

Esperienza nel controllo di una patologia emergente: le mastiti da *Pseudomonas*

Ruiu A., Liciardi M., Lollai S., Mugoni G., Vidili A.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi"

Briguglio P.
Associazione Regionale Allevatori Sardegna

- **Scopo**

Valutare e confrontare i principi basilari per il controllo delle infezioni mammarie, in virtù delle continue modifiche dell'epidemiologia delle mastiti, indotte dai miglioramenti della genetica, della nutrizione, sistema di mungitura e gestione dell'allevamento.

• Tassonomia

Il genere *Pseudomonas* appartiene alla famiglia delle *Pseudomonadaceae*, assegnata al gruppo dei batteri Gram Negativi Aerobi/Microaerofili. Gruppo molto eterogeneo di microrganismi, sia dal punto di vista morfologico che fisiologico. Comprende cocci e bacilli aerobi o microaerofili, con metabolismo strettamente respiratorio. La maggior parte utilizza l'ossigeno come accettore finale di elettroni, ma in alcune specie possono essere utilizzati altri substrati, organici o inorganici. Vi appartengono sia batteri ampiamente diffusi nell'ambiente, che parassiti e patogeni per gli animali e l'uomo (es. *Brucella*).

Rappresenta il genere tipo della famiglia.

- **Generalità e definizioni**

I microrganismi appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa* sono batteri a forma di bastoncello diritto o leggermente ricurvo, con lunghezza di $1,5 \pm 3 \mu\text{m}$ e larghezza compresa tra $0,5$ e $0,7 \mu\text{m}$, mobili tramite uno o più flagelli polari, Gram negativi, aerobi, ossidasi e catalasi positivi, con metabolismo respiratorio.

• Generalità e definizioni

La maggioranza dei ceppi cresce a 42° ma non a 4°. *P. aeruginosa* si caratterizza per la produzione di pigmenti solubili: piocianina di colore verde-blu, piorubina di colore rossastro-marrone e fluoresceina evidenziabile per fluorescenza. Più del 90% dei ceppi produce piocianina e un rapporto inversamente proporzionale sembra esistere tra i tassi di crescita e la produzione di piocianina; infatti, a decrementi del tasso di crescita corrisponderebbero incrementi nella produzione di questo pigmento.

- **Generalità e definizioni**

Pseudomonas aeruginosa è un microrganismo caratterizzato da una elevata capacità di adattamento.

Si rileva in acque superficiali, reflue e marine, suoli, vegetazione e in generale, in tutti gli ambienti umidi. Inoltre, è in grado di crescere in acqua distillata e di sopravvivere nei disinfettanti (per esempio sali quaternari d'ammonio, a meno che non siano usati a pH molto elevati).

• Generalità e definizioni

Si moltiplica facilmente, raggiungendo concentrazioni elevate, anche nelle acque oligotrofe dove la sua presenza è comunque difficilmente correlabile a quella degli indicatori di contaminazione fecale.

Rappresenta uno dei microrganismi tipici dei biofilm. Infatti, è in grado di aderire a superfici umide o in contatto con liquidi grazie alla produzione, da parte di ceppi mucoidi o non mucoidi, di lipopolisaccaridi e glicoproteine extracellulari.

- **Generalità e definizioni**

È un microrganismo prettamente ambientale e per questo rilevabile anche in acque sotterranee e in acque potabili dove può essere riscontrato in concentrazioni ampiamente variabili. In particolare, è facilmente rilevabile in condizioni di stagnamento di acqua ed è in grado di installarsi nei serbatoi, nei rompigitto dei rubinetti e nei “potabilizzatori” domestici, raggiungendo cariche batteriche elevate. Generalmente, nelle acque clorate *P. aeruginosa* viene evidenziato quando la concentrazione di cloro residuo è inferiore a 1 mg/L.

- **Generalità e definizioni**

La sua presenza è di norma considerata indice di cattiva procedura di confezionamento delle acque messe in vendita in bottiglia o in contenitori dove, se presente, è in grado di moltiplicarsi. In acque minerali imbottigliate il gruppo delle pseudomonacee, incluso *P. aeruginosa*, risulta essere il gruppo microbico dominante.

- **Generalità e definizioni**

Pseudomonas aeruginosa si caratterizza anche per essere multi-resistente agli antibiotici, rappresentando quindi un rischio per la salute in ambienti ospedalieri dove può provocare infezioni delle vie urinarie, delle ustioni e delle ferite, ulcere corneali e cheratiti, setticemie, gastroenteriti nei neonati, ascessi, broncopolmoniti e meningiti.

- **Generalità e definizioni**

La sua attività patogena è dovuta alla sua capacità invasiva e alla produzione di sostanze extracellulari, quali alcune proteasi, tossine emolitiche, enterotossine e la tossina letale, esotossina A. In aree ad elevata frequenza di infezioni nosocomiali, quindi nell'uomo (es., cardiocirurgia), può essere responsabile del 14,5% del totale delle infezioni. Risulta quindi essere un tipico patogeno opportunisto.

- **Generalità e definizioni**

Pseudomonas aeruginosa è un tipico patogeno opportunista anche in sanità animale, in quanto sfrutta alcune “rotture” delle difese immunitarie dell’ospite per provocare infezione. Una mammella in condizioni anatomo-funzionali non perfette, di frequente riscontro nei nostri greggi, ad esempio per un non corretto utilizzo della mungitrice, rappresenta un tipico bersaglio per l’azione di germi opportunisti quali *Pseudomonas aeruginosa*.

- **Generalità e definizioni**

Gli studi più recenti hanno comunque messo in evidenza che non esistono evidenze epidemiologiche che permettano di correlare la presenza di *P. aeruginosa* nelle acque potabili con malattie di natura gastroenterica nella popolazione sana, anche per l'alta dose infettante richiesta per produrre la malattia, 10^9 organismi nei soggetti immunocompetenti.

- **Generalità e definizioni**

La ricerca di *P.aeruginosa* nelle acque destinate al consumo umano in distribuzione ha una rilevanza legata prevalentemente alla verifica dell'efficacia del trattamento a cui sono soggette le acque. Il parametro è inserito tra quelli indicati nell'Avvertenza dell'Allegato I del Decreto Legislativo n. 31 del 2001 e successive modifiche ed integrazioni e va interpretato quindi come indicatore di qualità delle acque potabili in rete.

- **Tecniche colturali**

Pseudomonas aeruginosa non ha particolari esigenze nutritive. Il campione può essere seminato in un normale terreno di coltura, quale un agar nutritivo. Campioni nei quali si sospetta polimicrobismo possono essere inoculati in terreni anche fortemente selettivi, come l'agar Ceftrimide, contando sulla resistenza del batterio all'azione dei composti dell'ammonio quaternario.

- **Tecniche colturali**

Un arricchimento selettivo può anche essere ottenuto con un iniziale passaggio in un brodo colturale, incubato a temperature sfavorevoli allo sviluppo di microrganismi contaminanti eventualmente presenti (25°C, 30°C o anche 41°C), dal momento che il batterio si sviluppa in un range di temperature molto ampio.

• Tecniche colturali

Le piastre vanno incubate in atmosfera aerobia per 24-48 ore, quindi osservate per la presenza di colonie tipiche. *Pseudomonas aeruginosa* produce due tipi di colonie: un tipo largo, liscio, con bordi piatti e centro rilevato (a “uovo-fritto”) ed un tipo piccolo, “ruvido”, convesso. Il primo predomina nei materiali clinici, il secondo ha provenienza ambientale. Un terzo tipo di colonia, mucoide, è stato osservato ancora in materiali clinici.

• Tecniche colturali

La presenza del germe in coltura è anche rivelata da caratteristiche macroscopiche, quali la produzione di pigmenti, principalmente piocianina, pigmento verde-blu prodotto esclusivamente da questa specie, pioverdina, piorubina e piomelanina, queste ultime di colore scuro. Un forte indizio della presenza di *Pseudomonas aeruginosa* è anche dato dall'odore caratteristico della coltura, definito in genere come "fruttato" o di "succo d'uva" (Concord grapes).

• Tecniche colturali

All'osservazione microscopica appare come un bacillo Gram negativo, dritto, mobile per la presenza di flagelli polari.

L'identificazione finale prevede l'esecuzione del test dell'ossidasi, positivo, e tests biochimici che evidenzino almeno la presenza dell'enzima arginina diidrolasi, l'attività proteolitica in grado di idrolizzare la gelatina, l'utilizzo ossidativo del glucosio.

- **Terreni di coltura**

Colonie di *Pseudomonas aeruginosa* in Agar Ceftrimide dopo incubazione a 37°C per 24 ore



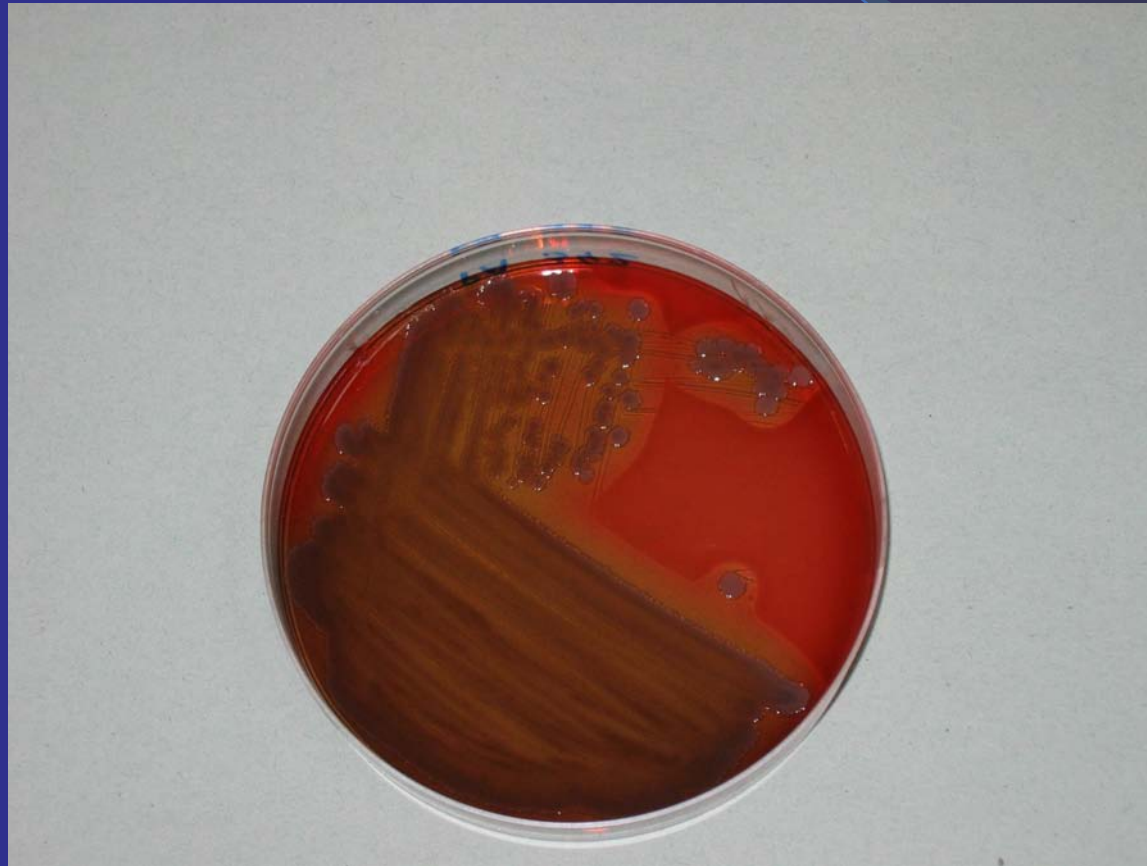
- **Terreni di coltura**

Colonie di *Pseudomonas aeruginosa* in Mac Conkey Agar n. 3 dopo incubazione a 37°C per 24 ore



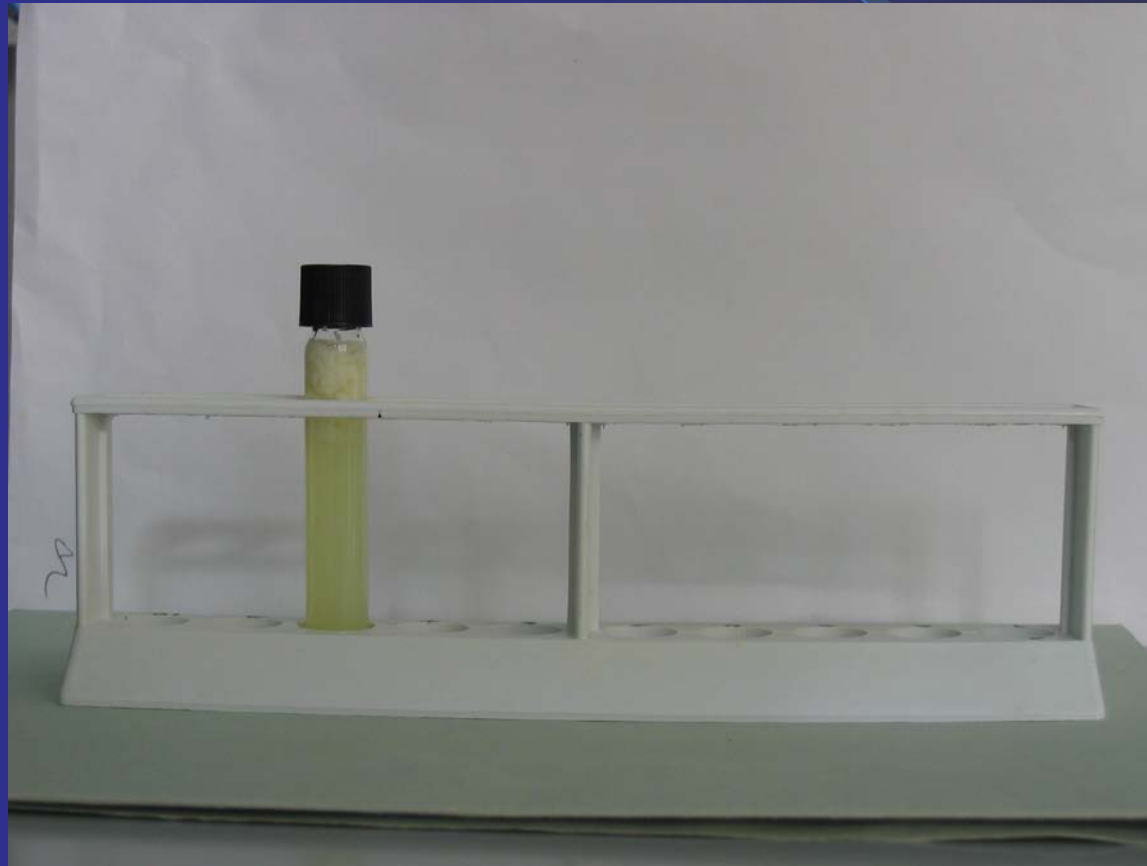
- **Terreni di coltura**

Colonie di *Pseudomonas aeruginosa* in Agar sangue dopo incubazione a 37°C per 24 ore



- **Matrice campionaria**

Campione di latte ovino prelevato da mammella con mastite acuta



• Principali agenti eziologici della mastite ovina

Batteri opportunisti di origine ambientale

Specie batterica

E. Coli

Klebs. pneumoniae

Klebs. oxytoca

Enterobacter spp.

Serratia spp.

Pseudomonas spp.

Proteus spp.

Streptococcus dysgalactiae

Streptococcus uberis

- **Principali agenti eziologici della mastite ovina**
Batteri opportunisti di origine ambientale

I batteri di questo gruppo, di origine ambientale, sono ubiquitari e capaci di moltiplicarsi ovunque trovino un pabulum sufficiente. In relazione al sistema di mungitura, mungitrice meccanica, se si moltiplicano nelle tettarelle e nelle guaine diffondono l'infezione da una mammella all'altra interessando un numero elevato di soggetti e compromettendo l'intera produzione.

- **Principali agenti eziologici della mastite ovina**
Batteri opportunisti di origine ambientale

Pseudomonas può provocare, in bovini ed ovicaprini, sia mastite acuta parenchimatosa con interessamento generale sia infezioni croniche caratterizzate da riacutizzazioni intermittenti.

I quadri clinici sono molto variegati potendosi osservare mammelle con le sole alterazioni dei caratteri organolettici del latte e tumefazione dei linfonodi sopramammari sino ad arrivare a quadri molto gravi assimilabili alla mastite gangrenosa e all'exitus.

Pseudomonas in allevamento è regolarmente isolata a partire da acqua contaminata, suolo, feci, paddock e mungitrici non adeguatamente pulite.



Mammella ovina: mastite acuta da *Stafilococco Aureo*. Anche in caso di forme acute-iperacute di mastite da *Pseudomonas* si possono osservare quadri anatomo-patologici simili

• DATI ATTIVITÀ

ANNO 2000		
ASL	COMUNI interessati	Allevamenti positivi
1	6	26
2	1	1
3	7	13
4	2	3
5	11	18
6	5	9
7	1	2
8	4	7
TOTALI	37	79

• DATI ATTIVITÀ

ANNO 2001		
ASL	COMUNI interessati	Allevamenti positivi
1	5	23
2	0	0
3	6	9
4	0	0
5	11	16
6	10	25
7	1	4
8	7	9
TOTALI	40	86

• DATI ATTIVITÀ

ANNO 2002		
ASL	COMUNI interessati	Allevamenti positivi
1	5	25
2	2	2
3	7	11
4	1	1
5	12	20
6	8	31
7	3	13
8	5	12
TOTALI	43	115

• DATI ATTIVITÀ

ANNO 2003		
ASL	COMUNI interessati	Allevamenti positivi
1	7	43
2	2	3
3	9	16
4	2	2
5	7	14
6	8	30
7	4	6
8	4	6
TOTALI	43	120

• DATI ATTIVITÀ

ANNO 2004		
ASL	COMUNI interessati	Allevamenti positivi
1	6	16
2	1	1
3	8	10
4	3	3
5	5	10
6	5	6
7	1	1
8	2	2
TOTALI	31	49

- **DATI ATTIVITÀ – Accettazioni positive**

ANNO	Acc. Positive
2000	113
2001	119
2002	161
2003	181
2004	64
TOT	638

• Attività diagnostica in allevamento - 2002

N° accettazione	Totale campioni es.	N° campioni Positivi
1810	2	1
2303	2	2
36325	1	1
36357	1	1
47017	7	4
50989	97	7
54307	6	3
81846	96	13
82137*	96	10
82701*	100	10
84247*	88	12

* esame colturale e conteggio ccs

- **Attività diagnostica in allevamento - 2003**

N° accettazione	Totale campioni es.	N° campioni Positivi
3611	76	14
4091	62	23
4389	70	20
9038	30	2
15840	10	3
19920	9	0

• Anamnesi

- 1 Gregge di razza sarda di circa 280 capi in lattazione allevato in provincia di Oristano.
- 1 Alimentazione tradizionale, pascolo coltivato ed irriguo ed integrazione alimentare con concentrati.
- 1 Mungitura meccanica, elevate produzioni.
- 1 Nel corso del 2001 l'allevatore lamenta elevato ccs.
- 1 In fase di asciutta, senza una precisa diagnosi eziologica, effettua un trattamento endomammario (***tra l'altro una delle modalità con cui possono essere veicolati agenti mastidogeni***).
- 1 Inizio lattazione 2002 si evidenziano i primi gravi casi di mastite.
- 1 Il collega che segue l'allevamento effettua, correttamente ed in maniera tempestiva, prelievi di latte per esami colturali.
- 1 Positività per *Pseudomonas aeruginosa*.

• Attività sul campo

- 1 Dopo la conferma diagnostica della presenza di *P. aeruginosa* nel gregge tutti gli animali con sintomatologia clinica e/o alterazione evidente delle caratteristiche del latte vengono separati, allontanati da qualsiasi contatto con la mungitrice e munti a mano.
- 1 Sono effettuati prelievi di acqua utilizzata per l'impianto di mungitura in diversi punti, che confermano presenza di *P. aeruginosa*.
- 1 Viene creato un gruppo di soggetti clinicamente sani ma nei quali non si può escludere l'infezione.
- 1 Si concordano con il veterinario ed il laboratorio modalità, tempi di prelievo e numero degli ulteriori campioni.
- 1 Impianto di mungitura viene sottoposto ad accurata revisione con smontaggio delle parti e disinfezione con prodotti a base di cloro.



Il controllo clinico ed il prelievo dei campioni di latte da tutti i capi in mungitura è sicuramente un'attività onerosa per l'allevatore ma indispensabile per attuare il risanamento del gregge

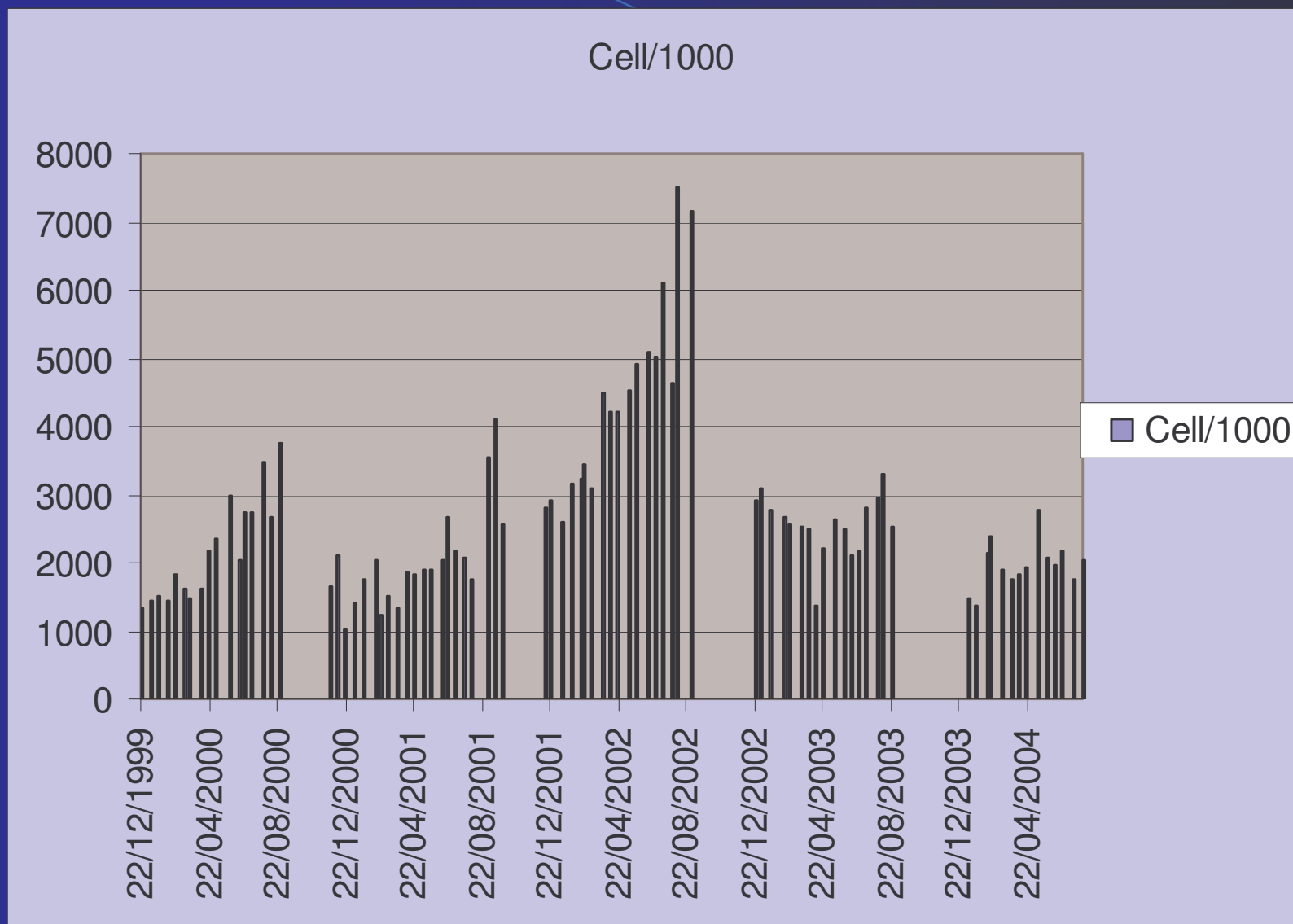
• Attività sul campo

- 1 Visite cliniche ed esami batteriologici mirati sono eseguiti frequentemente ed i capi positivi immediatamente allontanati dalla mungitura meccanica.
- 1 L'allevatore non ritiene in questa fase di dover eliminare i capi infetti, in virtù di un'ancora sufficiente produzione latte. Comunque si attiene scrupolosamente alle indicazioni del collega Veterinario, mantenendo assolutamente separati i capi infetti.
- 1 Si preleva quindi la totalità dei capi clinicamente sani per esami colturali e conteggio ccs. I capi positivi vengono regolarmente allontanati.

• Attività sul campo

- 1 Ad inizio lattazione vengono sottoposti a visita clinica, dopo il parto, gli animali clinicamente sani e vengono effettuati esami batteriologici mirati.
- 1 Si sottopongono ad esame colturale anche tutti i capi infetti l'anno precedente. La conferma della positività batteriologica per *P. aeruginosa* sulla quasi totalità dei capi induce questa volta l'allevatore ad optare per l'eliminazione dei capi stessi.
- 1 Viene prestata particolare e meticolosa cura in fase di mungitura alle caratteristiche chimico-fisiche del latte e si effettua frequente e puntuale manutenzione e disinfezione delle attrezzature dell'impianto di mungitura.
- 1 La situazione sanitaria del gregge viene regolarmente verificata anche grazie ai controlli periodici dei controlli funzionali.

• Dati controlli mensili qualità latte



Fonte: ARA

- **Alcune considerazioni...**

Impianto di mungitura

- 1 Gli impianti di mungitura, se pure hanno affrancato l'allevatore di ovini dal gravoso impegno della mungitura manuale, risultano sicuri ed affidabili solo se installati ed utilizzati correttamente, in termini di tecniche di mungitura, manutenzione e pulizia. In caso contrario possono comportare pesanti effetti negativi, danneggiando l'apparato mammario (patogeni opportunisti) degli animali e divenendo veicolo e causa di infezioni.



Impianto di mungitura per ovini

- **Alcune considerazioni...**

Impianto di mungitura

- 1 Con la mungitura meccanica rispetto a quella manuale, si hanno meno occasioni di valutare lo stato sanitario della mammella; ed è per questo che è consigliabile prima di iniziare le operazioni di mungitura effettuare la verifica dei primi spruzzi di latte. Questa operazione è spesso omessa nella mungitura dei piccoli ruminanti ma ha una doppia funzione: eliminare i primi due o tre getti di latte spesso contaminati, e scoprire eventuali mastiti cliniche osservando l'alterazione dei caratteri organolettici del latte stesso.



Un impianto di mungitura progettato, installato ed utilizzato correttamente è la prima azione di profilassi delle mastiti.

- **Alcune considerazioni...**

Importanza dell'acqua

- 1 Quando necessario, sospetta mastite da *Pseudomonas*, il germe deve essere ricercato nell'acqua che rifornisce la mungitrice e nei diversi settori della mungitrice stessa. Tuttavia tale ricerca da sola non è sufficiente ed assume valore probante solo nel caso di positività: quindi in prima istanza conviene stabilire quali sono le caratteristiche dell'acqua che si intende utilizzare tramite un controllo chimico- microbiologico globale.



La valutazione dello stato sanitario della mammella prima delle operazioni di mungitura è un'operazione fondamentale. In alcuni casi risulta indispensabile anche la disinfezione post-mungitura delle mammelle.

- **Alcune considerazioni...**

Importanza dell'acqua

- 1 Inoltre la conduzione degli allevamenti di pecore da latte è subordinato, nel nostro paese come nella restante parte dell'Unione Europea, all'applicazione delle norme del Regolamento 54/97 in materia di produzione ed immissione sul mercato di latte e prodotti a base di latte . Tra i vari requisiti che devono possedere le aziende produttrici, vi è la disponibilità di acqua potabile da utilizzare nelle operazioni di mungitura e conservazione del latte. Quindi si rende necessario verificare e valutare la qualità dell'acqua che si intende utilizzare nel proprio allevamento.

- **Alcune considerazioni...**

Importanza dell'acqua

- 1 L'utilizzo di acqua proveniente dall'acquedotto pubblico di solito non richiede nessun controllo specifico, mentre l'utilizzo di acqua di pozzo, cisterna o sorgente privata (frequente in Sardegna) deve prevedere controlli microbiologici secondo indicazioni sovrapponibili a quelle richieste per l'acqua destinata all'uso umano (D.P.R. 236/88), cioè almeno una volta all'anno da parte di un laboratorio ufficiale in occasione della registrazione dell'azienda; in caso siano necessari ulteriori controlli ci si potrà avvalere di un laboratorio riconosciuto ai sensi dell'art.17 del D.P.R. 54/97.

- **Alcune considerazioni...**

Importanza dell'acqua

- 1 In caso di alterazione dei parametri microbiologici, questi devono essere “corretti” e ricondotti ai requisiti di conformità mediante appositi trattamenti di potabilizzazione, quali clorazione o raggi UV. (in tal modo ovviamente si agisce anche nei confronti di un'eventuale presenza di *Pseudomonas*). Insieme all'esame microbiologico però, occorre valutare anche alcune caratteristiche chimiche; infatti la scelta del trattamento ed in particolare l'utilizzo di cloro dipendono dalle caratteristiche dell'acqua da trattare e dalla costanza delle sue caratteristiche (ecco perché conviene procedere a più controlli dell'acqua e non limitarsi al solo controllo iniziale).

- **Alcune considerazioni...**

Importanza dell'acqua

- 1 In particolare le dosi di cloro da utilizzare per ottenere la disinfezione , saranno tanto più elevate quanto maggiore è il contenuto dell'acqua in sostanze ossidabili (sostanze organiche, ammoniaca, H_2S , ecc), quanto più alto è il pH e quanto più bassa la temperatura. Da quanto sopra ne deriva che il giudizio ed il successivo trattamento dell'acqua devono essere eseguiti da ditte con personale specializzato per evitare insuccessi nel trattamento di potabilizzazione.

• Infine...

- 1 Obiettivo prioritario è quello di evitare, con l'applicazione puntuale e costante delle azioni preventive, di trovarsi ad affrontare epidemie di mastiti conclamate e in fase di piena produzione latte, momento in cui le possibilità di successo sono estremamente limitate.
- 1 Le azioni di prevenzione prima di ogni stagione di mungitura (visita clinica, CMT, controllo microbiologico dell'acqua, controllo impianto di mungitura...), indipendentemente dall'agente eziologico, ma in particolare nei casi da *Pseudomonas*, possono garantire maggiormente lo stato sanitario del gregge durante l'intera lattazione.

• Per concludere...

- 1 Al di là dell'impatto dirompente che ha l'infezione da *Pseudomonas* nei greggi, non andrebbe sottovalutato il suo potenziale pericolo zoonosico, per esempio per addetti ai lavori in presenza di alte cariche infettanti, nonché per le problematiche di antibioticoresistenza che i ceppi dimostrano di sviluppare anche a seguito di trattamenti totalmente inefficaci nei casi di mastite...