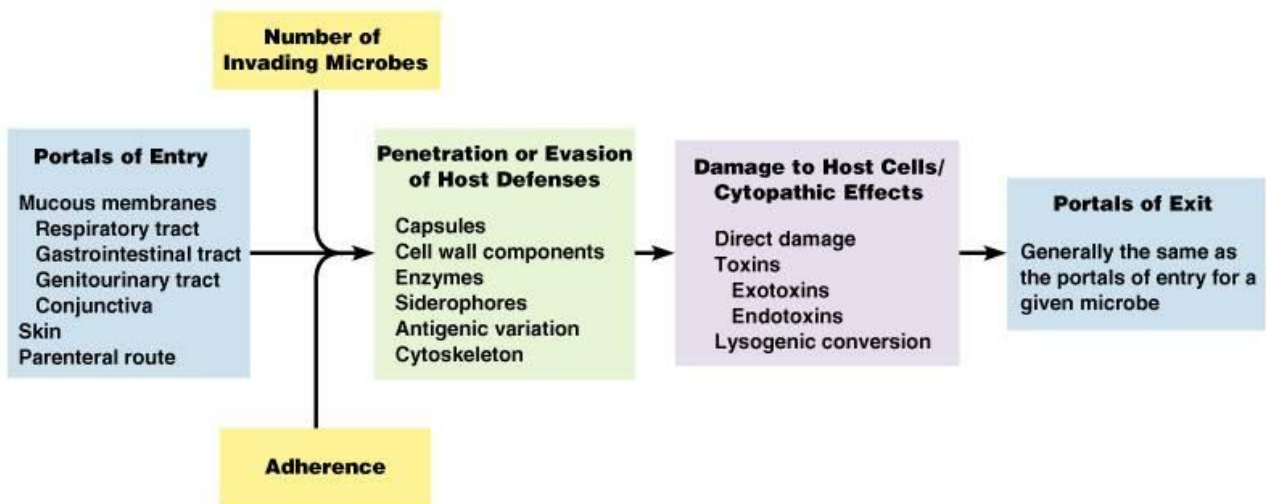
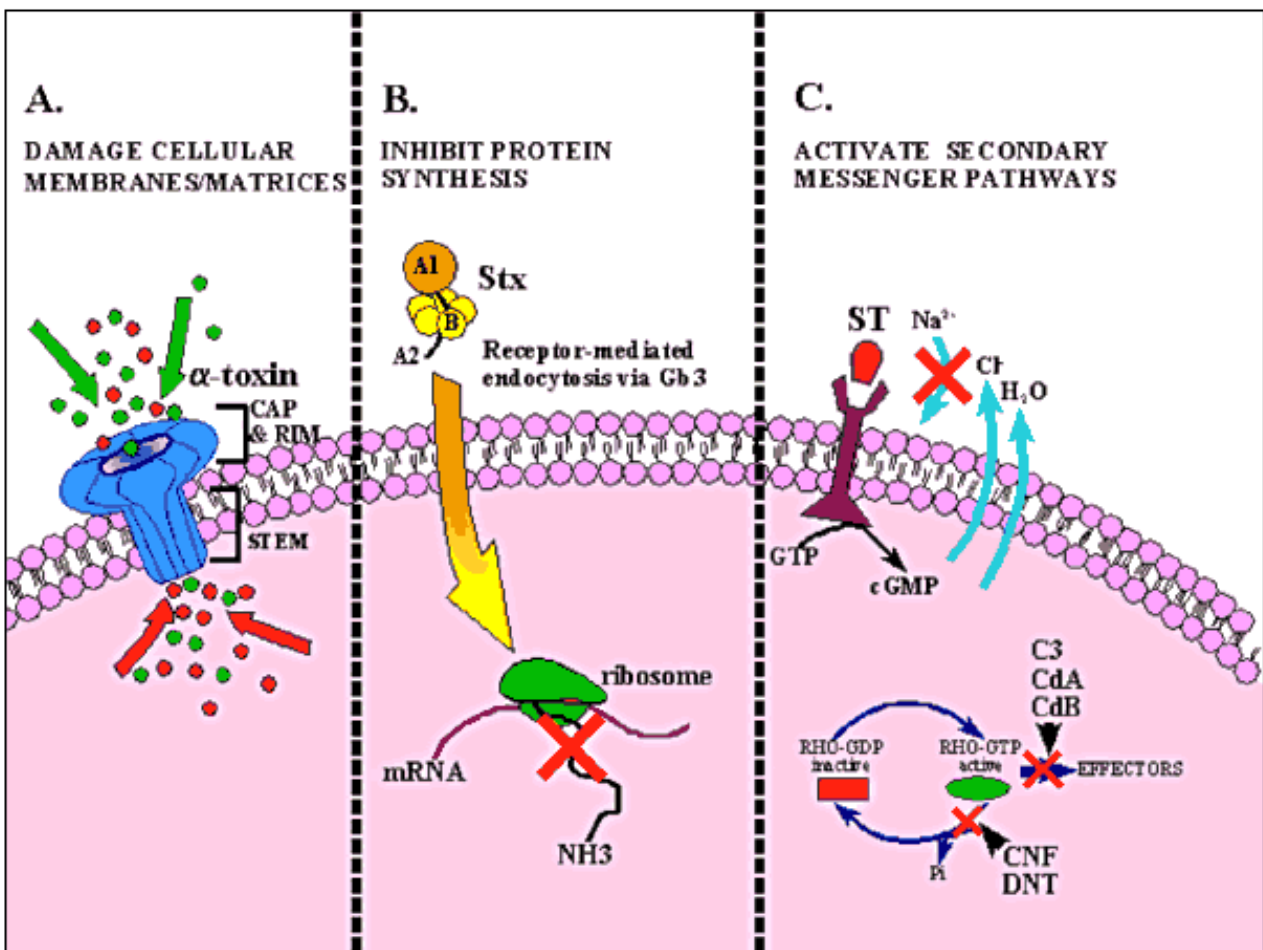


TOSSINE BATTERICHE



Le tossine batteriche si classificano in base alla loro attività:

- tipo1 o membrane-damaging, causano la formazione di pori (RTZ, CFT) o hanno attività enzimatica (PLC)
- tipo2 o membrane-acting (ST)
- tipo3 o intracellular-acting, entrano mediante endocitosi (TeNT, BoNT, DT, Stx, LT) o T3SS (Exo)



Si distinguono due tipologie di tossine batteriche:

- endotossine (lipide A del lipopolisaccaride), solo per i gram-negativi
- esotossine (proteine rilasciate nell'ambiente extracellulare dal batterio patogeno)

ESOTOSSINE

Proteine solubili secrete dai batteri gram-positivi e gram-negativi durante la fase di crescita esponenziale. Sono funzionalmente simili ad enzimi, poichè sono proteine, possono essere denaturate dal calore e hanno azione specifica. Sono superantigeni: possono causare una forte risposta immunitaria poichè possono stimolare la proliferazione dei linfocitiT tramite interazione con MHC2; ciò conduce alla produzione di IL1 e TNF che causano il danno associato con queste tossine.

Le tossine sono instabili: nel tempo perdono la loro azione tossica, ma mantengono i siti antigenici.

I tossoidi sono tossine che hanno perso la loro azione tossica, ma mantengono i siti antigenici e la capacità di evocare una risposta immunitaria. La formazione di tossoidi avviene mediante trattamento delle tossine con formalina, iodio, pepsina o chetoni, e serve per immunizzare artificialmente l'ospite (vaccino).

Molte tossine sono formate da due porzioni: la subunitàA (responsabile dell'attività enzimatica della tossina) e la subunitàB (responsabile dell'aggancio all'ospite e nel trasferimento della subunitàA attraverso la membrana). La subunitàA è attiva solo quando si distacca dalla subunitàB.

I geni che codificano per tossine sono localizzati generalmente su plasmidi o batteriofagi, quindi la coniugazione o la trasduzione possono muovere questi elementi genetici tra differenti batteri, aumentando il potenziale patogeno.

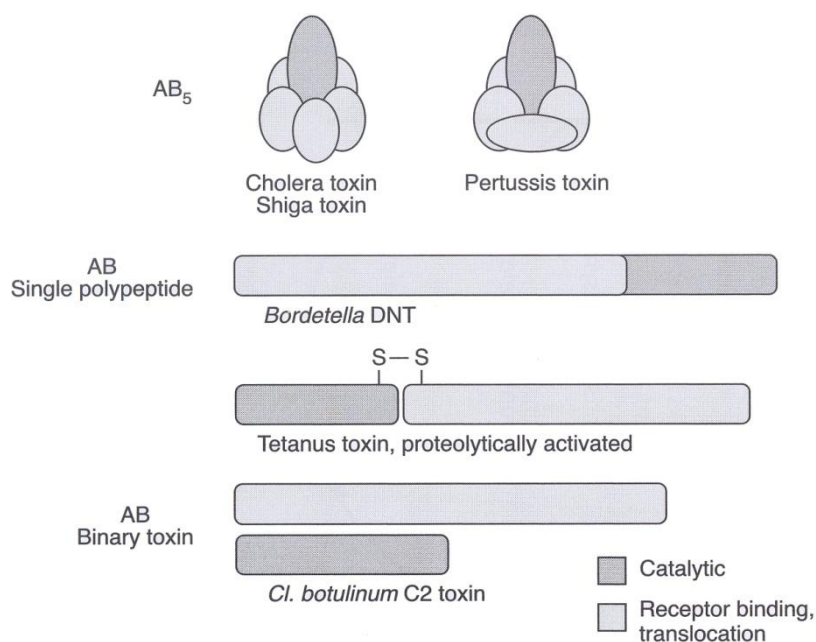
Ci sono due meccanismi di ingresso della tossina nella cellula.

- entrata diretta: la subunitàB si lega allo specifico recettore e induce la formazione di un poro nella membrana attraverso cui viene traslocata la subunitàA
- endocitosi mediata da recettore: dopo l'endocitosi, l'abbassamento del pH nell'endosoma causa la dissociazione delle due subunità, e la subA esplica la sua funzione, e la subB viene riciclata sulla superficie cellulare.

Le subunità delle tossine vengono riarrangiate in differenti modi:

- A-B o A-5B indica che le subunità sono sintetizzate separatamente e associate da legami non covalenti
- A/B indica che le subunità vengono separate da taglio proteolitico
- A+B indica che le subunità sono sintetizzate e secrete in modo separato, e interagiscono sulla c. bersaglio

Le tossine che si legano al colesterolo sono espresse dai batteri gram-positivi (streptococcus pneumoniae, streptococcus pyogenes, listeria monocytogenes, clostridium perfringens, clostridium tetani, bacillus cereus).



variazioni di architettura delle AB tossine

Esempi di esotossine

| tossina | | batterio | attività |
|--|------------------|---|---|
| fattore edematoso (EF) | A ₁ B | bacillus anthracis | è una adenilato ciclasi che aumenta i livelli intracellulari di cAMP e permette la formazione di acquaporine sulle membrane, causando emolisi ed edema |
| t. letale (LF) | A ₂ B | bacillus anthracis | proteasi Zn-dipendente verso MAPK, induce il rilascio di citochine e causa morte cellulare |
| enterotossina colerica (CT), t. termolabile di E. coli (LT) | A5B | vibrio cholerae, escherichia coli | ADP-ribosilazione della proteinaG stimolatoria dell'adenilato ciclasi, con attivazione permanente e aumento del cAMP nell'intestino, inserzione di acquaporine, secrezione di acqua ed elettroliti, diarrea |
| t. termostabile di E. coli (ST) | A5B | escherichia coli | stimola la guanilato-ciclasi, aumento cGMP, attivazione della protein-chinasiG (PKG), secrezione di acqua ed elettroliti, diarrea |
| t. di Shiga (Stx) | A5B | shigella dysenteriae | taglio enzimatico di 28S rRNA, inattivazione della subunità 60S del ribosoma, inibizione della sintesi proteica |
| t. botulinica (BoT) | AB | clostridium botulinum | proteasi Zn-dipendente per la sinaptobrevina che inibisce la trasmissione neuromuscolare nella placca motrice dei motoneuroni, inibisce il rilascio di ACh dai motoneuroni periferici, paralisi flaccida |
| t. tetanica (TeT) | AB | clostridium tetani | proteasi Zn-dipendente per la sinaptobrevina che inibisce la trasmissione neuromuscolare nei neuroni inibitori di Renshaw, inibisce il rilascio di glicina dagli interneuroni inibitori, paralisi spastica |
| t. difterica (DT), t. di pseudomonas (Exo) | AB | corynebacterium diptheriae, pseudomonas aeruginosa | ADP-ribosilazione del fattore di allungamento dei ribosomi (EF2), con inibizione della sintesi proteica |
| t. della pertosse (BT) | A5B | bordetella pertussis | ADP-ribosilazione della proteinaG inibitoria dell'adenilato ciclasi, blocca l'inibizione dell'adenilato ciclasi, aumento cAMP, diminuzione della attività fagocitica |
| t. della pertosse (DNT) | A5B | bordetella pertussis | deaminazione di Rho, Rac e Cdc42, inibizione della attività GTPasica, stimolo costitutivo per la riorganizzazione del citoscheletro |
| enterotossina stafilococcica | | staphylococcus aureus | superantigene, attivazione massiva del sistema immunitario, vomito |
| t. della sindrome da shock tossico (TSST) | | staphylococcus aureus | superantigene, infiammazione, febbre, shock |
| t. della scarlattina | | staphylococcus aureus | superantigene, reazione eritematosa locale |
| t. del clostridium (Tcd) | | clostridium difficile | glicosilazione di Rho, Rac e Cdc42, inibizione della attività GTPasica, diarrea e morte cellulare |
| t. della peste (Yop) | | yersinia pestis | esibizione di una proteina ad attività GTPasica, inibizione di Rho, blocco della fagocitosi, impedisce la sintesi di citochine, apoptosi |
| t. della pasteurella (PMT) | | pasteurella multocida | rilascio di IP ₃ , stimolazione della PLC e della PKC, riarrangiamenti del citoscheletro |

ENDOTOSSINE

L'endotossina è il lipideA del lipopolisaccaride (LPS), cioè una parte della membrana esterna dei batteri gram-negativi escherichia, salmonella, shigella, pseudomonas, neisseria, haemophilus. Normalmente il LPS partecipa in molte funzioni essenziali alla crescita e sopravvivenza batterica, e attiva il complemento mediante la via alternativa come via patogenetica preferenziale.

Le endotossine rimangono associate alla membrana esterna fino alla disgregazione del batterio, che può accadere per autolisi, lisi esterna o digestione fagocitica.

Rispetto alle esotossine, le endotossine sono meno potenti e meno specifiche nella loro azione, poichè non agiscono enzimaticamente. Sono termostabili, ma possono essere degradate da superossidi e perossidi. Le endotossine, sebbene fortemente antigeniche, non possono essere convertite in tossoidi.

| | endotossine | esotossine |
|----------------------------------|--------------------|-------------------|
| natura chimica | lipopolisaccaride | proteina |
| peso | 10 kDa | 100-1000 kDa |
| relazione con il batterio | membrana esterna | extracellulare |
| termostabile | si | no |
| antigenico | si | si |
| tossoidi | no | si |
| virulenza | bassa | alta |
| specificità | bassa | alta |
| attività enzimatica | no | si |
| pirogenicità | si | no |

LIPOPOLISACCARIDE

Il LPS è una molecola complessa di 10 kDa con variabile composizione chimica tra le specie. E' formata da:

- lipideA: componente lipidica, contiene la regione che si ancora alla membrana esterna. E' formata da un dimero di N-Ac-glucosammina (NAG) con 6 o 7 acidi grassi saturi attaccati direttamente o tramite un legame estere. La struttura è molto conservata nei gram-negativi. E' la componente tossica del LPS. Il lipideA si lega alla superficie dei macrofagi causando il rilascio di citochine che mediano i danni dell'endotossina.

- coreR: è connesso alla sesta posizione di un NAG e consiste di una breve catena di zuccheri, contenente KDO (uno zucchero unico che si ricerca per l'identificazione dell'endotossina). E' comune tra i membri di uno stesso genere, ma differente tra generi diversi.

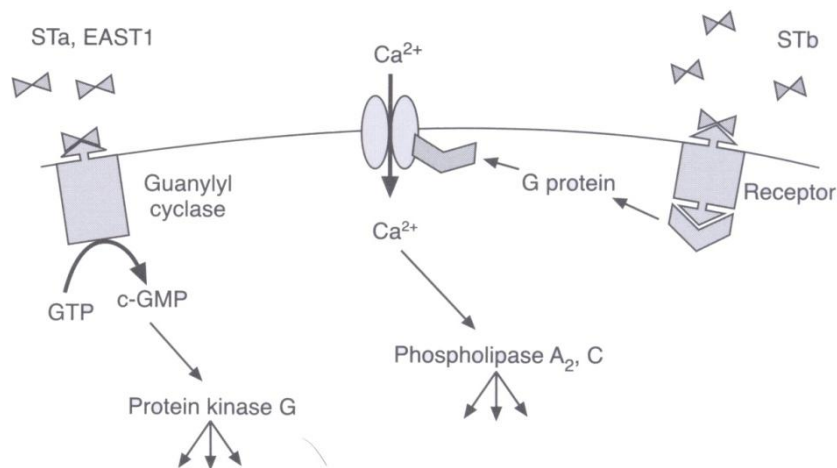
- antigeneO: è un polisaccaride connesso al coreR, ed è formato da ripetizioni oligosaccaridiche di 3-5 zuccheri, e le varie catene possono raggiungere le 40 ripetizioni. L'antigeneO è molto più lungo del coreR e forma i domini idrofili del LPS. E' il maggiore determinante antigenico, contenendo gli zuccheri di-desossiososi. L'antigeneO, sebbene non tossico, può fungere da determinante della virulenza poichè permette, tramite la sua lunghezza e la sua idrofilia, di consegnare il lipideA in ambiente idrofilico; inoltre, la lunga catena previene la risposta dell'ospite (soprattutto tramite il complemento), che causerebbe la lisi. L'antigeneO funziona da adesina verso la superficie target.

La produzione di citochine (IL1, IL6, IL8, TNF, PAF) stimola la sintesi di prostaglandine e leucotrieni, che sono mediatori potenti dello shock settico che accompagna la tossicità da endotossina. Inoltre si hanno:

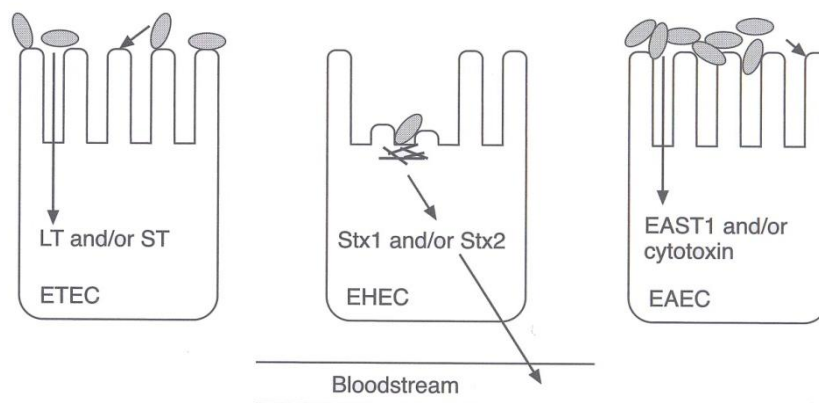
- attivazione del complemento (C3a e C5a causano rilascio di 5HT, causando vasodilatazione e chemiotassi dei neutrofili, che aumenta l'infiammazione)
- attivazione della coagulazione (trombosi, CID)
- plasmina (fibrinolisi e emorragia, ipotensione, shock)

Tossicità delle tossine batteriche, riferite a LD50 (ovvero la dose letale per il 50% del campione)

| batterio | malattia | azione | tossicità per mg (espressa come LD50) |
|--------------------------------|-------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| clostridium botulinum | botulismo | paralisi flaccida | 1,200,000 (cavia) |
| clostridium tetani | tetano | paralisi spastica cardiotossico | 1,200,000 (cavia) |
| clostridium perfringens | gangrena gassosa | necrosi emolisi | 200 (topo) |
| clostridium septicum | gangrena gassosa | emolisi | 50,000 (topo) |
| staphylococcus aureus | infezione piogena | necrosi emolisi | 50 (topo) |
| streptococcus pyogenes | scarlattina | emolisi rash | 0,5 (topo) |
| pasteurella pestis | peste | necrosi | 25 (topo) |
| shigella dysenteriae | dissenteria | emorragia paralisi | 1,200,000 (coniglio) |



meccanismo di azione della tossina termostabile ST di E. coli per aumentare i livelli di cGMP



tossine di E. coli enteropatogeni

CLASSIFICAZIONE DELLE TOSSINE BATTERICHE ASSOCIATE A DIARREA

- azione citotonica (vibrio cholerae, escherichia coli LT e ST (LT = Vibrio cholerae), bacillus cereus, aeromonas), non sono presenti granulociti nelle feci
- azione citotossica (shigella, clostridium perfringens / difficile, staphylococcus aureus, salmonella), sono presenti granulociti nelle feci (tramite colorazione con blu di metilene o ricerca di lattoferrina mediante il leucotest)

MECCANISMI MOLECOLARI DELLA CITOTOSSICITA' DELLE TOSSINE ADP-RIBOSILANTI

Le tossine possono essere enzimi (proteasi) o tossineAB, e alcune di queste sono ADP-ribosilanti. Ci sono poi glicosilazioni, deaminazioni, acetilazioni, ecc. Le tossine vengono inoltre classificate in esoenzimi, tossine che vengono rilasciate mediante sistemi di secrezione, tossine formanti pori, superantigeni.

Il frammentoA contiene il dominio catalitico, mentre il frammentoB contiene un dominio di traslocazione (T) che facilita la traslocazione del frammentoA all'interno del citoplasma della cellula ospite, e un dominio recettoriale (R) che si lega allo specifico recettore sulla membrana citoplasmatica dell'ospite.

Le ADP-ribosiltrasferasi catalizzano il trasferimento di ADP-ribosio dal NAD alla proteina dell'ospite, e vengono rilasciate mediante T3SS.

Quando l'ospite è attaccato sul fattore di allungamento EF2, come nella tossina difterica, l'attacco avviene sul "difteramide", una istidina modificata post-traduzionalmente.

Il fattore citotossico necrotizzante (RhoGAP) deamina una molecola di glutammato dalla Rho-GTPasi dell'ospite, causando attivazione costitutiva di Rho (proteina che allinea i residui catalitici delle proteineG per facilitare l'idrolisi del γ P del GTP all'interno della proteinaG), con aumento della polimerizzazione di actina.