

CORSO MICROBIOLOGIA ALIMENTARE: *Pseudomonas aeruginosa*

1.0 GENERALITÀ

Pseudomonas aeruginosa è un batterio appartenente alle *Pseudomonadaceae*, famiglia inclusa nell'ordine *Pseudomonadales*, a sua volta incluso nella classe dei *Gammaproteobacteria*.

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



Fig. 1: *P. aeruginosa* al microscopio elettronico

I microrganismi appartenenti alla specie *P. aeruginosa* sono bacilli asporigeni negativi alla colorazione di *Gram*, che possiedono morfologia a bastoncino 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 in numero variabile e, in generale, di motilità mediante uno o più flagelli unipolari, anche se sono stati isolati ceppi privi di flagelli.

Spesso i ceppi di questa specie sono caratterizzati da un *optimum* di temperatura ai fini della crescita intorno a 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 da un metabolismo respiratorio inscindibile dalla presenza di molecole di ossigeno biologicamente disponibili; invece, il batterio si è dimostrato in grado sopravvivere e di riprodursi in ambienti anaerobi, se in questi sono presenti nitrati, nitriti o, in ultima istanza, L-arginina.

Infatti, tale microrganismo è capace di impiegare i nitrati come accettori di elettroni alternativi all'ossigeno, producendo nitriti e, successivamente, azoto come cataboliti di scarto. Nel caso ossi-

geno o nitrati non siano sufficientemente presenti, è altresì in grado di impiegare L-arginina come accettore alternativo di elettroni, mediante l'enzima arginina deidrolasi.

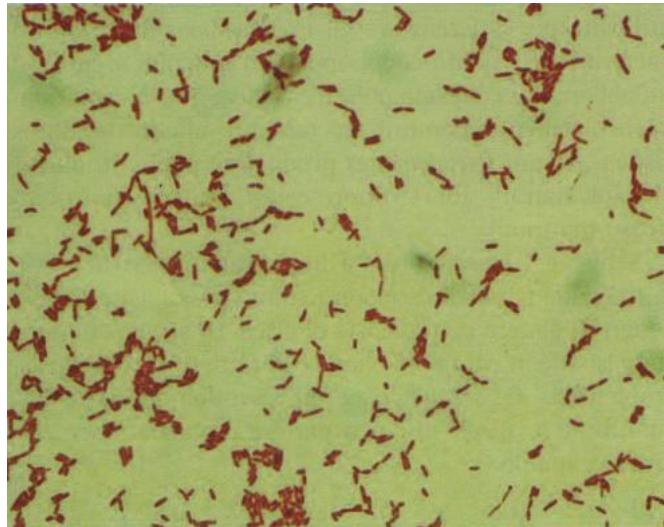


Fig. 2: *P. aeruginosa* vista al M.O. dopo colorazione di Gram

Oltre a quest'ultimo enzima, *P. aeruginosa* include nel proprio patrimonio enzimatico anche la citocromossidasi, la catalasi e molte proteasi idrolitiche. Circa il 20% dei ceppi possiede l'enzima ureasi, mentre in generale non possiede enzimi per la produzione di indolo ed enzimi idrolitici quali la β -glucosidasi e la β -galattosidasi (Para-NitroFenil- β D-Galattopiranosidasi).

Per quanto concerne il metabolismo, è possibile affermare che *P. aeruginosa* rientra tra i microrganismi non fermentativi dotati di ridotte necessità nutrizionali.

Inoltre, risulta capace di assimilare fonti energetiche quali D-glucosio, D-mannitolo, N-acetilglucosamina, potassio gluconato, acido caprico, acido adipico, acido malico e citrato trisodico; mentre non riesce ad assimilare e sfruttare molecole come L-arabinosio, D-mannosio, D-maltosio e acido fenilacetico; infine possiede la capacità di produrre ammonio a partire da acetamide.

2.0 PRESENZA DI *P. aeruginosa* NEGLI ALIMENTI

Questa specie microbica è pressoché ubiquitaria in nicchie ecologiche ad alto tasso di umidità che spaziano da ambienti marini ad acque reflue o stagnanti.

Un elevato grado di versatilità, unito ad esigue necessità nutrizionali, permettono a *P. aeruginosa* di colonizzare anche acque oligotrofiche o demineralizzate. Altresì le consentono di sopravvivere in ambienti altrimenti ostili quali cosmetici, disinfettanti a base di ammonio quaternario e acque clorate con concentrazione di cloro inferiore 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 di condutture ed apparecchiature per l'impiego di acqua potabile quali autoclavi, depuratori o depositi;
- supporti e superfici che con l'acqua vengono a contatto, come taglieri, piani d'appoggio o posate;
- svariati siti di una comune cucina quali acquai, rubinetti, rompi-getto o filtri per la potabilizzazione dell'acqua.

Le tipiche tipologie di alimenti soggette ad una contaminazione primaria da *P. aeruginosa* sono:

- verdure crude
- latticini freschi
- alimenti che necessitano numerosi lavaggi
- pesce, cotto e crudo

La contaminazione secondaria di un prodotto alimentare da parte *P. aeruginosa* può avvenire:

- per contatto con acqua contaminata (es. alimenti lavati con acqua contaminata);
- per manipolazione da parte di operatori con scarsa igiene personale;
- per utilizzo di utensili e attrezzature mal sanificati.



Fig. 3: Coltura di *P. aeruginosa* su TSA in piastra Petri

La presenza del batterio in acque potabili messe in vendita, in bottiglie o contenitori simili, è ritenuta indice di errata procedura di confezionamento. Come gruppo microbico dominante della matrice, infatti, è in grado di raggiungere un'elevata e potenzialmente pericolosa concentrazione in un periodo di tempo relativamente breve.

Occorre aggiungere che nell'uomo sano *P. aeruginosa* può essere riscontrata nelle vie respiratorie superiori nel 6% degli individui; mentre può colonizzare il tratto digestivo inferiore ed essere isolata

nel 10% dei campioni fecali, specie se l'individuo è stato sottoposto a terapia antibiotica. Occasionalmente è stata rinvenuta nella saliva, nella cute e nell'epidermide della regione ascellare ed anogenitale.

3.0 PATOLOGIA

P. aeruginosa è responsabile di molte patologie come polmoniti, infezioni al tratto urinario, infezioni di ferite chirurgiche e infezioni dell'apparato circolatorio. Sono state riscontrate caratteristiche e frequenti associazioni del batterio con infezioni croniche e spesso letali, in pazienti affetti da fibrosi cistica.

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 a 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 come l'uomo, altri di provocare in seguito gravi e spesso letali patologie. Una frazione minoritaria di questi fattori sono prettamente strutturali, mentre la maggior parte di essi sono rappresentati da pigmenti, enzimi e tossine diffuse nell'ospite.

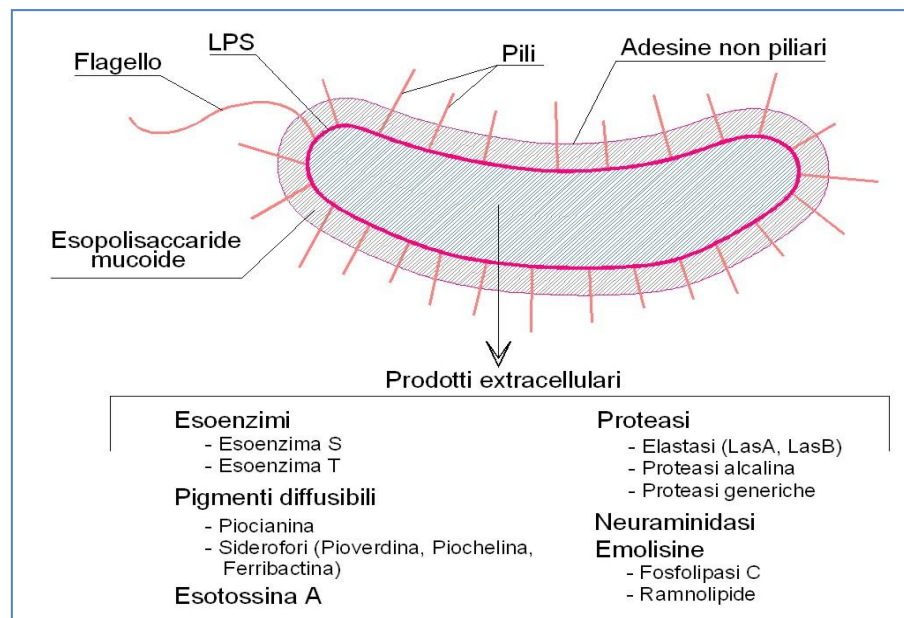


Fig. 4: Schema riassuntivo dei fattori di virulenza di *P. aeruginosa*

4.0 ANTIBIOTICO RESISTENZA

P. aeruginosa è un microrganismo dotato di intrinseche e molteplici capacità di resistere all'azione degli antibiotici.

Durante terapie che impiegano queste sostanze, si selezionano ceppi resistenti che possono colonizzare il sito trattato, anche grazie alla rimozione delle altre specie microbiche competitive maggiormente sensibili.

Uno dei meccanismi principali che fornisce antibiotico-resistenza a *P. aeruginosa* è senza dubbio la capacità di mutare i geni che sintetizzano le porine. Queste particolari proteine costituiscono i canali presenti nella membrana esterna attraverso i quali gli antibiotici penetrano nella cellula batterica. Se i canali subiscono alterazioni che riducono il flusso afferente nel citoplasma o che comunque creano ingombro sterico, ecco che il microrganismo acquisisce resistenza a svariate classi di antibiotici.

Analoghe difficoltà degli antibiotici di penetrare nel batterio si manifestano, come precedentemente detto, in ceppi costituenti biofilm o che comunque sono incapsulati da uno spesso strato di esopolisaccaride mucoide.

P. aeruginosa è inoltre capace di indurre la produzione di molte β -lattamasi e quindi di idrolizzare altrettanti antibiotici con anello β -lattamico come penicilline, cefalosporine e carbapenemi.

Altri significativi meccanismi difensivi operati dal batterio possono essere:

- alterazione del bersaglio ribosomiale degli aminoglicosidi;
- alterazione della DNA girasi bersaglio dei fluorochinoloni;
- alterazione delle proteine di legame degli antibiotici β -lattamici;
- idrolisi enzimatica mediante acetilazione, adenilazione o fosforilazione di aminoglicosidi;
- idrolisi enzimatica mediante acetiltransferasi del cloramfenicolo.

5.0 BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. AGENZIA ITALIANA DEL FARMACO, 2008. *British national formulary, guida all'uso dei farmaci V edizione*. Milano: Elsevier srl;
2. BERSELLI, S., 2005. *Ruolo di agenti mobilizzanti biogeni nella bonifica biologica di suoli contaminati da inquinanti organici*. Tesi di dottorato, Università di Bologna, CICLO XVIII: 2002-2005;
3. BIOLIFE ITALIANA SRL, 2003. *Leethen broth* [online]. Disponibile su <http://www.biolifeit.com/biolife/main.php> [data di accesso 19/12/2009];
4. BONADONNA, L. e DI PORTO, M., 2009. *L'acqua come veicolo di malattie: elaborazione e valutazione di dati registrati e notificati nell'area di Roma*. Rapporti ISTISAN 09/3, n. 1 (2° Suppl.). ISSN 1123-3117;
5. BONADONNA, L. e OTTAVIANI, M., 2007. *Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici*. Rapporti ISTISAN 07/5, n. 1 (6° Suppl.), 37-44. ISSN 1123-3117;

6. BONADONNA, L., BRIANCESCO, R. e DELLA LIBERA, S., 2005. *Biofilm microbici nelle reti idriche: implicazioni di carattere sanitario*. Notiziario dell'ISS, vol. 18, n. 10. ISSN 0394-9303;
7. BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, 2009. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing, Version 8, January 2009* [online]. Disponibile su <<http://www.bsac.org.uk/>> [data di accesso 18/12/2009];
8. CASOLARI, C., a cura di., et al., 2008. *Microbiologia medica quinta edizione in italiano*. Roma: EMSI;
9. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2006. *CLSI Antimicrobial Susceptibility Testing Standard* [online]. Disponibile su <<http://www.clsi.org/>> [data di accesso 18/12/2009];
10. DONELLI, G. e GUAGLIANONE, E., 2005. *Biofilm Microbici 2005. I Workshop nazionale. Roma, 20-21 giugno 2005. Riassunti*. ISTISAN Congressi 05/C5, n. 2 (1° Suppl.). ISSN 0393-5620;
11. DONELLI, G., et al., 2002. *Protocollo per la prevenzione, diagnosi e terapia delle infezioni associate a cateteri venosi centrali*. Rapporti ISTISAN 02/34, n. 4 (9° Suppl.). ISSN 1123-3117;
12. DONELLI, G., et al., 2003. *Protocollo per la prevenzione, la diagnosi e la terapia delle infezioni delle vie urinarie associate ai cateteri vescicali*. Rapporti ISTISAN 03/40, n. 4 (12° Suppl.). ISSN 1123-3117;
13. EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM, 2009. *EARSS Annual Report 2008*. The Netherlands: National Institute for Public Health and the Environment. ISBN 978-90-6960-236-3;
14. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2009. *Ecdc: rapporto 2008 sull'epidemiologia delle malattie trasmissibili*. (s.l.): ISS;
15. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2009. *The bacterial challenge: time to react*. Stoccolma: ECDC/EMEA Joint Working Group. ISBN 978-92-9193-193-4;
16. FERGUSON, D., CAHILL, O.J. e QUILTY, B, 2007. *Phenotypic, molecular and antibiotic resistance profiling of nosocomial Pseudomonas aeruginosa strains isolated from two Irish Hospitals*. Journal of Medicine, vol. 1, n. 1;
17. H. IGLEWSKI, B., 1996. *Pseudomonas*. Galveston (USA): The University of Texas Medical Branch;
18. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 1997. *Compendium of Chemical Terminology Internet edition* [online]. Disponibile su <<http://old.iupac.org/publications/compendium/index.html>> [data di accesso 17/12/2009];
19. ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA', 2004. *Le principali infezioni in ospedale* [online]. Disponibile su <<http://www.iss.it>> [data di accesso 10/02/2010];
20. KONEMAN, E.W., et al, 1984. *Testo-atlante di microbiologia diagnostica*. (s.l.): A. Delfino Editore;

21. LIM, K., et al., 2009. *Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of Pseudomonas aeruginosa hospital isolates in Malaysia*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, n. 42, 197-209;
22. OXOID LTD, 2007. *Oxidase detection strips* [online]. Disponibile su <<http://www.oxid.com/UK/blue/index.asp?c=UK&lang=EN>> [data di accesso 19/12/2009];
23. OXOID LTD, 2007. *Tryptone soya agar* [online]. Disponibile su <<http://www.oxid.com/UK/blue/index.asp?c=UK&lang=EN>> [data di accesso 19/12/2009];
24. OXOID LTD, 2008. *Mueller-Hinton agar* [online]. Disponibile su <<http://www.oxid.com/UK/blue/index.asp?c=UK&lang=EN>> [data di accesso 19/12/2009];
25. OXOID LTD, 2008. *Pseudomonas cetrinide agar* [online]. Disponibile su <<http://www.oxid.com/UK/blue/index.asp?c=UK&lang=EN>> [data di accesso 19/12/2009];
26. REZZA, G., 2009. *Archivio Infezioni ospedaliere* [online]. Disponibile su www.iss.it [data di accesso 03/01/2010];
27. SARTI, F., 2006. *Epidemie di infezioni correlate all'assistenza sanitaria. Sorveglianza e controllo. Rischio infettivo*. Bologna: Agenzia sanitaria regionale dell'Emilia-Romagna;
28. SERINO, L., 1996. *Salicylate and pyochelin biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa PA01*. Tesi di dottorato, Università di Roma "La Sapienza";
29. VAN DELDEN, C. e H. IGLEWSKI, B., 1998. *Cell-to-Cell Signaling and Pseudomonas aeruginosa Infections*. Rochester, New York (USA): University of Rochester School of Medicine and Dentistry;
30. ZAVANELLA, M. e D'INCAU, M., 2004. *Osservazioni su un patogeno sempre più temibile: Pseudomonas aeruginosa*. Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio news, vol. 10, n. 2.