Lezione Microbiologia 04.03.2019.

Email Docente: giulia.freer@med.unipi.it

Indirizzo esame: "Centro Retrovirus", parcheggio del mercato, Via del Brennero 2, Pisa. Esame scritto con 3 domande aperte per microbiologia. **Pre-appello:** 9 maggio ore 10.30 cl3.

15 aprile recupero lezione, mercoledì prossimo lezione (confermata).

Libro: Microbiologia e Microbiologia Clinica per infermieri (verde). Autori: De Grazia, Ferraro, Giammanco.

Prospettiva storica: classificazione e struttura dei batteri.

La teoria della generazione spontanea della vita dalla materia non vivente, risale ad Aristotele. E per più di 2000 anni rimase indiscutibile. La natura epidemica delle malattie infettive è stata sempre abbastanza nota, ma ad esempio: ciò che causa la malaria (il termine "malaria" deriva da "cattiva aria", i "puzzi" delle paludi; le persone non sapevano come si sviluppasse, da cosa era dovuta tale malattia infettiva), non era così chiaro tempo fa. Una volta ci si basava prevalentemente su ciò che aveva promulgato Aristotele -i suoi scritti-. Ma —> secondo Aristotele, *la materia vivente poteva nascere dalla materia inorganica* ("TEORIA DELLA GENERAZIONE SPONTANEA": non c'era bisogno di una cellula progenitrice per dare origine ad un essere vivente).

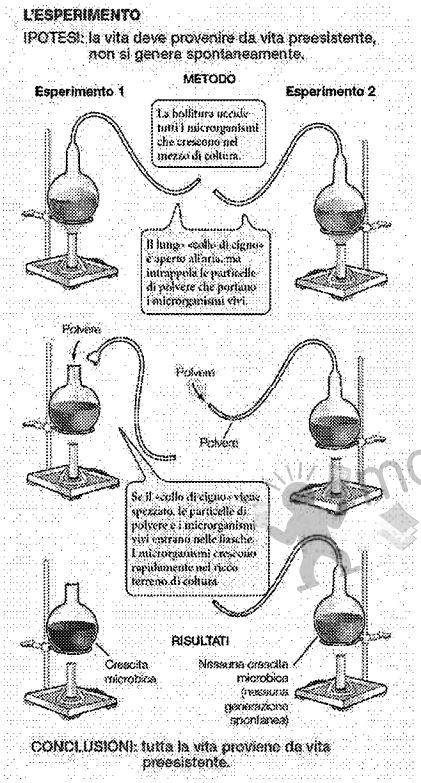
POI ⟹ 1600, Francesco Redi si chiese da dove provenissero le mosche, da "cosa nascessero": secondo Aristotele, spontaneamente dalla carne marcia. Egli considerò un vaso scoperto con della carne: qua vi nascevano mosche, in un altro vaso, però sigillato no. La teoria della generazione spontanea "fu considerata dannosa" per le tesi successive.

nel 1650 circa ⟹ Un mercante, Von Leeuwenhoek mise a punto un microscopio rudimentale, che usandolo e mettendolo davanti agli occhi, riuscì a vedere degli esseri microscopici (microbi, come le cellule tra i denti, gli spermatozoi): egli constatò l'esistenza di un "mondo al di sotto del potere risolutivo del nostro occhio". Questo mercante di stoffe mandò i suoi scritti, su ciò che riuscì a vedere, riguardo agenti microbici, anche se nessuno associava quest'ultimi all'eziologia delle malattie.

Luigi Pasteur ⟹ E' considerato il padre della microbiologia (1882-1895): fece una prova talmente inoppugnabile, che nessuno poteva smentirlo. Egli mise a punto un brodo fatto col fieno, che dopo un tot. di tempo "marciva" (secondo la teoria della generazione spontanea, tale "marciume" nascena dal nulla, dall'aria). Il "collo di cigno" di tale beuta, nel quale era contenuto il brodo e che è ancora sterile, venne piegato e poi riscaldato, facendolo bollire (sterilizzazione totale) e lo lasciò così. —> lo scienziato aspettò, lasciò uscire l'aria, ma essa rientrò, dato che l'ossigeno era ritenuto necessario. Piano piano, entrò della polvere, intrappolata nell'ansa del collo del cigno; allora il brodo marciva, soltanto se qualcosa dall'esterno, entrava nella beuta. In assenza della polvere, e delle spore perciò, il brodo marciva, solo se qualcosa entrava dall'esterno. La teoria della generazione spontanea fu smentita.

NON ESISTE NIENTE CHE NON NASCE DA QUALCOSA CHE ERA GIA' NATO PRIMA. Non esiste un batterio che nasce dal niente.

master COPY



Tra l'altro Pasteur, cominciò a sospettare che i batteri che osservava nel brodo, potessero somigliare a quegli agenti presenti durante le malattie: alcune malattie infettive, egli sostenne, sono dovute al fatto che qualcosa, nel nostro organismo, arriva dall'esterno, e perciò si ammala ("TEORIA DEL GERME"). Ciò derivò nel momento in cui Pasteur fu richiamato, per il problema del "mosto del vino", che diventava "marcio", imbevibile: egli guardò nel microscopio, e notò che nel mosto che sarebbe diventato vino, vi erano dei "lieviti" (cioè batteri); nel "mosto marcio", tali lieviti non erano presenti, ma vi erano delle forme più piccole, che degradavano il mosto. Bollendo il mosto **(pastorizzazione)**, e mettendoci quei miceti, i lieviti, esso —> diventava sempre vino (succede anche nei giorni d'oggi: il mosto viene riscaldato, e poi vi viene aggiunto quei lieviti che lo portano verso quel vino che devve essere prodotto. Perciò Pasteur:

1) dimostrò definitivamente sbagliata la teoria della generazione spontanea;
2) identifica degli agenti responsabili della fermentazione (lieviti, non processi solo chimici) e della decomposizione (batteri) dei cibi;
3) sviluppa la teoria della pastorizzazione;
4) porta prove a sostegno dell'origine microbica delle malattie infettive (baco da seta, carbonchio);
5) ideò la teoria del germe: le malattie infettive originano da germi (e non ad es. dall'aria inquinata o miasmi...);
6) sviluppa i vaccini contro la rabbia, e contro altre malattie;

Fine 1800: ⟹ Robert Koch (1843-1910):

1) fornì le prove definitive che la teoria del germe è giusta;
2) identifica l'agente eziologico del "carbonchio" e della "tubercolosi"; il carbonchio era una malattia batterica particolare, presa prevalentemente dalle pecore, nei greggi; oggi la tubercolosi è curabile con antibiotici;
3) introduce delle tecniche di coltura pura: mise a punto delle colture di germi, come quelli della tubercolosi.

Postulati di Koch: criteri da utilizzare per dimostrare che un determinato microrganismo è causa della malattia

in questione. Sono quattro, per identificare un microbo come agente eziologico di una malattia:

1. Il germe deve essere presente nell'organismo, nel corso della malattia;
2. deve essere isolato in forma pura, cioè cresciuto in vitro; (non era semplice isolare in forma pura, ai tempi di Koch, un germe);
3. gli isolati devono dare la stessa malattia, e rinoculati in animali sensibili;
4. il germe deve essere re-isolabile, dalla nuova vittima.

Quasi tutte le malattie infettive, seguono tale postulato (come il "treponema della sifilide").

Una volta accettata la teoria del germe, nacque la "TERAPIA ANTIBATTERICA", (la vita dell'uomo aumentò notevolmente: da una media di 40 anni, ad una media di 70) la più rilevante scoperta medica del diciannovesimo secolo. "Trovato il nemico, sarà ideata la terapia da attuare per combattere l'agente esterno".

Nel 1910 ⟹ Ehrlich sviluppò l'idea del proiettile magico. Egli lavorava in un'industria dove i tessuti venivano colorati: ciò che colorava il batterio, ma non il tessuto circostante, poteva curare la malattia causata dal batterio stesso. Dopo aver provato circa 650 colori diversi, in 7 anni, scoprì il "Salvarsan", un farmaco per trattare la sifilide.

Nel 1928 ⟹ La fortuna in realtà, la ebbe Alexander Fleming, che scoprì la penicillina, il primo farmaco antibatterico specifico; egli mise in una piastra, degli strafilococchi, uccisi in parte da una "muffa" (creazione dell'alone d'inibizione, un qualcosa che uccideva gli strafilococchi). Fu il primo farmaco che colpiva i batteri, senza causare danni all'ospite.

Nel 1932 ⟹ Damagk scoprì i sulfamidici,

Nel 1945 ⟹ venne scoperta la "streptomicina", attiva contro il batterio della tubercolosi. (M. tuberculosis).

Per la prima volta, furono scoperti farmaci che hanno una tossicità selettiva nei confronti di agenti microbici, e che non sono dannosi per l'ospite, per l'organismo.

Nel 1700 circa ⟹ (Non solo antibiotici) Edward Jenner (1749-1823), scoprì i *vaccini*, il primo vaccino che fu messo a punto, che prende il nome da "vacca": il primo vaccino fu ideato e messo a punto da un microbo delle vacche, per il vaiolo. Ciò che succedeva per le mungitrici del periodo, era che non si ammalavano di vaiolo; osservò che queste donne presentavano pustule sulla pelle, sulla mano, come quelle che apparivano sulle mammelle della vacca: la mungitrice perciò, contraeva la malattia dalla vacca; egli inoculò tale virus del vaiolo ad un bambino, che fu prelevato dalle lesioni delle mungitrici, presente in una famiglia dove era diffusa un epidemia del vaiolo, e vide che il bimbo poco dopo riuscì a sopravvivere. Tale vaccino provocava solo una pustula sulla faccia del bambino.

Dopo aver scoperto l'origine delle malattie infettive, Pasteur scoprì che alcuni germi sono attenuati se invecchiano in colture, ma riescono a servire lo stesso come vaccini.

⇒ La nascita dell'immunoprofilassi —> Vaccini introdotti: per il vaiolo (1700), per la rabbia (1885), la peste (1897), la difterite (1923), la pertosse (1926), la tubercolosi ed il tetano (1927), la febbre gialla (1935). Dopo la Seconda Guerra Mondiale: vaccino antipolio di Salk (IPV) (1955), vaccino antipolio di Sabin (OPV) (1962), Morbillo (1964), Parotite (Orecchioni) (1967), Rosolia (1970), Epatite B (1981).

DOMANDE TIPICHE DI ESAME.

1. **Perché Pasteur è definito il "padre della microbiologia moderna"?** Perché ha sconfitto la teoria della generazione spontanea: microbi originano da altri microbi; nacque successivamente la teoria del germe.
2. **E Koch che importanza ebbe?** Koch riuscì a dimostrare che la teoria del germe, che Pasteur aveva avanzato, era giusta, corretta, metodicamente dimostrata; dimostrò anche che il germe del "carbonchio" e della "tubercolosi" erano responsabili di queste due malattie.
3. **Cosa si intende per "proiettile magico"?** (Come nel caso degli antibiotici) Essi uccidono i batteri, senza uccidere i tessuti circostanti, sono farmaci selettivi; anche l'arsenico uccide il batterio, ma anche l'uomo malato.
4. **Perché se si guarisce dal vaiolo, non lo si contrae più?** Perché s'immunizza, si costruiscono "le difese immunitarie", gli anticorpi ovvero la protezione principale.

Il mondo microbico.

Il mondo microbico si compone di microbi composti da cellule, ma anche altri, come i virus, acellulati, senza alcuna struttura cellulare.

1) **"Microrganismi Acellulati"** —> virus. I virus sono studiati dalla virologia.

2) **"Microrganismi Cellulati"** —> (struttura cellulare) microrganismi a DNA, che viene trascritto in RNA, e poi tradotto in proteine. I microrganismi cellulati si dividono in procarioti ed eucarioti. I primi non hanno una membrana nucleare, sono senza organuli, come i batteri; i secondi sono i "miceti", ovvero i funghi (eurcarioti primitivi) ed i "protozoi parassiti". La differenza tra i due è medica, principalmente: gli antibiotici agiscono soltanto contro i batteri, e non contro i protozoi, che somigliano ancora di più a "noi", e quindi è ancora più difficile sconfiggerli; curarsi dalla malaria, non è certo come curarsi dalla bronchite, perché i farmaci sono pochi, e hanno effetti collaterali, in quanto il plasmodio della malaria è un eucariota, un parassita molto simile ai nostri componenti. I microrganismi cellulati sono studiati dalla batteriologia, micologia e protozoologia.

CLASSIFICAZIONE DEI MICRORGANISMI.

1) Eucarioti: (protozoi e funghi) sono tutti a DNA, hanno un nucleo ben distinto e circoscritto dalla membrana, hanno più cromosomi, sono costituiti da organuli, hanno un citoscheletro, sono di dimensioni maggiori, possono avere un movimento dovuto da filamenti.

2) Procarioti: (batteri) hanno un solo cromosoma, hanno un "nucleoide", non hanno organuli, sono costituiti da DNA, un groviglio di DNA da una parte, non circoscritto da membrana, hanno una parete cellulare rigida, che non consente movimenti (infatti i batteri non hanno citoscheletro), ma si muovono tramite flagelli, sono di 1 o 5 micro-metri.

3) Virus: possono essere a DNA, o RNA, non hanno citoplasma, non hanno una membrana, possono essere "nudi" o "rivestiti", sono immobili, sono l'anello mancante tra la materia animata ed animata; dimensione di circa 30-150 micro-metri; sono piccolissimi: serve il microscopio elettronico (1950); possono dare malattie gravissime.

◊ COME SI OSSERVANO I MICROBI?

Il limite di risoluzione (quello del nostro occhio è mille volte inferiorie, rispetto a quello del nostro occhio): la distanza più piccola fra due oggetti che consente di vederli come separati.
—> Occhio umano: riesce a vedere due oggetti separati se distano più di 200 micro-metri;
—> il microscopio ottico invece, 0,2 micro-metri (mille volte superiore l'occhio umano); cellule e batteri si osservano al microscopio ottico.
—> il microscopio elettronico, addirittura, 0,5 nano-metri, riesce infatti a distinguere immunogobuline, DNA, singole molecole .. (un millionesimo di millimetro). I virus, si osservano al microscopio elettronico, in quanto sono veramente piccoli (piccoli non significa meno dannosi).

1 La colorazione di Gram (Gram fu uno scienziato): è una tipica colorazione per visualizzare i batteri al microscopio ottico —> si strisciano i batteri su un vetrino da microscopia. Viene effettuato in questo modo:

1. tale vetrino era fissato al calore, con una fiamma;
2. poi si aggiunge una soluzione di cristal-violetto, che viene fatta precipitare; (colora tutto).
3. si lava e si aggiunge una soluzione iodio-iodurata, (fa precipitare il cristal violetto in tutti i batteri) per un minuto;
4. poi, si lava e si decolora con acetone-etanolo, (rimuove il colore solo dai Gram negativi, in quanto i Gram positivi restano colorati) per 30 secondi.

Con questa colorazione, si classificano i batteri in: 1) **Gram negativi** —> perdono la colorazione, quando si decolora con acetone-etanolo, non rimangono colorati, non trattengono la colorazione di Gram, ovvero il cristal-violetto, sono viola. 2) **Gram positivi** —> trattengono il colore, ovvero il cristal-violetto, rimangono colorati, sono viola.

Si colora infine il tutto, con la safranina ("colorazione di contrasto", che conferisce un colore tipico di rosa), per

rendere evidenti anche i Gram negativi.

E' importante colorare i batteri, altrimenti non si vedrebbero, e non si distinguerebbero (non si identificherebbero). Si può notare, per esempio, se è presente "liquor", e quindi iniziare la terapia anti-meningococco.

2 La colorazione di Ziehl-Neelsen: colorazione per quei batteri che non si evidenziano né col cristal-violetto, né con la safranina; è usata per batteri alcol-acido resistenti (resistono alla decolorazione con acido, che si fa durante tale colorazione). Tale colorazione serve per vedere il Mycobacterium tubercolosis ed altri batteri, che non si colorano al Gram. Tutte queste colorazioni sono utili per identificare tali batteri, visualizzarli. I passaggi sono questi:

1. si strisciano i batteri su un vetrino da microscopio;
2. si fissano al calore;
3. si aggiunge la carbofucsina e si flamba, un minuto;
4. si lava e si decolora con una soluzione alcol-acida;
5. si aggiunge il blu di metilene.



master copy

Batteri al microscopio ottico:

⇒ Cocchi Gram + positivi: sono viola; si possono trovare isolati, in un essudato, dopo isolamento, disposti a diplo, con spore deformanti, come nel tetano od a catenelle con spore.

⇒ Cocchi Gram - negativi: si possono trovare dopo isolamento, od inessudato.

Struttura dei batteri.

All'interno del batterio, è presente il "DNA batterico", con del citoplasma attorno; internamente vi è il nucleoide. Intorno infine, vi è la parete batterica, o cellulare. Componenti di un batterio:

1. **citosol:** è il citoplasma cellulare, con enzimi e sostanze nutritive;
2. nel citoplasma, vi è il **nucleoide,** con DNA circolare, una sola molecola circolare (mentre noi esseri umani abbiamo una doppia copia per ogni gene, siamo diploidi, i batteri sono aploidi, ovvero hanno una sola copia per un dato gene, con 5 milioni di coppie di basi azotate per DNA);
3. sempre nel citoplasma, vi è il **DNA plasmide, extra-cromosomico**, estremamente importante, che conferisce una certa caratteristica, propria per ogni ceppo di ogni specie, come la capacità di secernere tossine, ed usare alcuni substrati, o resistere ad alcuni antibiotici;
4. sempre nel citoplasma, vi sono **ribosomi ed alcuni granuli di sostanze**, chiamati **inclusioni**; non vi sono comunque, organuli. Il ribosoma è spesso bersaglio di antibiotici, perchè è molto diverso dal ribosoma eucariotico;
5. vi sono anche degli involucri esterni: tutti i batteri hanno una **membrana cellulare**, diversa da quella degli eucarioti, in quanto, per esempio, non contiene colesterolo, è sempre a struttura bi-laminare (doppio strato fosfolipidico), con funzione isolante ed osmotica, in quanto consente alla cellula di "conservare" la sua concentrazione di elettroliti, proteine, ed impedisce ad alcune sostanze di uscire dalla cellula. Al di fuori della membrana batterica, vi è, (esclusivamente per i batteri), la **parete cellulare**, estremamente importante (un altro involucro esterno), è una struttura rigida, costituita da peptidoglicani, responsabile della forma dei batteri, come nei bacelli, oppure nei batteri tondi, od a spirale; bersaglio della penicillina è proprio la parete batterica. Un'altra struttura-involucro esterno, è la **capsula**, propira di alcuni ceppi di una specie (non tutti i batteri hanno la capsula): sono i "Ceppi S" (cioè "liscio") ed i ceppi non capsulati, i "Ceppi R" (cioè "ruvido"). E' una struttura grazie al quale i batteri si proteggono dai fagociti, per sfuggire dai macrofagi e proteggersi dalla fagocitosi. E' perciò molto importante per i batteri patogeni, per la loro sopravvivenza nel nostro corpo; per noi è importante perché siamo riusciti a prelevare tale capsula, da usare come vaccini per i batteri stessi.
6. Solo per i batteri Gram negativi, vi è la **membrana esterna**, situata tra la capsula e la parete esterna.
7. Per le appendici batteriche, vi sono principalmente due forme di estroflessioni, ovvero i **pili** e le **fimbrie**: delle estroflessioni che servono per adesione e scambio di materiali, che "si attaccano" (come i "seria-gonorree",