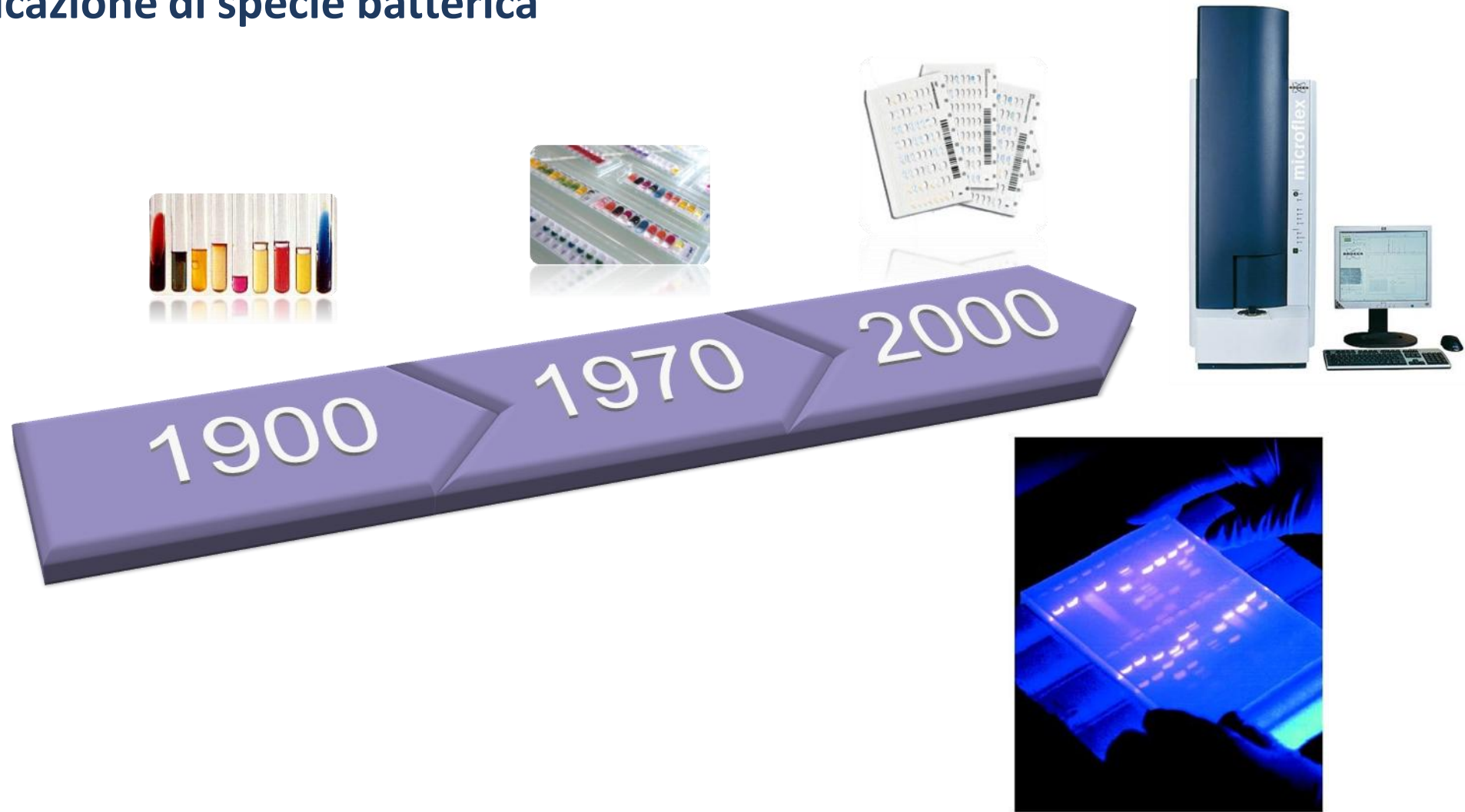


Storia delle metodologie per l'identificazione di specie batterica



Storia delle metodologie per l'identificazione di specie batterica

Laboratorio di microbiologia medica

Dalle osservazioni fenotipiche alla spettrometria MALDI-TOF e alla genomica

Fenotipo

Biotipi

Automazione

MALDI-TOF

Sequenziamento

Idea chiave: l'identificazione batterica è passata da metodi lenti, manuali e basati sul fenotipo a metodi rapidi, standardizzati e molecolari, con un impatto diretto su terapia, controllo infezioni e stewardship antimicrobica.

1. Dalle origini alla batteriologia classica (fine XIX secolo–anni 1950)

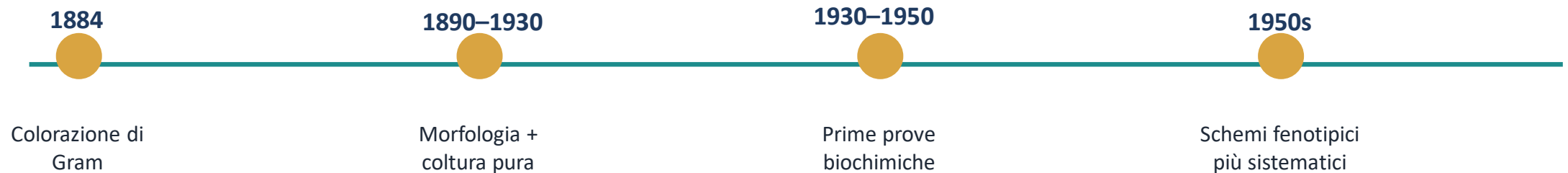
Microscopia, colorazioni e crescita in coltura come basi dell'identificazione

Metodi dominanti:

- Morfologia microscopica e disposizione cellulare
- Reazione di Gram e altre colorazioni
- Aspetto delle colonie, emolisi, crescita selettiva
- Prime prove: catalasi, ossidasi, fermentazione di zuccheri

Limiti principali:

- Dipendenza dall'esperienza dell'operatore
- Tempi lunghi legati alla crescita
- Bassa risoluzione per specie fenotipicamente simili



2. L'era dei test biochimici e dei sistemi miniaturizzati (anni 1960–1990)

Standardizzazione progressiva dell'identificazione fenotipica

Cosa cambia

- Gallerie multi-test e pannelli miniaturizzati
- Lettura più standardizzata di fermentazioni, enzimi e utilizzo di substrati
- Nascita di database interpretativi e profili numerici
- Diffusione di sistemi commerciali (es. API, Vitek)

Vantaggi per il laboratorio

- Maggiore riproducibilità
- **Riduzione della soggettività**
- Identificazione di molti batteri comuni in 18–24 h dopo isolamento
- Migliore integrazione con antibiogramma e flussi di routine



Criticità residue: batteri fastidiosi, anaerobi, non fermentanti e specie rare potevano restare difficili da distinguere solo con il fenotipo.

3. La svolta molecolare (anni 1990–2000)

Target genici e maggiore accuratezza tassonomica



Perché è importante

- Consente di identificare batteri lenti, atipici o difficili da coltivare
- Migliora la coerenza con la tassonomia moderna
- Supporta i casi in cui il fenotipo è ambiguo o discordante

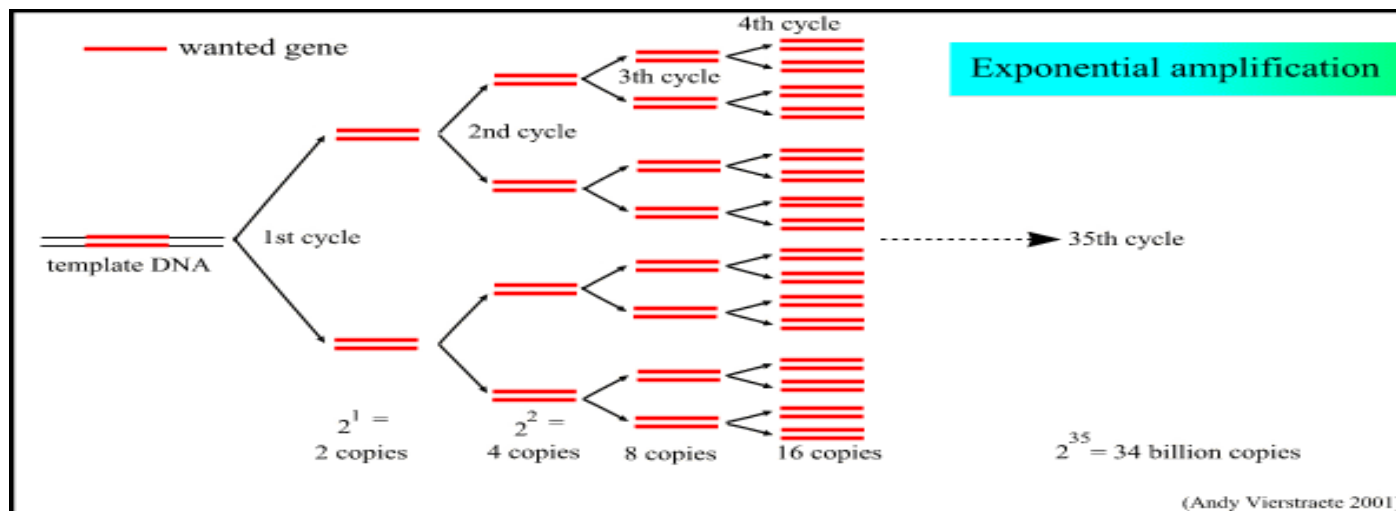
Nuovi limiti

- Costo e complessità maggiori
- Necessità di expertise bioinformatica/interpretativa
- Potere discriminante non sempre sufficiente del solo 16S per specie molto vicine

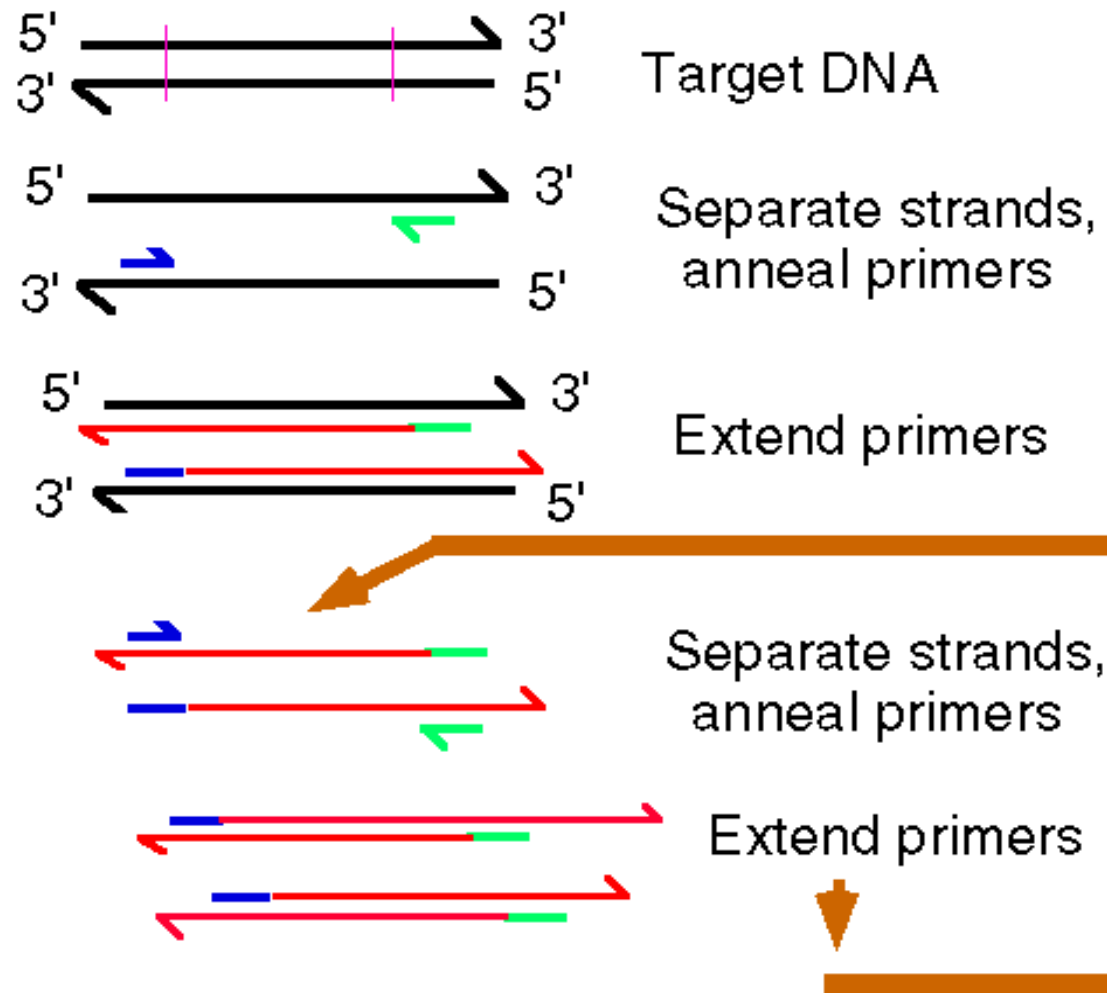
PCR - polymerase chain reaction

La PCR è un metodo rapido e versatile che consente l'amplificazione in vitro di sequenze bersaglio presenti in un campione eterogeneo di molecole di acidi nucleici

Si tratta di una **reazione enzimatica**, di **carattere ciclico**, che consente di copiare la sequenza bersaglio sfruttando una **DNA polimerasi termostabile** che utilizza come innesco due **oligonucleotidi complementari** al target



PCR - polymerase chain reaction

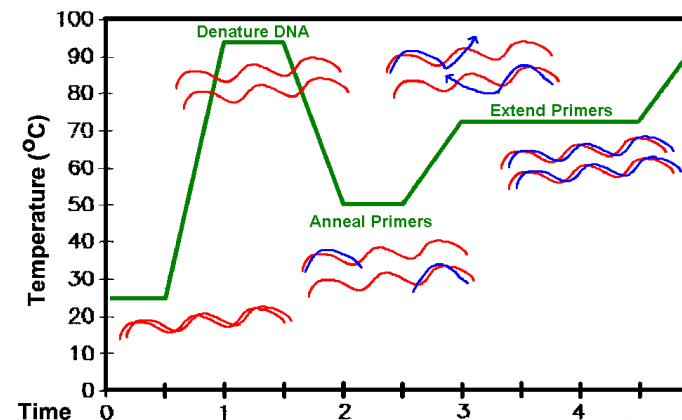


Ogni ciclo aumenta il numero di copie di target (prodotto)

Profilo termico della reazione di PCR

CYCLING PARAMETERS

Denaturation	93°C - 95°C 30 secs – 1min
Annealing	37°C - 65°C 30 secs – 1min depends on the duplex
Extension	72°C 1min (+ 30secs per 500bp DNA)
25-35 cycles	
Final extension	2-10mins



Mix per la Reazione di Sequenza

ACCTGTACTCGGCTAAG
TGGACATGAGCCGATTC

Dna stampo



Taq polimerasi

TTTT

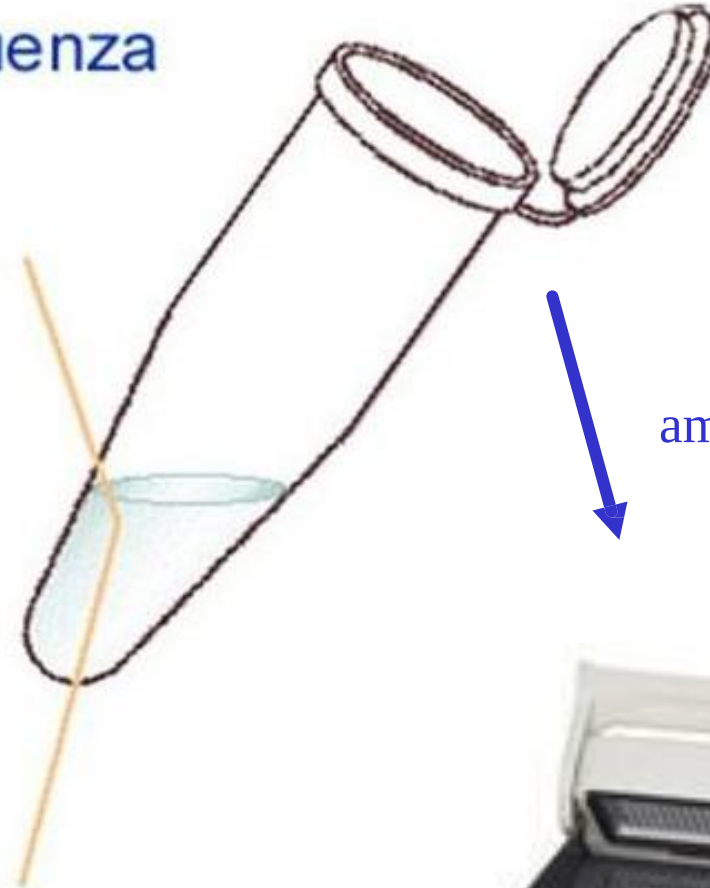
Primer

C A T G
T T T T

Deossinucleotidi



Dideossinucleotidi



amplificazione





Figure 1.
Fluorescently
labeled DNA
fragments move
through a capillary.

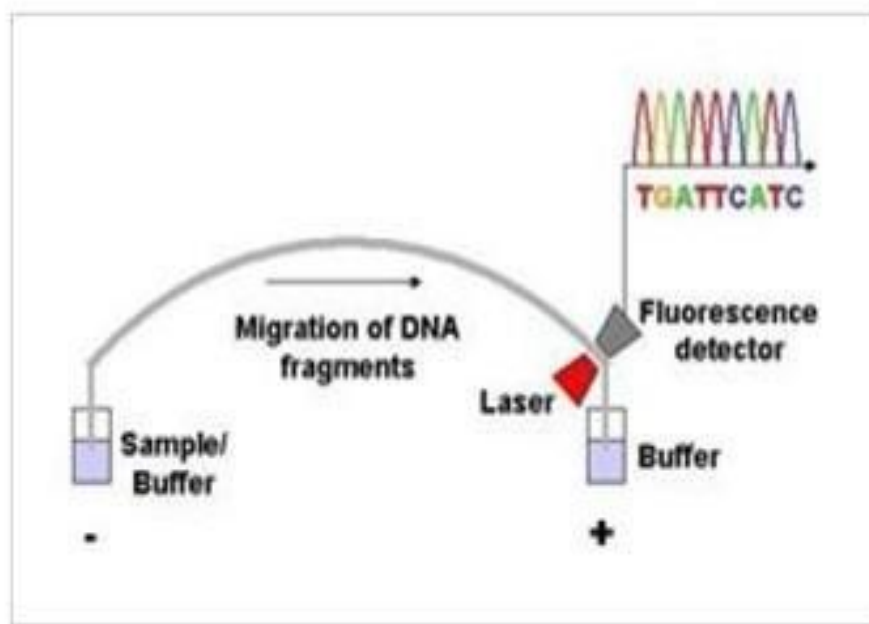
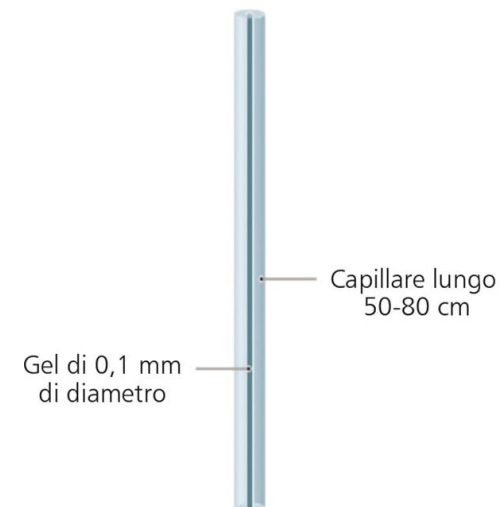


Figure 2. DNA fragments pass through a laser
beam and optical detector.



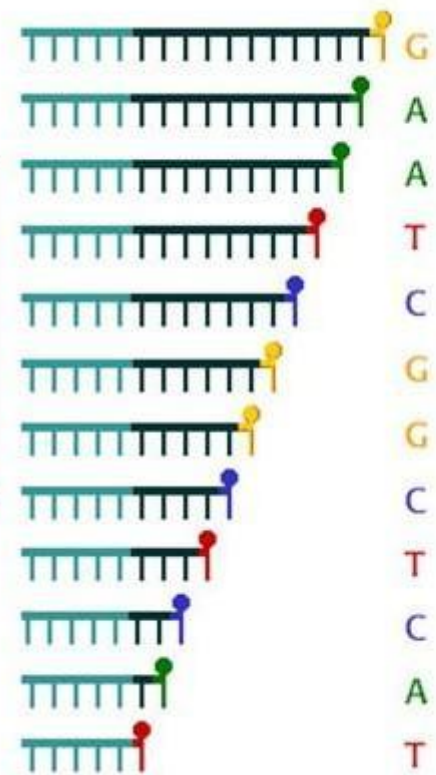
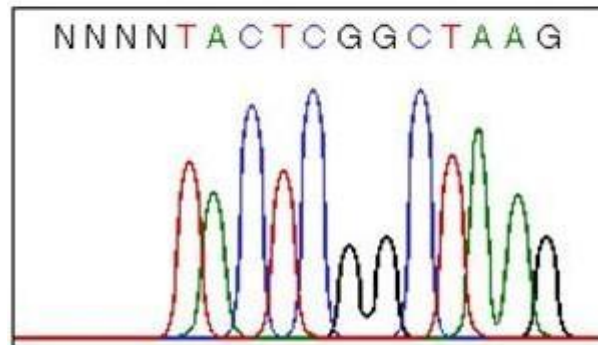
(a) Gel capillare



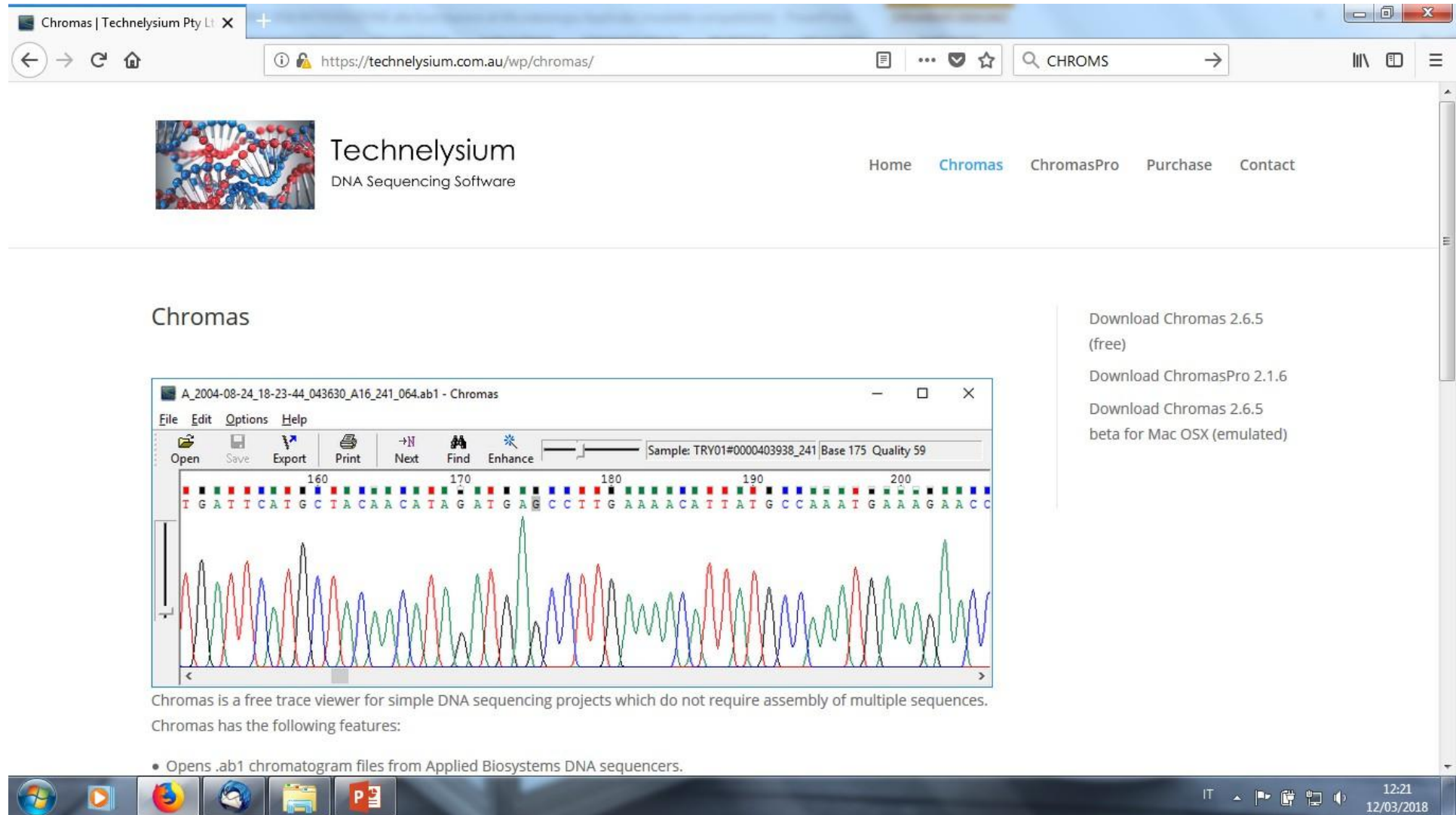
(b) Elettroforesi di molecole
di DNA a singolo filamento



RISULTATI



<https://technelysium.com.au/wp/chromas>



The screenshot displays a web browser window with the URL <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>. The website header features the Technelysium logo (DNA Sequencing Software) and navigation links: Home, Chromas, ChromasPro, Purchase, and Contact. The main content area is titled "Chromas" and includes a large image of the Chromas software interface. The software window shows a DNA sequence viewer with a chromatogram plot below it. The sequence is: T G A T T C A T G C T A C A A C A T A G A T G A G C C T T G A A A A C A T T A T G C C A A A T G A A A G A A C C. The software window also displays a menu bar (File, Edit, Options, Help) and a toolbar with buttons for Open, Save, Export, Print, Next, Find, and Enhance. The status bar indicates "Sample: TRY01#0000403938_241" and "Base 175 Quality 59". To the right of the software image, there are three download links: "Download Chromas 2.6.5 (free)", "Download ChromasPro 2.1.6", and "Download Chromas 2.6.5 beta for Mac OSX (emulated)". Below the software image, a text block states: "Chromas is a free trace viewer for simple DNA sequencing projects which do not require assembly of multiple sequences. Chromas has the following features:" followed by a bullet point: "• Opens .ab1 chromatogram files from Applied Biosystems DNA sequencers."

Chromas

Download Chromas 2.6.5 (free)

Download ChromasPro 2.1.6

Download Chromas 2.6.5 beta for Mac OSX (emulated)

Chromas is a free trace viewer for simple DNA sequencing projects which do not require assembly of multiple sequences. Chromas has the following features:

- Opens .ab1 chromatogram files from Applied Biosystems DNA sequencers.

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Universit  di Padova Centri-Sep Spin Columns - The IUPAC ambiguity codes. Nucle BLAST: Basic Local Alignment S

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi centrisept

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information Sign in to NCBI

BLAST Home Recent Results Saved Strategies Help

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

NEWS
BLAST+ 2.8.0-alpha released
BLAST+ now has a better database.
Wed, 28 Mar 2018 18:00:00 EST
[More BLAST news...](#)

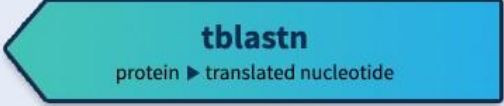
Web BLAST



Nucleotide BLAST
nucleotide ► nucleotide



blastx
translated nucleotide ► protein



tblastn
protein ► translated nucleotide

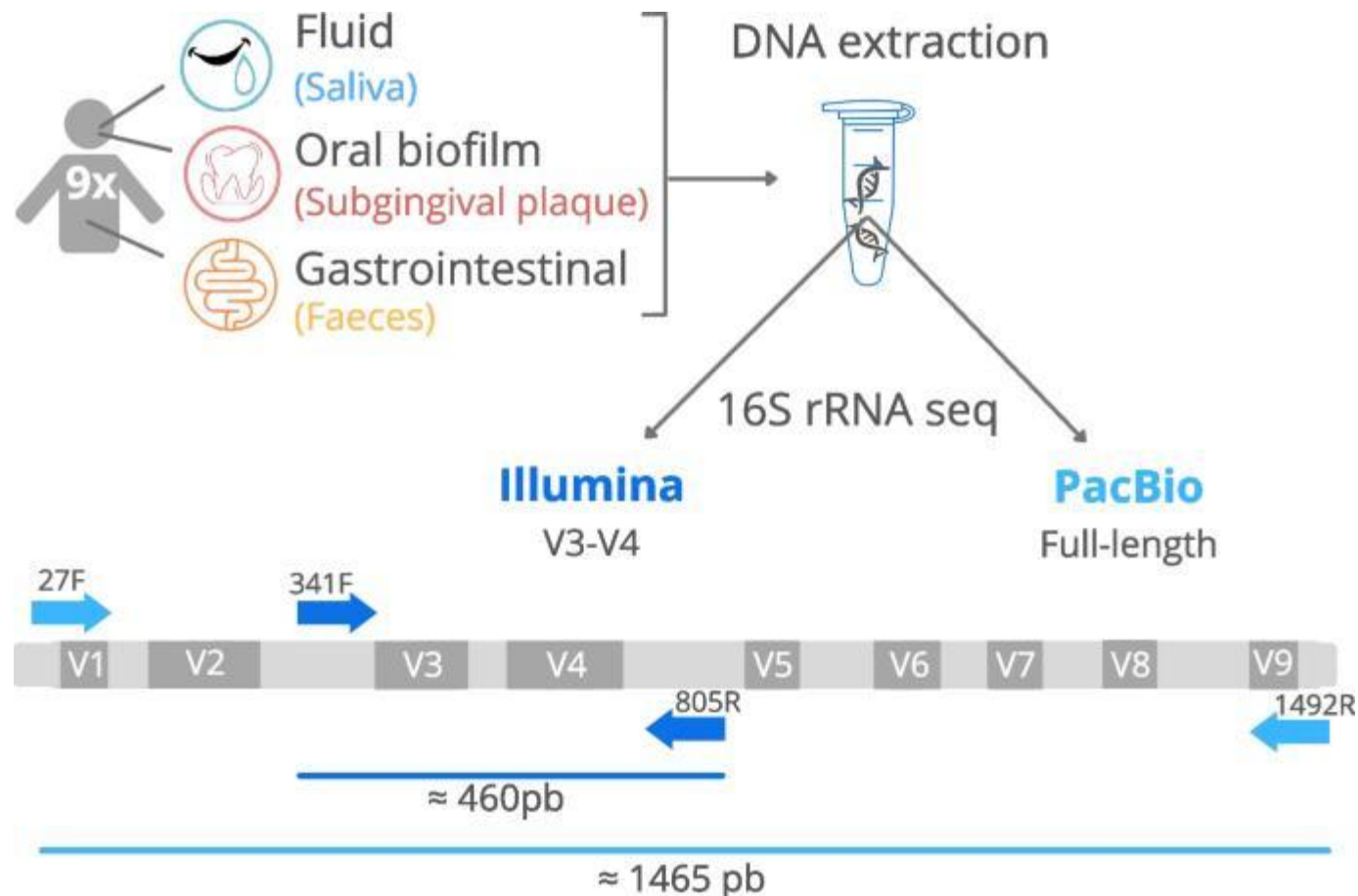
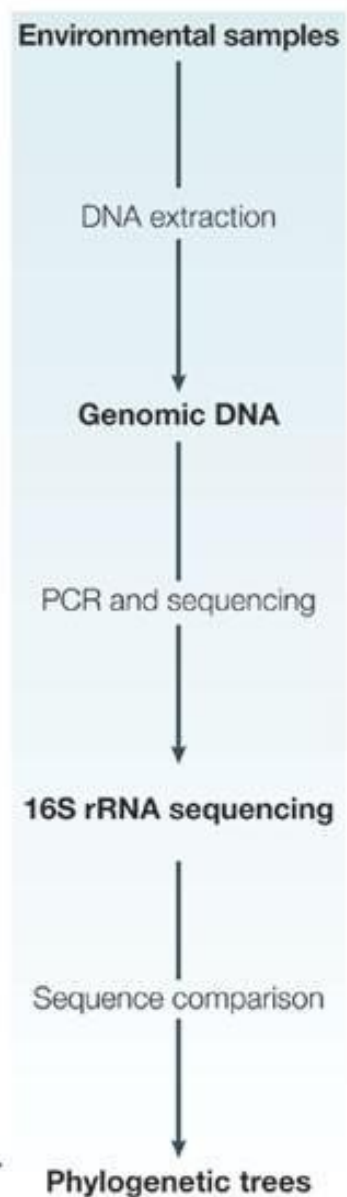
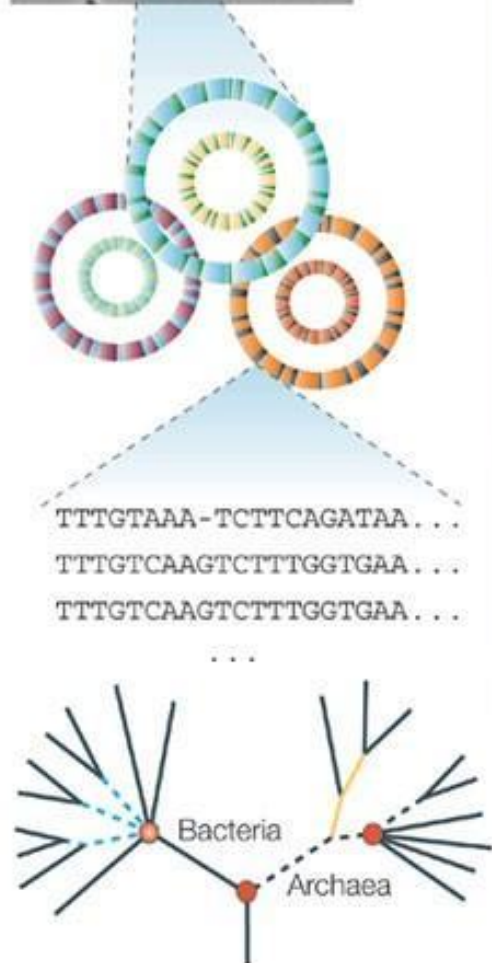
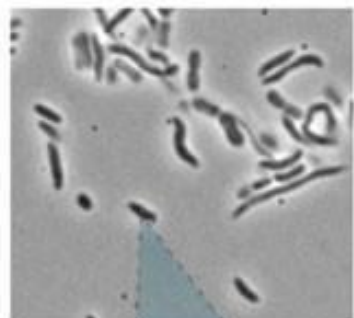


Protein BLAST
protein ► protein

BLAST Genomes

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

19:52 17/04/2018



4. La rivoluzione MALDI-TOF MS (anni 2010–oggi)

Dalla colonia all'identificazione in pochi minuti

Workflow essenziale

Prelievo colonia

Deposizione su target

Aggiunta matrice

Spettro proteico

Confronto con database

Impatto clinico-operativo

- Tempi drasticamente ridotti
- Costo per test molto basso dopo investimento iniziale
- Ottime prestazioni per gran parte dei batteri di routine
- Migliore turn-around time per terapia mirata

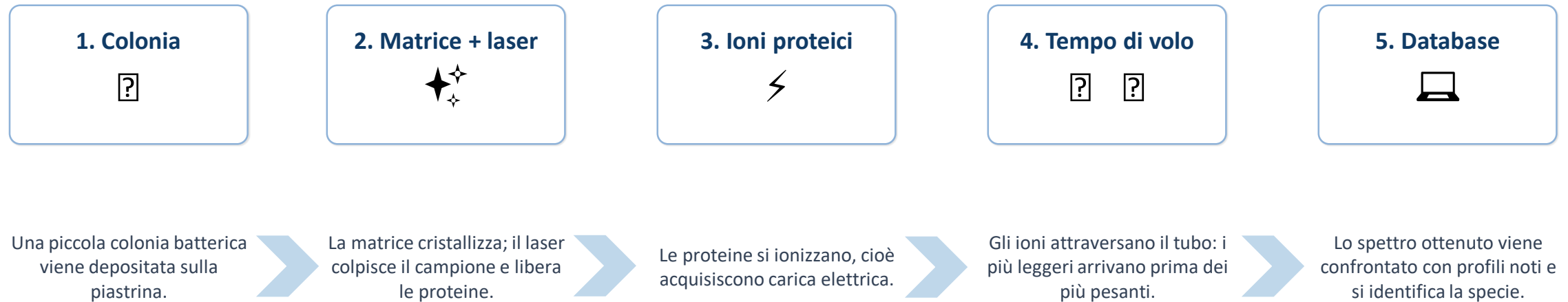
Punti di attenzione

- Dipende dalla qualità/ampiezza del database
- Alcune specie o complessi restano difficili
- Talvolta serve conferma molecolare

Oggi MALDI-TOF è il fulcro della routine in molti laboratori di microbiologia medica.

Come funziona il MALDI-TOF?

Identificazione rapida di specie batteriche tramite “impronta proteica”



Idea chiave: ogni batterio produce uno spettro di picchi caratteristico, come un'impronta digitale.

MALDI-TOF MS

Identificazione tramite
ionizzazione delle proteine
ribosomiali costantemente
espresse e abbondanti nelle
cellule batteriche rispetto alle
proteine di superficie

Attesa 10 min per ID
Dopo 24 da colonie



**MALDI-TOF
MS**

Matrix
Assisted
Laser
Desorption
Ionization

Metodo di ionizzazione in cui un laser colpisce una matrice di piccole molecole organiche per trasformare le grandi e fragili molecole di analita in ioni gassosi senza frammentarle o decomporle

Time
Of
Flight

Metodo di MS che separa gli ioni in base al loro rapporto massa/carica, determinato dal tempo impiegato dagli ioni a raggiungere un rilevatore

MALDI-TOF MS

Bacterial Identification Workflow



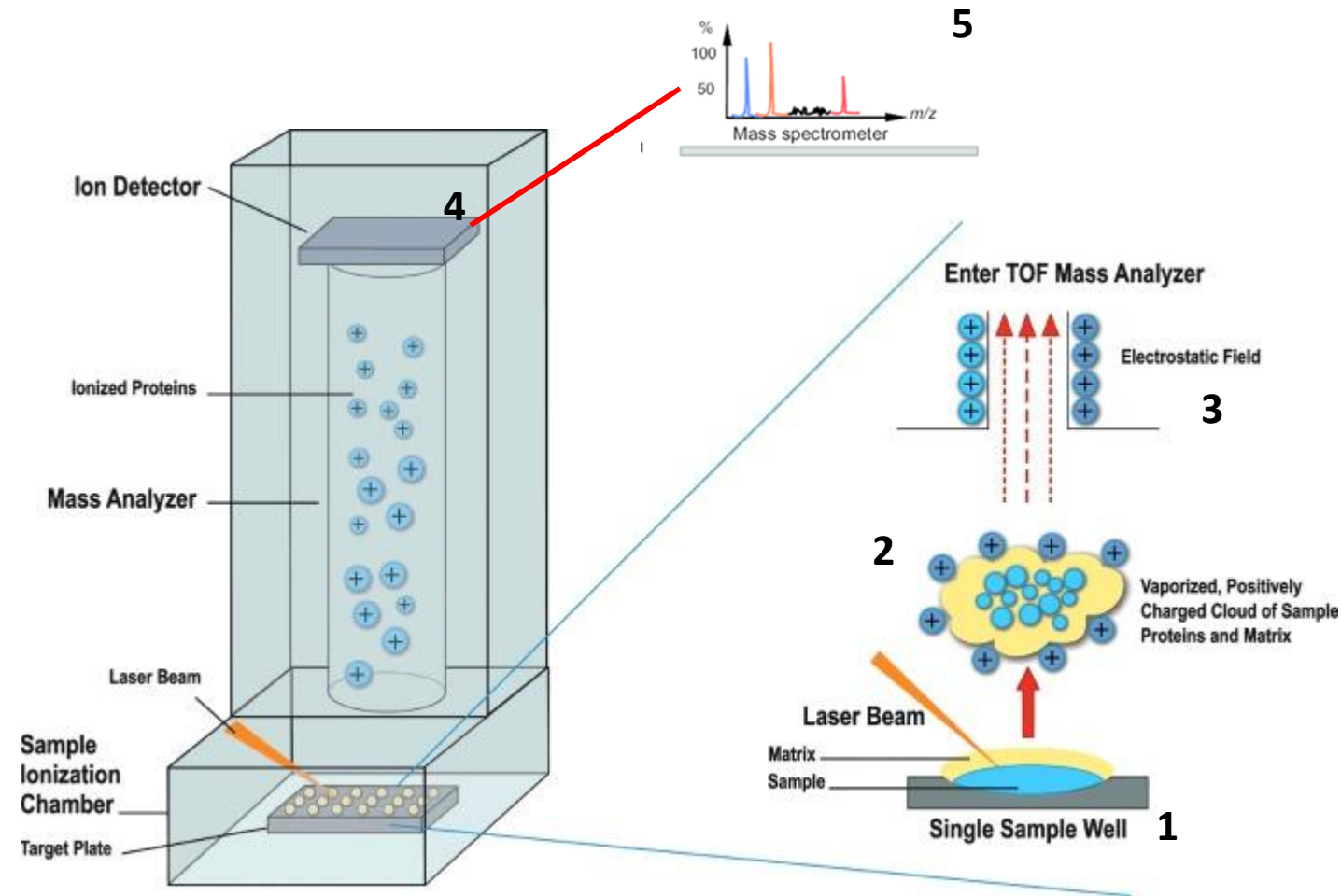
Matrice: piccola molecola organica utilizzata per facilitare il processo di ionizzazione. È costituita da un acido organico debole non volatile caratterizzato da cromofori in grado di assorbire radiazioni UV e far esplodere le molecole di analita nella fase gassosa.

Yeast Identification Workflow:



MALDI-TOF MS

Campione + matrice
3 settori
1 controllo per settore
48 campioni



1. Campione da analizzare, posizionato su un'apposita matrice
2. Viene colpito da un raggio laser che provoca la frammentazione delle sue molecole e la successiva ionizzazione dei frammenti ottenuti;
3. Queste particelle, dotate ora di carica elettrica uniforme, vengono poi convogliate all'interno di un campo elettrico che le accelera e le indirizza attraverso un percorso obbligato sino ad un sensore, che misura il rapporto massa/carica elettrica di ogni singola particella.
4. Il sensore invia poi un segnale ad un computer che codifica tale segnale (tramite un software apposito) in un picco su di un sistema di riferimento cartesiano; si ottiene così alla fine un tracciato (detto: "Spettro"(5)) formato da un insieme di picchi



RISULTATI

VITEK® MS Da rivedere									
VITEK® MS Da rivedere									
☐	P6505352	BARBAN MORENA	01568004493382.1	Fluidi	Enterococcus faecalis	99.9		Rivisto	
☐	P6509261	BASANA IVAN	01298004496304.1		Acinetobacter baumannii	99.9		Rivisto	
☐	P6509261	BASANA IVAN	03018004496304.1		Acinetobacter baumannii	99.9		Rivisto	
☐	P6513155	BASSAN GIANFRANCO	00018004498683.1	Sangue	Pseudomonas aeruginosa	99.9		Rivisto	
☐	P6513155	BASSAN GIANFRANCO	00028004498683.1	Sangue	Pseudomonas aeruginosa	99.9		Rivisto	
☐	P6500289	BECEVELLO IVANO	01708004489760.1	Sangue				Scaricato	
☐	P6520373	BEDIN GAIA	01438004504243.1		Escherichia coli	99.9		Rivisto	
☐	P6514426	BEGGIO LAURA	00878004499636.1	Pelle	Proteus mirabilis	99.9		Rivisto	
☐	P6512677	BEGGIO LILIANA	00018004498363.1	Sangue	Enterococcus faecium	99.9		Rivisto	
☐	P6525020	BELLESSO SOFIA	01438004507243.1					Scaricato	
☐	P6512771	BENETAZZO RITA	03018004498418.1		Klebsiella pneumoniae	99.9		Rivisto	
☐	P6512577	BERENGAN ELDA	00518004498269.1	Fluidi	Enterobacter cloacae	50.0		Rivisto	
☐	P6512577	BERENGAN ELDA	00518004498269.2	Fluidi	Enterobacter cloacae	50.0		Rivisto	
☐	P6513132	BERENGAN ELDA	00028004498662.1	Sangue	Staphylococcus haemolyticus	99.9		Rivisto	
☐	P6513132	BERENGAN ELDA	00018004498662.1	Sangue	Staphylococcus epidermidis	99.9		Rivisto	
☐	P6512584	BERENGAN ELDA	01678004498275.1	Sangue	Staphylococcus epidermidis	99.9		Rivisto	
☐	P6513132	BERENGAN ELDA	00018004498662.2	Sangue				Scaricato	
☐	P6512584	BERENGAN ELDA	01678004498275.2	Sangue	Candida albicans	99.1		Rivisto	
☐	P6512577	BERENGAN ELDA	00518004498269.3	Fluidi	Bacteroides fragilis	99.9		Rivisto	
☐	P6512736	BERRI A.D.I.ZA	03938004498395.1		Escherichia coli	99.9		Rivisto	



5. Presente e futuro: genomica, metagenomica e identificazione diretta

Verso un laboratorio più rapido, integrato e data-driven

WGS

Massima risoluzione per specie, cloni e resistenze; utile anche per sorveglianza epidemiologica.

Metagenomica

Analisi direttamente da campioni complessi; promettente quando la coltura è lenta o negativa.

POCT/NAAT

Pannelli sindromici e test rapidi integrano, ma non sostituiscono, la coltura.

AI & database

Interpretazione automatizzata e aggiornamento continuo migliorano accuratezza e standardizzazione.

Messaggio finale: il futuro non è “un metodo contro un altro”, ma una combinazione intelligente di coltura, MALDI-TOF, test molecolari e sequenziamento in base al quesito clinico.

6. In conclusione

Batteriologia classica

Identificazione basata su morfologia, colorazioni e coltura.

Biochimica miniaturizzata

Standardizza il fenotipo e rende la routine più affidabile.

Molecolare

Aumenta accuratezza e potere tassonomico nei casi complessi.

MALDI-TOF

Porta rapidità, costo/test ridotto e grande diffusione operativa.

Genomica

Apri a identificazione ad alta risoluzione e sorveglianza integrata.

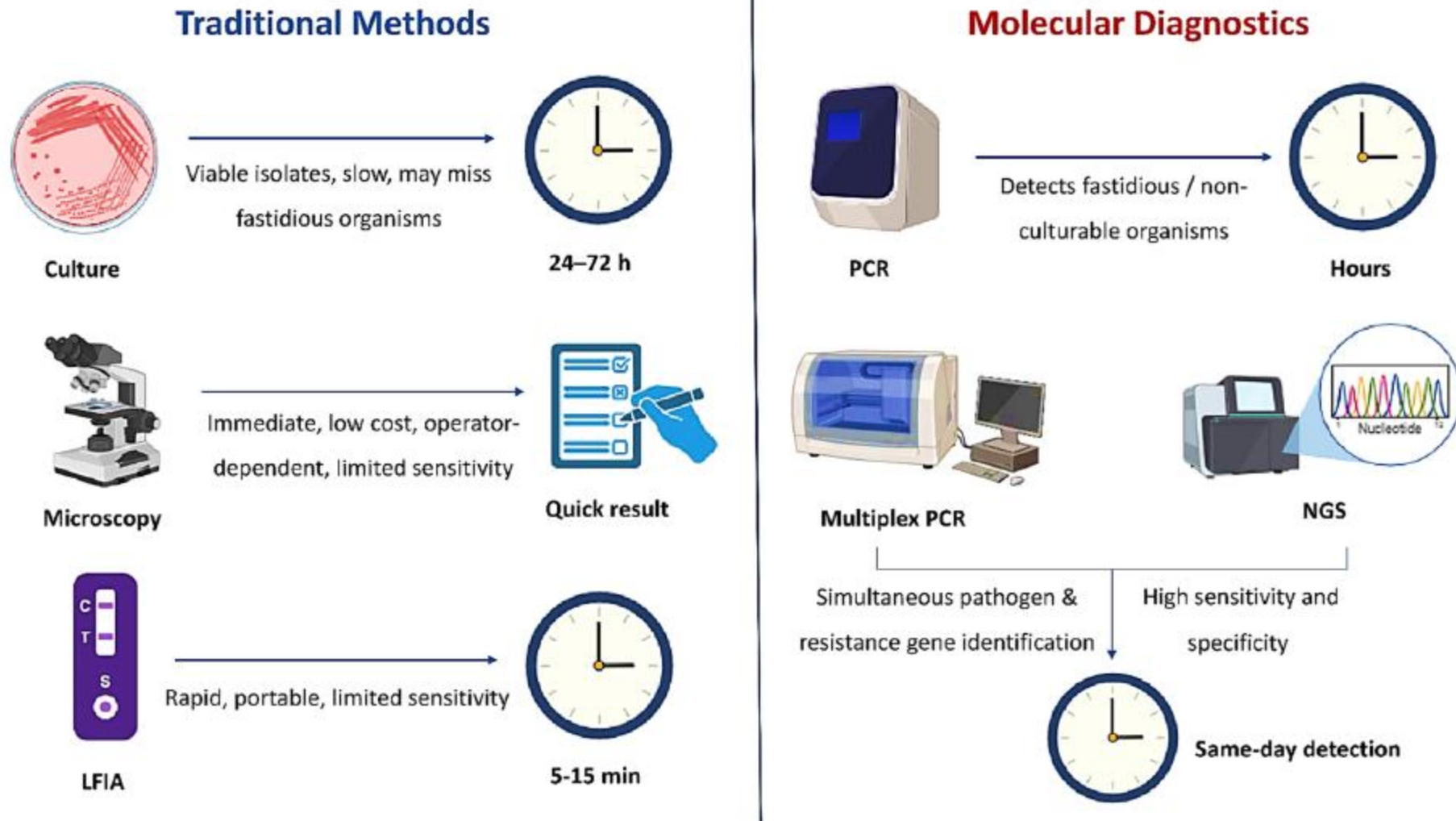


Fig. 1. Comparison of traditional and molecular diagnostic approaches in clinical microbiology.

Tassonomia dei batteri

Tassonomia e classificazione dei batteri

Due concetti correlati ma distinti

Tassonomia

La **tassonomia** è la **disciplina scientifica** che si occupa di identificare, descrivere, denominare e classificare gli organismi in base alle loro **relazioni evolutive**.

- Stabilisce i **criteri**, le **regole** e i **principi** per l'assegnazione dei nomi (**nomenclatura**).
- Definisce le **categorie** tassonomiche (specie, genere, famiglia, ecc.).
- Integra dati fenotipici, chemotassonomici, filogenetici e genomici.
- È descritta in codici internazionali di nomenclatura.



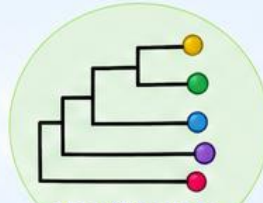
Identificazione
(chi è?)



Descrizione
(come è fatto?)



Nomenclatura
(come si chiama?)



Classificazione
(dove si colloca?)

Classificazione

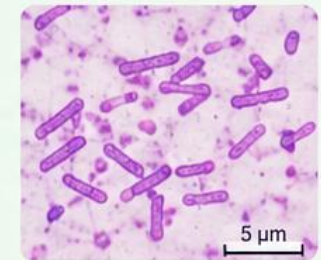
La **classificazione** è il **risultato operativo della tassonomia**: consiste nel **raggruppare** gli organismi in categorie gerarchiche (taxa) sulla base di **caratteristiche comuni** e del loro grado di **somiglianza** e di **parentela evolutiva**.

- Organizza i microrganismi in gruppi gerarchici.
- Si basa su caratteri fenotipici, chemotassonomici, genotipici e filogenetici.
- Produce una struttura classificatoria (es. dominio, phylum, classe, ...).
- È dinamica: può essere modificata alla luce di nuove conoscenze.

In sintesi

	TASSONOMIA	CLASSIFICAZIONE
Cosa è?	Disciplina scientifica	Risultato della tassonomia
Cosa fa?	Stabilisce criteri, regole, nomenclatura e principi	Raggruppa gli organismi in taxa
Obiettivo	Identificare, descrivere, nominare e classificare	Organizzare gli organismi in gruppi gerarchici
Tipi di dati	Fenotipici, chemotassonomici, genotipici, filogenetici	Si basa sugli stessi dati
Esempio	Codice Internazionale di Nomenclatura Procariotica	Assegnazione di un batterio al genere <i>Escherichia</i> , famiglia <i>Enterobacteriaceae</i> , ecc.

Esempio di classificazione gerarchica



Escherichia coli
(Gram-negativo)

Classificazione dei batteri: il metodo fenetico

Raggruppa i batteri in base alla somiglianza complessiva del loro fenotipo

Che cos'è?

Il metodo fenetico classifica i batteri confrontando un insieme ampio di caratteri osservabili (**fenotipo**), senza dare priorità a singoli caratteri, ma valutando la somiglianza complessiva tra i ceppi.

Su cosa si basa?

- Analisi di molteplici caratteristiche fenotipiche
- Valutazione della somiglianza globale tra i ceppi (distanza fenetica)
- Raggruppamento mediante metodi statistici (es. clustering)
- Produzione di dendrogrammi di similarità

Punti di forza e limiti



Punti di forza

- Approccio pratico e rapido
- Utilizza caratteristiche facilmente rilevabili in laboratorio
- Utile per identificazione preliminare e per gruppi numerosi di ceppi



Limiti

- Non fornisce informazioni evolutive
- Può essere influenzato dalle condizioni di crescita
- Caratteri fenotipici talvolta variabili o convergenti
- Oggi affiancato da metodi genotipici (es. filogenetici)

Principali caratteristiche fenotipiche utilizzate

Categoria	Caratteristiche considerate	Esempi / Metodi di analisi	Cosa indicano
Morfologiche 	• Forma e disposizione cellulare • Dimensioni • Strutture particolari (spore, capsule, flagelli)	Microscopia ottica/elettronica Colorazioni semplici e differenziali	Aspetto generale della cellula
Colturali 	• Tipo di colonia • Dimensioni, forma, colore, margine • Emolisi su agar sangue	Coltura su terreni solidi/liquidi	Crescita e caratteristiche macroscopiche
Fisiologiche 	• Temperatura di crescita (min, ott, max) • pH e tolleranza al sale • Requisiti di ossigeno (aerobi, anaerobi, microaerofili)	Prove di crescita in diverse condizioni	Adattamento ambientale e metabolismo generale
Biochimiche 	• Utilizzo di substrati (zuccheri, aminoacidi, etc.) • Produzione di enzimi e metaboliti • Reazioni specifiche (es. catalasi, ossidasi, fermentazione)	Test biochimici standardizzati (API, VITEK, prove manuali)	Capacità metaboliche e vie enzimatiche
Antigeniche 	• Strutture di superficie • Antigeni somatici (O), flagellari (H), capsulari (K)	Agglutinazione, ELISA, immunofluorescenza	Proprietà sierologiche
Sensibilità a composti 	• Sensibilità a antibiotici e coloranti • Resistenza a metalli pesanti o altre sostanze	Test di sensibilità (es. Kirby-Bauer)	Risposta a composti chimici, utile per differenziare i ceppi

Schema del processo fenetico

1. Raccolta dei dati

Rilevazione di molteplici caratteri fenotipici



2. Standardizzazione

Trasformazione dei dati in una matrice di similarità



3. Analisi statistica

Calcolo della distanza fenetica e clustering



4. Dendrogramma

Rappresentazione grafica dei gruppi di ceppi simili



5. Classificazione

Definizione di gruppi fenetici (es. specie, genere)

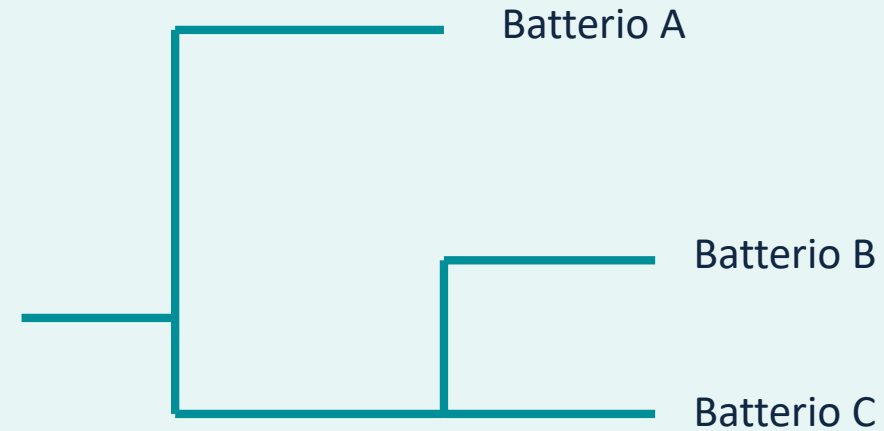
Classificazione filogenetica dei batteri

Ricostruisce le relazioni evolutive e l'ascendenza comune tra organismi

COME FUNZIONA

1. Si confrontano sequenze omologhe (es. 16S rRNA o geni conservati).
2. Si allineano le sequenze.
3. Si costruisce un albero filogenetico.

ESEMPIO SCHEMATICO



MESSAGGIO CHIAVE → La vicinanza dei rami indica una maggiore parentela evolutiva; non equivale necessariamente a somiglianza fenotipica.

Classificazione genetica (genomica) dei batteri

Misura la somiglianza del DNA per delimitare e identificare i gruppi tassonomici

16S rRNA

Confronto di un marcatore conservato; utile per identificazione e inquadramento generale.

ANI

Identità nucleotidica media tra genomi; $\approx 95\text{--}96\%$ è una soglia orientativa per la stessa specie.

dDDH

Ibridazione DNA–DNA digitale; $\approx 70\%$ è una soglia orientativa per la stessa specie.

Genomica comparativa

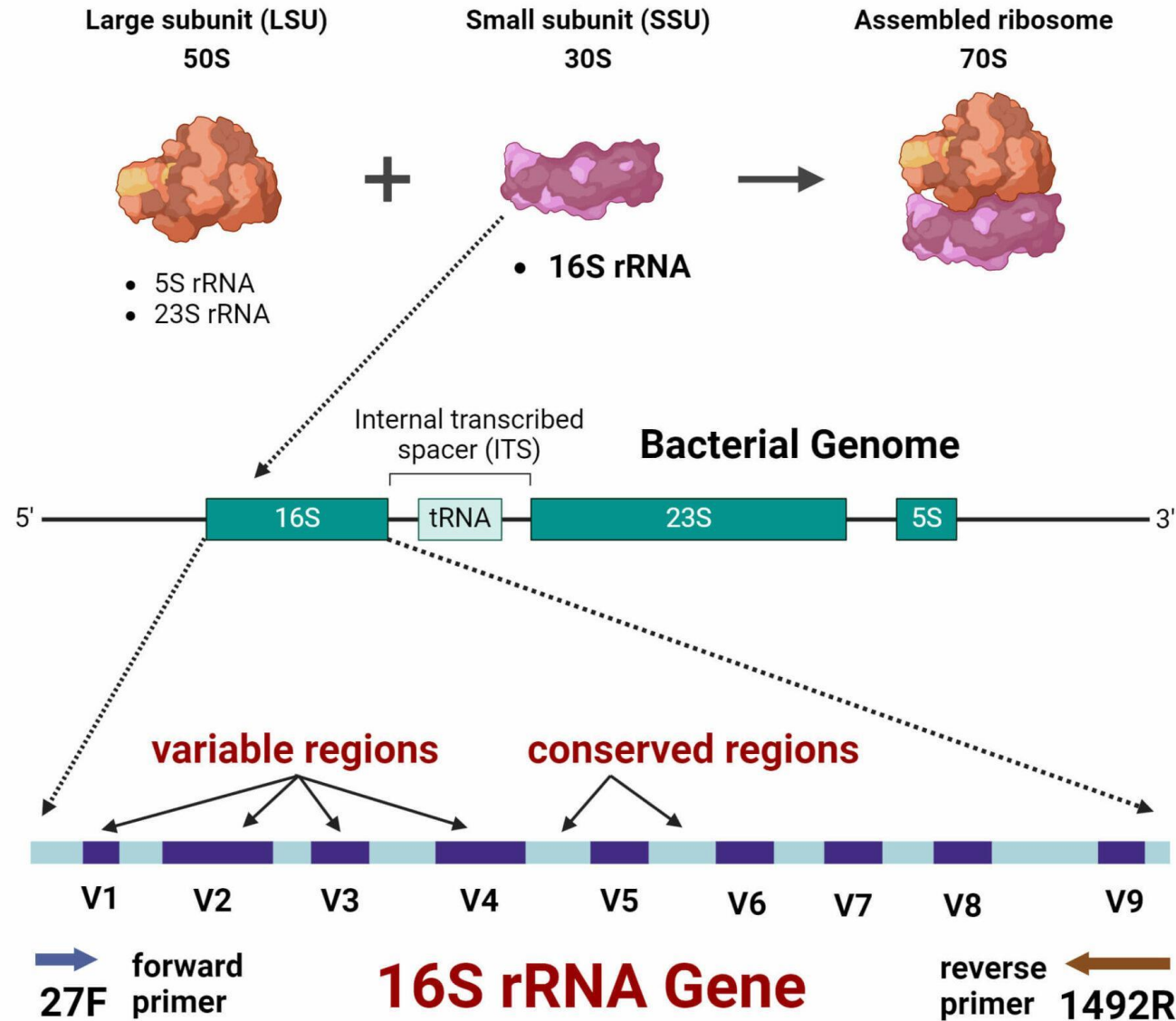
Confronto di geni condivisi, contenuto genico e interi genomi (core genome).

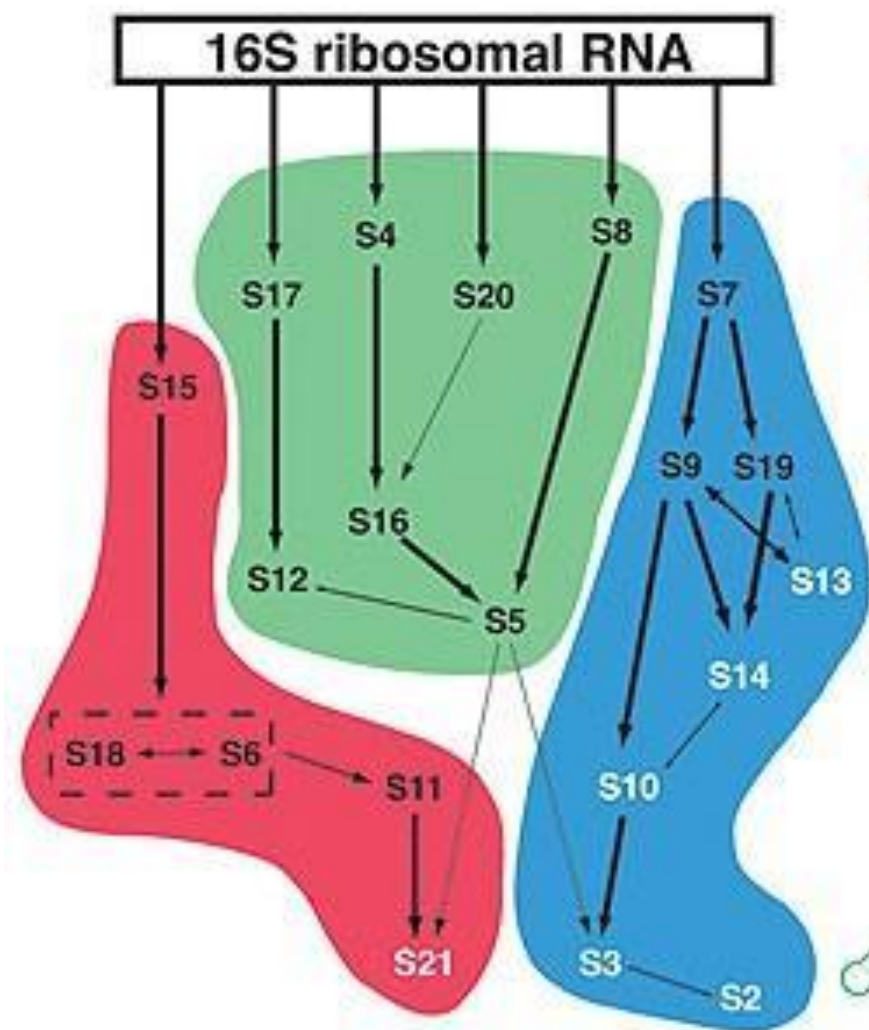
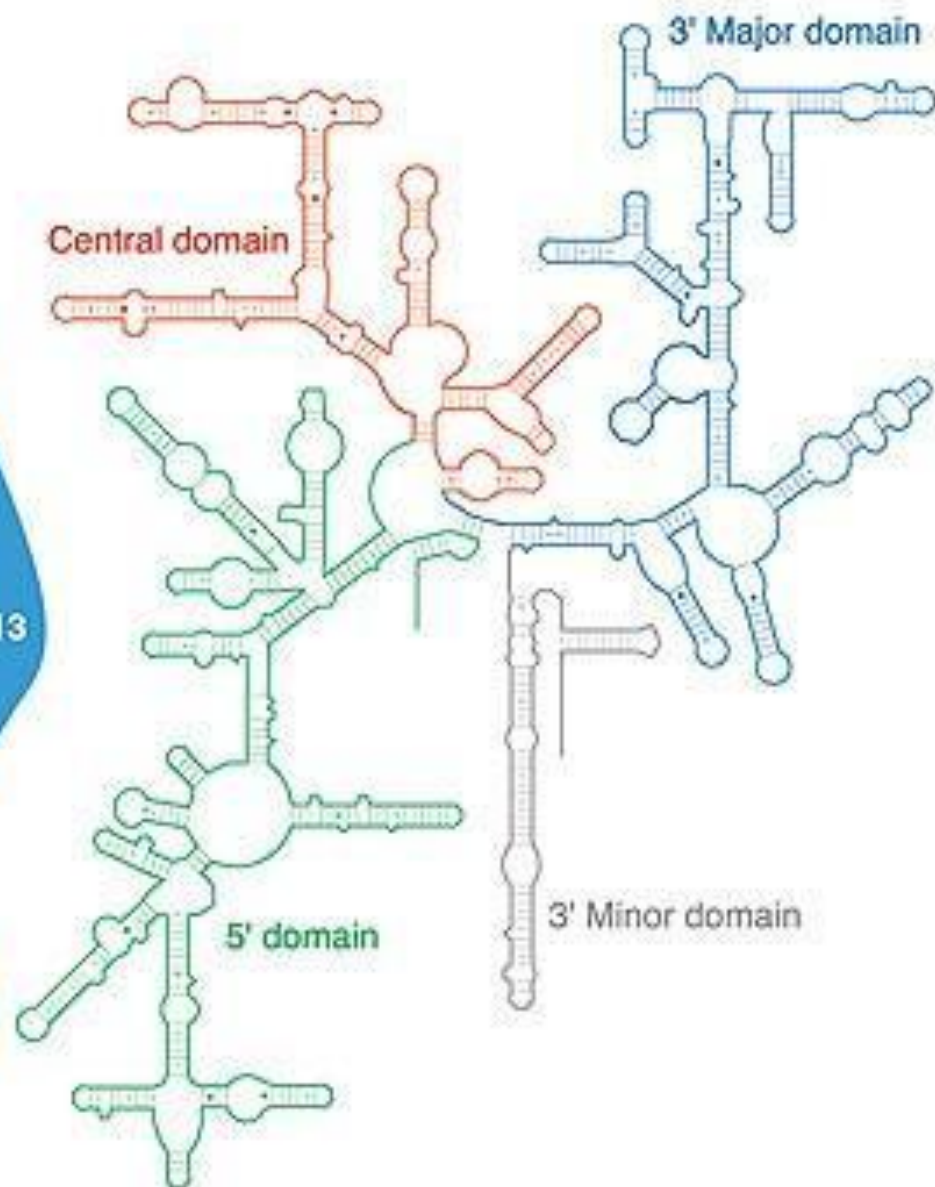
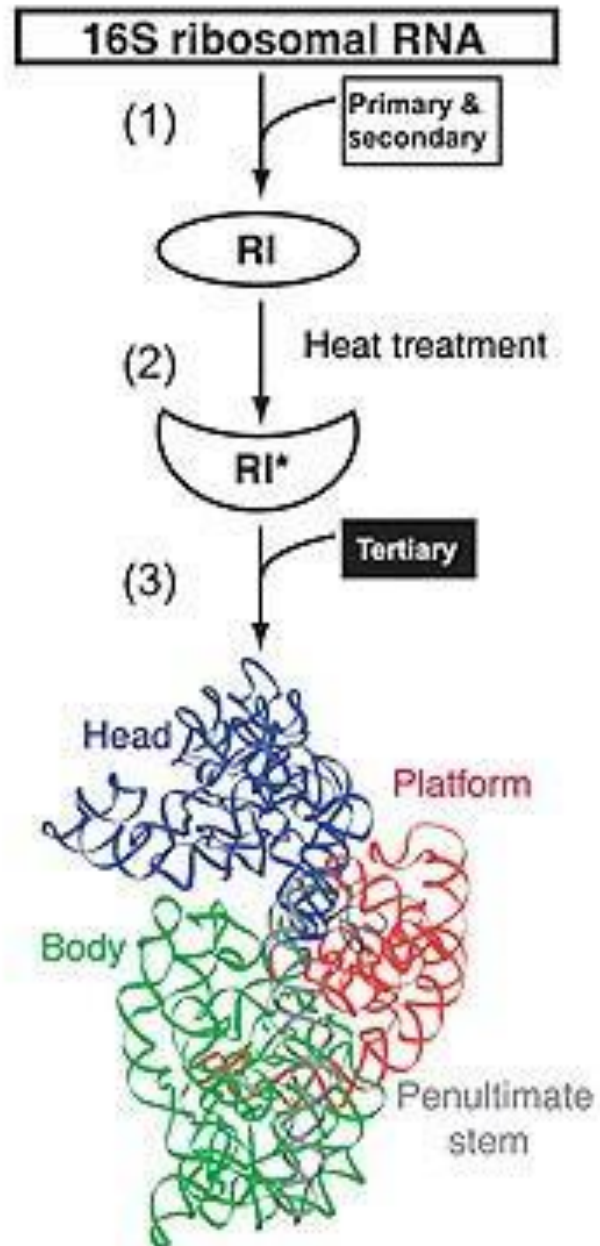
MESSAGGIO CHIAVE → La genomica quantifica le differenze genetiche; l'interpretazione tassonomica integra anche dati filogenetici e fenotipici.

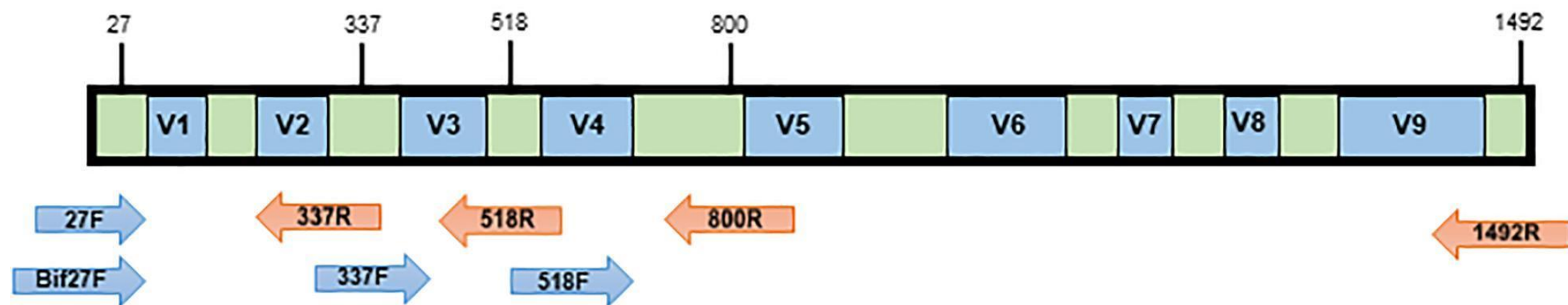
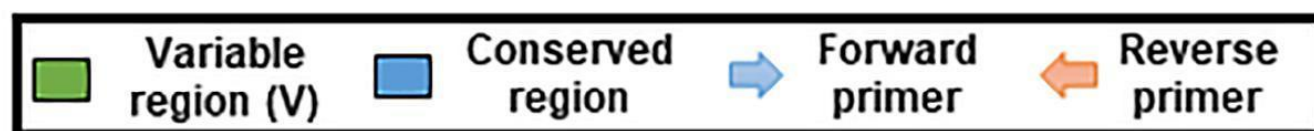
Nota: le soglie genomiche sono convenzioni operative, non criteri assoluti validi per ogni gruppo.

What is 16S rRNA gene?

Prokaryotic Ribosome



a**b****c**



Classificazione dei batteri secondo il Manuale del Bergey

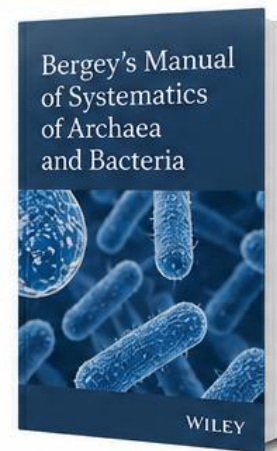
Un approccio *polifasico* basato su caratteristiche fenotipiche, *chemotassonomiche* e *genotipiche*

Il Manuale del Bergey

- Riferimento storico e fondamentale per la sistematica batterica.
- 1^a edizione: 1923
- Attualmente: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (cap. online, aggiornamenti continui).
- Utilizza un **approccio polifasico** che integra molteplici caratteristiche fenotipiche, chemiotassonomiche e, più recentemente, genotipiche.

Principi generali

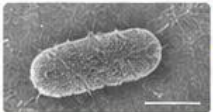
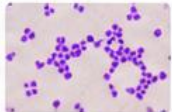
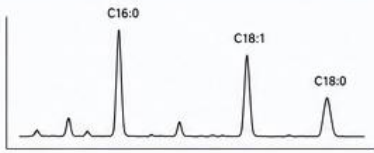
- La classificazione riflette **relazioni evolutive** basate sulla **somiglianza complessiva**.
- Si analizza un ampio insieme di **caratteri fenotipici, chemotassonomici e genetici**.
- I ceppi vengono prima assegnati a gruppi fenetici in base alla **similarità complessiva**.
- La classificazione segue una **gerarchia tassonomica** standard (specie → genere → famiglia → ordine → classe → phylum/Divisione).
- La descrizione formale di nuovi **taxa** richiede dati **polifasici** e, per la **specie**, il concetto di specie basato su ANI ≥ 95–96% e DDH ≥ 70% (nei moderni aggiornamenti).



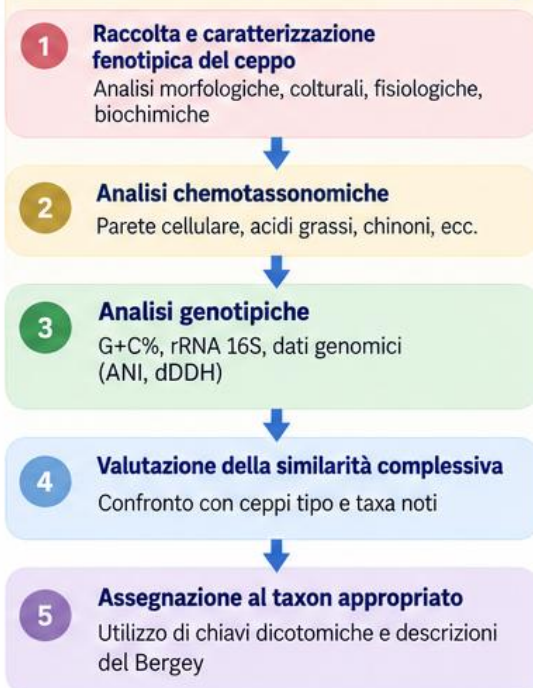
Cosa include

- Diagnosi e descrizione dei taxa batterici.
- Chiavi dicotomiche e caratteri differenziali.
- Informazioni ecologiche, fisiologiche e genomiche.
- Criteri per la validazione di nuovi taxa.

Caratteri utilizzati nel Manuale del Bergey

1. Caratteri morfologici	• Forma e dimensioni cellulari • Disposizione (cocchi, bacilli, spirilli, ecc.) • Strutture particolari (spore, capsule, flagelli) • Gram, acido-alcol resistenza	 
2. Caratteri culturali	• Tipo di colonia (forma, colore, margine) • Requisiti nutrizionali • Temperatura, pH, salinità ottimali • Condizioni di crescita (aerobi, anaerobi, microaerofili)	
3. Caratteri fisiologici e biochimici	• Utilizzo di substrati e fonti di carbonio/azoto • Attività enzimatiche (catalasi, ossidasi, ureasi, ecc.) • Produzione di metaboliti • Fermentazione, respirazione, riduzione di nitrati, ecc.	
4. Caratteri chemotassonomici	• Composizione della parete cellulare (es. tipo di peptidoglicano) • Acidi grassi di membrana • Chinoni respiratori • Lipidi polari • G+C% del DNA	
5. Caratteri genotipici (moderni aggiornamenti)	• Percentuale G+C del DNA • Ibridazione DNA-DNA (storicamente) • Sequenza del rRNA 16S • Analisi genomica (ANI, dDDH, filogenomica)	

Procedura di classificazione secondo il Bergey



Gerarchia tassonomica



Esempio (Bergey)

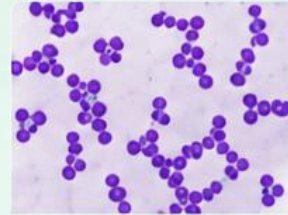
Bacteria
Proteobacteria
Gammaproteobacteria
Enterobacterales
Enterobacteriaceae
Escherichia
Escherichia coli

Classificazione dei batteri secondo il metodo fenetico: gracilicutes, firmicutes e altri gruppi basati sulla parete cellulare

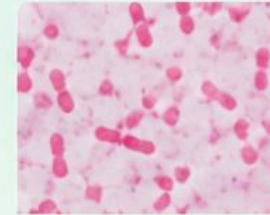
Il criterio della parete cellulare

- Nel metodo fenetico del Manuale del Bergey i batteri vengono raggruppati principalmente in base alle caratteristiche della parete **cellulare**, valutabili con la colorazione di Gram e con l'analisi chimica della parete.
- La composizione della parete riflette differenze strutturali e chimiche che permettono di definire grandi **gruppi fenetici**.

La colorazione di Gram

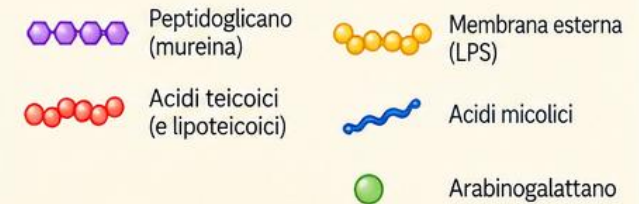


Gram-positivi
(Firmicutes)



Gram-negativi
(Gracilicutes)

Principali componenti della parete



Gruppo fenetico (Manuale del Bergey)	Firmicutes	Gracilicutes	Actinobacteria	Tenericutes	Chlamydiae	Planctomycetes
Colorazione di Gram	Gram-positivi 	Gram-negativi 	Gram-positivi (ad alto contenuto di GC) 	Non colorabili (parete assente) 	Gram-negativi (atipici) 	Colorazione variabile (spesso Gram-negativi)
Struttura della parete (cellula schematica)	 Acidi teicoici Peptidoglicano spesso (multi-strato) Membrana citoplasmatica	 LPS (membrana esterna) Peptidoglicano sottile Membrana citoplasmatica	 Acidi micolici (in alcuni gruppi) Peptidoglicano spesso Membrana citoplasmatica	 Nessuna parete solo membrana citoplasmatica	 LPS (membrana esterna) Peptidoglicano sottile Membrana citoplasmatica	 Parete priva di peptidoglicano (proteine/glicoproteine) Membrana citoplasmatica
Caratteristiche principali	- Peptidoglicano spesso - Acidi teicoici e lipoteicoici - Gram-positivi - Spesso basso contenuto di GC (nei Bacilli) - Sensibili alla lisozima	- Peptidoglicano sottile - Membrana esterna con LPS - Gram-negativi - Periplasma ben sviluppato	- Peptidoglicano spesso - Acidi teicoici e, in alcuni gruppi, acidi micolici - Alto contenuto di GC - Gram-positivi	- Assenza di parete cellulare - Solo membrana citoplasmatica sterolo-dipendente - Non colorabili con Gram	- Peptidoglicano sottile - Membrana esterna con LPS (atipico) - Ciclo intracellulare obbligato - Gram-negativi (deboli)	- Parete priva di peptidoglicano - Struttura paragonabile a membrane interne (compartimentalizzazione) - Gram-negativi o variabili - Morfologia spesso atipica
Esempi di generi/specie	<i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> <i>Listeria</i>	<i>Escherichia</i> <i>Salmonella</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Neisseria</i> <i>Vibrio</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Streptomyces</i> <i>Nocardia</i> <i>Bifidobacterium</i>	<i>Mycoplasma</i> <i>Ureaplasma</i>	<i>Chlamydia</i> <i>Chlamydophila</i>	<i>Planctomyces</i> <i>Gemmata</i>

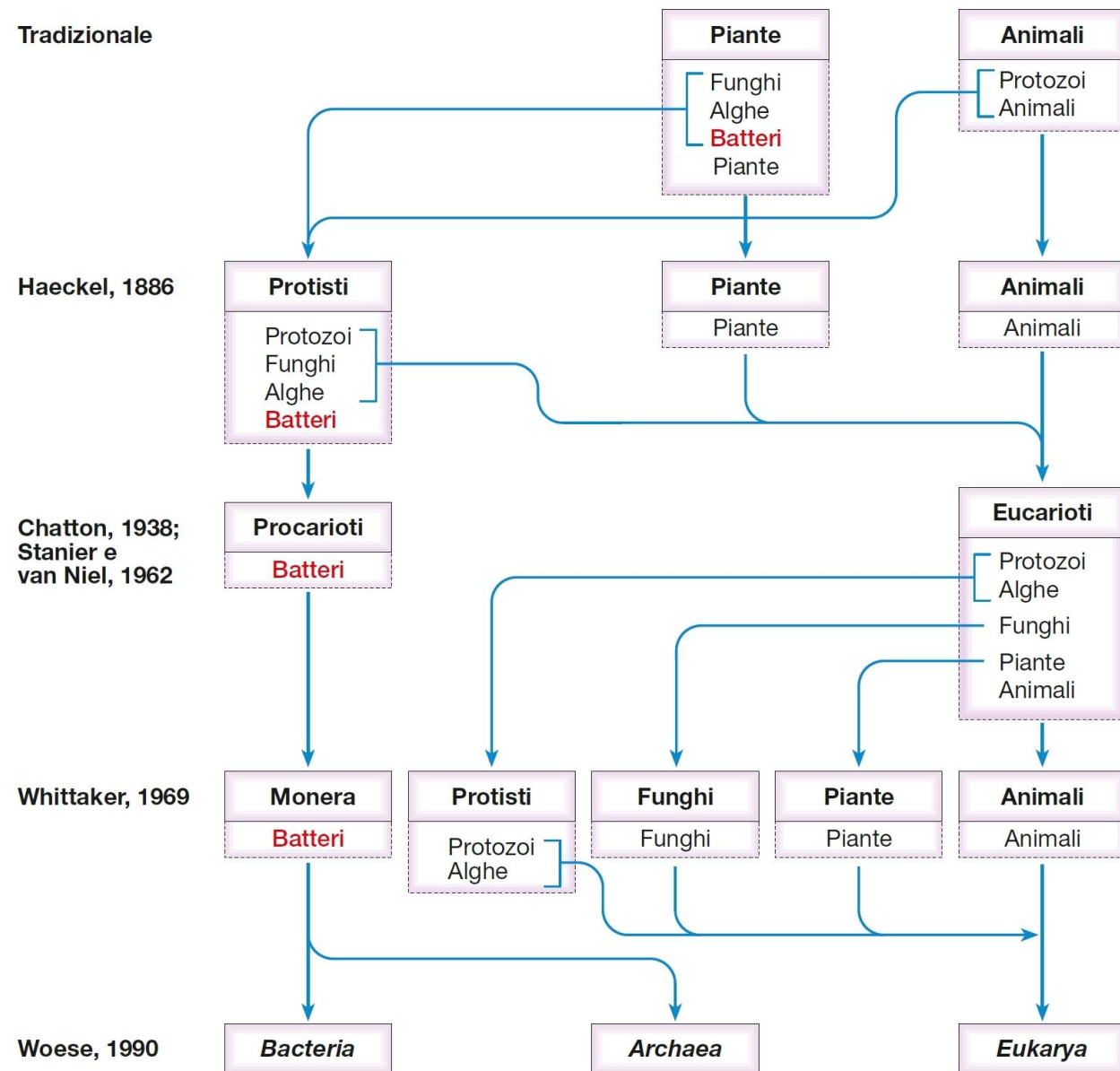


Figura 1.3 EVOLUZIONE DEI SISTEMI DI CLASSIFICAZIONE DEGLI ORGANISMI VIVENTI. I raggruppamenti tassonomici fondamentali (Regni, Domini) sono indicati in grassetto; i Phyla principali via via attribuiti a ciascuna suddivisione sono riportati in chiaro.

Classificazione secondo Woese: 3 domini

1988

Carl R. Woese (1928-2012) propone sistema a 3
Domini:

Eubacteria, Archaeobacteria (da lui scoperti nel 1977),
Eucaryota

RNA ribosomale:

- molecola antica
- distribuzione universale (presente in tutti gli organismi)
- rRNA16S e 18S: informazioni sufficienti per analisi comparativa (sequenza breve, ≈1500 basi)
- funzioni costanti: regioni altamente conservate e regioni variabili

Gli rRNA sono un elemento ideale per gli studi sull'evoluzione :

1. sono essenziali
2. hanno la stessa funzione in tutti i ribosomi
3. si modificano nel tempo con estrema lentezza

Il vantaggio consiste nel fatto che microrganismi poco correlati possono essere studiati solo usando sequenze che, nel tempo, vanno incontro a scarsi cambiamenti

- rRNA 16S: sequenziamento ed allineamento; calcolo del coefficiente di associazione (*Sab*)

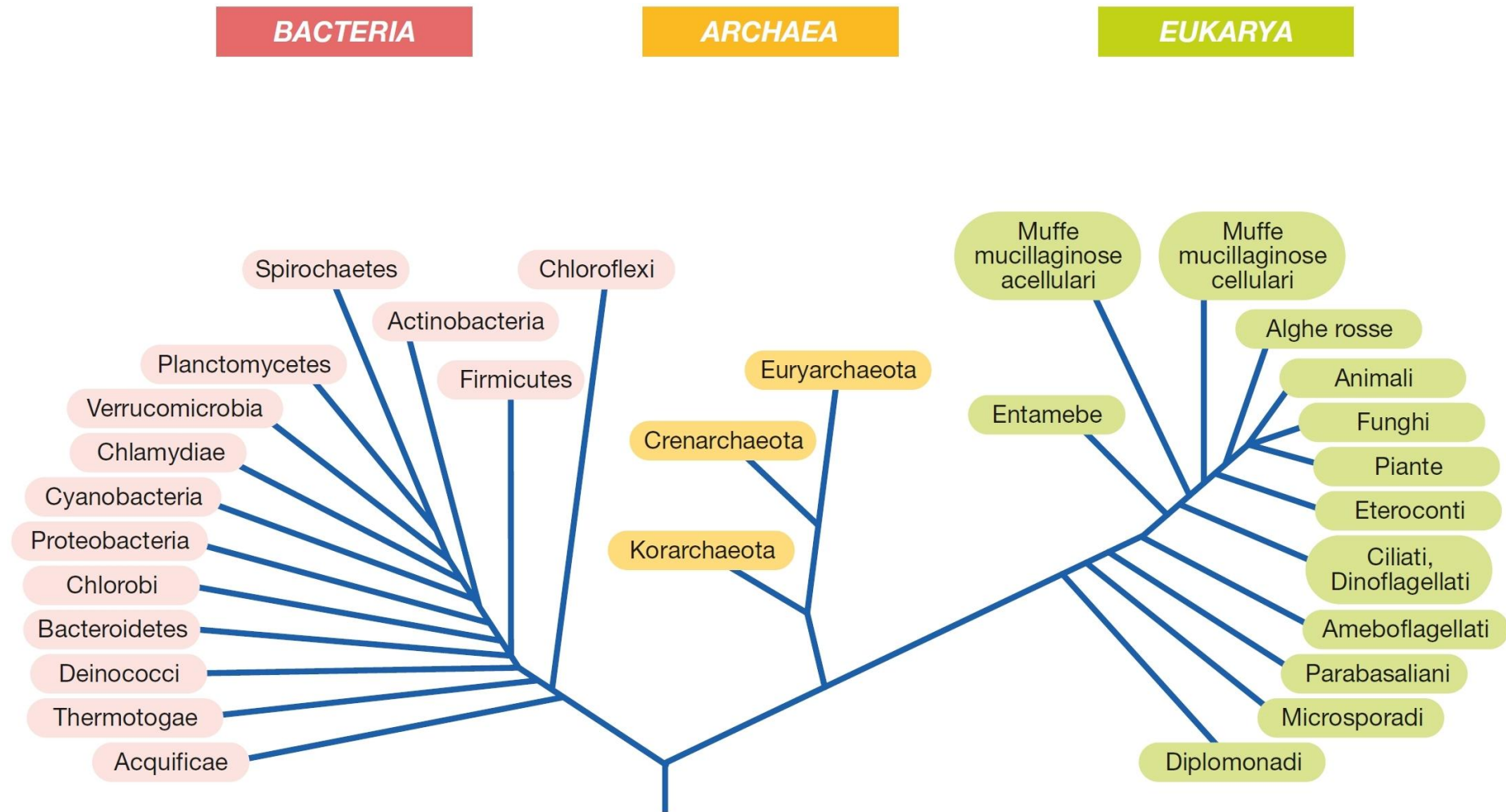
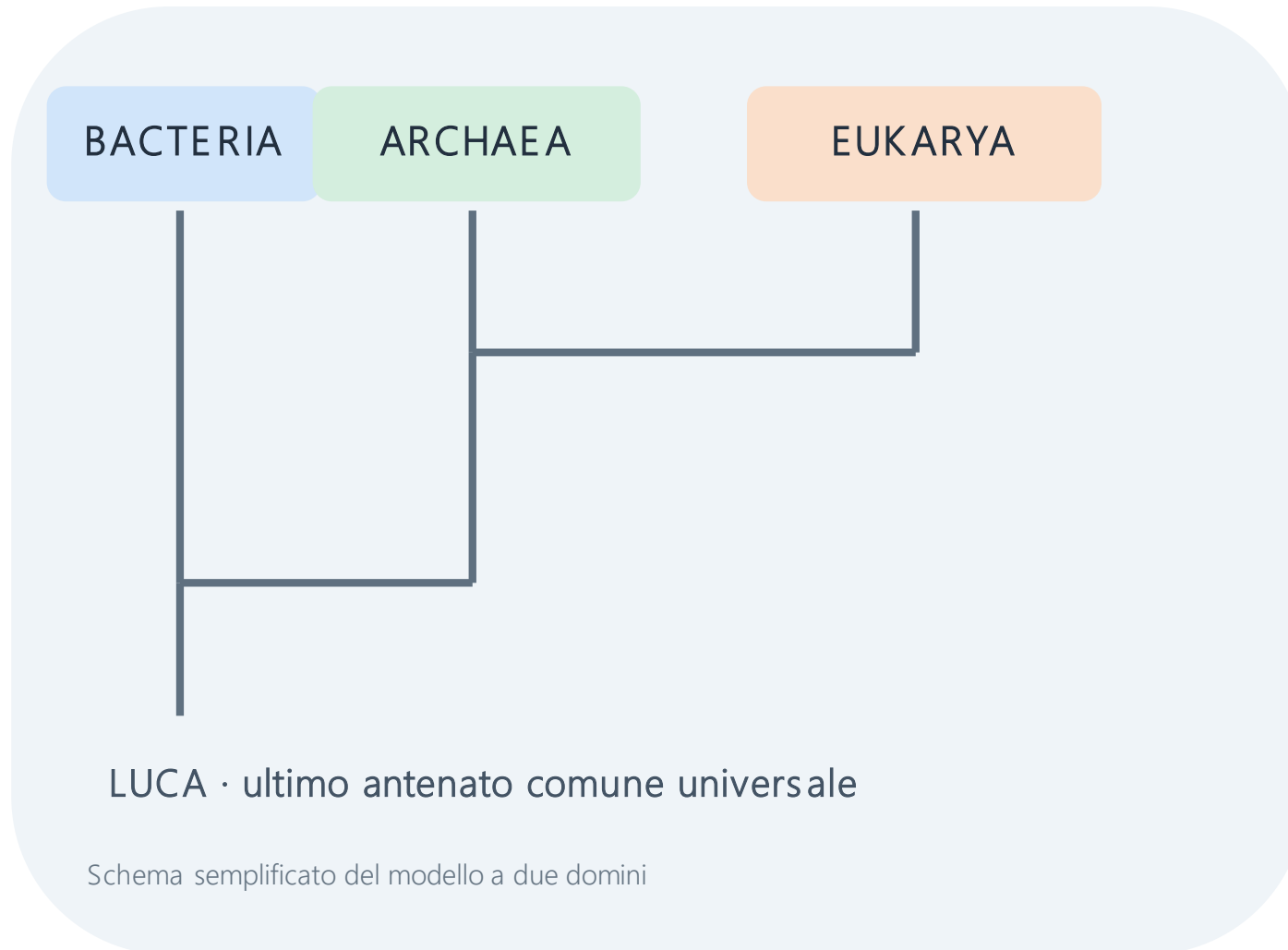


Figura 1.18 ALBERO FILOGENETICO UNIVERSALE. Il dendrogramma illustra le distanze filogenetiche tra organismi appartenenti a gruppi tassonomici diversi ottenute confrontando le sequenze nucleotidiche dell'RNA della subunità piccola del ribosoma.

L'albero della vita: Batteri, Archea ed Eucarioti

Relazioni evolutive e caratteristiche cellulari essenziali



BATTERI

Procarioti; membrana con lipidi a legami estere; peptidoglicano; ribosomi 70S; trascrizione con fattori σ .

ARCHAEA

Procarioti; lipidi di membrana a legami etere; assenza di peptidoglicano; ribosomi 70S; trascrizione simile agli eucarioti.

EUCARIOTI

Nucleo e organelli; cromosomi lineari; ribosomi citoplasmatici 80S; trascrizione nucleare e maturazione dell'mRNA.

Nota: i dati filogenomici collocano gli eucarioti all'interno della diversità archeale; l'origine eucariotica include anche endosimbiosi batterica.

1 | Organizzazione cellulare e DNA

Differenze strutturali tra i tre domini

CARATTERISTICA	BATTERI	ARCHEI	EUCARIOTI
Nucleo e organelli	Nucleo assente; senza organelli membranosi tipici	Nucleo assente; senza organelli membranosi tipici	Nucleo e organelli membranosi
Membrana	Lipidi con legami estere	Lipidi isoprenoidi con legami etere	Lipidi con legami estere
Parete	Spesso peptidoglicano	Niente peptidoglicano; S-layer o altre strutture	Cellulosa (piante), chitina (funghi); assente negli animali
Cromosomi	Generalmente circolari	Generalmente circolari	Nucleari lineari
Proteine del DNA	Proteine del nucleotide	Istoni in molti gruppi	Istoni e nucleosomi
Introni	Rari	In alcuni geni, specie tRNA/rRNA	Frequenti nei geni nucleari

Da ricordare: Archei e Batteri hanno membrane chimicamente diverse.

2 | Trascrizione

Macchinario molecolare e maturazione dell'RNA

CARATTERISTICA	BATTERI	ARCHEI	EUCARIOTI
RNA polimerasi	Una polimerasi principale	Una polimerasi complessa, affine alla Pol II	Pol I, II e III (nucleari)
Riconoscimento promotore	Fattori σ ; regioni -10/-35	TBP e TFB; spesso TATA/BRE	Fattori generali; promotori variabili
Localizzazione	Citoplasma / nucleoide	Citoplasma / nucleoide	Nucleo
mRNA policistronici	Frequenti	Frequenti	Rari nei geni nucleari
Cap 5' e poli-A	Nessun cap canonico; poli-A spesso legata a degradazione	Cap canonico generalmente assente; poli-A variabile	Cap 5' e poli-A nella maggioranza degli mRNA
Splicing	Raro	In alcuni tRNA/rRNA	Frequente; spliceosoma
Accoppiamento con traduzione	Sì	Possibile e frequente	No per i geni nucleari

Da ricordare: la trascrizione degli Archei è più affine a quella eucariotica.

3 | Traduzione e ribosomi

Dimensione dei ribosomi, inizio e fattori proteici

CARATTERISTICA	BATTERI	ARCHEI	EUCARIOTI
Ribosomi	70S = 30S + 50S	70S = 30S + 50S	80S = 40S + 60S
rRNA subunità piccola	16S	16S	18S
rRNA subunità grande	23S + 5S	23S + 5S	28S + 5.8S + 5S (vertebrati)
Amminoacido iniziale	N-formilmetionina (fMet)	Metionina (Met)	Metionina (Met)
Inizio traduzione	Spesso Shine–Dalgarno	Shine–Dalgarno o mRNA leaderless	Generalmente scanning 5' e Kozak
Fattori di inizio	IF1, IF2, IF3	Fattori affini agli eIF	Numerosi eIF
Fattori di elongazione	EF-Tu, EF-G	aEF1A, aEF2	eEF1A, eEF2
Antibiotici antibatterici	Spesso sensibili, salvo resistenze	Generalmente poco sensibili	Ribosomi citoplasmatici poco sensibili

70S e 80S sono coefficienti di sedimentazione, non somme aritmetiche.

4 | Replicazione e organizzazione genetica

Le proteine replicative degli Archei mostrano forti affinità con quelle eucariotiche

CARATTERISTICA	BATTERI	ARCHEI	EUCARIOTI
DNA polimerasi	Principalmente Pol III	Pol B e/o Pol D	Principalmente Pol α , δ , ϵ
Elicasi replicativa	DnaB	MCM	Complesso CMG (MCM2–7)
Inizio replicazione	DnaA in molti batteri	Orc1/Cdc6 in molti Archei	ORC, Cdc6, Cdt1
Origini di replicazione	Spesso una per cromosoma	Una o più	Molte per cromosoma
DNA a singolo filamento	SSB	SSB o RPA-like	RPA
Telomeri	Generalmente assenti	Generalmente assenti	Presenti sui cromosomi nucleari
Organizzazione genica	Operoni comuni	Operoni comuni	Geni nucleari perlopiù individuali
Trasferimento orizzontale	Molto importante	Molto importante	Presente, meno frequente

Da ricordare: il macchinario di replicazione archeale è spesso di tipo eucariotico.

5 | Similitudini e messaggio evolutivo

Conservazione delle funzioni fondamentali e differenze filogenetiche

CARATTERISTICA	BATTERI	ARCHEI	EUCARIOTI
Materiale genetico	DNA	DNA	DNA
Flusso informazione	DNA → RNA → proteina	DNA → RNA → proteina	DNA → RNA → proteina
Codice genetico	Quasi universale	Quasi universale	Quasi universale
Ribosomi e tRNA	Presenti	Presenti	Presenti
Energia	ATP	ATP	ATP
Membrana cellulare	Presente	Presente	Presente
Affinità strutturale	Procariote	Procariote	Cellula compartimentata
Affinità molecolare	Macchinari batterici	Trascrizione/replicazione simili a Eukarya	Molti sistemi informazionali affini agli Archei

Visione moderna: gli Eucarioti derivano da una linea archeale; modello filogenomico a due domini.