

INDICE

Organizzazione del percorso didattico	2
Lezioni frontali	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
<i>Caratteristiche generali</i>	3
<i>Azione patogena e significato clinico</i>	5
<i>Resistenza agli antibiotici</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
<i>Caratteristiche generali</i>	6
<i>Principali fattori di virulenza extracellulari</i>	8
<i>Azione patogena e significato clinico</i>	8
<i>Resistenza agli antibiotici</i>	10
Caratteristiche chiave di <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	10
Un po' di prevenzione. Cosa evitare?	11
Esperienza di laboratorio	12
<i>Materiali e metodi</i>	12
<i>Procedimento</i>	12
<i>Risultati ottenuti</i>	13
<i>Conclusioni</i>	13
Mappa concettuale riassuntiva	17
Bibliografia	18

Organizzazione del percorso didattico

L'argomento scelto comprende la descrizione di due batteri patogeni, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, che possono causare patologie di entità diversa.

Il lavoro è rivolto alla classe prima della scuola secondaria di primo grado in quanto ben si inserisce nella programmazione didattica: dopo aver introdotto i cinque regni, l'attenzione si concentra, *in primis*, sugli organismi procariotici e, successivamente, ai batteri.

Dopo aver fornito agli alunni le conoscenze sulle caratteristiche e strutture principali della cellula batterica, si parlerà dei due batteri patogeni scelti. Le lezioni frontali saranno seguite anche da un'esperienza laboratoriale.

Il tempo dedicato per svolgere l'intera attività sarà di 6 ore, distribuite su 15 giorni, divise in tre lezioni frontali e tre ore di attività pratica (laboratorio). Nelle esercitazioni verranno dedicate due ore il giorno dell'isolamento batterico ed un'ora, dopo dieci giorni, per l'analisi dei risultati ottenuti. L'attività pratica di laboratorio dovrebbe aiutare tutti gli alunni nel memorizzare i concetti fondamentali.

Alla fine delle lezioni frontali, sarà illustrata una tabella con le caratteristiche principali dei due batteri ed una mappa concettuale con i punti chiave (Fig. 8).

Al termine dell'unità didattica, gli alunni svolgeranno una semplice relazione sull'attività di laboratorio svolta. Inoltre, verranno valutati con una prova scritta che riguarderà sia la parte teorica che quella pratica.

La lezione teorica avrà molti contenuti nozionistici. Il linguaggio, anche se semplificato, sarà comunque un linguaggio scientifico, indispensabile per svolgere in modo completo questi argomenti.

Oltre a parlare delle classiche malattie connesse a questi due batteri, si è aggiunto una tabella illustrativa su come si può essere infettati dai batteri anche nella vita quotidiana. Questa deve essere interpretata, e gestita dall'insegnante, solo come uno spunto di riflessione e non con lo scopo di generare inutili allarmismi.

Lezioni frontali

Staphylococcus aureus

Caratteristiche generali

Staphylococcus aureus è un batterio Gram-positivo, patogeno per l'uomo, con diametro di circa 1 μm (Fig. 1). Le colonie presentano un colore giallo-oro su particolari terreni selettivi (da qui il nome *aureus*), a causa della sintesi di pigmenti carotenoidi.

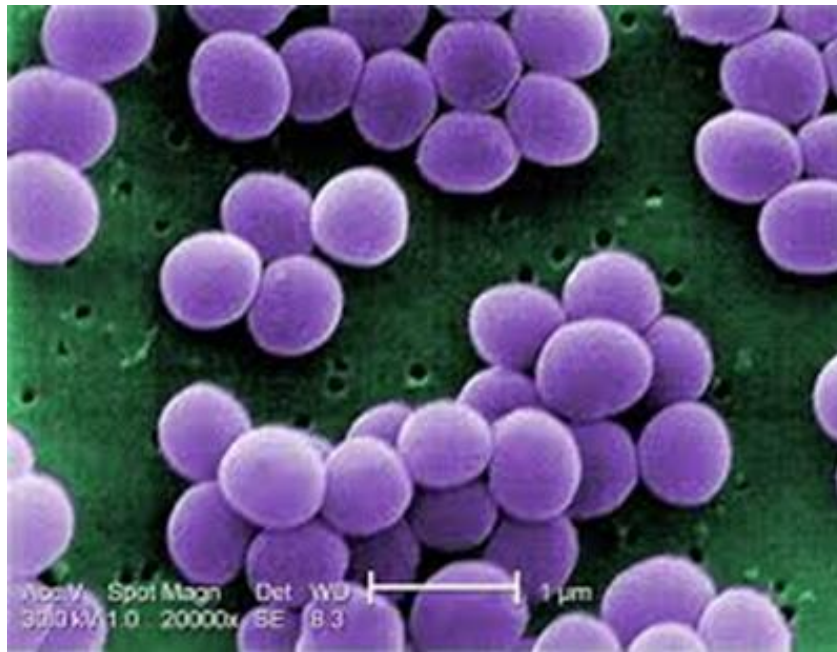


Figura 1. Cellule di *S. aureus* al microscopio elettronico a scansione.

Gli Stafilococchi sono aerobi-anaerobi facoltativi e, quindi, crescono bene nei comuni terreni di coltura. Non presentano flagelli o altre strutture per il movimento (infatti sono immobili) e non producono spore (asporigeni). Sono alofili e, quindi, riescono a svilupparsi in ambienti con alte concentrazioni saline (NaCl 7,5%).

I cocci Gram-positivi disposti a grappolo sono visibili al microscopio ottico mediante colorazione Gram con la caratteristica colorazione viola dovuta ad uno spesso

strato di peptidoglicano nella parete cellulare che permette al colorante cristal-violetto di legarsi alla suddetta struttura (Fig. 2).

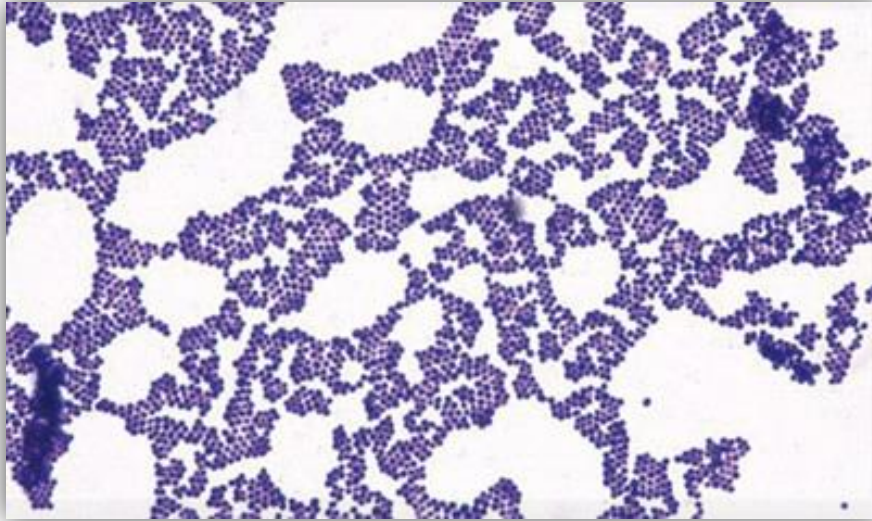


Figura 2. Cellule di *S. aureus* visualizzati al microscopio ottico grazie alla colorazione Gram.

S. aureus possiede una capsula polisaccaridica poco sviluppata (non evidente al microscopio), ma con potere antifagocitario che protegge i batteri dall'azione dei neutrofili e dei macrofagi (entrambe cellule con attività fagocitica).

Possiede, poi, importanti strutture di superficie ed una serie di proteine capaci di legarsi a macromolecole dell'ospite (fibronectina, adesina, collagene) fungendo da adesine. Tra le più importanti adesine ricordiamo:

- **Emolisina alfa** (o **alfa-tossina**): tossina in grado di formare pori nelle membrane di numerose cellule di mammiferi.
- **Coagulasi**: pro-fattore proteico che reagisce con un co-fattore plasmatico protrombino simile, trasformando il fibrinogeno in fibrina.
- **Catalasi**: enzima che scinde il perossido di idrogeno (tossico per il batterio) in acqua ed ossigeno e permette alla cellula batterica di moltiplicarsi all'interno dei fagociti dell'ospite.

Azione patogena e significato clinico

L'uomo è un serbatoio naturale di *Staphylococcus aureus*: il suo habitat naturale è la cute ma anche bulbi piliferi, ghiandole sebacee, mucose, vie respiratorie e gastroenteriche. Si calcola che il 30-50% dei soggetti adulti ne siano colonizzati in modo asintomatico.

S. aureus è dotato di un'elevata potenzialità patogena dovuta, probabilmente, alle tossine che è in grado di produrre.

Essendo poi in grado di sviluppare farmaco-resistenze, risulta essere un patogeno di successo soprattutto in ambito ospedaliero.

Le infezioni alla cute da *S. aureus* hanno generalmente carattere suppurativo (infiammazione tessuti con formazione di pus), con sede e gravità variabile. Provocano: ascessi, foruncoli, acne, impetigine, mastiti.

S. aureus può anche causare tossinfezioni alimentari dovute all'ingestione di alimenti, ricchi di lipidi (come crema o panna, favorenti la crescita batterica), nei quali sia stata prodotta una notevole quantità di enterotossine. Dopo una breve incubazione (circa 10 ore), porta a gastroenterite senza la comparsa di episodi febbrili (il decorso clinico è, infatti, rapido e favorevole).

Può anche causare la sindrome della cute ustionata (detta anche SSSS, Staphylococcal Scaldes Skin Syndrome), caratterizzata da eritema, epidermolisi ed esfoliazione degli strati superficiali dell'epidermide in bambini e neonati in seguito a degradazione dei desmosomi (giunzione, di natura proteica, tra cellule).

S. aureus può provocare anche la sindrome da shock tossico (TSS, Toxic Shock Syndrome). Il quadro patologico è determinato da una tossina (TSST-1) che diffonde per via ematogena da un focolaio di partenza spesso ignorato. E' una sindrome acuta e grave, caratterizzata da febbre, ipotensione, eritrodermia desquamativa e vari sintomi d'organo.

Infine, può causare infezioni respiratorie delle vie aeree superiori (sinusiti) o inferiori (polmoniti e pleuriti).

Resistenza agli antibiotici

Nel corso del tempo, *Staphylococcus aureus* è riuscito a sviluppare resistenza ad antibiotici. I ceppi penicillino-resistenti che avevano acquisito la capacità di produrre penicillinasi comparvero già negli anni '50 del secolo scorso. Per combattere la resistenza alla penicillina vennero scoperti nuovi antibiotici, fra cui la meticillina. Recentemente vi è la diffusione di ceppi meticillino-resistenti, capaci cioè di resistere alla meticillina.

Pseudomonas aeruginosa

Caratteristiche generali

I batteri del genere *Pseudomonas* sono Gram-negativi, con forma bastoncellare (dimensioni 0,5-1 x 1,5-3 μm), mobili grazie alla presenza di uno o più flagelli polari e asporigeni (Fig. 3).



Figura 3. Flagelli polari di *P. aeruginosa* visibili al microscopio elettronico a scansione.

Sono batteri aerobi, incapaci di utilizzare le vie metaboliche fermentative, ma che crescono bene su quasi tutti i terreni di coltura utilizzati in microbiologia poiché, sapendo utilizzare come fonti di carbonio e di energia una grande varietà di composti organici, hanno poche esigenze nutrizionali. Il batterio è riconoscibile per la morfologia delle colonie, per l'incapacità di fermentare il lattosio e per la positività del test dell'ossidasi.

I batteri Gram-negativi risultato rosa al microscopio ottico dopo la colorazione Gram poiché, a livello della parete cellulare, possiedono uno strato di peptidoglicano sottile, che non è in grado di trattenere il colorante cristal-violetto. La colorazione rosa è da attribuire alla presenza di un secondo colorante (safranina) che colora le cellule (Fig. 4).

In *P. aeruginosa*, la pigmentazione delle colonie è dovuta alla produzione di due molecole pigmentate: la piocianina (blu) e la pioverdina (giallo-verde) (Fig. 5).



Figura 4. *P. aeruginosa* al microscopio ottico dopo colorazione Gram.

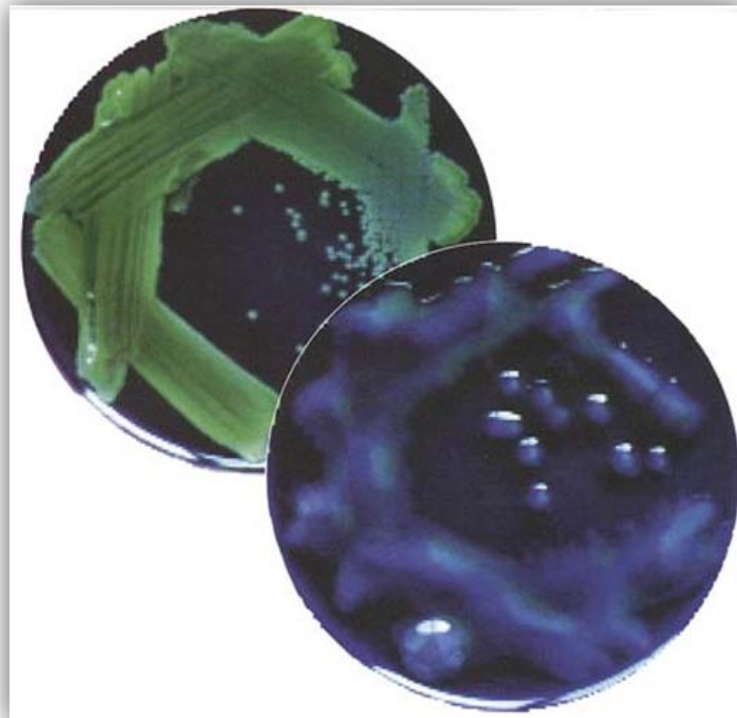


Figura 5. Colonie batteriche di *P. aeruginosa* in cui emerge la tipica colorazione dovuta alla produzione di pigmenti.

P. aeruginosa ha una membrana esterna, con una permeabilità molto bassa, contenente il lipopolisaccaride (LPS, come in tutti i batteri Gram-negativi). Questa molecola rappresenta sia l'endotossina che l'antigene somatico O (regione estrema del LPS, costituita da unità di ripetizione di 3-5 zuccheri).

Inoltre, *P. aeruginosa* presenta fimbrie, ovvero strutture di ancoraggio in grado di avviare i processi infettivi. LPS, fimbrie e diverse sostanze extracellulari prodotte, costituiscono alcuni fattori di virulenza del batterio.

Principali fattori di virulenza extracellulari

Alcune delle tossine prodotte da *P. aeruginosa* sono:

- **Esotossina A:** blocca la sintesi proteica portando alla morte della cellula infettata.
- **Fosfolipasi C:** enzima fondamentale nell'insorgenza e nel mantenimento delle infezioni polmonari.
- **Elastasi:** enzima coinvolto nella degradazione del collagene (principale proteina del tessuto connettivo negli animali). Questa proteina è particolarmente presente nel tessuto corneale e quindi coinvolta nella patogenesi delle cheratiti.

Azione patogena e significato clinico

P. aeruginosa è considerato un patogeno opportunista, ovvero in grado di determinare infezioni in soggetti immunodepressi. Colpisce con particolare frequenza i soggetti ospedalizzati: infatti, il batterio è stato isolato, in ambito ospedaliero, dall'acqua, da soluzioni iniettabili, da prodotti farmaceutici e da strumenti chirurgici.

P. aeruginosa è in grado di determinare diversi tipi di infezioni che interessano organi differenti:

- Infezione dell'ustione e della ferita della cute ustionata e delle ferite chirurgiche: è una delle cause più importanti (insieme a *S. aureus*) di complicanza post-chirurgica. Infatti costituisce il punto di partenza di gravi batteriemie.
- Infezioni dell'apparato respiratorio: si tratta per lo più di infezioni polmonari. In particolar modo, ne vengono colpiti i pazienti affetti da fibrosi cistica, malattia genetica che si caratterizza per secrezioni dense a livello bronchiale che inibiscono il sistema di difesa muco-ciliare. Questi pazienti vanno solitamente

incontro a infezioni croniche sostenute inizialmente da *S. aureus* e successivamente da *P. aeruginosa* (Fig. 6).

- Infezioni urinarie: è la terza causa di infezioni delle vie urinarie dopo *Escherichia coli* ed *Enterococcus* spp. Tali infezioni si verificano soprattutto in pazienti portatori di catetere. Si tratta di infezioni che tendono a cronicizzare e che risultano comunque difficili da eradicare.
- Infezioni all'orecchio.
- Infezioni oculari: in seguito a operazioni chirurgiche all'occhio o in soggetti che utilizzano per lunghi periodi le lenti a contatto.
- Altre infezioni: sono meno frequenti ed interessano l'apparato osteoarticolare e il sistema nervoso centrale.

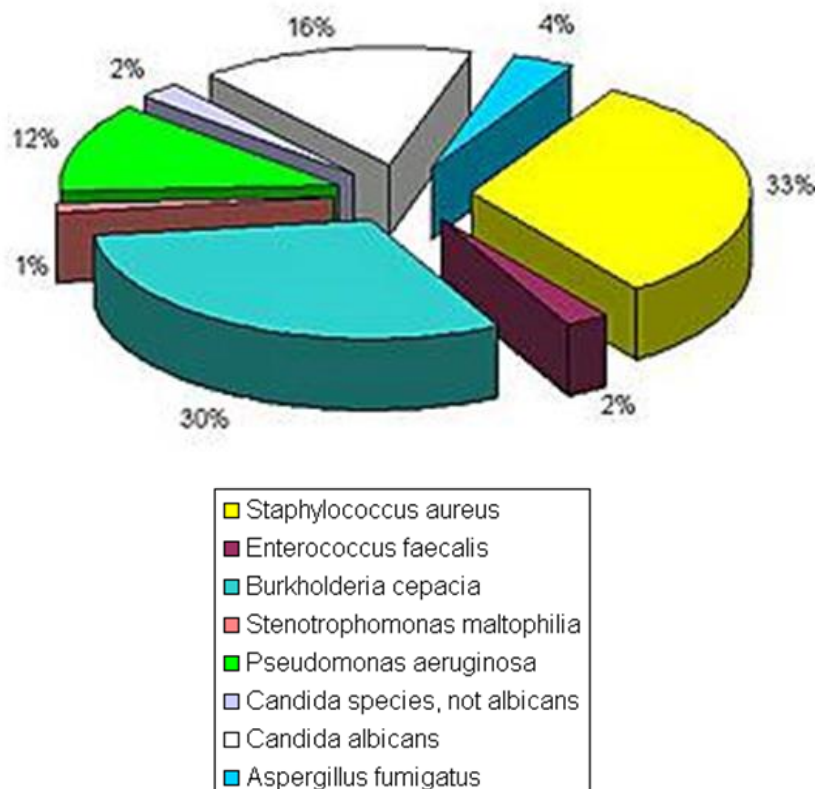


Figura 6. Casi di infezioni da batteri patogeni in pazienti affetti da fibrosi cistica.

Lo studio è stato effettuato su 34 pazienti (13 maschi e 21 femmine) affetti da FC ed afferenti al “Centro di supporto Fibrosi Cistica” del Trentino (studio effettuato tra luglio 2005 e agosto 2008). Un terzo dei casi, è determinato da *S. aureus*.

Resistenza agli antibiotici

Al di là della loro gravità, le infezioni da *P. aeruginosa* pongono seri problemi terapeutici legati alla farmaco-resistenza, che in molti ceppi si estende alla maggior parte degli antibiotici in uso. Ciò è dovuto in particolar modo alla bassissima permeabilità della membrana cellulare. Tuttavia, la resistenza alle due grandi famiglie farmacologiche dei betalattamici e degli aminoglicosidi va in gran parte attribuita a meccanismi di natura enzimatica.

Caratteristiche chiave di *S. aureus* e *P. aeruginosa*

In Tabella 1 sono riassunte le caratteristiche più importanti dei due patogeni trattati.

Specie	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Morfologia della cellula	Cocchi disposti a grappoli	Bastoncello
Colore delle colonie	Giallo-oro	Blu-verde
Colorazione Gram	Gram-positivo	Gram-negativo
Metabolismo	Aerobi/anaerobi facoltativi	Aerobi obbligati
Movimento	Assente	Uno o più flagelli polari
Spore	Assenti	Assenti
elementi patogeni	Tossine	Tossine
Colonizzazione	Uomo	Uomo
Patologie principali	Infezioni con formazione pus, tossinfezioni alimentari, sindrome della cute ustionata, sindrome dello shock tossico, infezioni respiratorie.	Infezioni alle ferite chirurgiche, infezioni respiratorie, infezioni urinarie, infezioni all'orecchio, infezioni oculari.
Farmaco-resistenza	Sì	Sì

Tabella 1. Caratteristiche chiave di *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Un po' di prevenzione. Cosa evitare?





Comportamenti a rischio	Perché?	Cosa fare?	
Mangiare unghie o pellicine.	Le nostre mani sono un serbatoio di batteri.	Cercare di perdere il vizio utilizzando smalti appositi.	
Mangiare cibo senza essersi lavati le mani in precedenza.	Le nostre mani sono un serbatoio di batteri.	Lavarsi le mani o, se impossibilitati, portare con sé un gel secco disinfettante.	
Buchi alle orecchie o piercing in centri non autorizzati.	Attrezzi non sterili potrebbero provocare infezioni batteriche.	Rivolgersi alle farmacie o ai centri specializzati e a norma.	
Tatuaggi	Aghi non sterili potrebbero provocare infezioni batteriche.	Effettuare tatuaggi solo in strutture autorizzate, pulite e che utilizzino aghi sterili.	

Tabella 2. Consigli per evitare possibili infezioni batteriche.

Esperienza di laboratorio

Scopo del lavoro: analizzare quali sono gli inquinanti dell'aria che respiriamo e delle nostre mani.

Materiali e metodi

contenitori con coperchio sterili;

zucchero;

dado vegetale granulare;

acqua;

preparato per gelatina;

pellicola trasparente;

bilancia da cucina;

pennarello indelebile.

Per sterilizzare: pentola, acqua, fornello, cucchiaio, timer, frigorifero (per far solidificare la gelatina più rapidamente).

Procedimento

Le classiche piastre Petri sono state sostituite con contenitori di omogeneizzati dotati di coperchio. Questi sono stati preventivamente sterilizzati utilizzando come tecnica il calore, ovvero facendoli bollire per 10 minuti.

Non avendo un laboratorio di scienze all'interno della scuola e non potendo utilizzare il fornello in classe, il terreno di coltura è stato preparato in casa, la sera precedente all'esperimento da svolgere in classe, utilizzando:

- 1g di zucchero;
- 10 g di dado vegetale granulare;
- 36 g di preparato per gelatina;
- 1 l di acqua.

Una volta uniti, tutti gli ingredienti sono stati mescolati sulla fiamma fino a quando non si sono totalmente amalgamati. Si è lasciato, poi, raffreddare il terreno e,

prima della solidificazione, lo si è versato nei contenitori. Questi sono stati poi coperti e riposti in frigorifero.

La mattina seguente, i contenitori sterili sono stati distribuiti alla classe: ogni alunno, dopo averlo nominato esternamente con un pennarello indelebile, ha svitato il coperchio e toccato con le dita il terreno in modo da piastrare eventuali batteri presenti sulle mani. Alcuni alunni hanno prima lavato le mani o utilizzato un gel disinfettante.

Dopo l'esperimento, ci siamo accorti che è necessario utilizzare una certa delicatezza essendo il terreno di coltura piuttosto morbido (alcuni alunni hanno infatti suggerito che forse avrei dovuto lasciarlo in frigorifero più tempo rispetto alle 12 ore effettive).

Una piastra è stata lasciata aperta sulla cattedra per andare ad indagare se sono presenti batteri nell'aria dell'ambiente che ci circonda.

Terminato l'esperimento, le piastre sono state richiuse e, per sicurezza, parafilmate singolarmente. Le piastre sono poi state lasciate a temperatura ambiente, per dieci giorni.

Terminati questi, ogni alunno ha visionato il proprio esperimento.

Risultati ottenuti

Le piastre ottenute sono risultate diverse tra loro grazie alla colonizzazione di diversi ceppi batterici.

Sono state piastrate 24 piastre (23 dagli alunni e 1 dall'aria), che presentavano una crescita con colonie batteriche aventi morfologia differente. Alcune potevano essere degli Stafilococchi, ma era impossibile individuare la specie. Per l'identificazione batterica, bisognerebbe utilizzare terreni selettivi.

Conclusioni

I batteri crescono bene nel nostro terreno di coltura. Questo infatti possiede tutti gli ingredienti fondamentali per la vita di un batterio: il dado consente al batterio di avere a disposizione tutti i nutrienti di cui necessita, la gelatina permette alla soluzione di addensarsi (altrimenti rimarrebbe liquida), lo zucchero fornisce una fonte di carbonio, elemento fondamentale per gli organismi eterotrofi ovvero quelli non in grado di fabbricarsi da soli il nutrimento.

Gli alunni, durante l'esperimento, hanno esposto al docente diversi dubbi:

- Perché bisogna utilizzare anche la gelatina?
Se il terreno rimanesse liquido, i batteri crescerebbero ugualmente, ma risulterebbe impossibile visualizzare le colonie batteriche.
- Non è troppo salato il terreno di coltura con tutto quel dado?
Abbiamo visto che alcuni batteri sono in grado di tollerare anche alte concentrazioni saline. Inoltre le concentrazioni utilizzate sono basse.
- Mettendo il coperchio alle nostre piastre, i batteri riescono a respirare?
Le piastre non sono sigillate, quindi l'ossigeno che c'è all'interno del contenitore è sufficiente per i batteri.
- Perché aspettiamo dieci giorni prima di andare a valutare le colonie?
La crescita batterica non è immediata, ma segue una curva costituita da una fase iniziale, detta di latenza, in cui il batterio si adatta all'ambiente in cui si trova. A questa fase, segue quella di crescita repentina (detta esponenziale) in cui il batterio si riproduce e, quindi, diventa visibile sotto forma di colonie.
Per rendere più chiara la spiegazione, è stata mostrata graficamente alla lavagna la curva di crescita batterica (Fig. 7).
La curva di crescita della popolazione batterica segue un andamento caratteristico, suddivisibile in quattro fasi:
 - *LATENZA: i batteri sintetizzano le sostanze necessarie per prepararsi alla divisione e non aumentano di numero; la sua durata varia da specie a specie ed in relazione alle condizioni ambientali.*
 - *CRESCITA ESPONENZIALE: in cui la popolazione cresce in fase esponenziale e duplica in una generazione.*
 - *FASE STAZIONARIA: scarseggiano le sostanze nutritive e il numero di nuove cellule batteriche equivale al numero di quelle morte.*
 - *MORTE: il drastico calo di nutrienti porta alla morte di un numero di batteri superiore rispetto a quello delle cellule ancora in grado di riprodursi.*



Figura 7. Curva di crescita batterica.

Mappa concettuale riassuntiva

In Figura 8 è riportata la mappa concettuale comprendente le principali caratteristiche di *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

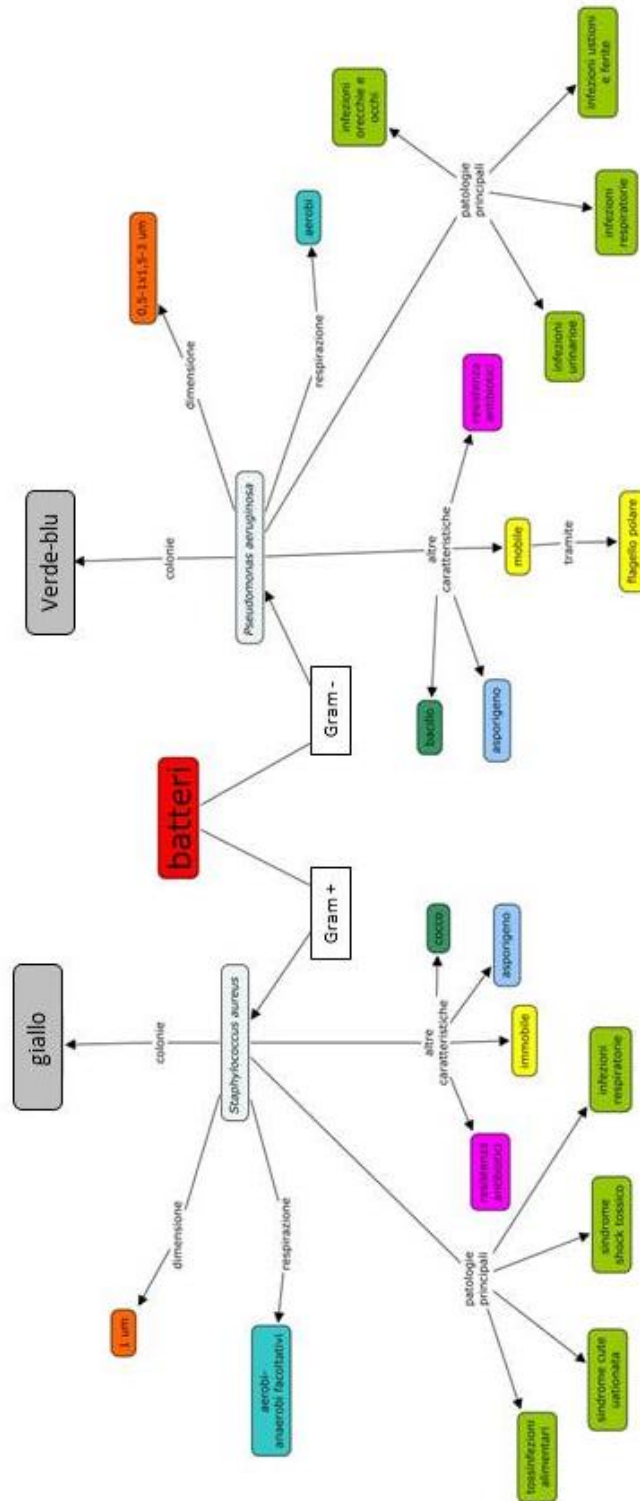


Figura 8. Mappa concettuale

Bibliografia

- Antonelli G., Clementi M., Pozzi G., Rossolini G.M., 2010, *Principi di microbiologia medica*.
- Brock D., Madigan M.D., Martinko J.M., Parker J., 2003, *Microbiologia*.
- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg, 1993, *Microbiologia*.
- La Placa, 2005, *Principi di Microbiologia Medica*.
- Lanciotti E., 2012, *Principi di microbiologia clinica*.
- www.associazionetrentinafibrosicistica.it
- www.scienceing.tumblr.com
- www.wikipedia.org
- www.treccani.it
- www.textbookofbacteriology.net
- www.my-personaltrainer.it
- www.slideplayer.it