

Infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* negli acquari

In questo articolo viene delineato uno dei più pericolosi patogeni opportunisti d'acquario: *Pseudomonas aeruginosa*. Di fronte al crescente numero delle segnalazioni in merito, è sempre più necessario sensibilizzare gli appassionati circa i possibili danni agli animali provocati dalle infezioni da questo batterio, nonché fornire suggerimenti per contrastarne l'insorgenza.

Di Luca Lazzeri

Inquadramento tassonomico

Pseudomonas aeruginosa (Schröter 1872) è un batterio appartenente alle pseudomonadacee, famiglia inclusa nell'ordine pseudomonadali, a sua volta incluso nella classe dei gammaproteobatteri.

Il nome *Pseudomonas aeruginosa* significa in latino "falsa unità (*pseudo* = falso, *monas* = unità) piena di ruggine color rame o verde (*aeruginosa*)", in chiaro riferimento ai pigmenti prodotti dal batterio.

Fisiologia e morfologia

I microrganismi appartenenti alla specie *P. aeruginosa* sono bacilli *asporigeni* (non generanti spore) negativi alla colorazione di Gram, che possiedono morfologia a bastoncello dritto o leggermente ricurvo, di lunghezza variabile tra 1,5 e 5,0 µm e larghezza compresa tra 0,5 e 1,0 µm, tipicamente appaiati o singoli.

Risultano essere dotati di *pili* (strutture di membrana impiegate nei processi sessuali e nell'adesione a superfici) in numero variabile e, in generale, di motilità mediante uno o più flagelli ad un polo del batterio, anche se sono stati isolati ceppi privi di flagelli.

Spesso i ceppi di questa specie sono caratterizzati da una temperatura di crescita ideale di circa 37 °C; alcuni ceppi riescono, però, a riprodursi ad una temperatura di 42 °C, ma la maggior parte di essi arresta la sua moltiplicazione a 4 °C. Fino a pochi anni fa, *P. aeruginosa* veniva ritenuto un microrganismo *aerobio stretto*, caratterizzato quindi da un'esistenza inscindibile dalla presenza di molecole di ossigeno biologicamente disponibili. Invece, il batterio si è dimostrato in grado di sopravvivere e di riprodursi in ambienti privi di ossigeno, se in questi sono presenti nitrati, nitriti o, in ultima istanza, l'amminoacido L-arginina.

Infatti, tale microrganismo è capace di impiegare i nitrati come alternativa all'ossigeno, producendo nitriti e, successivamente, azoto come sostanze di scarto. Interessanti funzioni di questo microrganismo, in un'ottica ecologica, possono essere quindi correlabili ad una interferenza con il ciclo dell'azoto dell'acquario, incentivando o meno l'eliminazione di nitrati e nitriti, nonché la produzione di azoto molecolare. Ovviamente si sconsiglia l'inoculo volontario di masse di questo batterio nell'acquario, preferendo invece le colonizzazioni naturali di nicchie specifiche. Ceppi di *P. aeruginosa* potranno quindi essere rinvenuti in ambienti ricchi di sacche anossiche come ad esempio in fondi alti e in grosse rocce vive, dove è possibile trovare anche molti altri batteri denitrificanti.

Per quanto concerne il metabolismo, è possibile affermare che *P. aeruginosa* rientra tra i microrganismi che non impiegano le fermentazioni per procurarsi nutrimento e che sono dotati di ridotte necessità nutrizionali.

Molti ceppi di *P. aeruginosa* sono caratterizzati da una cospicua produzione di pigmenti diffusibili all'esterno della cellula microbica quali la piocianina, sostanza solubile in acqua di colore verde-blu, la piorubina, insolubile in acqua di colore rossastro-marrone, e la fluoresceina (o pioverdina), solubile in acqua di colore variabile dal giallo-verde al giallo-bruno e capace di emettere fluorescenza se sottoposto a luce ultravioletta (UV).

Si ritiene che la piorubina sia implicata nella riduzione dello stress che il microrganismo subisce in condizioni avverse, rappresentando una possibile difesa nei confronti di disinfettanti come l'acqua ossigenata.

Habitat

Questa specie microbica è pressoché ubiquitaria in nicchie ecologiche ad alto

tasso di umidità che spaziano da ambienti marini ad acque reflue o stagnanti. Non è pertanto da escludere la sua presenza significativa anche negli acquari di qualunque tipo.

Un elevato grado di versatilità, unito ad esigue necessità nutrizionali, permettono a *P. aeruginosa* di colonizzare anche acque *oligotrofiche* (con poche sostanze nutritive) o demineralizzate. Altresì le consentono di sopravvivere in ambienti altrimenti ostili quali disinfettanti a base di ammonio e acque con cloro in concentrazioni inferiori ad 1 mg/L; questa specie è infatti classificata nel gruppo dei *microrganismi ambientali*.

Inoltre, risulta molto elevata la probabilità di reperire colonie di *P. aeruginosa* anche in:

- punti critici delle teche e di apparecchiature per l'osmosi inversa;
- svariati siti di abituali fonti d'acqua quali acquai, rubinetti o filtri per la potabilizzazione dell'acqua;
- elementi decorativi in plastica, legno o coccio ricchi di anfratti ed irregolarità;
- rocce, sassi e ghiaia;
- supporti e superfici che con l'acqua vengono a contatto, come strumenti per la pulizia dell'acquario, piani d'appoggio e piante parzialmente sommerse.

Questo accade perché *P. aeruginosa* rappresenta uno dei microrganismi tipicamente riscontrabili in quelle patine microbiche che si vengono a formare sulle superfici spesso in contatto con liquidi, denominate *biofilm*. Infatti, il batterio è dotato della capacità di aderire a queste tipologie di superfici, grazie alla secrezione di una combinazione di acido mannuronico e di acido glucuronico, chiamato *esopolisaccaride mucoide* (o *rivestimento di alginato* o *glicocalice*).

Nel biofilm si verranno quindi ad avere colonie incapsulate in questo rivestimento ed irrorate da canalicoli. In tal modo, si consente un continuo flusso d'acqua, onde permettere un corretto apporto nutritivo per la colonia ed un allontanamento di sostanze eventualmente tossiche. Si costituisce così una perfetta matrice extracellulare protettiva nei confronti di pressioni anche elevate, insulti meccanici, disinfettanti ed antibiotici.

Liquidi scarsamente dinamici, elevate concentrazioni di carbonio organico biodisponibile, irregolarità di superficie e superfici non permeabili all'acqua (ad esempio plastiche) favoriscono la formazione di questa tipologia di biofilm.

Patogenesi e fattori di virulenza: generalità

Diversamente da quanto si possa pensare, difficilmente *P. aeruginosa* è in grado di provocare gravi patologie in individui con sistema immunitario funzionante; profondamente diversa è invece la situazione in animali debilitati che sono ad alto rischio di contrarre un'infezione di questo tipo. Pertanto, è possibile definire questo microrganismo come patogeno opportunisto.

L'affermarsi di un'infezione di *P. aeruginosa* evolve attraverso tre tappe fondamentali:

1. adesione alle cellule dell'ospite;
2. soppressione iniziale delle difese immunitarie locali, che, generalmente, vertono già in pessime condizioni;
3. rafforzamento ed espansione dal sito iniziale d'infezione, fino ad infezione generalizzata (setticemia).

Questa specie microbica annovera un numero sorprendentemente elevato di fattori di virulenza: alcuni le permettono di aumentare le probabilità di colonizzare diversi distretti anatomici di ospiti animali, altri di provocare in seguito gravi e spesso letali patologie. Una frazione minoritaria di questi fattori sono dovuti a parti della struttura del microrganismo, mentre la maggior parte di essi sono rappresentati da pigmenti, enzimi e tossine diffuse nell'ospite.

Per quanto concerne i fattori di virulenza strutturali, includono quei fattori che inizialmente permettono la colonizzazione di particolari siti. Questa, infatti, avviene su sostanze presenti sulle superfici cellulari epiteliali e anche nelle vie respiratorie: l'acido N-acetil-neuraminico e l'N-acetil-glucosammina.

I fattori di virulenza rappresentati da prodotti extracellulari secreti nell'ospite, occorrono invece al microrganismo principalmente per rafforzare e diffondere il sito d'infezione.

In questa sede verranno illustrati brevemente soltanto alcuni fattori di

virulenza rappresentativi. Nella figura a pagina seguente (**dipende dov'è lo schema**) sono riportati tutti i fattori di virulenza di *P. aeruginosa*.

Patogenesi e fattori di virulenza: fattori di virulenza strutturali atti all'adesione

Pseudomonas aeruginosa presenta dei pili, costituiti chimicamente dalla proteina pilina, che risultano essere decisivi per creare legami con le cellule epiteliali dell'ospite. Rendono inoltre difficoltosa l'azione del sistema immunitario.

Pseudomonas aeruginosa può essere caratterizzata da un ampio rivestimento di alginato, come precedentemente illustrato. Questo strato extracellulare permette una maggiore adesione alle cellule epiteliali in generale e in particolar modo all'epitelio delle vie respiratorie, garantendo una valida protezione dall'azione immunitaria e di taluni antibiotici quali gli aminoglicosidi.

Patogenesi e fattori di virulenza: esotossina A

L'*esotossina A* (ETA), prodotta da *P. aeruginosa*, è una tossina composta da due subunità (A e B), una in grado di legarsi (B = *binding*) al recettore specifico espresso sulla superficie della cellula bersaglio e di traslocarvi all'interno la subunità A e l'altra capace di provocare il danno cellulare (A = *active*). La tossina porta quindi ad un arresto della sintesi proteica e alla conseguente morte cellulare. Sembrerebbe, pertanto, che l'esotossina A provochi danni tissutali durante infezioni di ferite e in infezioni bronchiali croniche, soggette per un lungo periodo di tempo all'azione della tossina stessa. Si ritiene che l'esotossina A sia uno dei più importanti fattori di virulenza di *P. aeruginosa*, anche per l'effetto immunosoppressivo di cui è dotata.

Patogenesi e fattori di virulenza: proteasi

P. aeruginosa secerne due enzimi del tipo delle elastasi: *LasA* e *LasB*. Questi sono in grado di degradare l'elastina, agendo sinergicamente: *LasA* danneggia la struttura dell'elastina, rendendola degradabile da *LasB* e da altre proteasi.

Questa sinergia provoca gravissimi danni alla struttura dei tessuti contenenti elastina, quali l'endotelio e il parenchima branchiale, causando serie lesioni emorragiche. Inoltre, gli enzimi sono in grado di degradare ed interferire con componenti del sistema immunitario, avendo quindi un'elevata importanza nella diffusione dell'infezione e nel danno tissutale.

Patogenesi e fattori di virulenza: emolisine

La *fosfolipasi C* è un'emolisina secreta e termolabile capace di degradare fosfolipidi come la lecitina, provocando ingenti danni tissutali; agendo con questa modalità sulle membrane cellulari, svolge un'estesa azione citotossica. Altresì degrada la sostanza surfactante (muco) delle vie aeree, collaborando con il ramnolipide. Con questa azione sinergica, *P. aeruginosa* inibisce l'attività delle cellule ciliari delle vie aeree, garantendo una maggiore diffusione del microrganismo con incremento del sito di infezione.

Anche il *ramnolipide* è un'emolisina secreta che aumenta il grado di distruzione dei tessuti contenenti lecitina ma a differenza della fosfolipasi C, è termoresistente. Grazie alla sua struttura contenente glicolipidi biosurfattanti, riesce a solubilizzare i fosfolipidi della sostanza surfactante presente nelle vie respiratorie, rendendola maggiormente suscettibile all'azione della fosfolipasi C. Inoltre, è capace di inibire la funzione ciliare stessa degli epitelii respiratori, garantendo un ristagno del muco e un ambiente favorevole al batterio.

Sintomatologia

In pratica, qualunque ittioside, crostaceo, anfibio o mollusco d'acquario può essere soggetto ad un'infezione da *P. aeruginosa*. Nelle tabelle 1, 2, 3 e 4 sono elencati alcuni esempi di specie che frequentemente vengono infettate da questo microrganismo.

Specie a rischio infezione I

- *Symphysodon spp.* (discus);
- *Helostoma temminckii* (gurami);
- *Poecilia reticulata* (guppy);
- *Pterophyllum scalare* (pesce angelo);
- *Xiphophorus helleri* (portaspada);
- *Xiphophorus maculatus* (platy).

Tab. 1: Alcune delle numerose specie di ittiopsidi soggette ad infezioni da *P. aeruginosa*.

Specie a rischio infezione II
▪ <i>Caridina multidentata</i> (caridina japónica);
▪ <i>Gecarcinus quadratus</i> (granchio di halloween);
▪ <i>Grapsus grapsus</i> (granchio rosso delle rocce);
▪ <i>Odontodactylus scyllarus</i> (canocchia pavone);
▪ <i>Potamon fluviatile</i> (granchio di fiume);
▪ <i>Stenopus hispidus</i> (gambero pulitore a bande).

Tab. 2: Alcune delle numerose specie di crostacei soggette ad infezioni da *P. aeruginosa*.

Specie a rischio infezione III
▪ <i>Lissotriton vulgaris</i> (tritone comune);
▪ <i>Triturus carnifex</i> (tritone crestato italiano);
▪ <i>Triturus cristatus</i> (tritone crestato);
▪ <i>Triturus helveticus</i> (tritone palmato);
▪ <i>Xenopus laevis</i> (xenopo liscio);
▪ <i>Xenopus longipes</i> .

Tab. 3: Alcune delle numerose specie di anfibi soggette ad infezioni da *P. aeruginosa*.

Specie a rischio infezione IV
▪ <i>Marisa cornuarietis</i> (conchiglia Marisa);
▪ <i>Mytilus galloprovincialis</i> (cozza);
▪ <i>Octopus vulgaris</i> (polpo comune);
▪ <i>Pinna nobilis</i> (nacchera);
▪ <i>Pomacea bridgesii</i> ;
▪ <i>Pomacea canaliculata</i> .

Tab. 4: Alcune delle numerose specie di molluschi soggette ad infezioni da *P. aeruginosa*.

Un'infezione localizzata pregressa da *P. aeruginosa* è contraddistinta da necrosi e tumefazione del sito di infezione.

Sulla livrea dei pesci potrebbero comparire fori e chiazze purulente di colore rosso, blu-verde o giallo dall'aspetto non gradevole. Questa tipologia di infezione è frequente in animali feriti o che comunque presentano dei difetti e malformazioni a livello dell'apparato tegumentario.

Un'analogia pigmentazione occorre spesso nelle branchie e nella cartilagine della bocca infette che assumono un aspetto corrosivo e vengono ricoperte da un velo di muco. Questo avviene perché le branchie, fungendo da filtro, spesso favoriscono la

concentrazione dei batteri presenti nell'acqua. Da questo sito anatomico, l'infezione invade facilmente la cartilagine buccale, soggetta al flusso d'acqua contaminato che proviene dalle branchie.

Molto frequentemente *P. aeruginosa* è anche il responsabile della cosiddetta "corrosione della pinna", attaccando i tessuti cartilaginei che la compongono e facendole assumere un aspetto appunto corrosivo e sfilacciato nella fase tardiva della patologia. Nelle fasi iniziali, invece, le pinne acquistano un aspetto traslucido ai bordi, apparendo arrossate alla base. Questa malattia è spesso favorita se la pinna è ricca di pieghe e siti dove il batterio si può facilmente insinuare.

Infine in animali debilitati o con ulcerazioni a livello dell'apparato digerente, avvengono occasionalmente colonizzazioni dello stesso, dato che il batterio viene ingerito insieme al cibo oppure proviene dall'apparato respiratorio.

Se trascurata, l'infezione in qualunque sito può sfociare in una setticemia generalizzata, portando in modo rapido l'animale al decesso.

Prevenzione

Il miglior mezzo a disposizione per evitare gravi danni agli animali d'acquario è mantenere un basso profilo di stress unito ad un tenore igienico ambientale accettabile.

Evitare quindi sovraffollamento, cambiare spesso l'acqua per diminuire il carbonio biodisponibile, i nitriti e i fosfati presenti, pulire periodicamente la teca e sostituire i filtri sono tutti ottimi accorgimenti per diminuire i rischi di infezione.

Occorre ricordare però che il tutto deve essere fatto con criterio e metodo, considerando l'impatto negativo che avrebbero improvvisi cambi d'acqua e frequenti operazioni di pulizia sulla salute stessa degli animali e delle piante. In maniera analoga, una sostituzione continua dei filtri biologici impedirebbe l'esistenza stessa dell'acquario, sottraendovi dei microrganismi fondamentali.

Inoltre, occorre tenere in considerazione le esigenze specifiche del proprio acquario ed adattarvi le metodologie d'igiene, ottenendo così un sistema ottimale e sicuro di abbattimento del rischio di infezioni da *P. aeruginosa*.

Data la grande adattabilità di *P. aeruginosa*, occorre ricordare di sostituire periodicamente contenitori di disinfettanti e la strumentazione per la pulizia dell'acquario, in quanto l'eliminazione totale del microrganismo è molto difficile. Spesso però, occorre tenere conto di come anche la presenza di *P. aeruginosa* sia necessaria all'interno di un ecosistema, occupando una nicchia ecologica che altrimenti sarebbe colonizzata da altre specie microbiche che potrebbero danneggiare maggiormente un qualche aspetto del piccolo "ecosistema acquario".

Se fosse possibile, occorrerebbe trattare con il calore le superfici a rischio su cui non fosse desiderata la presenza di *P. aeruginosa* e di molti altri microrganismi.

Animali feriti o soggetti a carenze alimentari devono essere curati tempestivamente, onde evitare di permettere al batterio di colonizzare l'individuo.

Terapie

Spesso la prevenzione fallisce nel salvaguardare la salute degli animali, ed in tal caso occorrerebbe rivolgersi ad un veterinario per un parere esperto. Da ricordare, infatti, che anche l'uomo può contrarre un'infezione da *P. aeruginosa* e pertanto alcuni accorgimenti devono essere tenuti in considerazione per non incorrere in gravi patologie polmonari e dermatologiche:

- evitare di introdurre mani prive di protezione nell'acquario, qualora un animale presenti i sintomi di infezione da *P. aeruginosa*;
- evitare il contatto di ferite ed ustioni anche piccole con materiale potenzialmente contaminato come strumenti per la pulizia e filtri;
- individui con sistema immunitario compromesso dovrebbero evitare in generale il contatto diretto con pesci d'acquario, in quanto frequentemente sono portatori sani del batterio.

Una volta accertata la responsabilità di *P. aeruginosa* nella patologia, è possibile impiegare queste sostanze per tentare di risolvere infezioni lievi o moderate a livello epiteliale o delle alte vie branchiali:

- cloruro di sodio (sale);

- permanganato di potassio;
- acriflavina;
- verde malachite.

Sarà comunque buona prassi accertarsi che la sostanza che si vuole impiegare non sia eventualmente dannosa per la specie da trattare.

In caso di infezioni gravi, la migliore cura attualmente a disposizione è rappresentata da un'ampia gamma di antibiotici, liquidi o in pastiglie.

Possibili sostanze antibiotiche impiegabili nel trattamento di un'infezione da *P. aeruginosa* sono illustrate nella tabella 5. Si raccomanda l'uso delle terapie antibiotiche solo dietro parere veterinario e di rispettare le dosi e il periodo di cura prescritto. Infatti, questo patogeno è in grado di sviluppare resistenza agli antibiotici in maniera molto efficiente e frequente, necessitando di terapie mirate e funzionali.

Classe antibiotico	Rappresentanti
Aminoglicosidi	<i>Amikacina, gentamicina</i>
Carbapenemi	<i>imipenem, meropenem</i>
Cefalosporine	<i>Ceftazidima, cefepime, ceftriaxone</i>
Combinazioni antibiotico β -lattamico/inibitori di β -lattamasi	<i>Piperacillina/tazobactam</i>
Fluorochinoloni	<i>Ciprofloxacina, levofloxacina</i>
Monobattami	<i>Aztreonam</i>
Penicilline	<i>Piperacillina</i>
Tetracicline	<i>Tetraciclina</i>

Tab. 5: Antibiotici impiegabili per la cura di infezioni da *P. aeruginosa*.

Spesso il veterinario prescriverà un antibiotico solo in seguito all'esecuzione di un *antibiogramma*, effettuato su un campione di *P. aeruginosa* prelevato dall'animale infetto. Questo assicurerà una terapia appropriata e funzionale, aumentando le probabilità di sopravvivenza dell'animale. Un antibiogramma consiste nel determinare l'efficacia di un antibiotico nei confronti di un microrganismo, aiutando ad eludere le sue eventuali "immunità" e accorciando quindi il tempo di terapia necessario.

Qualunque tipologia di cura dovrà essere somministrata preferenzialmente in vasche di quarantena, onde non generare stress

negli animali sani o eliminare specie microbiche utili presenti nell'acquario. Spesso, infatti, una cura funzionale nei confronti di *P. aeruginosa* potrebbe coinvolgere altre specie microbiche non nocive o addirittura necessarie (ad esempio batteri nitrificanti), come nel caso della *tetraciclina*, un antibiotico a largo spettro d'azione.

Bibliografia

- Biofilm Microbici 2005. I Workshop nazionale. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 20-21 giugno 2005. Riassunti. Gianfranco Donelli ed Emilio Guaglianone. ISSN 0393-5620, 2005;
- Biofilm microbici nelle reti idriche: implicazioni di carattere sanitario. Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco, Simonetta Della Libera. Notiziario dell'ISS, Volume 18, numero 10, ottobre 2005;
- British national formulary, Guida all'uso dei farmaci IV edizione. Lavis, agenzia italiana del farmaco, 2007;
- Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Christian Van Delden and Barbara H. Iglewski. University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, New York, USA, 1998;
- CLSI Antimicrobial Susceptibility Testing Standard. CLSI, 2006;
- Determinazione di *Pseudomonas aeruginosa*. Rapporti ISTISAN, 2005;
- La medicina di laboratorio. Editore Piccin. ISSN 0393-7623;
- L'acqua come veicolo di malattie: elaborazione e valutazione di dati registrati e notificati nell'area di Roma. Lucia Bonadonna, Marco Di Porto. ISSN 1123-3117, 2009;
- Microbiologia medica quinta edizione in italiano. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller. EMSI, 2008;
- Osservazioni su un patogeno sempre più temibile: *Pseudomonas aeruginosa*. M. Zavanella, M. D'Incau. Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio news vol. 10, n. 2, Editore Sirse, 2004;
- *Pseudomonas*. Barbara H. Iglewski. The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996;
- Ruolo di agenti mobilizzanti biogeni nella bonifica biologica di suoli contaminati da inquinanti organici. Sara

Berselli. dottorato di ricerca università di Bologna, CICLO XVIII: 2002-2005;

- Salicylate and pyochelin biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Laura serino. dottorato di ricerca, Università di Roma "La Sapienza", Zurich, 1996;
- Testo-atlante di microbiologia diagnostica. E.W. Koneman (Stephen D. Allew, V.R. Dowell, Hebeit M. Sommers). A. Delfino editore, 1984.

Pseudomonadacee,_Pseudomonas_aeruginosa,_001,_L.Lazzeri

Ceppo di *Pseudomonas aeruginosa* produttore di piorubina.

Pseudomonadacee,_Pseudomonas_aeruginosa,_002,_L.Lazzeri

Ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* produttori di piocianina a sinistra, pioverdina in basso e piorubina a destra.

Pseudomonadacee,_Pseudomonas_aeruginosa,_003,_L.Lazzeri

Schema riassuntivo dei fattori di virulenza di *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonadacee,_Pseudomonas_aeruginosa,_004,_L.Lazzeri

Ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* isolati da campioni di acqua prelevati da rubinetti di cucine domestiche.

Pseudomonadacee,_Pseudomonas_aeruginosa,_006,_L.Lazzeri

Corrosione della pinna provocata da *P. aeruginosa* in un esemplare di *Poecilia reticulata* (guppy). Nel riquadro la pinna sana.

Pseudomonadacee,_Pseudomonas_aeruginosa,_005,_L.Lazzeri

Determinazione delle resistenze agli antibiotici in un ceppo di *P. aeruginosa*: gli aloni intorno ai dischetti bianchi, imbevuti ciascuno con un diverso tipo di antibiotico, indicano sensibilità.