

Osservazioni su un patogeno sempre più temibile: *Pseudomonas aeruginosa*

M. Zavanella, M. D'Incau*

Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia

* Reparto di Batteriologia Specializzata – Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna “Bruno Ubertini”, Brescia

Riassunto. Mentre le storiche patologie ad eziologia batterica sembrano oggi meno temibili per l'esistenza di metodi di controllo efficaci, alcune infezioni da germi opportunisti, sinora ritenuti di secondaria importanza, stanno assumendo un certo significato. Le conseguenze provocate da questi microrganismi possono essere di notevole gravità, sia in medicina umana che altrove, soprattutto per l'insensibilità ai farmaci.

Pseudomonas aeruginosa è un interessante esempio di opportunisto capace di trasformarsi all'occorrenza in patogeno nell'uomo, negli animali e nelle piante. Per vastità di meccanismi d'offesa, merita di essere preso come modello di studio sulla virulenza nei microrganismi.

Summary. The opportunistic infections can have remarkable consequences in human and veterinary medicine, above all for drug resistance. *Pseudomonas aeruginosa* is an interesting example of an opportunistic microorganism that can become pathogenic for men, animals and plants. It can also be considered as a model for the general study of virulence of bacteria.

Questo bacillo Gram-negativo aerobio, mobile, vive soprattutto nel terriccio e nelle acque dei depuratori, dove usa l'energia dei nitrati per la respirazione anaerobia (Schroth e Coll., 1977). Colonizza la pelle e le mucose degli animali, compreso l'uomo, nonché la superficie dei vegetali (Balows e Coll., 1991). E' stato trovato negli ambienti più disparati, dalle acque minerali alle apparecchiature medico-chirurgiche e si conoscono ceppi chiamati “gasoline dependent” che albergano nel cherosene per aerei (Schroth e Coll., 1977, Topley-Wilson, 1998).

Viene chiamato “quintessenza degli opportunisti” perché in grado di ammalare individui ai quali sono calate le difese immunitarie per stress o malattie. Si trovano particolarmente esposti al rischio gli ambienti densamente abitati, per cui si possono, in un certo senso, mettere sullo stesso piano i nosocomi, gli allevamenti e le serre (Lyzac e Coll., 2000).

Inoltre, *P. aeruginosa* partecipa alla degradazione

dei cibi ad elevato contenuto proteico tenuti in frigorifero (carni, pesce, latte, uova), con produzione di pigmenti e odori sgradevoli, nonché all'alterazione di verdure, frutta e fiori recisi.

Il capitolo degli effetti indesiderati sugli alimenti è talmente vasto da rendere impossibile una rassegna bibliografica esaustiva, per cui si citano solo alcuni lavori (Ingraham e Coll., 1959; Ayres, 1960; Buttiaux e Coll., 1964; Barnes e Coll., 1968; Rey e Coll., 1969; Ingram e Coll., 1971; Kilwein, 1971; Lahellec e Coll., 1972; Reuter e Coll., 1972; Samagh e Coll., 1972; Berry e Coll., 1987; Gustavsson e Coll., 1990; Kramer e Coll., 1990; Eyles e Coll., 1993; Sierra e Coll., 1995; Tiecco, 1992).

In contrasto con tanti effetti negativi, *P. aeruginosa* offre il vantaggio di poter essere adoperata per risanare le coste inquinate da prodotti tossici oleosi, essendo capace di biodegradare parecchie sostanze derivate dal petrolio (Topley-Wilson, 1998) e di posse-

dere i requisiti per la lotta biologica contro alcune malattie da funghi (cancrena, antracosi) nelle piante da frutto.

L'interesse suscitato da questo microrganismo ha portato ad affinare la diagnostica di laboratorio, dove è disponibile una collaudata tecnica d'isolamento in coltura con terreni selettivi molto validi da incubare a +37 °C per 24-48 ore (tra cui *Pseudomonas* Agar, *Pseudosel* Agar, *Cetrimide* Agar), oltre a un patrimonio di *test* biochimici, sierologici, biologici e molecolari usato per l'identificazione (Lennette, 1974; Buxton, 1977; La Placa, 1988; Merck, 1991; Delfino e Coll., 1995; Farina e Coll., 1995).

Fattori di virulenza

I meccanismi di aggressione sono estremamente numerosi e neppure del tutto chiariti (Davis e Coll., 1981; Rey e Coll., 1969; Salyers e Coll., 1987), come si può vedere dalla seguente tabella I:

Tabella I.

| Fattori di virulenza in <i>P. aeruginosa</i> | Probabile ruolo nella patogenesi in animali e piante |
|--|---|
| Pili proteine regolate da geni, simili a quelle di <i>Vibrio cholerae</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | adesività alle cellule epiteliali |
| Adesine non-pili sostanze di natura non definita | adesività al muco |
| Emolisine fosfolipasi C e ramnolipide | azione infiammatoria e inibizione delle cellule ciliate nell'apparato respiratorio |
| Neuraminidasi | rimuove l'acido sialico dalle cellule, favorendo l'adesività con i pili |
| Esoenzima S (ETS) proteina regolata da geni | inibisce la fagocitosi, citotossico, rilevabile nel sangue prima dei germi |
| Esotossina A (ETA) proteina regolata da un gene, simile alla tossina difterica | tossica, inibisce la fagocitosi |
| Elastasi enzimi <i>LasA</i> e <i>LasB</i> , immunogeni, regolati da geni | rompe l'elastina dei tessuti e della parete dei vasi sanguigni, danneggia il complemento, favorisce l'insediamento del germe, causa emorragie polmonari |
| Altre proteasi una proteasi generale ed una proteasi alcalina | degradano gelatina, caseina, collagene, fibrina, danneggiano i polipeptidi della coagulazione e le citochine |
| Alginato polimero ad effetto protettivo (viscoso-gelificante, immunogeno, formerebbe un <i>glycocalix</i>) | formando un <i>biofilm</i> contrasta la fagocitosi, favorisce l'adesività e l'antibiotico-resistenza |
| LPS lipopolisaccaride della membrana | attività pirogena, <i>shock</i> settico letale, resistenza a fagociti, opsonine, antibiotici |
| Siderofori piochelina, pioverdina, ferribactina | sopravvivenza di PA nel siero e in altri ambienti poveri di ferro |
| Piocianina pigmento verde derivato della fenazina | danneggia i tessuti convertendo l'ossigeno a perossido |

La produzione di fattori di virulenza multipli (elastasi, proteasi alcalina, proteasi *LasA*, fosfolipasi C, esotossina A, ramnolipide e piocianina) è soggetta al sistema di comunicazione da cellula a cellula conosciuto come "*quorum sensing*", posseduto da *P. aeruginosa* nei due tipi *LasA* e *Rhl*, che funzionano da regolatori di proteine capaci di modulare la trascrizione dei geni (Hogardt e Coll., 2004).

Patogenesi nel regno animale

P. aeruginosa può localizzarsi o virulentarsi indipendentemente dal distretto di colonizzazione.

L'infezione inizia quando il germe si attacca alle cellule epiteliali mediante antigeni di superficie, cioè adesine (*pili* o *fimbriae*) e un esopolisaccaride mucoso (alginato), con l'aiuto di recettori dell'ospite (acido N-acetil-neuraminico e N-acetil-glucosamina), presenti sulle cellule epiteliali tracheali e nella mucina tracheobronchiale.

Il germe compromette le difese locali dell'ospite con i polisaccaridi di superficie, portando a una grave leucopenia, quindi passa all'offensiva con una serie di enzimi *extra*-cellulari (proteasi alcalina, elastasi, fosfolipasi, citotossine, esotossine A ed S) che distruggono i tessuti ed aprono le porte alla batteriemia, culminante in una sindrome sistemica con risposta infiammatoria o SIRS.

La sindrome settica assomiglia a quella prodotta da altri Gram-negativi, in cui giocano un ruolo fondamentale le endotossine di natura lipopolisaccaridica della membrana batterica e l'esotossina A.

Quest'ultima ha effetti citotossici *in vitro* e necrotizzanti *in vivo*, causa *shock* fatale negli animali da esperimento, inibisce la sintesi proteica impedendo la ribossilazione dell'ADP.

I suoi effetti sono devastanti nei soggetti sprovvisti di preesistenti anticorpi (Baunani e Coll., 2003).

Conseguenze dell'infezione nell'uomo

Le principali malattie umane, alla cui insorgenza *P. aeruginosa* a qualche titolo partecipa sono elencate in tabella II.

La malattia più grave nell'uomo, anche in età pediatrica, rimane comunque la fibrosi cistica, sulla quale molto è stato scritto (Baunani e Coll., 2003); (Lee e Coll., 2003); (Bragonzi e Coll., 2004); (Edenborough e Coll., 2004); (Tacetti e Coll., 2004); Rogan e Coll., 2004); O'Carroll e Coll., 2004); (Saiman, 2004); (Rosenfeld e Coll., 2003); (Donaldson e Coll., 2003). Sembra che l'ambiente polmonare selezioni un sottogruppo di varianti autoaggregative e iperpiliate, capaci di aderire, molto più tenacemente dei ceppi selvaggi, all'epitelio e, *in vitro*, ai terreni solidi o alla linea cellulare A549 (Murray e Coll., 2003), anche se in laboratorio il fenomeno è meno

intenso (Reid e Coll., 2004). I ceppi mucosi contenuti nella saliva dei malati sono capaci di sopravvivere fino a 8 giorni sulle superfici asciutte (Saiman e Coll., 2004).

Questi morfotipi, che crescono con colonie più piccole (*small colony variants*, SCVs), sono più mobili e più aggressivi. Nel polmone *P. aeruginosa* vive in anaerobiosi (Reid e Coll., 2004), formando *biofilm* mucosi per la presenza di alginato, nel cui spessore riescono ad annidarsi dei conglomerati batterici irraggiungibili dai farmaci (Haussler e Coll., 2003; Haussler, 2004), dando origine al fenomeno della multi-resistenza agli antibiotici (Saiman e Coll., 1996). Sembra che la limitazione dell'ossigeno, unita alla presenza di nitrati, contribuisca in maniera determinante alla tolleranza verso gli antibiotici all'interno dei *biofilm* (Borriello e Coll., 2004).

Gli esperimenti su modelli animali hanno provato che la gravità delle infezioni polmonari da *P. aeruginosa* è dovuta a stimolazione del sistema secretorio di tipo III (o TTSS), quando il germe viene a contatto con le cellule polmonari in ambiente povero di calcio e ricco di ferro (Smith e Coll., 2004; Zeng e Coll., 2004).

In queste situazioni il genoma di *P. aeruginosa* codifica il sistema secretorio di tipo III attraverso l'adenilato ciclastasi, liberando una serie di proteine eso S, T, Y ed U, causa della tossicità acuta verso le cellule epiteliali e i macrofagi (Hogardt e Coll., 2004).

P. aeruginosa può causare, inoltre, infezioni gastroenteriche in bambini e adulti con forme ematiche maligne e neutropenia o quando i meccanismi di difesa immunitaria vengono alterati da trattamenti farmacologici, malattie croniche o età avanzata.

E' descritta un'enterocolite necrotizzante per esposizione prolungata in ambiente ospedaliero o pressione selettiva degli antibiotici. Le ulcere necrotiche ed emorragiche, che in seguito ad invasione vascolare si estendono alla sottomucosa e alla sierosa, con

Tabella II. *P. aeruginosa* nell'uomo.

| Distretto interessato | Via d'infezione e conseguente malattia |
|-----------------------|--|
| Pelle | Ferite, ustioni, traumi chirurgici, infezioni da inoculazioni intravena, necrosi emorragica della cute o ectima gangrenoso |
| Orecchio | Otite esterna dei nuotatori, otite interna dei diabetici |
| Occhio | Traumi operatori |
| Sistema respiratorio | Polmonite necrotizzante da respiratori contaminati, infezioni da intubazione endotracheale, sindrome da stress respiratorio nell'adulto, fibrosi cistica |
| Apparato uro-genitale | Infezioni delle vie urinarie da catetere o da irrigazioni |
| Apparato digerente | Diarrea nei bambini (febbre di Shangai), forme diarroiche colera-simili, cecite o tiflite nei leucemici, ascessi rettali nei malati di tumore |
| Sistema circolatorio | Metaemoglobinemia |
| Sistema nervoso | Meningite da rachicentesi |

conseguente peritonite perforante, possono interessare anche altre porzioni del tratto digerente (Lyzac e Coll., 2000).

Si ricorda che questo microrganismo è responsabile del 50% delle infezioni ospedaliere (Daly e Coll., 1984; Lyzac e Coll., 2000; Topley-Wilson, 1998; Ruiz e Coll., 2004), attraverso ceppi endemici e solo raramente epidemici. I principali serbatoi sono apparecchiature per la respirazione, endoscopi, nebulizzatori, spazzolini da denti, soluzioni detergenti e disinfettanti, lavandini, piscine per fisioterapia, piante ornamentali e fiori (Muscarella, 2004).

La trasmissione dell'infezione avviene principalmente attraverso le mani del personale (Saiman e Coll., 2004). I reparti maggiormente a rischio sono terapia intensiva e pediatria.

Da un'indagine condotta presso l'Ospedale Bichat di Parigi (Trouillet e Coll., 2002), è emerso che da pazienti ricoverati in terapia intensiva con VAP (*ventilator-associated-pneumonia*) veniva isolato, a seguito di broncoscopia, un 34.4% di ceppi di *P. aeruginosa* con resistenza per ticarcillina-acido clavulanico del 94.1%, piperacillina-tazobactam 88.2%, ciprofloxacina 70.6%, ceftazidime 61.8%, imipenem 58.8%.

Presso il reparto di pediatria dell'Ospedale di Cleveland (Ohio) si è visto che i germi prevalenti nelle patologie faringee croniche erano *Stenotrophomonas maltophilia* (26%) e *P. aeruginosa* (25%), con resistenze superiori al 50% verso ceftazidime e piperacillina-tazobactam (Lidsky e Coll., 2002).

Negli ospedali italiani *P. aeruginosa* viene più frequentemente isolata da materiali respiratori (70%), urine (21%), emocolture (5%), liquidi biologici vari (4%). All'interno dei materiali respiratori, *P. aeruginosa* rappresenta il 17% dei microrganismi isolati, mentre per emocolture, urine e liquidi biologici vari incide al 4% circa.

Nei trattamenti in medicina umana un aminoglicoside viene spesso associato ad una cefalosporina di terza generazione (Leman e Coll., 1986; Topley-Wilson, 1998). Recentemente è stato proposto anche un protocollo di trattamento per le polmoniti nosocomiali da *Pseudomonas*, che prevede levofloxacina i.v. 750 mg/die oppure imipenem/cilastatin (500 mg-1 g ogni 6-8 ore) associati con ceftazidime o piperacillina/tazobactam (Drusano e Coll., 2004).

Conseguenze dell'infezione negli animali

Raramente *P. aeruginosa* si presenta come agente eziologico esclusivo, ma si può affermare che la sua compartecipazione ha un ruolo decisivo sull'insorgenza di alcune patologie (tabella III).

Si ricorda che nella *routine* diagnostica degli Istituti Zooprofilattici di Ferrara, Forlì e Ravenna, buona parte degli isolamenti di *P. aeruginosa* risulta conseguenza di tamponi cutanei e auricolari o nasali effettuati su cani e gatti con otiti e congiuntiviti refrattarie ai trattamenti.

Si tratta di animali da compagnia, che vivono a stretto contatto con l'uomo e che possono trasmettere i germi specialmente in occasione di recidive.

Il microrganismo viene isolato anche da volatili con forme setticemiche di natura iatrogena, causate da ripetuti interventi vaccinali e terapeutici in un contesto di scarsa sepsi oppure nei casi menzionati in tabella a proposito di malattie sviluppate negli incubatoi.

In veterinaria per il trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa* si ricorre ad aminoglicosidi e polimixine, eventualmente associati ad una cefalosporina di terza generazione (cefquinome) o ad un fluorochinolone sul tipo della marbofloxacina, disponibile da poco anche per i piccoli animali.

Tabella III. *P. aeruginosa* negli animali.

| Specie | Azione patogena |
|--|--|
| Bovini e ovi-caprini | Mastite purulenta acuta parenchimatosa, infezioni cutanee, uterine, enteriche, aborti |
| Suini | Epidermite essudativa, enterite, rinite atrofica, polmonite cronica, mastite, infezioni dell'apparato genito-urinario |
| Equini | Otiti, dermatiti, cistiti |
| Volatili (polli e tacchini) | Mortalità embrionale e neonatale nei pulcini con difficoltà di schiusa, scarso riassorbimento del sacco vitellino e quadri di onfalite |
| Animali da pelliccia (visoni e cincillà) | Polmoniti, enteriti |
| Cani e gatti | Processi infiammatori cutanei a carattere purulento, otorrea |
| Rettili | Ascessi, setticemie |

I migliori risultati, almeno dal punto di vista dell'attività *in vitro*, sono stati ottenuti a Forlì con la marbofloxacin, seguita da kanamicina ed enrofloxacin.

Le malattie nelle piante

P. aeruginosa colonizza i vegetali, talvolta senza alterazioni visibili. Molti ceppi sono in grado di produrre un leggero marciume sui tessuti vegetali dopo inoculazione, ma questa attività non sembra legata con la patogenicità sulla pianta. Probabilmente *P. aeruginosa* è coinvolta in modo sinergico con la patogenesi di altri batteri, quali *P. maginalis* ed *Erwinia carotovora*.

Per questo comportamento anomalo, esistono opinioni contrastanti sulle reali valenze patologiche di *P. aeruginosa* tra i vegetali. Secondo qualche Autore (Bradbury, 1986), non sarebbe un vero e proprio patogeno, mentre secondo altri è agente eziologico di malattie specifiche nel pomodoro, nei bulbi di cipolla dopo raccolta, nella lattuga danneggiata dal gelo, nella patata e in altre piante, tra cui canna da zucchero, tabacco, crisantemo (Burkholder, 1950; Schroth e Coll., 1977; Rahme e Coll., 1995; Topley-Wilson, 1998). L'infezione può rimanere localizzata, manifestandosi con vari gradi di clorosi fogliare, oppure subire una diffusione sistemica, arrivando alla fine al rammollimento delle radici, evento che decreta la morte della pianta (Plotnikova e Coll., 2000).

Si sa che i ceppi virulenti si attaccano alla superficie delle foglie, si aggregano, penetrano attraverso gli stomi e invadono gli spazi intracellulari del parenchima fogliare. La parete delle cellule del mesofillo viene aggredita secondo una tecnica interessante, in quanto *Pseudomonas* si posiziona perpendicolarmente alla parete della cellula da invadere e la perfora, creandosi un varco circolare press'a poco del suo stesso diametro. Attraverso i vasi linfatici, il germe inizia poi un movimento basipeto, con macerazione del picciolo e della parte centrale della gemma.

Si conoscono ceppi mono-specifici e ceppi multi-specifici, che sono spesso i più virulenti, caratterizzati da una forte capacità emolitica *in vitro*.

I sierotipi PA14, PA29, PAK, PA01, per esempio, attaccano alcune piante da frutto, uccidono alcuni insetti della frutta (*Galleria mellonella*) o dei nematodi (*Caenorhabditis elegans*), ammalano il topo (Plotnikova e Coll., 2000; Jander e Coll., 2000).

Si è visto che su 21 geni responsabili della patogenicità nei vegetali, ne occorrono 17 per riprodurre la malattia nei topi (Tan e Coll., 1999). Inoltre, 10 su 13 geni collaborano a rendere patogena *P. aeruginosa* contemporaneamente nelle piante e nei nematodi (Mahajan-Miklos e Coll., 1999).

Questa larga piattaforma genetica della patogenicità ha fatto pensare che i ceppi più virulenti per le piante, come PA01 e PA14, siano geneticamente identici a quelli più pericolosi per l'uomo (Rahme e Coll., 1995).

Evoluzione della pericolosità

P. aeruginosa resiste spontaneamente a molti antibiotici e può trasmettere questa proprietà ad altri germi, anche potenzialmente patogeni (Davis e Coll., 1981).

In medicina umana la letteratura è molto ricca di lavori sulla multi-resistenza, per cui si citano solo alcuni Autori recenti.

Bonfiglio e Coll., dopo un'indagine in quindici ospedali italiani, hanno riscontrato le seguenti resistenze *in vitro*: meropenem 9.1%, imipenem 19.3%, ceftazidime 13.4%, carbenicillina 27.3%, piperacillina 12%, ticarcillina+acido clavulanico 22.8%, amikacina 10.6%, ciprofloxacina 31.9%.

Paul e Coll. (1997) in quattro ospedali degli USA, nei quali si faceva largo uso di antibiotici, hanno ottenuto qualche risultato sui ceppi isolati solo con cefotaxime, mentre altre cefalosporine non sortivano alcun effetto.

Carmeli e Coll. (1999) hanno constatato, fra i soggetti appena ricoverati in ospedale a Boston per infezioni da *P. aeruginosa*, che 144 su 489 (circa il 30%) non rispondevano alle terapie antibiotiche, mentre altri 30 erano diventati multiresistenti durante la degenza. Il 14% era poi incorso in una batteriemia secondaria con un 27% di mortalità.

Baunani e Coll. (2003) hanno visto fra il 1997 e il 2001 in 33 ospedali degli Stati Uniti che su 487 isolamenti di *P. aeruginosa* (prevalentemente da emocolture) il 14% era resistente al cefepime, il 15% alla ciprofloxacina e il 26% alla piperacillina+tazobactam.

In campo veterinario si riferiscono, come esempio, le percentuali di resistenza trovate in provincia di Ravenna: polimixina 7%, marbofloxacin 25%, lincomicina+spectinomomicina 33%, gentamicina 35%, colistina 57%, apramicina 62%, sulfadiazina 75%, cefquinome 84%, enrofloxacin 95%.

E' da tener presente, tuttavia, che gli antibiogrammi sono stati standardizzati come *test* predittivi dell'efficacia del farmaco nell'uomo, mentre negli animali le condizioni possono essere diverse. Anche le vie di somministrazione in veterinaria sono notevolmente differenti e poco standardizzabili, se si pensa, per esempio, alla somministrazione attraverso l'acqua di abbeverata.

In agricoltura è risaputo che alcuni antibiotici vengono adoperati per combattere le malattie delle piante da frutto, delle patate, del tabacco e per prevenire l'ingiallimento dei fiori nelle piante ornamentali, tra

cui i crisantemi. I farmaci vengono nebulizzati sopra enormi estensioni di terreni coltivati a frutteto. Negli stati della costa atlantica degli USA ogni anno si irrorano da 20 a 25 tonnellate di ossitetraciclina e streptomina, quanto basterebbe per trattare in un giorno più di venti milioni di persone. Queste due sostanze sono ammesse negli Stati Uniti per legge, ma sembra che la lista dei prodotti illegalmente circolanti in agricoltura sia molto più ricca. A questo va aggiunta la massa di antibiotici usati a scopo ausiliario in zootecnia ed escreti dagli animali allevati, i cui residui finiscono nelle acque reflue o nel concime, poi distribuiti sulle coltivazioni.

E' ovvio che alcuni batteri patogeni delle piante (tra cui *Erwinia*, *Pseudomonas* e altri), in seguito al contatto ripetuto con i farmaci, finiscano per diventare insensibili a questi e ad altri antibiotici per i quali esistono geni della resistenza in comune. Studi fatti a Boston hanno dimostrato che su frutta e vegetali nei supermercati si trovano da 10.000 a 100.000 germi per grammo resistenti agli antibiotici e che dal 10 al 20 % di questi microrganismi sono in condizione di colonizzare l'intestino umano, trasmettendo la resistenza ad altri batteri, patogeni (coli, *Salmonella*, *Shigella*) o saprofiti (Levy, 1992).

Numerose ipotesi sono nate attorno alla comparsa dell'antibiotico-resistenza, per stabilire se essa dipenda da variazioni della permeabilità della membrana cellulare oppure da produzione di beta-lattamasi, mediata da plasmidi o da cromosomi extracellulari (Salyers e Coll., 1987).

Notoriamente *P. aeruginosa* produce enzimi inattivanti, determina impermeabilità della parete, forma delle metallo beta-lattamasi (MBL) identificate con la sigla VIM, cadmio o zinco dipendenti, in grado di inattivare i carbapenemi.

Attualmente si riconoscono a *P. aeruginosa* due meccanismi peculiari, che entrerebbero in funzione a seconda della natura degli antibiotici.

Nel primo caso, come per l'imipenem, una mutazione genetica che annulla la sintesi delle porine, renderebbe il germe resistente alle molecole che si legano a questi vettori per attraversare la membrana batterica e raggiungere i bersagli nel citoplasma.

Nel secondo caso, un cambiamento di carica elettrica impedirebbe ai lipopolisaccaridi di traghettare fluorochinoloni e aminoglicosidi attraverso la membrana batterica (Topley-Wilson, 1998). L'evento si osserva dopo lunga permanenza del germe negli organi, ad esempio nei polmoni, ed è contemporaneo alla variazione dei ceppi da non-mucoidi in mucoidi (Schroth e Coll., 1977).

Considerazioni conclusive

L'antibiotico-resistenza non sarebbe motivo sufficiente per giustificare la potenzialità infettante di *P. aeruginosa*. Alcuni Autori non accettano la divisione in ceppi avirulenti e virulenti, affermando che questi ultimi non appartengono a particolari *biovar* o *pathovar*, in quanto le caratteristiche della virulenza (e della resistenza agli antibiotici) si ritrovano anche in isolamenti non clinici.

I dati sperimentali mostrano che ceppi isolati da fibrosi cistica e ceppi provenienti dal suolo inquinato da idrocarburi sono parimenti insensibili ai chinoloni, sostanze sintetiche impossibili da trovare libere nell'ambiente. Secondo questi Autori, pertanto, i ceppi clinici e quelli ambientali si possono definire virulenti quando possiedono geni capaci di agire sui sistemi del *quorum-sensing* e delle secrezioni di tipo III, invadono le cellule epiteliali, dimostrano forte attività emolitica e/o proteolitica e sanno usare gli alcani, cioè gli idrocarburi oleosi, come sorgente di carbonio (Alonso e Coll., 1999).

Ulteriori preoccupazioni possono derivare dalla dispersione intenzionale in agricoltura del microrganismo praticata attraverso la lotta biologica, al fine di ridurre l'utilizzo di molecole chimiche di sintesi, tra cui metalaxyl e chlorothalonil (Lee e Coll., 2003).

Per fornire un esempio, si ricorda che vengono sfruttati particolari ceppi di *P. aeruginosa* (7NSK2, GRC1, GC-B26, X3, Pag) produttori di alcuni metaboliti (piochelina, piocianina, acidi fenolico, salicilico, phenazin-1-carbossilico) fortemente attivi contro i funghi patogeni per le piante da frutto (*Botrytis cinerea* in fagiolini e pomodori, *Fusarium oxysporum* e *Macrophomina phaseolina* nel pomodoro, *Phytophthora capsici* nei peperoni, *Colletotrichum orbiculare* nel cocomero, *Sclerotium rolfsii* nei ceci) (De Meyer e Coll., 1999; Gupta e Coll., 1999; Adenaert e Coll., 2002; Shaikat e Coll., 2003; Shen e Coll., 2003; Singh e Coll., 2003).

La maggior pressione ambientale esercitata da *P. aeruginosa* con questi trattamenti potrebbe nascondere conseguenze negative legate all'eventuale trasmissione di materiale genetico regolatore dell'antibiotico-resistenza.

Hanno collaborato a questa sintesi:

- per *Medicina Umana*
D. Colombrita, G. Ravizzola, I. Foresti
Istituto di Microbiologia dell'Università di Brescia – Facoltà di Medicina e Chirurgia

- *per Veterinaria*
F. Marzadori e M. Frasnelli (Lugo di Romagna, Ravenna), A. Galuppi e R. Gamberini (Ferrara), P. Massi e L. Fiorentini (Forlì), S. Tagliabue (Brescia)
Sedi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
- *per Agraria*
A. Martinelli - CIV - Consorzio Italiano Vivaisti - S. Giuseppe di Comacchio (FE)
A.R. Babini, R. Gozzi - CAV - Centro Attività Vivaistiche - Faenza (Forlì)

Bibliografia

1. Adenaert K., Pattery T., Cornelis P., Hofte M., Induction of systemic resistance of *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin and pyocyanin, *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 1147-1156, 2002
2. Alonso A., Rojo F., Martinez J.L., Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin, *Environm. Microbiol.* 1, 421, 1999
3. Ayres J.C., The relationship of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs, *J. Appl. Bact.* 23, 471, 1960
4. Balows A. e Coll., *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed., ASM, Washington, USA, 1991
5. Barnes E.M. e Coll., Psychrophilic spoilage bacteria of poultry, *J. Appl. Bact.* 31, 97, 1968
6. Baunani S.M., Hammel J.P., Forrest A., Ambrose P.G., Rubino C.M., Jones R.N. Relationship between susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and hospital- and patient- specific variables: report from the antimicrobial resistance rate epidemiology study tream (ARREST Program) www.cognigencorp.com (2003)
7. Bonfiglio G., Carciotto V., Russo G., Stefani S., Schito G.C., Debbia E., Nicoletti G., Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an Italian survey, *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 307-310, 1998
8. Borriello G., Wernwe E., Roe F., Kim A.M., Ehrlich G.D., Stewart P.S., Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2659-2664, 2004
9. Berry E.D. e Coll., Cold temperature adaptation and growth of microorganisms, *J. Food Protect.* 60, 1583, 1987
10. Bradbury J.F., *Guide to plant pathogenic bacteria*, CAB International, Kew, London, 1986
11. Bragonzi A, Copreni E, de Bentzmann S, Ulrich M, Conese M. Airway epithelial cell-pathogen interactions. *J Cyst Fibros.* 2004 Aug;3 Suppl 2:197-201
12. Burkholder W.H., Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs, *Phytopathology* 40, 115-117, 1950
13. Buttiaux R. e Coll., Les bactéries psychrotrophes des carcasses de porc entreposées en chambre froide, *Ann. Inst. Pasteur Lille* 15, 165, 1964
14. Buxton A. e Coll., *Animal Microbiology*, vol. 1, Blackwell Sci. Publ., Oxford, England, 1977
15. Carmeli Y., Troillet N., Karchmer A.W., Samore M.H., Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Arch. Intern. Med.* 159:1127-1132, 1999
16. Carter G.R., *Diagnostic procedures in veterinary microbiology*, 2nd ed., Thomas, Springfield, Illinois, USA, 1975
17. Daly J.A. e Coll., Differential primary plating medium for enhancement of pigment production by *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Clin. Microbiol.* 19, 742, 1984
18. Davis B.D. e Coll., *Trattato di Microbiologia*, Piccin, Padova, 1981
19. Delfino G. e Coll., *Biologia e Medicina*, Zanichelli, Bologna, 1995
20. De Meyer G., Capieau K., Adenaert K., Bucala A., Metraux J.P., Hofte M., Nanogram amounts of salicylic acid produced by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean, *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 450-458, 1999
21. Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2003 Nov;9(6):486-91
22. Drusano G.L., Preston S.L., Fowler C., Corrado M., Weisinger B., Kahn J., Relationship between fluoroquinolone area under the curve: MIC ratio and the probability of eradication of the infecting pathogen in patients with nosocomial pneumonia, *J. Inf. Dis.* 189, 1590-1597, 2004
23. Edenborough FP, Stone HR, Kelly SJ, Zadik P, Doherty CJ, Govan JR. Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis suggests need for segregation. *J Cyst Fibros.* 2004 Mar;3(1):37-44
24. Eyles M.J. e Coll., The effect of modified atmospheres on the growth of psychrotrophic pseudomonads on a surface in a model system, *Int. J. Food Microbiol.* 20, 97, 1993
25. Farina R. e Coll., *Malattie infettive degli animali*, UTET, Torino, 1995
26. Gupta C.P., Sharma A., Dubey R.C., Maheswari D.K., *Pseudomonas aeruginosa* (GRC1) as a strong antagonist of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum*, *Cytobios.* 99, 183-189, 1999
27. Gustavsson P. e Coll., Contamination of beef carcasses by psychrotrophic *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* at different stages along the processing line, *Int. J. Food Microbiol.* 8, 67, 199
28. Haussler S., Ziegler I., Von Gotz F., Rohde M., Wehmhoner D., Saravanamuthu S., Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection, *J. Med. Microbiol.* 52, 295-301, 2003
29. Haussler S. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* 2004 Jun;6(6):546-51.

30. Kilwein G., Die Isolierung und Differenzierung von Pseudomonaden aus Lebensmitteln, Arch. Lebens., 22, 29, 1971
31. Kramer J. e Coll., Alimenti. Microbiologia e igiene, OEMF, Milano, 1990
32. Ingraham J.L., Psychrophilic bacteria, Bacteriol. Rev. 23, 97, 1959
33. Ingram M. e Coll., Changes caused by microbes on spoilage of meats, J. Appl. Bact. 34, 21, 1971
34. Jander G., Rahme L.G., Ausubel F.M., Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects, J. Bacteriol. 182, 3843-3845, 2000
35. Lahellec C. e Coll., La flore psychrotrophe des carcasses de volailles, Ann. Rech. Vet. 2, 421, 1972
36. La Placa M., Principi di microbiologia medica, 5a. ed., Esculapio, Bologna, 1988
37. Lee J.Y., Moon S.S., Hwang B.K., Isolation and in vitro and in vivo activity against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare* of phenazine-1-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain GC-B26, Pest. Manag. Sci. 59, 872-882, 2003
38. Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2003 Mar;2(1):29-34
Leman A.D. e Coll., Diseases of Swine, 6th ed., Iowa State University, Ames, Iowa, USA, 1986
39. Lennette E.H. e Coll., Manual of Clinical Microbiology, 2nd ed., ASM, Washington, USA, 1974
40. Levy S., The Antibiotic Paradox: How miracle drugs are destroying the miracle, Plenum Publishing, Washington, USA, 1992
41. Lidsky K., Hoyen C., Salvator A., Rice L.B., Toltzis P., Antibiotic resistant gram-negative organisms in pediatric chronic-care facilities, Clin. Inf. Dis. 34, 760-766, 2002
42. Lyzac J.B. e Coll., Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lesson from a versatile opportunist, Microbes and Infection 2, 1051, 2000
43. Mahajan-Miklos S., Tan M.W., Rahme L.G., Ausubel F.M., Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model, Cell 96, 4756, 1999
44. Mariani-Kurkdjian P, Bingen E. Pathogenic bacteria in cystic fibrosis. Arch Pediatr. 2003 Sep;10 Suppl 2:342s-346s
45. Merck, Microbiological Manual, Merck, Darmstadt, Germania, 1991
46. Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A., Microbiologia, 2a. ed., Edises, Napoli, 2003
47. Muscarella LF. Contribution of tap water and environmental surfaces to nosocomial transmission of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004 Apr;25(4):342-5.
48. O'Carroll MR, Syrmis MW, Wainwright CE, Greer RM, Mitchell P, Coulter C, Sloots TP, Nissen MD, Bell SC.
49. Clonal strains of *Pseudomonas aeruginosa* in paediatric and adult cystic fibrosis units. Eur Respir J. 2004 Jul;24(1):101-6.
50. Paul S., Bezbaruah R. L., Roy M. K., Ghosh A. C., Multiple antibiotic resistance (MAR) index and its reversion in *Pseudomonas aeruginosa*, Letters in Applied Microbiology, 24, 169, 1997
51. Pltnikova J., Rahme L., Ausubel F., Pathogenesis of the human opportunistic *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*, Plant Physiol. 124, 1766-1774, 2000
52. Rahme L.G., Stevens E.J., Wolfort S.F., Shao J., Tompkins R.G., Ausubel F.M., Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals, Science 268, 1899-1902, 1995
53. Reid D.W., Kirov S.M., Iron, *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis, Microbiology 150, 516, 2004
54. Reuter G., Vorkommen und Bedeutung von psychrotrophen Mikroorganismen in Fleisch, Arch. Lebens. 23, 272, 1972
55. Rey C.L. e Coll., Influence of temperature on some biochemical characteristics of *Pseudomonas* associated with spoilage of chicken, J. Food Sci. 34, 279, 1969
56. Rogan MP, Taggart CC, Greene CM, Murphy PG, O'Neill SJ, McElvaney NG. Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis. 2004 Oct 1;190(7):1245-53
57. Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL. *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. Curr Opin Pulm Med. 2003 Nov;9(6):492-7.
58. Ruiz L, Dominguez MA, Ruiz N, Vinas M. Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. Arch Med Res. 2004 May-Jun;35(3):251-7.
59. Saiman L. Microbiology of early CF lung disease. Paediatr Respir Rev. 2004;5 Suppl A:S367-9
60. Saiman L., Siegel J., Infection control in cystic fibrosis, Clin. Microbiol. Rev. 17, 57-71, 2004
61. Salyers A.A. e Coll., Bacterial pathogenesis. A molecular approach, ASM, Washington, USA, 1987
62. Samagh B.S. e Coll., Numerical taxonomy of the genus *Pseudomonas* from milk and milk products, J. Dairy Sci. 1, 19, 1972
63. Shaukat S.S., Siddiqui I.A., The influence of mineral and carbon sources on biological control of charcoal rot fungus *Macrophomina phaseolina* by fluorescent pseudomonads in tomato, Letters Appl. Microbiol. 36, 392-398, 2003
64. Schroth N.M. e Coll., in V. Mae Young, *Pseudomonas aeruginosa*: ecological aspects and patient colonisation, Raven Press, New York, 1977
65. Shen A., Zhang B., Li B., Shen L., Yu J., Sheng Y.Y., Identification on an antagonistic rhizobacterium X3 from Rhizosphere of cucumber, Tai Xue Bao. 14, 1521-1524, 203
66. Sierra M. e Coll., Species of psychrotrophic bacteria on freshly dressed lamb carcasses, Arch. Lebens. 46, 1, 1995

67. Singh U.P., Sarma B.K., Singh D.P., Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria and culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* on phenolic and salicylic acid contents in chickpea (*Cicer arietinum*), *Curr. Microbiol.* 46, 131-140, 2003
68. Smith R.S., Wolfgang M.C., Lory S., An adenylate cyclase-controlled signalling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in mouse model of acute pneumonia, *Infection and Immunity* 72, 1677-1684, 2004
69. Tan M.V., Rahme L.G., Sternberg J.A., Thompkins R.G., Ausubel F.M., *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 2408-2499, 1999
70. Tiecco G.F., *Microbiologia degli alimenti di origine animale*, Edagricole, Bologna, 1992
71. Topley-Wilson, *Microbiology and microbial infections*, vol.2, 9th ed., Arnold, London, 1998
72. Trouillet J.L., Vuaqgnat A., Combes A., Kassis N., Chastre J., Gibert C., *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: comparison of episodes due to piperacillin-resistant versus piperacillin-susceptible organisms, *Clin. Inf. Dis.* 34, 1047-1054, 2002
73. Witter L.D., Psychrophilic bacteria. A review, *J. Dairy Sci.* 44, 983, 1961
74. Zeng A.P., Kim E.J., Iron availability, oxygen limitation, *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis, *Microbiology* 150, 517, 20.