LMSE Raccolta Quaderni

CORINEBATTERI

Tassonomia e morfologia

I corinebatteri sono batteri Gram+, asporigeni, a forma bastoncellare, con estremità arrotondate e dilatate a forma di clava, sprovvisti di flagelli e di capsula. La lunghezza varia da 2 a 6 μm e il diametro è compreso tra 0,5 e 1 μm.

Coltivazione

Nel terreno di Loeffler e in agar-sangue le colonie hanno colorazione crema o grigiastra; in agar-tellurito si presentano di color grigio scuro o nero per via della riduzione intracellulare del tellurito a tellurio.

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

E' un aerobio obbligato. Per effettuare l'isolamento primario viene usato terreno con siero coagulato di Loeffler. L'agar-sangue o agar-cioccolato, arricchito di tellurito di potassio per inibire lo sviluppo della maggior parte degli altri batteri (normalmente presenti nella gola), risulta un terreno selettivo per *C. diphtheriae*.

C.diphtheriae si riproduce bene su terreni contenenti gli aminoacidi essenziali e una sorgente di energia come glucosio o maltosio.

I bacilli difterici hanno la caratteristica di fermentare rapidamente il glucosio e lentamente il maltosio, con produzione di acidi ma non di gas.

Patogenicita'

Esistono ceppi tossigeni e non tossigeni; tale differenza è data dalla capacità di produrre la tossina difterica.

Solo i ceppi lisogeni per il profago beta producono la tossina difterica che uccide le cellule bloccandone la sintesi proteica. Tale azione è dovuta alla sua conversione in un enzima che inattiva il fattore EF-2.

In natura l'unico sito d'infezione è costituito dal tratto superiore dell'apparato respiratorio di uomo e cavallo.

Nell'uomo i batteri elaborano la tossina sugli strati superficiali della mucosa, provocando necrosi e portando alla formazione della pseudomembrana difterica

Immunita' ed epidemiologia

Nelle aree in cui la difterite non è endemica, la maggior parte dei bambini, a meno che non venga immunizzata artificialmente, diviene fortemente sensibile entro pochi mesi dalla nascita, per cui è raccomandata una vaccinazione precoce.

L'incidenza dei portatori di *C.diphtheriae* tossigeno nelle grandi città raggiungeva il 5%; Tale percentuale è calata drasticamente con l'introduzione della vaccinazione di massa.

Diagnosi di laboratorio

Una diagnosi sicura di difterite può essere di solito posta solo con l'isolamento dei bacilli tossigeni dalla lesione primaria. L'essudato della lesione deve essere inoculato in terreno di Loeffler, in una piastra agar-sangue e in un'altra di agar-tellurite. Dopo un intervallo di 24 ore, occorre esaminare ogni coltura ed eseguire strisci da ogni tipo di colonia. Una volta identificati i corinebatteri, occorre trapiantarli in terreno di Loeffler e saggiarli per la produzione della tossina.

Terapia

Nei casi sospetti di difterite è necessario effettuare una pronta terapia con antitossina. L'antitossina deve essere somministrata per via intramuscolare in dose unica e ad alta concentrazione.

Sebbene tali bacilli siano sensibili alla penicillina, alle tetracicline e alla eritromicina, alla terapia antibiotica si associa spesso quella con l'antitossina.

CORYNEBACTERIUM GRUPPO JK

E' un gruppo recentemente identificato, isolato da sangue, tessuto, fluido cerebrospinale, fluido peritoneale e siti genitourinari. Molte infezioni hanno luogo in pazienti con granulocitopenia. Questi organismi sembrano far parte della normale popolazione microbica della pelle negli individui sani.

Alla colorazione Gram appaiono di forma coccoide o coccobacillare. Le colonie crescono lentamente; sono piccole grigie o bianche, e di solito non emolitiche su agar-sangue. Al contrario degli altri corinebatteri non producono ureasi e non riducono nitrato. Sono caratterizzati da resistenza multipla agli antibiotici.

CORYNEBACTERIUM HAEMOLYTICUM (ARCANOBACTERIUM HAEMOLYTICUM)
E' causa di faringiti e ulcere della pelle.
La morfologia è simile a *C. diphtheriae*; la crescita su tellurite è povera. Le colonie su agar-sangue sono piccole (0,1mm a 24 ore e 0,5 mm a 48 ore), con una zona circostante di emolisi. La fermentazione del glucosio e del maltosio avviene entro le 24/48 ore.

LISTERIA
Descrizione del genere
Il genere *Listeria* comprende sei specie, tra cui *Listeria monocytogenes*; sono organismi Gram+, asporigeni, dalla morfologia corta e regolare, che presentano motilità a 28°C grazie all'attività di alcuni flagelli peritrichi (da 1 a 5). Generalmente le *Listerie* si dispongono come cellule isolate o in brevi catenelle, anche se si possono trovare filamenti di 6-20 μ nelle colture più vecchie. In terreno solido le colonie sono piccole, mucose e di 1-2 mm dopo 24-48 h di incubazione a 37°C. La temperatura di crescita ottimale è compresa tra i 30°C e i 37°C, anche se si è notata crescita per pochi giorni addirittura a 4°C.
Listeria spp. sono anaerobi facoltativi, produttori di catalasi, ma negativi per il test dell'ossidasi, producono acidi dalla fermentazione del D-glucosio e da altri zuccheri.

Habitat naturale
Le specie appartenenti al genere *Listeria* si trovano distribuite diffusamente nell'ambiente: dal suolo alla materia vegetale in decomposizione, all'acqua, ai cibi freschi e lavorati (latte fresco, formaggi ed altro) e da portatori sani sia umani che animali.

Significato clinico
Listeria monocytogenes è un patogeno facoltativo intracellulare che può crescere all'interno di macrofagi, di cellule epiteliali e in colture di fibroblasti. Tutti i ceppi virulenti producono un'emolisina (listeriolisina O) che è geneticamente correlata alla Streptolisina O e alla pneumolisina, necessaria perché il batterio venga rilasciato dopo la fagocitosi e la conseguente crescita intracellulare.
In esseri umani adulti, *Listeria monocytogenes* causa principalmente meningiti, encefaliti e setticemie; i pazienti anziani o immunodepressi (trapiantati, affetti da linfoma e AIDS) sono particolarmente suscettibili.
Il tropismo di *Listeria monocytogenes* per il Sistema Nervoso Centrale (SNC) è causa di serie patologie, spesso caratterizzate da alta mortalità (dal 20 al 50%) o da conseguenze neurologiche tra i sopravvissuti.
Nelle donne in gravidanza *Listeria* spesso causa una patologia batteriemica simil-influenzale che, se non trattata, potrebbe portare a complicazioni risultanti in aborti spontanei o nascite premature.
Sono state descritte due forme di malattia neonatale: una ad esordio precoce (acquisita nell'utero per via transplacentale) ed una ad esordio tardivo (acquisita all'atto della nascita o subito dopo). La prima, detta anche Granulomatosi infantisettica se non opportunamente trattata è associata ad un'alta percentuale di mortalità. La malattia ad esordio tardivo si verifica due o tre settimane dopo la nascita in forma di meningite o meningo-encefalite con setticemia.
Negli adulti sani la maggior parte delle infezioni è asintomatica o si presenta come una lieve sindrome simil-influenzale con, a volte, complicanze gastrointestinali.
La meningite è la forma d'infezione da *Listeria* più comune tra gli adulti, benchè i segni clinici e i sintomi della meningite causata da questo microrganismo non sono specifici, la *Listeria* dovrebbe essere sempre sospettata in pazienti trapiantati, affetti da tumore o in età avanzata.
Una diagnosi precoce può essere fatta ricercando *Listeria monocytogenes* nel sangue materno; alla nascita gli organismi vanno ricercati nel fluido cerebrospinale (CSF), nel sangue, nel liquido amniotico, nelle secrezioni respiratorie, nell'aspirato gastrico o nel meconio del neonato.

Diagnosi di laboratorio
Campioni di liquor colorati col metodo Gram non evidenziano la presenza di *Listerie*, perché sono batteri che generalmente si presentano in concentrazioni di 100-1000 volte minori rispetto a quelle dei batteri causa di meningite.
Si osservano coccobacilli Gram +, intra ed extracellulari in preparazioni che si colorano positivamente per *Listeria*, è comunque necessaria una certa attenzione vista la somiglianza con *Corynebacterium, Streptococcus pneumoniae, Enterococcus*.

EMSE Riservato agli studenti

Il genere *Listeria* cresce bene sui più comuni terreni di laboratorio, la β-emolisi si agar sangue ne permette il riconoscimento da batteri simili, per l'identificazione può essere poi utile l'utilizzo di agar semisolido o terreno liquido per evidenziarne la motilità.

Terapia e profilassi
Penicillina ed ampicillina da sole o in combinazione con gentamicina sono i farmaci d'elezione per le infezioni da *Listeria monocytogenes*. L'eritromicina può essere utilizzata in pazienti allergici alla penicillina. E' stata osservata resistenza al trimethoprim ed alle tetracicline.
Essendo le *Listerie* ubiquitarie, è difficile un controllo efficace, per le persone ad alto rischio (donne in gravidanza ed immunodepressi) si sconsiglia il consumo di cibi crudi o poco cotti, formaggi freschi o verdure crude non lavate.

CLOSTRIDI

Tassonomia
Il genere *Clostridium* comprende bacilli anaerobi, Gram-positivi, capaci di formare endospore, catalasi-negativi.

Morfologia e coltura
Forma bastoncellare, con dimensioni comprese tra 3-8 μm; formano spore con caratteristica posizione terminale o subterminale e diametro eccedente quello delle cellule che le contengono.
I clostridi crescono bene in anaerobiosi su terreni al sangue dopo 1-2 giorni di incubazione.

Epidemiologia
sono ampiamente presenti in natura, sul suolo e in ambiente acquatico, essendo per la maggior parte mesofili. Alcuni membri sono residenti in diversi siti anatomici dell'uomo senza essere responsabili di manifestazioni patologiche. In particolare, numerose specie fanno parte della popolazione batterica residente dell'intestino umano.

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS
Fisiologia e struttura
Clostridium perfringens è la specie più frequentemente isolata dai campioni clinici, associato a semplice colonizzazione oppure causa di grave malattia e morte. Bacillo di grandi dimensioni, di forma rettangolare, per il quale la produzione di spore è stata osservata raramente. E' uno dei pochi clostridi immobili, che tuttavia si caratterizza per una crescita a rapida diffusione; è emolitico e metabolicamente attivo. La produzione delle 4 principali tossine letali (alfa, beta, epsilon e iota) viene utilizzata per suddividere i ceppi isolati in 5 tipi (da A a E).
La tossina alfa, la più importante e la sola ad essere prodotta da tutti i *C.perfringens*, è una lecitinasi (fosfolipasi C) che provoca la lisi degli eritrociti, piastrine, leucociti e delle cellule endoteliali.
La tossina beta è responsabile delle lesioni necrotiche.
La tossina epsilon è una protossina che aumenta la permeabilità vascolare della parete gastroenterica.
La tossina iota ha attività necrotica e aumenta la permeabilità vascolare.
L'enterotossina è una proteina termolabile prodotta nel colon e rilasciata durante la formazione delle spore, modifica la permeabilità di ileo e digiuno.

Sindromi cliniche
Mionecrosi (gangrena gassosa) dovuta alla penetrazione dei clostridi nei tessuti attraverso un trauma; essi generano una estesa necrosi a carico dei muscoli. Può portare alla morte nel giro di 2 giorni.
Cellulite, fascite e altre infezioni dei tessuti molli poiché sono anaerobi sono in grado di germinare e di crescere in ferite profonde che diventano necrotiche in seguito a una minore irrorazione di sangue.
Intossicazione alimentare deriva dall'ingestione di prodotti a base di carne contaminati da molti microrganismi (10^8-10^9).
Enterite necrotizzante, setticemia.

EMSE - Raccolta Dispense

Identificazione
L'essudato viene coltivato in brodo tioglicolato e su piastre di agar-sangue che vengono incubate sia aerobicamente che anaerobicamente. La presenza di bastoncelli G+ che crescono solo in anaerobiosi è un indice certo della presenza di clostridi.
C.perfringens è caratterizzato da violenta fermentazione nel latte in cui il coagulo è compreso dai gas che si formano durante la fermentazione del lattosio. I batteri che producono la tossina alfa possono utilizzare le lecitine in terreni al rosso d'uovo.

CLOSTRIDIUM DIFFICILE
Normale componente della popolazione batterica intestinale riesce a svilupparsi in grande quantità tale da provocare la malattia nei pazienti trattati con antibiotico poiché questi agenti alterano la normale composizione delle specie batteriche enteriche.
Provoca la malattia elaborando un'enterotossina e\o una citotossina.
Identificazione
La diagnosi viene confermata con l'isolamento del microrganismo da un campione di feci seminato in terreno di coltura fortemente selettivo, dalla dimostrazione della citotossina e dell''nterotossina mediante test immunoenzimatico.
Il test più specifico per la diagnosi di malattia da *C.difficile* è il saggio di citotossicità. L'impiego discontinuo di antibiotici è in genere sufficiente per guarire la malattia. Le recidive possono verificarsi nel 20-30% dei pazienti dopo il completamento della terapia poiché le spore sono resistenti al trattamento antibiotico.

Clostridium botulinum
Generalità:
Bacilli gram positivi, catalasi negativi, anaerobi obbligati, mobili, sporigeni.
Localizzazione: ubiquitari, presenti nel suolo e nelle acque, frequentemente anche nell'intestino di mammiferi, uccelli, pesci.

Identificazione:
Se il campione è contaminato da altri microrganismi lo si scalda per 10 minuti a 80° C per uccidere le forme vegetative, poi il campione trattato al calore viene coltivato su terreno ricco in anaerobiosi per far germinare le spore.
Caratteristiche colturali: la crescita ottimale si ha a 35°C in condizioni anaerobie dopo 1-2 giorni di incubazione. Su agar sangue si osserva emolisi. Se si utilizza agar a base di rosso d'uovo le colonie presentano una pellicola iridescente dovuta alla produzione di lipasi. L'identificazione può anche avvenire in base alle caratteristiche biochimiche, ad es. fermentazione del glucosio, oppure mediante l'analisi dei prodotti metabolici mediante gas cromatografia.
La ricerca di *C.botulinum* si può anche fare in immunofluorescenza, oppure si può ricercare la tossina da esso prodotta mediante tecnica ELISA.

Patogenicità:
È dovuta alla capacità di sopravvivere in condizioni ambientali avverse mediante la formazione di spore e alla produzione di tossine. Le spore sono notevolmente resistenti al calore, possono resistere a 100° C per diverse ore, sono distrutte in autoclave a 121° C per 15 minuti.
Le tossine vengono prodotte in seguito alla germinazione delle spore, sono resistenti al pH acido e pertanto possono attraversare lo stomaco senza essere denaturate per poi essere assorbite nel tratto gastrointestinale e raggiungere la circolazione.
Vi è produzione di una neurotossina altamente specifica per le terminazioni nervose colinergiche (sono state identificate 7 diverse molecole: A, B, C, D, E, F, G, la produzione di alcune delle quali e regolata da specifici batteriofagi) e di una tossina binaria.
La neurotossina attiva si presenta come una doppia catena polipeptidica costituita da una catena pesante e da una catena leggera responsabile dell'azione tossica; l'estremità carbossiterminale della catena pesante si lega ai recettori presenti sulla superficie esterna della membrana delle cellule nervose e la tossina penetra nella cellula tramite endocitosi mediata dal recettore di membrana a cui si è legata. L'abbassamento di pH nella vescicola endocitica provoca un cambiamento conformazionale della tossina: la regione amminoterminale forma un canale nella membrana della vescicola che permette il passaggio della catena leggera nel citoplasma della cellula. La tossina così liberata altera la funzionalità di una molecola di

EMERF Raccolta Quaderni

membrana essenziale nel processo di esocitosi dell'acetilcolina, pertanto blocca la trasmissione nervosa a livello delle sinapsi colinergiche prevenendo il rilascio del neurotrasmettitore.
La tossina binaria è costitituita da 2 catene polipeptidiche che prese singolarmente non hanno effetto tossico mentre sono estremamente tossiche in associazione. La catena pesante consente il legame alla membrana cellulare , la catena leggera ha attività enzimatica. A differenza della neurotossina agisce su vari tessuti: cervello, fegato, polmone, intestino, vasi.

Manifestazioni cliniche:
- *Botulismo alimentare*
- *Botulismo infantile*
- *Botulismo delle ferite*

Il botulismo alimentare è diffuso in tutto il mondo, maggiormente nei paesi a clima temperato e freddo. È dovuto all'ingestione di tossina preformata presente in cibo contaminato, ove è stata prodotta dal microrganismo sviluppatosi in seguito alla germinazione delle spore contaminanti. La maggior parte dei casi è associata al consumo di cibi inscatolati in casa. I sintomi insorgono dopo 1-2 giorni dal consumo dell'alimento contaminato: i pazienti manifestano debolezza, vertigini, stato confusionale, vista offuscata, pupille dilatate e fisse, bocca secca, incapacità di deglutire, difficoltà a parlare, dolori addominali, la febbre è assente. Progressivamente si ha paralisi flaccida che può portare alla morte per paralisi dei muscoli respiratori. La mortalità è circa del 60%.
Il botulismo infantile tipicamente colpisce i bambini di età inferiore a 1 anno ed è associato al consumo di cibo (es. miele) contaminato con le spore: la neurotossina viene prodotta in vivo dal microrganismo che colonizza il tratto gastrointestinale. I sintomi inizialmente non sono specifici, poi la malattia progredisce nella paralisi flaccida e può sopraggiungere arresto respiratorio. La mortalità è bassa: 1-2 %.
Il botulismo delle ferite è molto raro, è dovuto a produzione di tossina da parte del microrganismo sviluppatosi in una ferita infetta. I sintomi sono uguali a quelli del botulismo alimentare ma il periodo di incubazione è più lungo: 4 o più giorni.

Diagnosi:
- Isolamento del microrganismo dalle feci e dall'alimento.
- Dimostrazione dell'attività della tossina saggiando feci, alimento e siero del paziente.

Si fa in laboratori di riferimento tramite uno studio in vivo sul topo: il campione è suddiviso in due parti e una viene trattata con antitossina, entrambe vengono inoculate nel topo per via intraperitoneale. I topi trattati con la tossina da sola muoiono per paralisi flaccida, se il trattamento con antitossina protegge il topo si ha conferma dell'attività della tossina.

Terapia:
- Ventilazione
- Metronidazolo o penicillina
- Antitossina botulinica polivalente (contro A, B, E).

Serve a legare la tossina ancora circolante nel sangue e deve avvenire il più precocemente possibile perché una volta che la tossina si è legata alla membrana delle cellule nervose non è più neutralizzabile dall'antitossina.

BACILLUS
Tassonomia :
Bastoncini gram-positivi o gram-variabili aerobi o anaerobi facoltativi, sporigeni , si riproducono in maniera ottimale in condizioni di aerobiosi .
Attualmente il genere *Bacillus* comprende 51 specie ben descritte di cui la sola specie altamente patogena per l'uomo è il *Bacillus anthracis* , agente eziologico del carbonchio .

LMSE - Raccolta Quaderni

Morfologia :
Le cellule sono allungate con la parte terminale arrotondata o quadrata, hanno dimensioni comprese tra 0.5x1.2 a 2.5x10 µm, si presentano singoli o in catenelle di diversa lunghezza a seconda della specie.
Le endospore hanno di norma posizione centrale o paracentrale e il loro diametro non eccede mai quello della cellula madre o sporangio.
La maggior parte delle specie sono mobili (con l'eccezione di *B.antrhacis* che è immobile) e produttrici di catalasi .

Habitat Naturale
Per la maggior parte sono saprofiti, ampiamente distribuiti nel suolo, nell'acqua e nell'aria. Alcune specie sono termofile, acidofile o alofile, sono in grado di sopravvivere in forma di spore in condizioni ambientali estreme.

Significato clinico
La maggior parte dei microorganismi del genere *Bacillus* è raramente associata a malattie nell'uomo, le principali eccezioni riguardano il *B.antrhacis e B.cereus*

Bacillus anthracis :
Il carbonchio o antrace è una malattia che colpisce principalmente gli erbivori e che può essere trasmessa all'uomo. Le spore che si trovano nel suolo o sulla vegetazione vengono ingerite o inalate, oppure raggiungono il sottocutaneo attraverso abrasioni della cute o delle mucose. Le spore germinano nei tessuti e se i bacilli raggiungono il sistema linfatico o la circolazione può sopravvenire una setticemia fatale. Nell'uomo la malattia è considerata un rischio professionale per agricoltori, veterinari (**carbonchio agricolo**) o addetti alla lavorazione industriale delle pelli, della lana o del cuoio **(carbonchio industriale**).

Per essere completamente virulento *B.antrhacis* deve produrre la capsula e una esotossina proteica; il polipeptide capsulare rende il batterio in grado di eludere la fagocitosi, ma non la produzione di anticorpi protettivi .

L'esotossina proteica è formata da tre fattori: **fattore edemigeno** (EF), **antigene protettivo** (PA) e **fattore letale** (LF) che separatamente non esplicano attività tossica, ma la combinazione di PA con uno degli altri due fattori produce due distinte risposte tossiche: l'edema cutaneo e la morte .
Il fattore edemigeno è la forma inattiva dell'adenilato ciclasi, il PA si lega alla membrana citoplasmatica della cellula ospite interagisce con EF, il quale viene trasportato nel citoplasma della cellula con produzione di AMPc che induce ipersecrezione da parte delle cellule di mammifero e quindi comparsa dell'edema.

Vi sono tre diverse forme di antrace:
- **Antrace cutaneo** in cui il batterio penetra nell'organismo attraverso lesioni di continuo della cute. Le spore germinano e dopo un periodo di incubazione di 2-5 giorni, si sviluppa una lesione papulosa infiammatoria che evolve in vescicola, la quale si rompe e viene sostituita da un'escara nera circondata da edema. Nelle forme gravi si ha ingrossamento dei linfonodi regionali ed infine invasione del circolo sanguigno.
- **Antrace polmonare** si manifesta in seguito alla esposizione a polvere ricca di spore che si localizzano nell'apparato respiratorio provocando emorragia locale ed edema; talora si ha setticemia che porta a meningite.
- **Antrace gastrointestinale** si manifesta in seguito all'ingestione di carne poco cotta proveniente da animali infetti. La tossina prodotta nell'intestino forma una lesione necrotica dell'ileo o del cieco; l'indice di mortalità è elevato.

EMOF - Raccolta Quaderni

***Bacillus cereus*:**
Può provocare epidemie di intossicazione alimentare per la produzione di tossine da parte di spore germinanti, conseguente al riscaldamento di cibi cotti dopo una impropria refrigerazione.
B.cereus produce due enterotossine responsabili di due affezioni cliniche:
La forma diarroica , una tipica gastroenterite che si manifesta dopo 8-16 ore dall'ingestione di cibi contaminati e la forma emetica, con la comparsa dei sintomi dopo 1-5 ore dall'ingestione soprattutto di piatti a base di riso.
Entrambe le forme sono autolimitanti e non richiedono trattamenti particolari.
B. cereus è anche riconosciuto come causa principale di infezioni oculari a seguito di traumi; altre infezioni non gastrointestinali si possono verificare in ambiente ospedaliero per contaminazione di cateteri venosi, indumenti, biancheria.

Sensibilità agli antibiotici :
La penicillina è spesso l'antibiotico di scelta nel trattamento di infezioni da *B. anthracis* che è sensibile anche alla eritromicina, gentamicina, cloramfenicolo. Recenti test dimostrano che l'infezione risponde bene alla ciprofloxacina e doxiciclina; il microorganismo è normalmente sensibile alla streptomicina ma resistente al cefuroxime.
Il carbonchio è endemico in molte zone della terra specialmente nelle aree sottosviluppate; il controllo più efficace è la vaccinazione dei bovini, la cremazione o il seppellimento con calce viva degli animali infetti .
B.cereus produce una β-lattamasi ad ampio spettro e quindi è resistente a penicillina, ampicillina e cefalosporine.E' quasi sempre sensibile a eritromicina, clindamicina, vancomicina, aminoglicosidi e tetracicline .

EMSE - Raccolta Quaderni