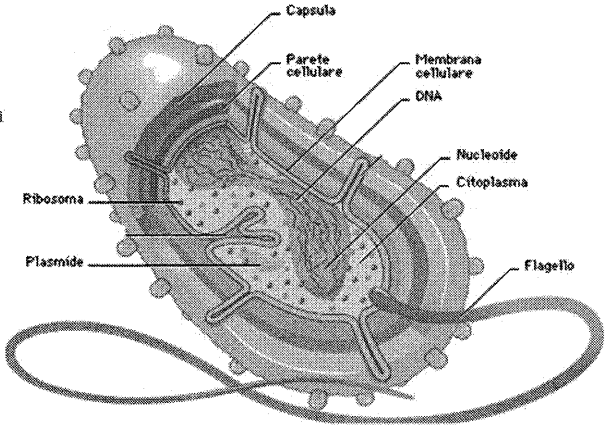
• ***I procarioti:*** sono piuttosto semplici e comprendono: i ***batteri***, cellule capaci di vita autonoma; fra questi vi sono tuttavia parassiti endocellulari obbligati come le ***rickettsie*** e le ***clamidie***. A questo gruppo appartengono anche le ***spirochete***, batteri spiraliformi.

• ***Gli eucarioti:*** sono più complessi ed evoluti comprendono: i ***miceti o funghi*** che possono essere uni o pluricellulari con parete spessa; ed i ***protozoi***, microrganismi unicellulari privi di parete.

- Confronto fra cellula procariotica e cellula eucariotica:

Caratteristiche	Eucarioti	Procarioti
Gruppi principali	Alghe, funghi, protozoi, piante, animali	Batteri
Dimensioni	> 5 µm	Da 0,5 a 3,0 µm
Organizzazione nucleare	Nucleo con membrana, cromosomi, fuso mitotico e genoma diploide	Nessuna membrana nucleare, cromosoma unico, genoma aploide
Riproduzione	Sessuata e asessuata	Asessuata (scissione binaria)
Strutture citoplasmatiche	La membrana contiene steroli; nel citoplasma vi sono mitocondri, corpi del Golgi, reticolo endoplasmatico, ribosomi 80S	La membrana non contiene steroli (eccetto micoplasmi), sono assenti mitocondri, corpi del Golgi, reticolo endoplasmatico. I ribosomi hanno coefficiente di sedimentazione 70S
Parete	È presente in funghi e piante	Sempre presente (eccetto micoplasmi)
Movimento	Flagelli complessi	Flagelli semplici con un unico filamento
Metabolismo	Limitata variabilità metabolica; reazioni di ossido – riduzione nei mitocondri	Numerose attività metaboliche con diverse fonti energetiche, respirazione aerobia, anaerobia, fermentazione; reazioni di ossido – riduzione a livello di membrana

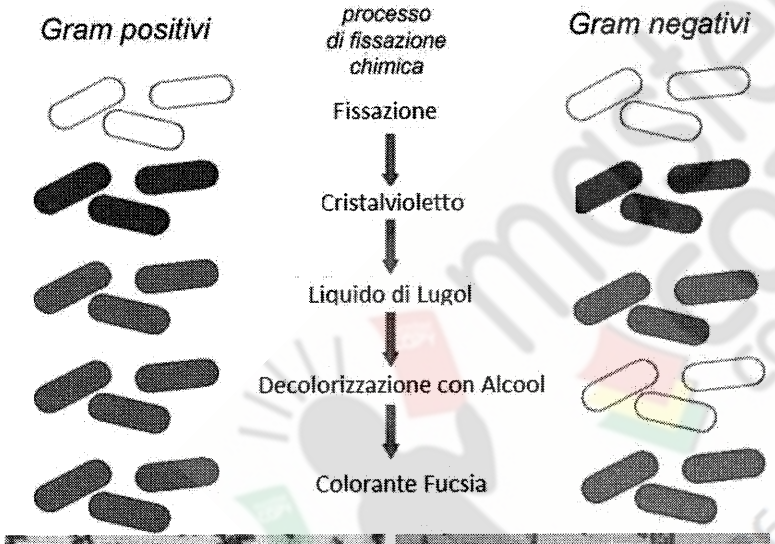




- Classificazione in base a criteri morfologici: i caratteri morfologici sono rappresentati dalle proprietà delle cellule e dalle colonie batteriche. Comprendono tutte le caratteristiche fenotipiche, ovvero tutto ciò che non prevede l'analisi di DNA o RNA.

1. Caratteri tintoriali → colorazione di Gram: per poter osservare i batteri al microscopio ottico è necessario colorarli; fu per questo che verso la fine dell'800 *Hans Christian Joachim Gram*, mise a punto la ***colorazione di gram***, che permetteva di suddividere i batteri in due gruppi importanti: i gram positivi ed i gram negativi a seconda del colore che presentavano alla fine di questo procedimento.
Per la colorazione di gram si usano vetrini portaoggetti sui quali viene spalmata con un'ansa una piccola quantità della coltura batterica che voglio osservare; si fa asciugare all'aria ed infine si fissa con il calore della fiamma che fa aderire le cellule batteriche alla superficie del vetrino, in modo che non vengono portate via con la colorazione.

- ***Procedimento:***



- ***Colorazione primaria:*** preparare lo striscio del batterio e trattarlo con il colorante ***cristal violetto*** (colore viola). In questa fase sia batteri gram positivi che i batteri gram negativi si presentano di colore viola.

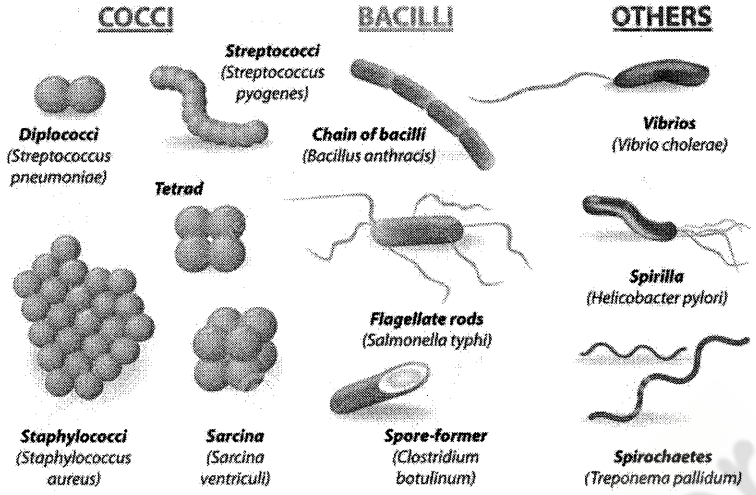
- ***Mordente:*** fase di fissaggio del colore. Si copre il preparato con una ***soluzione di iodio e ioduro di potassio***, che si complessa sia con il cristal violetto che con il materiale cellulare, quindi fissa il colore. Tutti i batteri saranno sempre colorati di violetto.

- ***Decolorazione:*** si aggiungono allo striscio alcune gocce di ***etanolo***. In questa fase il colorante viene lavato via dai gram negativi, mentre i gram positivi trattengono parte del colorante rimanendo intensamente colorati di violetto.

- ***Colorazione di contrasto:*** trattare il preparato con ***safranina***, un colorante rosso.
I batteri gram negativi sono ora colorati di rosso, mentre i gram positivi rimangono di colore violetto.

La morfologie, le caratteristiche tintoriali e la disposizione delle singole cellule batteriche possono essere osservate solo con il microscopio ottico dopo aver allestito un vetrino con il metodo di gram.

2. Forma: si hanno due forme principali: i ***cocchi***, per la maggior parte esattamente sferici, se reniformi prendono in nome di ***neisserie*** e ***pneumococchi*** se con forma a punta di lancia; ed i ***bastoncelli***, che se hanno forma bastoncellare, dritta e regolare prendono il nome di ***bacilli***, se incurvati a virgola si parla di ***vibrioni*** ed infine se sono avvolti a spirale prendono il nome di ***spirilli***.

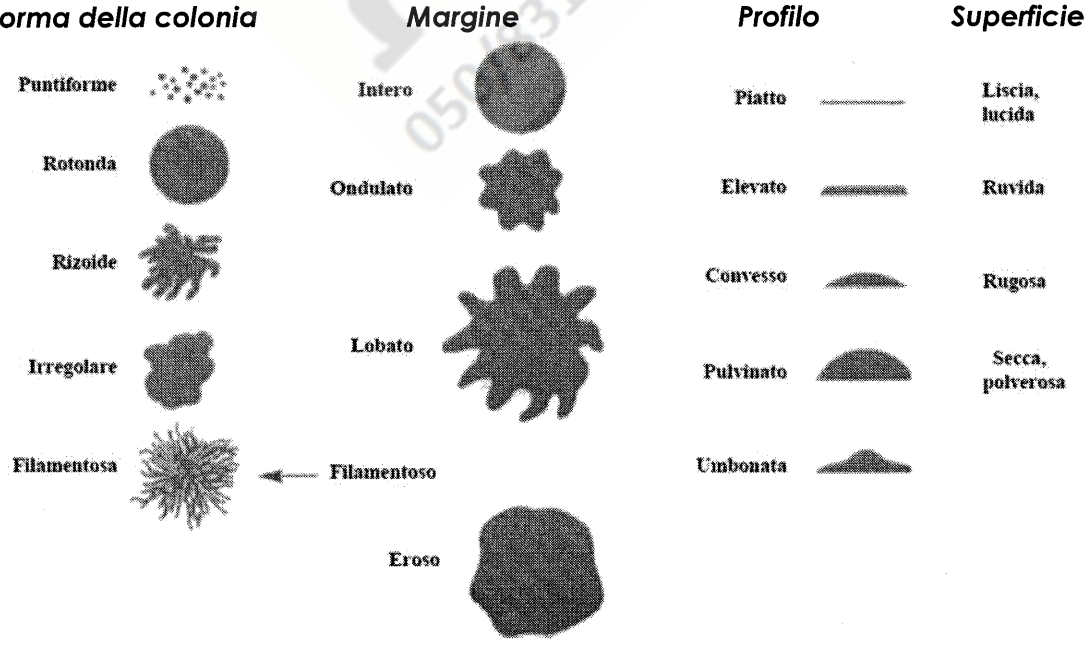


3. Disposizione: come una cellula batterica si dispone rispetto alle altre, ha molto rilievo nei batteri ed è il risultato di una non completa divisione cellulare.

- ***Cocchi:*** si organizzano in funzione del piano di divisione cellulare. La divisione secondo un solo asse porta alla formazione di ***diplococchi***, cellule unite a due a due; ***streptococchi,*** formati da cellule figlie che rimangono unite ed a loro volta si dividono secondo piani tra loro paralleli e perpendicolari al piano di allungamento della catena di cellule.
Se invece la divisione avviene secondo assi casuali irregolari si ha la formazione degli ***staphylococchi*** *(grappoli)*, ovvero ammassi irregolari di cellule.

- ***Bacilli:*** anche in questo caso si può avere una disposizione regolare o irregolare, sempre a seconda dei piani di divisione.

4. Caratteri macroscopici → morfologia delle colonie: i batteri possono essere osservati ad occhio nudo in forma di colonie batteriche: il prodotto di una singola divisione batterica che contengono milioni di cellule batteriche. Le colonie possono essere osservate sulla superficie di terreni di coltura solidi, ovvero mezzi artificiali che contengono vari nutrienti in grado di sostenere la crescita batterica.



- *Classificazione in base a caratteri biochimici e metabolici:* permettono di identificare una specie batterica o varianti (biotipi), tramite l'analisi del "profilo" biochimico. Ad esempio: *necessità o meno dell'ossigeno per la crescita (aerobi o anaerobi); utilizzazione di alcuni zuccheri come unica fonte di carbonio; produzione di certi substrati; utilizzazione del citrato; produzione di certi enzimi e molti altri.*
Esistono kit commerciali che permettono di eseguire contemporaneamente sullo stesso isolato clinico, 20 o più test biochimici miniaturizzati. Dopo incubazione si confrontano i risultati con quelli prodotti da batteri noti di diversi generi e specie e si può determinare la specie batterica della coltura analizzata.

6 Marzo 2015

- *Classificazione in base a caratteri sierologici:* permettono di identificare una specie batterica o varianti all'interno di essa (sierotipi / sierogruppi) tramite la rilevazione delle caratteristiche antigeniche (presenza di molecole di superficie riconosciute da anticorpi specifici prodotti dal sistema immunitario di animali dell'uomo). ***Antigene:*** molecola che l'organismo percepisce come estranea, i batteri sono mosaici di antigeni, perché contengono numerose molecole che l'organismo riconosce come non self.
Molti batteri patogeni esistono in natura come varianti antigeniche multiple (vantaggio selettivo); ad esempio il virus dell'influenza che ogni anno varia il suo repertorio antigenico. Questa variabilità è un vantaggio selettivo nei confronti dell'ospite perché hanno più possibilità di riprodursi in esso.

- *Classificazione in base a caratteri genetici:* è il metodo più accurato di identificazione di una specie, analizza una serie di caratteri genetici uguali: *percentuale di guanina e citosina (GC radio)* in quanto due microrganismi appartenenti alla stesa specie devono avere un contenuto equivalente di guanine e citosine ed un'omologia di sequenza del DNA di almeno il 70%; *percentuale di ibridazione del DNA*, che consente di misurare il grado di omologia delle sequenze genomiche, è considerato il metodo di riferimento per stabilire il grado di relazione genetica tra due specie; *analisi dei plasmidi; analisi delle sequenze codificanti per l'RNA ribosomiale; analisi di frammenti di DNA cromosomico generati con enzimi di restrizione; analisi della sequenza nucleotidica di particolari regioni genetiche o di tutto il genoma*.

Sequenziare: stabilire la sequenza delle basi di tutti i geni di un genoma. Quest'operazione è stata fatta per il genoma umano (progetto genoma umano) ed anche su molti batteri (patogeni, saprofiti..) di cui sappiamo esattamente tutta la sequenza di basi nel DNA.
Nel 1995 sono state ottenute le sequenze complete del genoma di due specie batteriche: *Haemophilus influenzae* e Mycoplasma genitalum; da allora sono stati sequenziati e pubblicati più di 300 genomi batterici appartenenti per lo più a batteri patogeni, ma anche a normali saprofiti ambientali.
Circa 940 genomi batterici sono al momento in corso di sequenziamento.

Nomenclatura binomiale:

Ogni specie è identificata da una denominazione binomiale che fu ideata da Linneo, quindi i nomi dei microrganismi sono in latino o in greco in tutto il mondo, e vengono scritti in corsivo.

MASTER COPY
Tel. 050 8312126
Cell. 388 9837745