FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
BRESCIA

MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA
IN SINTESI

Maurizio Zavanella

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

1¹1

MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA
IN SINTESI

I DISEGNI SONO DI:

Francesco Tullio Altan (Treviso, 1942)

È una delle penne più velenose della satira politica italiana per le vignette pubblicate sull'*Espresso* e su *Repubblica*, ma è anche creatore di personaggi tenerissimi per bambini, come la celebre "Pimpa" sul *Corriere dei Piccoli*. Vive ad Aquileia.

Clark Zavanella (1904-1996)

Professore di Storia dell'Arte e allievo di Ettore Tito all'Accademia di Belle Arti di Venezia, è l'autore dei paesaggi riportati in questo libro.

Binta Niang Zavanella (Brescia, 2009)

Fumettista in erba e appassionata di danza classica e di chitarra, ritrae a suo modo la vita in un mondo di sogni declinato al femminile.

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
- BRESCIA -

Responsabile scientifico: Prof. MARIO COLOMBO

MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA IN SINTESI

MAURIZIO ZAVANELLA

Collaboratori:

SALVATORE CATANIA
RICCARDO MULIARI
SONIA FLAMINIA LAVAGNOLI
MATTIA CECCHINATO
GIOVANNI FRANZO
GIUSEPPE RAVIZZOLA
ANTONELLA TOSCA

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via Istria, 3/b - 25125 Brescia
www.fondiz.it

ETTORE TITO (1859-1941) - Nato a Castellammare di Stabia, ebbe a Napoli come primo maestro l'olandese Van Haanen, ma all' età di otto anni si trasferì a Venezia dove studiò con Pompeo Marino Molmenti, prendendo ispirazione attraverso il suo peregrinare per le calli remote tra i ceti più umili. L'Accademia delle Belle Arti accetta la sua domanda di ammissione quando ha solo 12 anni, grazie alle sue abilità nel disegnare, diplomandosi nel 1876. Tra i suoi quadri più significativi, *La fa la modèla*, opera con cui si affermò all'esposizione di Belle Arti di Milano del 1884. Nel 1887 viene premiato all' Esposizione Nazionale di Venezia con un dipinto chiamato "*Pescheria vecchia*". Durante la prima Biennale di Venezia del 1895 presenta due opere e si mette in contatto con i più importanti artisti europei. La grande abilità tecnica, la felice disinvoltura, il raro virtuosismo degli scorci e degli effetti di luce, la vivacità del colore e la scelta dei soggetti sempre all'aria aperta, hanno dato all'opera di Ettore Tito un inconfondibile prestigio.

Si è voluto vedere in Ettore Tito una sorta di continuatore della libertà e della leggerezza tiepolesche: alcuni suoi affreschi mostrano chiarissime suggestioni tratte dall'arte di Tiepolo e in un'occasione, nel 1917, si trovò anche a dover sostituire un distrutto affresco dell' illustre pittore settecentesco sul soffitto della Chiesa degli Scalzi, dove sarà sepolto. Ma in Tito si possono rivedere anche le ovattate atmosfere di Guardi, nonché i generosi corpi e il vivace colorismo del Veronese: non a caso, Roberto Longhi definì Ettore Tito "*un Paolo Veronese con la Kodak*". In effetti, egli seppe conciliare la tradizione del colore veneto con tecniche dell'impressionismo (le ampie e libere pennellate) e del verismo (scene quotidiane, di vita vera). Dal 1895 al 1927 fu titolare della cattedra di Disegno di Figura dell'Accademia di Belle Arti di Venezia, dove diresse con successo anche la Scuola Libera del Nudo, frequentata da allievi quali Amedeo Modigliani e Umberto Boccioni. Ebbe il più grande riconoscimento ufficiale con la nomina ad Accademico d'Italia nel 1929. Tra le sue opere: *Sulla laguna* (1897, Venezia, Galleria Internazionale d'Arte Moderna di Ca' Pesaro) - *Pagine d'amore* (1909, Genova, Raccolte Frugone) - ***Il bagno*** (1909, Parigi, Musée d'Orsay) - *Le ninfe* (1912, Piacenza, Galleria Ricci Oddi) - *Luglio* (1893-1894, Trissino, Villa Trissino Marzotto) – *La gomena* (1909, Galleria d' Arte Moderna e Contemporanea, Roma)
(da www.finestresullarte.info, www.clponline.it, www.milanofree.it, www.stilearte.it/, www.artericerca.com).

In copertina:

Ettore Tito (1859-1941), *La maestrina*, 1913, olio su tavola, cm. 74 x 100,5
Courtesy Enrico Gallerie d'arte, Milano.

ISBN 978-88-97562-25-2

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, novembre 2019

Litos S.r.l. - Gianico (Bs) 2019

MAURIZIO ZAVANELLA

Laureato in Scienze Biologiche all'Università di Padova, ha diretto il Dipartimento di Batteriologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (sede centrale di Brescia).

maurizio.zavanella@libero.it

SALVATORE CATANIA

Laureato in Medicina Veterinaria con Dottorato di Ricerca presso l'Università di Messina, si è specializzato a Padova. É Dirigente Veterinario con titolo ECPVS del Laboratorio di Medicina aviare, Micoplasmi e Anticorpi monoclonali dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Lavora attualmente presso la Sede di Verona dell' IZS.

scatania@izsvenezie.it

RICCARDO MULIARI

Dirigente Veterinario nella Struttura Complessa Territoriale per l' Area Diagnostica di Verona dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Data la zona di competenza, la sua attività di laboratorio, estesa agli animali da reddito, è concentrata soprattutto sui problemi sanitari legati agli allevamenti avicoli.

rmuliari@izsvenezie.it

SONIA FLAMINIA LAVAGNOLI

Laureata in Medicina Veterinaria all'Università di Parma, ha ottenuto il Diploma di Perfezionamento in Zooprofilassi presso la Scuola per la Ricerca Scientifica di Brescia e si è specializzata in Igiene e Tecnologia delle carni, sanità pubblica veterinaria e legislazione veterinaria presso l'Università di Milano. È Dirigente Veterinario dell'Azienda ULSS 20 di Verona - Servizio di Igiene degli Allevamenti e Produzioni zootecniche – dove lavora con particolare interesse per il benessere animale e la compatibilità ambientale degli allevamenti zootecnici.

sonia.lavagnoli@alice.it

MATTIA CECCHINATO

Veterinario, laureato a Padova, è Professore associato presso il Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) dell'Università degli Studi di Padova. Si occupa di virologia classica e molecolare per la diagnosi e il controllo di malattie infettive di animali da reddito con particolare attenzione alle filiere del settore avicolo e del suino.

mattia.cecchinato@unipd.it

GIOVANNI FRANZO

Veterinario, laureato a Padova, è Ricercatore presso il Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) dell'Università degli Studi di Padova. Si occupa di virologia e di epidemiologia molecolare, focalizzandosi in particolare sull'evoluzione di virus di interesse veterinario e studiandone l'impatto nella loro epidemiologia, diagnosi e controllo.

giovanni.franzo@unipd.it

GIUSEPPE RAVIZZOLA

Biologo del Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Ospedale Civile di Brescia. Si occupa di diagnostica delle malattie ad eziologia batterica e vanta una lodevole conoscenza pratica dei metodi d'analisi. Ha pubblicato vari lavori dedicati, tra l'altro, all'azione dei farmaci sui batteri e al fenomeno dell'antibiotico-resistenza.

g.ravizzola@libero.it

ANTONELLA TOSCA

Laureata in Biotecnologie Mediche e in Scienze delle Professioni Sanitarie Tecnico- Diagnostiche, Formatore presso l' ASST Spedali Civili di Brescia. Già insegnante di Tecnica Microbiologica all' I.P.C. "Camillo Golgi " di Brescia, per anni ha lavorato come Tecnica di laboratorio presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Ospedale Civile di Brescia.

Antonella.Tosca@libero.it

INDICE

Presentazione IX

Prefazione XI

Introduzione 1

Cap. 1 - Generalità 31

Cap. 2 - Uomo 79

Cap. 3 - Animali 145

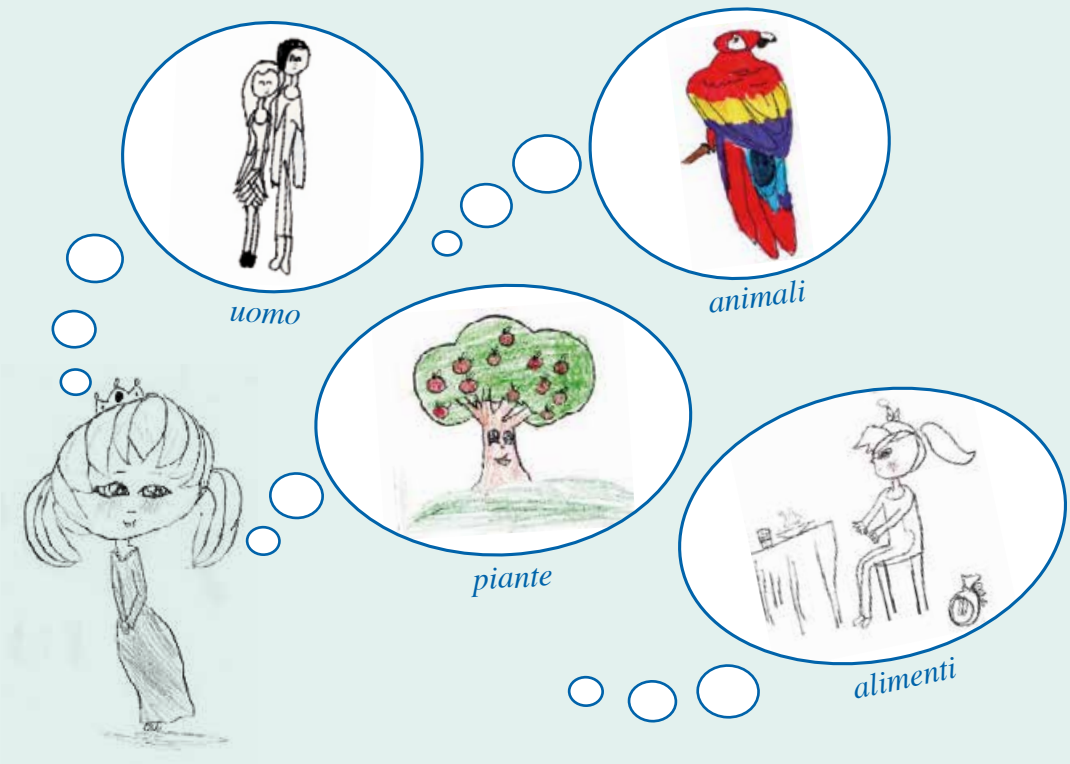
Cap. 4 - Alimenti 207

Cap. 5 - Piante 261

Appendice 291

Bibliografia 305

Batteri, miceti, virus…
lo studio della microbiologia riguarda



PRESENTAZIONE

Nel 2011 è stato pubblicato un quaderno di microbiologia accolto con gradimento da quanti nell'area bio-medica e di scienza dell'alimentazione dovevano preparare concorsi pubblici.

Il libro era diviso in due parti, di cui la prima di teoria e la seconda di pratica di laboratorio, sotto il titolo "Esercitazioni di microbiologia".

A distanza di otto anni la Fondazione presenta questo nuovo testo aggiornato di orientamento didattico che tratta le infezioni da microrganismi nell'uomo, negli animali e nelle piante.

Questo testo descrive in modo sintetico il mondo dei batteri, dei miceti e dei virus. Un universo che vale la pena di studiare, anche al di fuori di un obbligo scolastico.

È un quaderno da leggere con la curiosità di imparare qualcosa, come dalla "maestrina" nel quadro di Ettore Tito ambientato in una calle veneziana del primo '900.

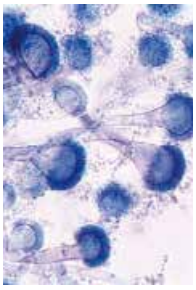
Fondazione Iniziative Zooprofilattiche
e Zootecniche di Brescia

PREFAZIONE

Potremmo chiamarli "*gli invisibili a occhio nudo*". Sono quei microrganismi che vengono raggruppati in **BATTERI**, **MICETI**, **VIRUS**, per i quali è necessario disporre del microscopio ottico o, addirittura, di quello elettronico. Hanno caratteristiche molto diverse.

• BATTERI - Sono le più piccole e primordiali forme di vita comparse sulla Terra. Alcuni batteri possono sopravvivere in condizioni estreme (ghiaccio, acqua ad elevata temperatura) o in fondo ai mari, dove manca l'ossigeno. Sono formati da una sola cellula ed hanno forma rotondeggiante (*cocchi*), allungata (*bacilli*), spiralata (*spirilli*). Sono spesso dotati di appendici per muoversi, i flagelli. A seconda delle esigenze nutritive, si dividono in *saprofiti* (se vivono su organismi viventi traendone semplicemente alimento) e *patogeni* (se sono in grado di provocare malattie). Esistono specie che vengono utilizzate dall' industria per preparare antibiotici e cibi fermentati, come formaggi e *yogurt*.

Batteri al microscopio elettronico



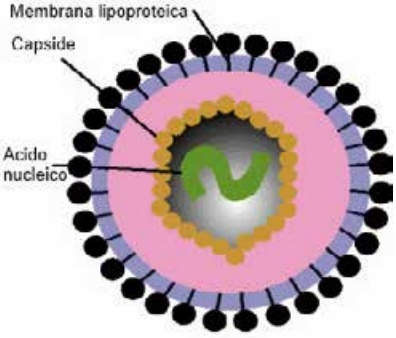
Muffa

Lievito

• MICETI - Hanno una parete cellulare, sono immobili e non possiedono la fotosintesi. Le loro cellule sono complesse (eucariote), quindi organizzate meglio di quelle dei batteri (procariote). Dipendono da fonti esterne di sostanze organiche per nutrirsi. Si distinguono in **muffe** se formano strutture multicellulari con filamenti caratteristici (*ife*) talvolta provviste di ramificazioni (*conidi)* e in **lieviti,** che sono formati da singole cellule ed assomigliano di più ai batteri. Possono danneggiare gli alimenti e causare malattie nelle piante, negli animali e nell' uomo (*micosi*). Muffe e lieviti formano assieme i **miceti.** Si riproducono in maniera caratteristica, mediante la liberazione di *spore*.

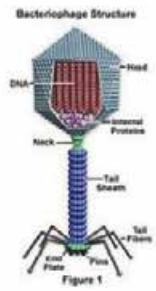
• VIRUS - Sono gli esseri viventi più elementari conosciuti. Non hanno organi, non sono composti da cellule e non si riproducono autonomamente. Sono formati da un involucro proteico (capside) che contiene una molecola di acido nucleico (DNA o RNA). Sono più piccoli dei batteri e osservabili solo al microscopio elettronico. Per sopravvivere devono infettare le cellule degli animali o delle piante, uscendo dalle quali resistono solo poco tempo. Il virus penetrato in una cellula duplica il suo acido nucleico utilizzando i sistemi enzimatici della cellula ospite e, uscito, infetta altre cellule, sia vegetali (colme nel mosaico del tabacco) che animali (come nell' AIDS o nell' influenza) e addirittura quelle batteriche (come fanno i batteriofagi). Restano anche inattivi per lungo tempo e non si lasciano vincere in genere da molti farmaci.

NOTA – I **viroidi** sono agenti infettivi simili a virus, scoperti nel 1971 da Theodor O. Diener, formati da una piccola molecola di RNA non rivestita da capside. Non codificano nessuna proteina. Infettano i vegetali, e possono essere trasmessi mediante semi, pollini e strumenti agricoli.

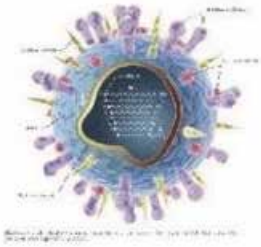


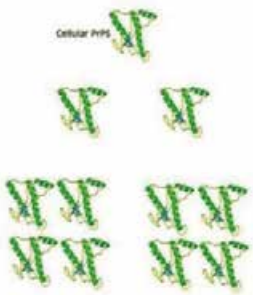
Struttura schematizzata di un virus

I **prioni** non sono virus, ma glicoproteine che si trovano normalmente nel cervello degli animali e dell'uomo. Queste molecole proteiche diventano pericolose in seguito a mutazioni genetiche o indotte da altri prioni. Resistono al calore, ai disinfettanti, alle radiazioni ionizzanti e non sono attaccati dagli antibiotici. Si riproducono per reazioni a catena e causano alterazioni strutturali nel tessuto cerebrale (aspetto spugnoso della materia grigia), causando una serie di malattie neurodegenerative, senza infiammazione, tra cui la *BSE* nei bovini e la malattia di *Creutzfeldt-Jakob* nell' uomo. Altre forme analoghe sono state descritte nei felini, negli ovi-caprini (*scrapie*), nei cervidi, nei visoni e negli uccelli. Il periodo d'incubazione è lungo (nell'uomo 5-10 anni) e l'esito sempre fatale.



Virus

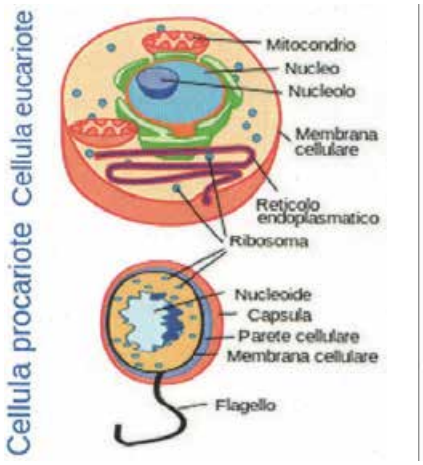

Viroide



Prione

SULLE ORIGINI DELLA VITA

Secondo la teoria evoluzionistica, la vita sulla Terra sarebbe comparsa dopo la formazione di molecole organiche, una conseguenza di processi chimico-fisici durati milioni di anni.
È stato ipotizzato che 4,5 miliardi di anni fa sulla crosta terrestre si siano creati grandi laghi salati, mentre l' atmosfera scarsa di ossigeno conteneva idrogeno, ammoniaca e metano. Le eruzioni vulcaniche e le scariche elettriche delle tempeste avrebbero favorito la combinazione dei gas, da cui potevano nascere aminoacidi e nucleotidi sempre più complessi, fino all' RNA, l'acido nucleico. Da qui in poi era possibile la sintesi delle proteine nelle prime cellule procariote (i ***Cianobatteri***) capaci con la fotosintesi di generare ossigeno. Era il segnale di via libera al formarsi di organismi più completi (gli eucarioti), cioè al fenomeno della vita (*interpretato liberamente nel disegno*).



UNA CLASSIFICAZIONE DEI MICRORGANISMI

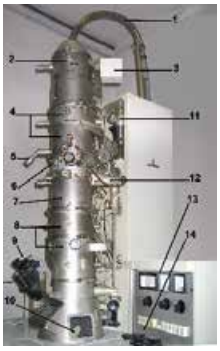
Cellule	Eucarioti*	Procarioti**	Acellulari***
Animali	Protozoi	Batteri	Virus
Vegetali	Alghe unicellulari	Cianobatteri	Viroidi
Alghe pluricellulari	Funghi		Prioni

* comprendono organismi unicellulari e pluricellulari (piante e animali superiori)
** a differenza degli eucarioti, le cellule procariote non hanno la membrana nucleare, il nucleolo, i mitocondri, l'apparato del Golgi, il reticolo endoplasmatico e possiedono un solo cromosoma.
*** non hanno l'organizzazione delle cellule

TUTTO QUESTO È STATO POSSIBILE DOPO DUE INVENZIONI…

Alcuni storici attribuiscono l'invenzione del **microscopio ottico** a Galileo, che nel 1624 avrebbe messo a punto uno strumento dotato di lenti. Altri studiosi però ritengono che il merito vada attribuito a Zacaria Jannsen, un olandese che nel 1595 avrebbe costruito uno strumento analogo e altri ancora citano **Antonie van Leeuwenhoek** di Delft, un commerciante di tessuti che voleva vedere meglio, ingrandendoli circa 300 volte, i filati che acquistava. L'ingrandimento dei microscopi ottici attuali, all'interno dello spettro di luce visibile, è fino a 1.500 volte, con un limite di risoluzione di circa 0,2 μm (millesimi di millimetro).

È invece molto più recente il **microscopio elettronico**, costruito dalla Siemens AG dal 1938. Era stato ideato nel 1931 da Manfred von Ardenne e **Ernst Ruska**, un fisico dell' Università di Heidelberg, che ottenne il premio Nobel nel 1986. In questo caso l'oggetto viene esaminato con un fascio di elettroni, anziché con luce visibile, il che consente di ingrandire un particolare più di 100 mila volte.



…E DUE SCOPERTE

Gli anticorpi monoclonali

Gli **anticorpi** (o immunoglobuline) sono glico-proteine prodotte dai linfociti del sistema immunitario dell'uomo e degli animali, capaci di riconoscere altre proteine (chiamate **antigeni**) e di legarsi ad esse in maniera specifica. La loro funzione è di riconoscere e neutralizzare gli agenti patogeni (batteri, virus, tossine) o altre sostanze ritenute estranee all'organismo. Hanno una forma ad Y, sulle cui estremità flessibili si trovano dei siti di legame specifici per un determinato antigene.

Gli **anticorpi monoclonali** sono particolari proteine prodotte in laboratorio su animali da esperimento con tecniche di ingegneria genetica, incrociando un unico tipo di cellula immunitaria con delle cellule tumorali, per cui si auto-replicano molecole altamente specifiche verso un antigene-bersaglio. Sono usati per diversi scopi (ad esempio, *test* di gravidanza, ricerca di cellule tumorali e del virus AIDS) e in *test* di laboratorio al posto dei tradizionali sieri diagnostici policlonali: agglutinazione (*slide/tube/latex agglutination*), immunofluorescenza diretta e indiretta (IF), *Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay* (ELISA), immuno-precipitazione in agar-*gel* (AGID), immuno-separazione magnetica, ecc. per cui ne hanno tratto vantaggio sia la batteriologia che la virologia.

La sintesi degli anticorpi monoclonali (*mAb*) è stata messa a punto nel 1975 da **César Milstein** (un biochimico argentino, 1927-2002) e da **Georges Köhler**, biologo tedesco (1946-1996) che nel 1984 per questa scoperta vinsero il premio Nobel per la medicina.

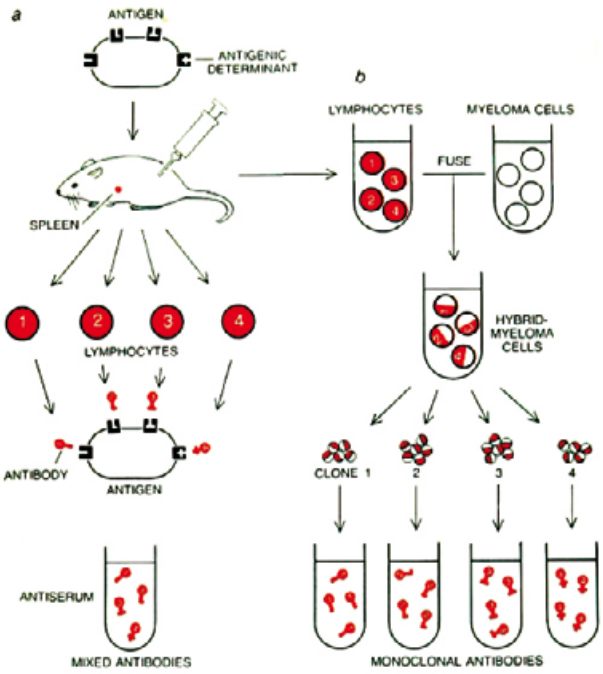
L'ibridazione del DNA

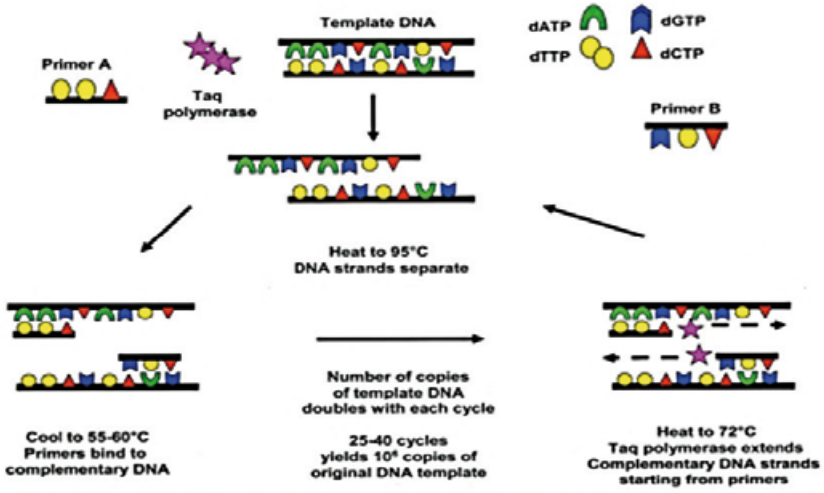
Si tratta di una tecnica di biologia molecolare (*descritta nei dettagli nei capitoli 1 e 3*) che misura il grado di somiglianza genetica tra miscele di sequenze di DNA. Comunemente viene usata per determinare la distanza genetica esistente fra due organismi, di cui uno sconosciuto. Ha trovato largo impiego in studi tassonomici e filogenetici, sia in batteriologia che in virologia, oltre che in zoologia e botanica.

Un'applicazione di questa tecnica sta nella **reazione a catena della polimerasi** (*Polymerase Chain Reaction o **PCR***), che consente la moltiplicazione (*amplificazione*) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscono le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali, aumentando molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.

La tecnica PCR fu ideata nel 1983 da **Kary B. Mullis** (biochimico americano, nato nel 1944) il quale ottenne per questa il Premio Nobel per la chimica nel 1993.

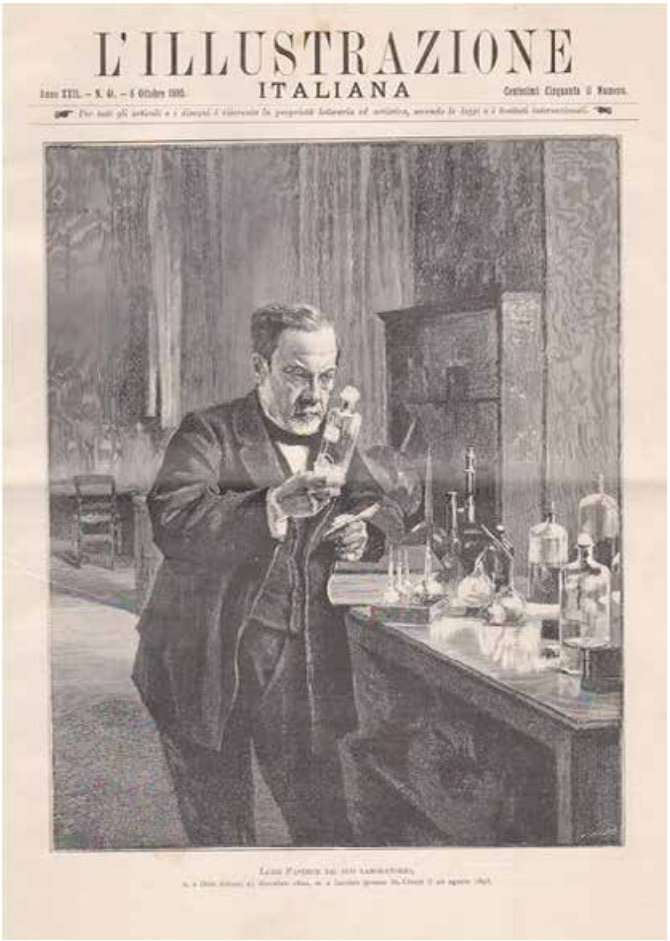
Anticorpi monoclonali e ibridazione del DNA





INTRODUZIONE

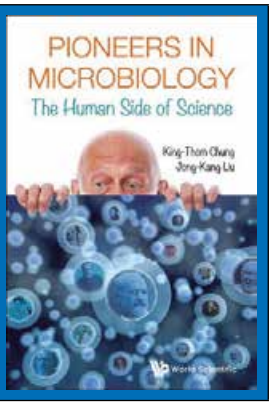
Un po' di storia della microbiologia


L'ILLUSTRAZIONE
ITALIANA
Anno XXII. – N. 41. – 6 Ottobre 1895. Centesimi Cinquanta il Numero.
Per tutti gli articoli e i disegni è riservata la proprietà letteraria ed artistica, secondo le leggi e i trattati internazionali.
LUIGI PASTEUR NEL SUO LABORATORIO.

I PIONIERI

Nomi da ricordare

Francesco Redi (1626-1697)
Antonie van Leeuwenhoek *(1632-1723)*
Robert Hooke (1635-1703)
Lazzaro Spallanzani (1729-1799)
Edward Jenner (1749-1823)
Agostino Maria Bassi (1773-1850)
Louis Pasteur (1822-1895)
Robert Koch (1843-1910)
Martinus Willelm Beijerinck (1851-1931)
Émile Roux (1853-1933)
Emil von Behering (1854-1917)
Paul Ehrlich (1854-1915)
Alexander Fleming (1881-1955)



L'occhio umano non riesce a vedere un oggetto più piccolo di 0,1 mm (=100 μm), per cui senza l'ausilio delle lenti (peraltro già conosciute dagli antichi Romani) non sarebbe nata la microbiologia.

Ma è solo nel '700 che un olandese, **Antonie van Leeuwenhoek**, riesce a distinguere dei parassiti in una goccia d'acqua con un rudimentale microscopio da lui stesso costruito.

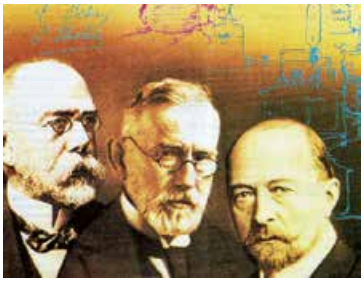
Quasi negli stessi anni un altro studioso riuscì a vedere dei bacilli: era **Robert Hoocke**, un biologo inglese dai molteplici interessi scientifici (ingegnere, architetto, scrittore).

A quel tempo predominava ancora la credenza che i microrganismi invisibili a occhio nudo nascessero spontaneamente (era la famosa *teoria della generazione spontanea*). Solo gli esperimenti di **Francesco Redi**, un medico di Arezzo e soprattutto di **Lazzaro Spallanzani** (un gesuita biologo) risolsero questa diatriba, dimostrando che i parassiti sparivano se riscaldavi il materiale.

Il secolo XIX si apre con grandi scoperte. **Edward Jenner** (un medico inglese) mette a punto un presidio immunizzante contro il vaiolo. È il primo vaccino della storia.

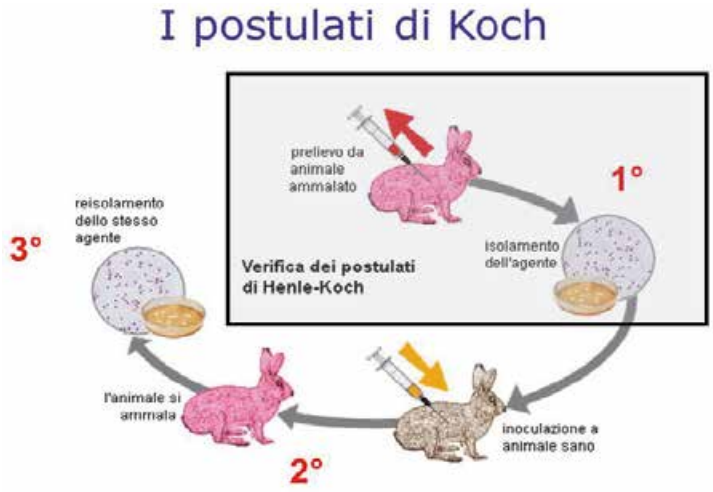
Ormai è assodato che le malattie infettive sono sostenute da microrganismi (batteri e funghi, poi arriveranno i virus) e il teorico di tutto questo si chiama **Agostino Bassi**. È un naturalista e botanico nato dalle parti di Lodi, che scopre un fungo patogeno per i bachi da seta in Lombardia e che può essere a ragione considerato il primo vero padre della *micologia*.

Ormai i microbi non sono più un'entità astratta, ma si capisce che è possibile coltivarli in laboratorio, dopo le esperienze del più grande microbiologo della storia, **Louis Pasteur** (in un'immagine d'epoca alla pagina 1), un chimico e biologo francese. Fabbricandosi i terreni colturali artificiali, Pasteur scopre l'esistenza dei microrganismi responsabili delle fermentazioni, aprendo così la strada alla *microbiologia degli alimenti*. Riconosce anche numerosi agenti eziologici di malattie, tra cui lo Streptococco della polmonite batterica. Sperimentò per primo nel 1881 un vaccino contro il carbonchio, anche se Pasteur utilizzò il metodo di un altro studioso e rivale, Jean-Joseph-Henri Toussaint (1847-1890), un veterinario di Tolosa. C'è un altro francese che gli fa concorrenza, **Émile Roux**, lo studioso della difterite e autore di un vaccino omonimo. Nel giro di 25 anni, grosso modo fra il 1875 e il 1900, furono scoperti molti batteri causa di malattie importanti dell'uomo.



Si affermano così due scuole: in Francia, attorno a Pasteur, si studiano i meccanismi delle fermentazioni, gettando le basi della futura microbiologia industriale, mentre in Germania, specie nelle Università di Berlino e di Hannover, si studia prevalentemente il biochimismo dei batteri, la loro classificazione e le modalità con cui insorgono le malattie infettive.

Un medico tedesco, **Robert Koch** (*nel ritratto, nell'ordine da sinistra, assieme a Ehrlich e Behering)*, studiò la tubercolosi (e la tubercolina per diagnosticarla) oltre al carbonchio, e formulò importanti criteri destinati a stabilire la relazione di causa-effetto che lega un microrganismo a una malattia.

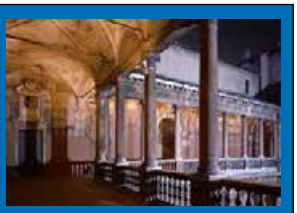


Alla fine del 1800 arrivarono sulla scena i virologi con **Martinus Willelm Beeijerinck**, che sconfiggerà con le sue scoperte il virus dell'afta e quello del mosaico del tabacco. Quest'ultima impresa segna forse l'avvio dello studio delle *malattie trasmissibili delle piante*. Siamo ormai all'inizio del '900 quando nasce la sierologia (applicata alla microbiologia) con **Emil von Behering** (era un botanico olandese) e il suo amico **Paul Ehrlich**, mentre un altro illustre scienziato inglese, **Alexander Fleming** nel 1928 trova che esistono dei funghi capaci di contrastare i batteri producendo una sostanza che prenderà il nome di penicillina (da *Penicillium notatum*), dando origine (senza volerlo) all'era degli antibiotici. È successo così, per caso, anche con la plastica. Molti altri nomi di scienziati benemeriti sarebbero da ricordare. Hanno studiato tutti per migliorare la qualità della vita nei paesi dove vivevano e lavoravano, illuminando con le loro scoperte ciò che gli altri non vedevano.

E IN ITALIA? NON SI POSSONO DIMENTICARE…

…Maestri di Scienze Mediche all'Università di Padova, fondata nel 1222

Alessandro Benedetti (1450-1512)
Girolamo Fracastoro (1476-1553)
Gabriele Falloppio (1523-1562)
Girolamo Fabrici d'Acquapendente (1537-1619),
William Harwey (1568-1657)
Antonio Vallisneri (1661-1730)
Gian Battista Morgagni (1682-1771)



"*Hic est locus ubi mors gaudet succurrere vitae*"
(è questo il luogo dove la morte gode nel soccorrere la vita):
il Teatro anatomico nel Palazzo del Bo,
sede dell'Università di Padova

Nella "culla della rivoluzione scientifica" un personaggio speciale: Andrea Vesalio

Così è stata definita **Padova** da Herbert Butterfield, Professore di Storia all'Università di Cambridge nel suo libro "*The Origins of Modern Science, 1300 -1800*", pubblicato nel 1959. Effettivamente la città dove è nata la moderna medicina aveva all'inizio del '400 – su una popolazione di 40.000 abitanti – una decina di "*hospitali*". Il più importante era l'**Ospedale di S. Francesco Grande**, in pieno centro, dove si trova oggi il **Musme** (Museo della Medicina). Sarebbe stata la prima sede dell'insegnamento clinico al mondo ad opera di **Giovanni Battista da Monte (1498-1551),** docente di medicina pratica ordinaria dal 1539. A lui andrebbe il merito di aver integrato le lezioni universitarie con la pratica clinica al letto del malato, condotta proprio al San Francesco. Il vecchio Ospedale fu sostituito nel 1778 dall'**Ospedale Giustinianeo,** voluto dal Vescovo Nicolò Giustiniani.

Ritratto di Andrea Vesalio, il frontespizio e una tavola dell'opera *De Humani Corporis Fabrica*.

Via S. Francesco, sede del Museo della Medicina (Musme).

In questo contesto eccezionale si inserisce la vicenda di **Andrea Vesalio** (1515-1564), nativo di Bruxelles, laureato a Padova nel 1573 e nominato a 23 anni **lettore in anatomia e chirurgia** nell'Università. Pubblicò nel 1538 per gli studenti le innovative *Tabulae anatomicae*, basate su schizzi dello stesso Vesalio. La sua opera più importante è la *De Humani Corporis Fabrica* (1543), corredata da più di 300 tavole a cui mise mano la bottega veneziana di Tiziano. Vale la pena di ricordare che a quel tempo il corpo umano, in

Il cortile dell'Ospedale Giustinianeo.

quanto microcosmo, era considerato sede di conflitti tra energie occulte e soggetto all'influsso astrale. Quando sui banchi dell'Università sedeva **Nicolò Copernico** (1473-1543), le lezioni di medicina erano improntate alla lettura di Avicenna, Ippocrate o Galeno. Qualcosa però stava cambiando. Si parlava di nuove teorie anatomiste, della scoperta nel nuovo continente di malattie sconosciute, di orientamenti terapeutici diversi, basati su rimedi botanico-farmaceutici. Era ancora presto, ma a Padova si stava respirando già aria nuova. A causa di questo lavoro, Vesalio fu chiamato il "*fondatore dell'anatomia descrittiva*". Si narra che, posto sotto accusa dall'Inquisizione e incarcerato, si sia rifugiato in Spagna, dove divenne medico personale di Carlo V. Morì a Zante, di ritorno da un misterioso pellegrinaggio in Terra Santa.

Un altro Andrea (e per di più padovano) con l'anatomia ci sapeva fare. Era il **Mantegna** (1431-1506), che dipinse la Cappella Ovetari agli Eremitani a Padova e il *Cristo Morto* (oggi nella Pinacoteca di Brera a Milano), preceduto da uno studio del corpo umano che segnò una rivoluzione nell'arte rinascimentale. E questo avveniva in contemporanea (a Milano) con un altro genio studioso di anatomia: **Leonardo da Vinci** (1452-1519).

Si dice che Padova sia stata sempre un centro di conflitti fra oscurantismo e innovazione. Qui agli inizi del '500 si erano diffuse più che altrove le idee di Martin Lutero, probabilmente per la presenza di studenti provenienti dall'Europa centrale e per una certa tolleranza ostentata dalla Repubblica di Venezia (non sempre sincera: Il Doge Mocenigo si comportò molto male). Qual'è stato il rapporto tra la cultura rinascimentale-umanistica e quella scientifica ? Nello studio del corpo umano la dissezione, nonostante le scoperte di Andrea Vesalio, era destinata a essere marchiata come segno d'infamia, essendo riservata ai condannati a morte colpevoli di crimini particolarmente feroci, ai miscredenti e agli eretici. La pratica settoria è stata una vera rivoluzione per i medici del tempo, che la consideravano un sapere secondario, poiché privilegiavano la vecchia *teoria umorale*. Vesalio sosterrà per primo il collegamento fra anatomia, filosofia e medicina. Ma per quanta ansia di novità ci fosse, essa non bastava a rendere le menti illuminate libere di esprimere le proprie idee. Bastano tre nomi per capire che aria tirava: **Girolamo Savonarola** (1452-1498), **Giordano Bruno** (1548-1600) e **Tommaso Campanella** (1568-1639) sono passati da Padova, presi per eretici e destinati a una brutta fine.

Altrettanto triste è la storia di **Pomponio de Algerio** (1531-1556)**,** arrivato nella città del Santo per studiare filosofia, teologia, medicina e diritto. Aderì con entusiasmo alle dottrine della Riforma protestante. Denunciato da un delatore, accusato di eresia in quanto negava la transustanziazione e l'autorità della Chiesa, fu arrestato, condotto a Roma e condannato a morte in piazza Navona dal papa Paolo IV. È ricordato da una lapide nel cortile dell'Università, al Bo.

Un'altra vittima illustre dell'Inquisizione sarà più tardi **Galileo Galilei** (1564-1642), insegnante all'Università di Padova dal 1592 al 1610. Tramite il perfezionamento del cannocchiale, i suoi calcoli matematici e le osservazioni degli astri, riuscì a verificare le teorie di Copernico, di cui era sostenitore. Una leggenda metropolitana narra che le sue famose osservazioni del cielo venissero fatte dalla *Torlonga*, la futura Specola. Scoperte di una portata tale da sovvertire il mondo così come lo si era sempre concepito nei precedenti 2000 anni: perfetto, con una visione aristotelica e geocentrica del creato, fatta in sintonia con la Chiesa che ovviamente mise in moto la macchina dell'Inquisizione. Galileo fu costretto ad abiurare per non perdere la vita.

Cattedra di Galileo.

Il cortile dell'Università al Bo.

Ma che cos'è il *metodo scientifico-sperimentale galileiano*? **Un modo di procedere in qualsiasi ramo del sapere che si basa su una prima osservazione, seguita da un esperimento, sviluppato in maniera controllata, in modo tale che si possa riprodurre il fenomeno che si vuole studiare**. Galileo è ricordato dalla sua cattedra conservata nella Sala dei Quaranta all'Università. Enorme è stato l'impatto delle lenti d' ingrandimento galileiane sulle conoscenze in **Medicina** e nelle **Scienze Biologiche.** Il suo insegnamento portò conseguenze rivoluzionarie dove la scienza poteva recepire la novità del metodo sperimentale. Non a caso si sono parallelamente sviluppate a Padova l'**Astronomia** e la **Botanica.**

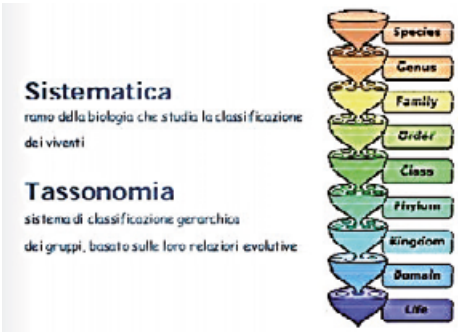
L'**Osservatorio Astronomico** fu fondato da un abate, astronomo e metereologo, Giuseppe Toaldo (1719-1797) sulla *Torlonga*, un'antica torre di difesa medievale risistemata da Ezzelino III da Romano nel XIII secolo,

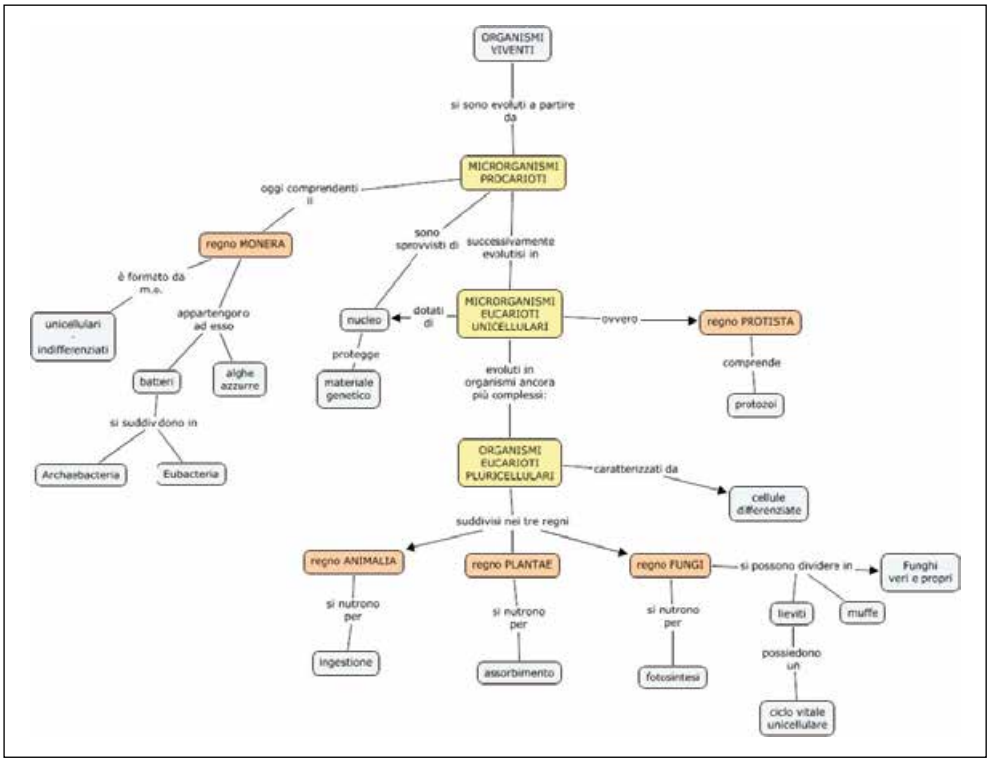
L'**Orto Botanico** nacque nel 1545 per merito di Luigi Squalermo detto l'Anguillara (1512-1570). Destinato alla coltivazione di piante medicinali "semplici", prese il nome di "*Giardino dei Semplici*".

la *Torlonga* dell'Osservatorio Astronomico.

L'Orto Botanico.

A tutti i microrganismi viene assegnato un nome. La denominazione deve rispettare determinati criteri, stabiliti da una disciplina chiamata **nomenclatura**. I soggetti che hanno ricevuto una specifica denominazione vengono poi classificati in schemi ordinati da un'altra disciplina, la **tassonomia**, che è la collocazione dei microrganismi in gruppi tassonomici (*taxa)* sulla base di somiglianze e relazioni, per cui si stabiliscono delle gerarchie con nomi formali.





BATTERI

Possono essere classificati adoperando vari criteri (morfologico, colturale, biochimico, sierologico, ecc) che però non producono classificazioni oggettive.

Si usa invece il seguente metodo: batteri accomunati da caratteri che li distinguono da altri germi formano un insieme chiamato **specie**. *Specie affini sono raggruppate in* **generi**; *i generi in* **famiglie**; *le famiglie in* **ordini**; *gli ordini in* **classi**.

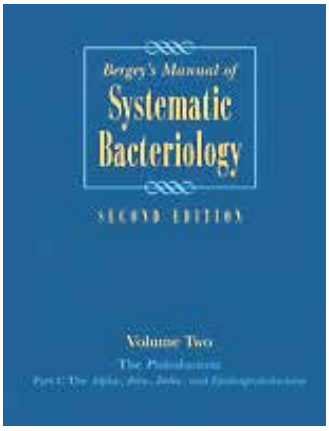
Più classi formano una **divisione**.

Nella nomenclatura le parole che designano gli ordini terminano in ***-ales***, le parole che definiscono le famiglie terminano in ***-aceae***. La nomenclatura consente l'assegnazione dei nomi ai gruppi secondo regole internazionali.

Ciascuna specie riceve due nomi latini o latinizzati (ad esempio, *Pseudomonas aeruginosa*), in cui il primo è il nome del genere (al singolare, scritto con iniziale maiuscola) e il secondo è il nome della specie (scritto con iniziale minuscola). Di solito, il nome della specie è un genitivo che precisa meglio qualche caratteristica del germe (ad esempio: *Diplococcus pneumoniae*) o un aggettivo che integra la fisionomia del germe (ad esempio: *Streptococcus mitis*) o ne descrive una caratteristica (ad esempio: *Staphylococcus aureus*).

Il nome del genere viene scritto talvolta al plurale, per illustrare proprietà collettive di quel gruppo di microrganismi (ad esempio: neisserie, vibrioni, clostridi, ecc.), usando, in questo caso, lettere italiche e iniziale minuscola.

L'ultima unità classificativa dei batteri è il **ceppo**, che è l'insieme di tutte le cellule figlie discendenti da un'unica colonia batterica. La coltura che si realizza a partire da una sola colonia si chiama anche **clone**.



La classificazione dei batteri secondo lo schema sopracitato non stabilisce nette differenze tra le varie suddivisioni e i limiti non sono sempre ben definiti. *Il concetto di specie non può essere definito come nel regno animale o vegetale, in quanto, nei batteri, non esiste la riproduzione sessuata, per cui una specie è un gruppo di organismi che, a intervalli, si incrociano dando una discendenza omogenea*.

Il sistema di classificazione adottato per i batteri è quello del *Bergey's Manual*, che segue un criterio filogenetico, cioè raggruppa fra loro germi aventi progenitori comuni. Il *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (dal nome dell'Autore David Hendricks Bergey, batteriologo americano, 1860-1937) è il primo testo (dal 1923) che si è occupato di classificazione dei microrganismi.

Tutti i batteri sono inclusi in una sezione del regno vegetale (PROTOFITI) CLASSE II (SCHIZOMICETI) divisi a loro volta in 10 ordini, di cui 5 soltanto hanno importanza per la medicina.

Il concetto di specie è nei batteri meno chiaro che negli organismi superiori. Una specie può essere considerata una "collezione" di ceppi che hanno molti aspetti in comune e che differiscono considerevolmente da altri ceppi.

Un ceppo è formato dalla discendenza di una singola colonia e quindi è una coltura pura per definizione.

Se un ceppo è rappresentativo della specie cui appartiene si chiama **"*ceppo-tipo*"** e serve come esempio di tutta la specie.

Uno dei caratteri più importanti per definire una singola specie è il livello di uguaglianza del DNA mostrato da un gruppo di ceppi che si ritiene possano essere unificati in una stessa specie. La **sottospecie** è un'ulteriore divisione della specie fatta sulla base di differenze fenotipiche e genetiche di "*cluster*" di ceppi. È la più bassa suddivisione tassonomica che possiede nomi.

Al di sotto della sottospecie esistono gruppi di ceppi che vengono assimilati mostrando antigeni comuni (**sierotipi**), oppure biochimismo comune (**biotipi**), oppure sensibilità a *fagi* comune (**fagotipi**). Queste entità non hanno una collocazione ufficiale nella nomenclatura, ma hanno notevole importanza pratica.

Il **"*genus*"**. Tutte le specie sono assegnate a un *genus*. La differenziazione tra *genera* è basata su differenze tra sequenze di nucleotidi dell'RNA dei ribosomi. L'identificazione è il procedimento per determinare se un nuovo isolamento appartiene a un *taxon* già noto e determinato. Richiede l'applicazione di verifiche morfologiche, biochimiche, fisiologiche e genetiche.

MICETI

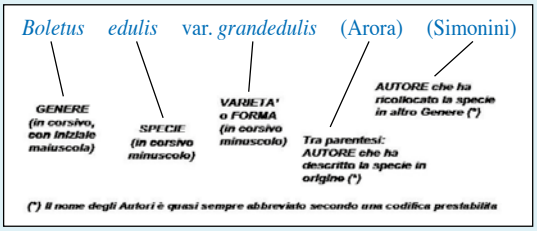
MICETI = FUNGHI + LIEVITI

I funghi o miceti sono organismi eucarioti, eterotrofi, unicellulari (lieviti) o pluricellulari (muffe). In condizioni avverse producono aschi all'interno dei quali vi sono le spore.

Hanno talvolta due denominazioni, una scientifica e una popolare (ad esempio, *Saccharomyces cerevisiae* = lievito di birra). Non è infrequente che la stessa specie venga descritta quasi contemporaneamente da più studiosi: ne consegue che essa possa essere inizialmente conosciuta con un nome scientifico, ma successivamente, accertata la priorità di ritrovamento ed analisi, le possa venir attribuito un nome scientifico diverso. Questo alternarsi di denominazione può ovviamente creare confusione anche tra gli studiosi. Per evitare ogni dubbio circa l'individuazione della specie, il nome scientifico viene di norma accompagnato dal nome o dall'abbreviazione dell'Autore che ha attribuito tale denominazione, ovvero l'abbia ricollocata in altro genere.

Agostino Bassi (1773-1856) ha dato il nome a *Beauveria bassiana*, una muffa che combatte un insetto parassita del baco da seta.

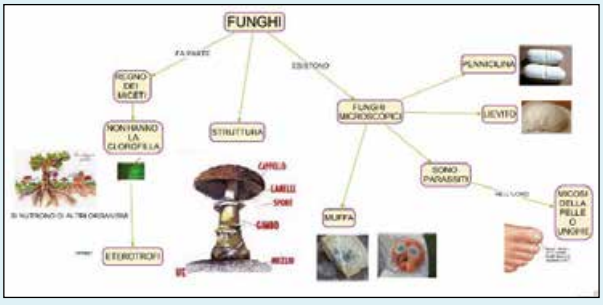
Per avere un unico nome di riferimento, valido ovunque, è ststa attribuita ai funghi la stessa denominazione che il naturalista svedese Linneo aveva adottato in botanica nel 1600. Si tratta di una **denominazione binomia** in latino, spesso con etimologia greca, che rappresenta un vero e proprio *cognome e nome* del fungo.
Questa convenzione consente l'identificazione univoca di una specie, il cui **nome scientifico** viene coniato dalla combinazione di due parole:



- il nome del *genere* cui appartiene la specie
- un *genitivo* che distingue quella specie dalle altre appartenenti al quel genere. Il primo termine (nome di genere) porta sempre l'iniziale maiuscola, mentre il secondo (nome di specie) viene scritto in minuscolo; entrambi i nomi vanno scritti in corsivo.

PREGI E DIFETTI DEI MICETI:
ma quanti sono?

Formano un regno di organismi eucarioti, unicellulari e pluricellulari che comprende **più di 100.000 specie,** classificate scientificamente da Linneo come *Piante* e diventate *Regno* dopo gli studi di Nees nel 1817 e di Whittaker nel 1968.



VIRUS

(MATTIA CECCHINATO – GIOVANNI FRANZO)

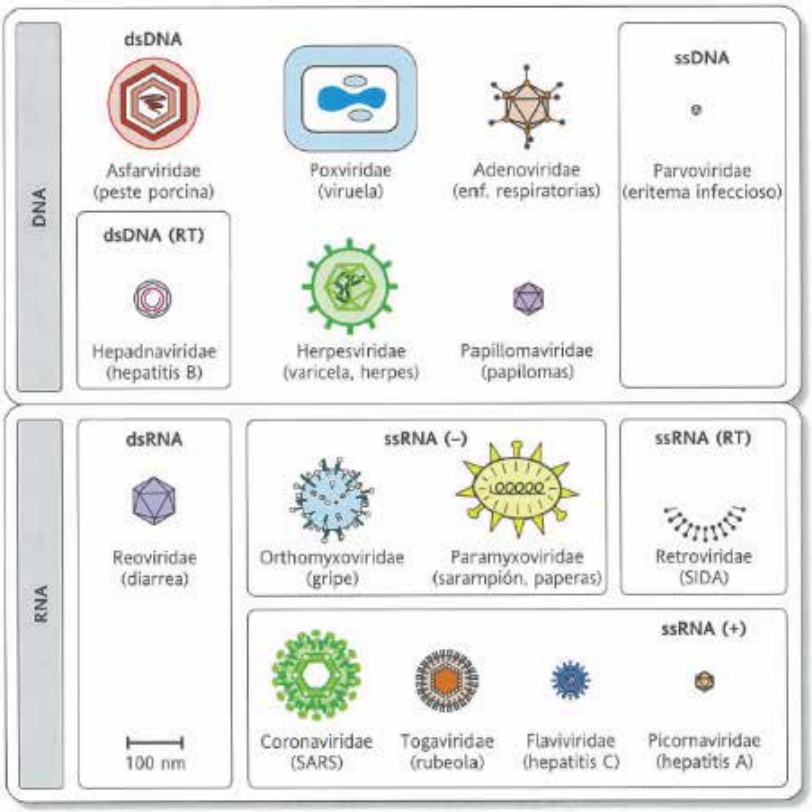
Nomenclatura

La nomenclatura dei virus differisce a seconda che la si usi in senso tassonomico o ci si riferisca al virus in qualità di entità fisica o genetica replicante in un organismo. Un'analogia può essere il diverso uso del nome tassonomico *Homo sapiens sapiens* rispetto a "uomo".

Nel primo caso, il nome della specie deve essere scritto secondo delle regole precise definite dall'ICTV: i nomi di tutti i livelli tassonomici devono essere scritti in corsivo, con solamente la prima lettera del nome in maiuscolo. Anche nel caso della specie, spesso composta da più di una parola, solamente la prima deve essere riportata con la prima lettera maiuscola. Fanno eccezione eventuali nomi propri.

Nell'uso informale, il nome del virus non deve essere in corsivo né devono essere riportate maiuscole (a eccezione dei nomi propri). Tale nomenclatura è talvolta all'origine di incomprensioni in quanto storicamente è stata utilizzata la stessa dicitura per diversi livelli tassonomici e.g. *Bunyavirus* può riferirsi alla famiglia *Bunyaviridae* o al genere *Orthobunyavirus*. Per questo motivo è opportuno specificare il livello tassonomico a cui si riferisce.

Infine, una classificazione non ufficiale, ma molto comune in ambito clinico, prevede l'aggregazione delle specie virali in funzione di criteri epidemiologici (e.g. virus enterici, respiratori, arbovirus, virus oncogenici, etc).



Identificazione di nuovi virus e tassonomia nell'era della meta-genomica

L'avvento della meta-genomica ha determinato un dilemma nella definizione di nuove specie virali. Infatti, nel passato, l'approvazione di una nuova specie tipicamente richiedeva la disponibilità di dati che dimostrassero la presenza di caratteristiche biologiche distintive del nuovo virus. Tuttavia, negli studi meta-genomici è tipicamente possibile identificare sequenze complete o parziali di nuovi virus, senza che però queste forniscano informazioni dirette sulle proprietà biologiche.

L'orientamento corrente, sebbene con una serie di precauzioni, è di ritenere il rilevamento di una sequenze genetica in un campione come un'evidenza sufficiente dell'esistenza del corrispondente virus. Il razionale risiede nel fatto che le proprietà biologiche di un virus sono in massima parte determinate dal suo corredo genetico ed è solo la nostra attuale incapacità di interpretare accuratamente tali informazioni a impedirci di inferire le proprietà biologiche e strutturali degli organismi.
Grande attenzione e prudenza deve invece essere prestata all'attribuire un nesso di causalità fra il rilevamento di una nuova specie virale in soggetti malati e la malattia stessa. L'interazione con l'ospite è infatti spesso complessa e, oltre che antagonistica, può avere i caratteri di commensalismo o addirittura di mutualismo. Inversamente, anche agenti effettivamente patogeni possono essere in grado di esplicare la loro azione sono in presenza di alcuni co-fattori, fungendo quindi da "fattori di rischio" più che da causa di malattie.

Tassonomia

I virus sono parassiti intracellulari obbligati che probabilmente infettano ogni fonte di vita. I recenti progressi nell'ambito della meta-genomica hanno permesso di evidenziare l'esistenza di un viroma sorprendentemente vasto e diversificato in ogni ambito della biosfera, al punto da far ritenere che la *virosfera (*ossia, il numero di particelle virali*)* sia da 10 a 100 volte più numerosa rispetto agli organismi cellulari. Per dare un'immagine più concreta, la biomassa virale è stata stimata essere dell'ordine delle 200 milioni di tonnellate (quanto 75 milioni di balenottere azzurre) e la concatenazione dei loro genomi si estenderebbe per 65 galassie. In aggiunta a ciò, i virus sono estremamente diversi per natura, organizzazione genomica, proteine, struttura, meccanismi replicativi ed interazione con il loro ospiti. Appare quindi evidente la basilare importanza di un'accurata classificazione tassonomica per permetterne lo studio, conoscerne, e in parte predire, il loro comportamento.

La classificazione iniziale dei virus fu fatta studiando le possibilità di causare infezioni, quindi esaminando le proprietà patogenetiche, il tropismo cellulare del virus, le caratteristiche ecologiche e di trasmssione. Pertanto furono distinti virus dermotropici (nelle malattie della pelle), respiratori, enterici (quelli che causavano diarrea). Solo nel 1996 il Comtato Internazionale di Tassonomia dei Virus (ICTV) ha istituito un codice di comportamento per inserire i virus in un tipo di tassonomia più evoluta, riunendo le **specie** dentro **generi**, questi dentro **famiglie** e le famiglie dentro **ordini**. La terminologia degli ordini termina in *-virales*, quella delle famiglie in ***-irideae***, quella dei generi in ***-virus***. Solo le specie singole vengono chiamate con un nome in inglese. In questo modo la terminologia dei virus si accompagna a quella degli altri microrganismi e viene scritta in italico con la prima lettera maiuscola. L'attuale classificazione contiene 3 ordini, 56 famiglie, 233 generi e 1.550 specie (www.portaleducacao.com.br)

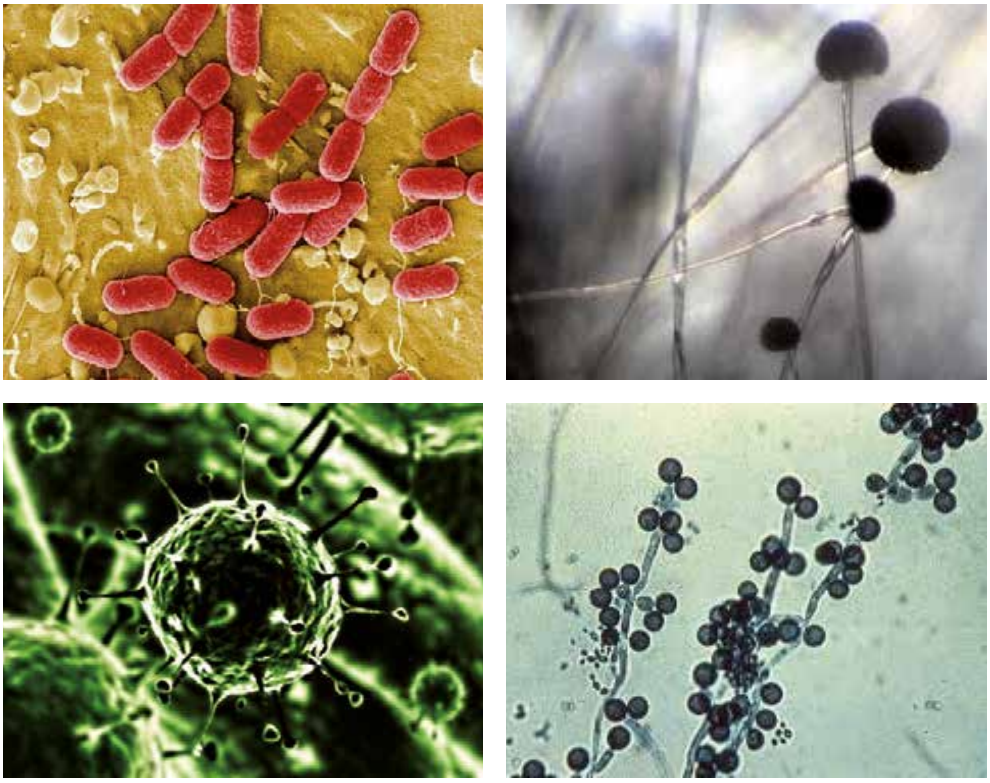
I virologi hanno definito un sistema di classificazione e nomenclatura che è regolato e continuamente aggiornato dal *International Commitee on Taxonomy of Viruses* (ICTV).

In passato questa classificazione virale era essenzialmente basata sul tipo di acido nucleico (DNA o RNA), dimensioni del virione, morfologia, stabilità (e.g. a temperature, pH, solventi, etc) e antigenicità. Attualmente, la possibilità di sequenziare il genoma virale ha radicalmente modificato l'approccio tassonomico, che è difatti basato su:

1) tipo, caratteristiche e sequenza del genoma virale;
2) strategia di replicazione;
3) struttura del virione.

Nell'ultimo aggiornamento (*Virus Taxonomy: 2018 Release*) è stato definito un sistema gerarchico di 18 livelli che vanno dal reame alla specie. Tuttavia, è necessario sottolineare come, in questo caso, non vi sia l'intento di ricondurre tutti i virus ad una radice comune in quanto non esiste un equivalente dell'"albero della vita", con cui comunemente si descrivono le relazioni fra organismi cellulari. Non vi sono infatti dei geni comuni a tutti i virus su cui costruire un'unica filogenesi e, in effetti, vi sono buone evidenze a favore di origini indipendenti per diversi gruppi virali. Nella pratica, ciò comporta che non sia necessario utilizzare tutti i livelli tassonomici e solamente *genere* e *specie* siano obbligatori. Infatti, il sistema tassonomico è sostanzialmente completo a livello di famiglia e genere (ossia quasi tutte le specie virali sono state classificate all'interno di un genere e una famiglia), ma solo una parte di questi sono stati aggregati in livelli tassonomici superiori.

La *specie* è l'unita base del sistema tassonomico, sebbene sia spesso il più difficile da delimitare. Attualmente la specie viene definita come un gruppo monofiletico di virus con caratteristiche che lo differenzia da altre specie sulla base di criteri multipli. Questi criteri non sono universali e vengono definiti da appositi gruppi di studio ma, in termini generali, comprendono (senza essere limitati a) tropismo d'ospite, tissutale e cellulare, patogenicità, speci-



Batteri, funghi, lieviti e virus: in senso orario, un mondo invisibile estremamente vario e imprevedibile. Le immagini, viste al microscopio ottico o al microscopio elettronico, **sembrano uscite da un racconto *fantasy***.

ficità del vettore, antigenicità e vicinanza genetica. I *generi* sono usati per raggruppare virus con evidenti relazioni evolutive e biologiche (antigeniche, epidemiologiche, tropismo d'ospite, ecc.). Le *famiglie* virali comprendono *generi* con una organizzazione genomica, strategia replicativa e morfologia sostanzialmente sovrapponibili. Talvolta *famiglie* virali distanti, ma con caratteristiche filogenetiche comuni (e.g. geni o domini conservati), possono venir raggruppate in *ordini*. Come precedentemente accennato, raggruppamenti tassonomici superiori, sebbene presenti, sono attualmente poco utilizzati.

Nonostante nel corso del tempo siano state sovente introdotte categorie inferiori alla *specie* (e.g. sierotipi, genotipi, sottotipi, varianti) e la loro rilevanza sia notevole dal punto di vista clinico, epidemiologico e evolutivo, la definizione di questi gruppi non rientra nella responsabilità dell'ICTV e viene demandata a gruppi di riconosciuti specialisti internazionali.

VITA DIFFICILE PER I MICRORGANISMI SE CI SONO GLI ANTIBIOTICI

Quando si parla di **antibiotici** si pensa subito ad **Alexander Fleming**, un batteriologo inglese che nel 1928 scoprì la *penicillina*. Era stato un evento casuale: dentro una coltura in piastra di stafilococco erano cadute accidentalmente delle spore di *Penicillium*, una muffa, che avevano ostacolato la crescita del germe. Altri due Ricercatori, **Ernst Chain** (biochimico tedesco, 1906-1979) e **Walter Florey** (patologo australiano, 1898-1968) purificarono in seguito il principio attivo della penicillina, che trovò largo impiego nella seconda guerra mondiale. Sarà sufficiente ricordare che prima dell'avvento della penicillina si usava il *Prontosil*®, un sulfamidico sintetizzato in Germania negli anni '30 dai chimici **Josef Klarer** e **Fritz Mietzsch** della Bayer. Negli anni successivi videro la luce la *streptomicina* (1944) usata contro la Tbc, il *cloramfenicolo* (1947) contro il tifo, l'*aureomicina* (1948) contro le infezioni polmonari e la *neomicina* (1949), la prima sostanza a largo spettro.

Pochi però ricordano che la scoperta di Fleming era stata preceduta dalle osservazioni di due studiosi italiani, **Vincenzo Tiberio** (medico molisano della Marina Militare, 1869-1915) e **Bartolomeo Gosio** (medico piemontese, 1863-1944). Entrambi avevano notato l'effetto battericida del *Penicillium* sui germi nei pozzi d' acqua, che in presenza di questa muffa ritornava addirittura potabile.

In natura si trovano altre sostanze ad azione antibatterica, ad esempio nei vegetali, la cui ricerca è spinta dall'esigenza di isolare nuove sostanze capaci di aggirare l'insorgere dell'antibiotico-resistenza (da www.my-personaltrainer.it/):

- Diverse *Ranunculaceae* producono la **proto-anemonina**, che ha dimostrato di possedere attività anti-batterica ad ampio spettro e anti-fungina.
- Alcune crucifere (*Brassicaceae*) producono sostanze solforate ad azione antibiotica, come il **sulforafano**, attive contro l'*Helicobacter pylori*.
- L'olio di iperico contiene l'**iperforina**, che ha dimostrato proprietà antibiotiche nei confronti di numerose specie batteriche.
- La **berberina**, estratta per esempio dall'idraste, è dotata di proprietà batteriostatiche a deboli dosi e battericide a dosaggi più elevati; è inoltre attiva contro funghi, come la *Candida albicans* e diversi parassiti;

- Svariati licheni, come il lichene islandico, producono **acido usnico**, una sostanza dalle spiccate proprietà batteriostatiche e anti-fungine.
- Nell'aglio e nelle cipolle troviamo l› **allicina**, potente antibiotico naturale, che sembra possedere anche attività anti-virale, anti-protozoaria, anti-micotica, anti-infiammatoria ed analgesica.
- In genere molti **oli essenziali** sono dotati di attività anti-microbica. Tra i più impiegati a tale scopo, vi sono quelli di origano, timo, cannella, geranio, melaleuca e limone.

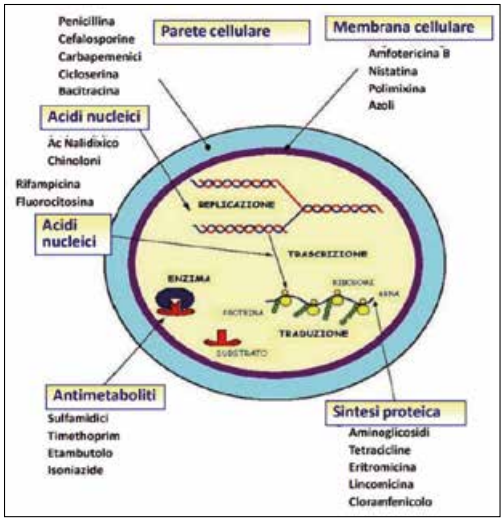
COME NASCONO GLI ANTIBIOTICI E COME AGISCONO

Oggi si possono far sviluppare i microrganismi entro "*fermentatori*", cioè apparecchi formati da una recipiente termostatato (*tank)* dotato di pale per l'agitazione del liquido di coltura (*impeller*) e di un diffusore per l'aria introdotta (*sparger*). Una strumentazione accessoria consente di controllare l'andamento del processo, monitorando in continuo tutti i parametri (temperatura, pH, concentrazione di ossigeno). Il procedimento comporta il lavaggio dell'impianto, la sterilizzazione mediate vapore fluente, l'aggiunta del terreno liquido di coltura, introdotto attraverso filtri sterilizzanti. Dopo l'inoculazione del microrganismo da moltiplicare, la formazione della **biomassa** richiede alcuni giorni. L'estrazione e la purificazione dell'antibiotico avvengono con solventi chimici, seguite da liofilizzazione del prodotto farmaceutico.

In laboratorio li ricerchiamo negli alimenti come residui col nome generico di "sostanze inibenti" *(vedi capitolo 4)* ***con metodi microbiologici o per via chimica (HPLC).***

Non sempre gli antibatterici funzionano. Il fenomeno dell'**antibiotico-resistenza** è ben noto e può essere qui esemplificato in due situazioni.

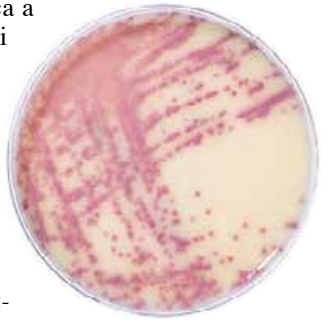
I casi di resistenza agli antibiotici sono in aumento anche fra quei ceppi di *S. aureus* (chiamati MRSA), che diventano **insensibili alla meticillina** e ad altre penicilline sintetiche. Il riconoscimento di tali germi risulta essenziale per ottimizzare la terapia, evitare inutili trattamenti e ridurre i costi delle cure.



Siti d'azione degli antibiotici.

La procedura diagnostica tradizionale richiede 72 ore, mentre con l'introduzione di un nuovo terreno cromogeno specifico per MRSA l'analisi può considerarsi conclusa già dopo 20 ore dal prelievo. Questo terreno (MRSA *Select*) inibisce i germi diversi dagli stafilococchi attraverso l'elevato contenuto di sale. Le colonie che si formano vengono poi selezionate da diversi antibiotici aggiunti nella composizione del terreno. Il riconoscimento delle colonie MRSA è reso possibile da un substrato enzimatico particolare che impartisce un colore fra il rosa e il malva.

Le **beta-lattamasi** sono enzimi che si formano attraverso mutazioni all'interno delle cellule batteriche. Ne esistono ameno 200 tipi. La loro origine può essere cromosomica o plasmidica, quindi trasferibile da una cellula batterica a un'altra. Sono dannose, in quanto conferiscono ai germi il potere di resistere a certi antibiotici, soprattutto cefalosporine e penicilline, oppure, con minor frequenza, aminoglicosidi, trimethoprim-cotrimoxazolo e fluorchinoloni. Le beta-lattamasi che idrolizzano più antibiotici (quindi più temibili, soprattutto nelle infezioni nosocomiali) si chiamano a spettro esteso (ESBL) e sono prodotte specialmente da germi Gram-negativi.

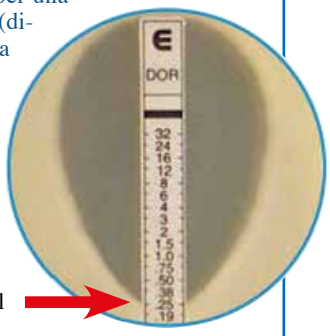


Numerose sono le specie batteriche i cui ceppi possono produrre beta-lattamasi. Tra i Gram-negativi si ricordano: *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Serratia marcescens, Citrobacter diversus, Proteus stuartii, Proteus mirabilis, Salmonella, Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia, Acinetobacter* spp. Tra i Gram-positivi si citano: *Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Neisseria gonhorreae, Staphylococcus aureus, Branhamella catarrhalis, Enterococcus faecalis*. Questi microrganismi, spesso inoffensivi in condizioni di salute normali, diventano aggressivi nei riguardi di individui deboli o ammalati.

I *TEST*

E-test® (AB Biodisk) è un *test* valido per cercare le beta-lattamasi ad ampio spettro (*extended spectrum* o ESBL), inibite dall'acido clavulanico. Si considerano produttori di ESBL i ceppi che formano, sulle piastre, aloni d'inibizione di forma irregolare o che mostrano una riduzione della MIC, in presenza di acido clavulanico, pari ad almeno 3 logaritmi in base 2. Il *kit* è formato da sottili strisce di materiale plastico recanti, su una metà, diluizioni scalari di una cefalosporina (cefotaxime o ceftazidime) e sull'altra metà gli stessi antibiotici addizionati di acido clavulanico. Le strisce vengono appoggiate su piastre di Mueller-Hinton Agar, dove è stato distribuito il microrganismo in esame, opportunamente diluito. Dopo incubazione in termostato per una notte, si vedono aloni di inibizione sulla crescita batterica, misurabili (direttamente come MIC) in corrispondenza della graduazione riportata sopra la striscia.

Beta-lactamase TestKit® (Fluka) è basato sull'idrolisi dell'anello beta-lattamico della benzil-penicillina inclusa nel *test*, con formazione di acido penicilloico e conseguente abbassamento del *p*H. Il *test* è valido per *Haemophilus*, *Neisseria* e *Saphylococcus*. La prova si svolge nei pozzetti di una piastra *microtiter,* in cui si introduce una sospensione del ceppo in esame entro apposito diluente. Dopo incubazione a temperatura ambiente, si potrà desumere la presenza di beta-lattamasi dal viraggio dell'indicatore.



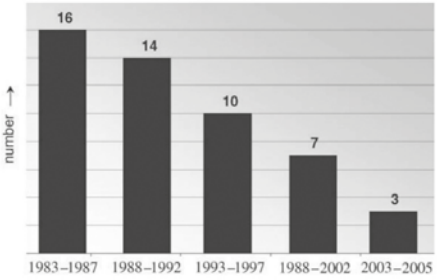
MIC 0.25µg/ml

MICRORGANISMI ED ANTIBIOTICI: UNA SFIDA INFINITA

(GIUSEPPE RAVIZZOLA)

Capita di frequente di leggere sugli organi di informazione notizie riguardanti i "super- batteri", intendendo con questo termine microrganismi per i quali gli antibiotici attualmente a disposizione per la terapia delle infezioni umane risultano sempre meno efficaci.

Se negli anni '80 furono introdotti in clinica numerosi nuovi antibiotici; al contrario, quelli presenti sul mercato negli ultimi anni rappresentano variazioni di prodotti già esistenti e pertanto la loro attività antimicrobica non persenta significativi miglioramenti. In pratica da anni non sono introdotte in clinica nuove famiglie di antibiotici.



New antibacterial agents approved in the US.[62]

Una delle cause che portano allo sviluppo di questi "super-batteri" è rappresentata dall'uso scorretto degli antibiotici, come l'elevato consumo, il dosaggio, la durata della terapia, la via di somministrazione, l'intervallo tra le dosi. Non a caso alcuni farmaci sono di utilizzo prettamente ospedaliero dove le infezioni sono più complicate, maggiore è la possibilità di isolare batteri multi-resistenti e sono prescritti da specialisti infettivologi.

Dalla letteratura sappiamo che in fase sperimentale ci sono circa 40-50 nuovi antibiotici, ma di questi solo la metà presenta un meccanismo d'azione diverso da quello degli attuali farmaci. Il fatto che sia allo studio un numero così elevato di molecole, se da un lato ci può confortare, dall'altro non ci deve fare illudere che sicuramente saranno introdotte nella pratica clinica nuove molecole efficaci nel combattere infezioni sostenute da questi "super-batteri".

La resistenza batterica è un meccanismo con il quale i microrganismi rispondono ad una pressione selettiva che proviene dall'esterno e questa non è rappresentata solo dall'utilizzo di un farmaco in clinica, ma investe anche altri ambiti, come ad esempio quello veterinario. Negli anni '90 si è assistito all'insorgere di ceppi di *Enterococcus faecium* resistenti ai glicopeptidi e tra le varie cause era stato individuato l'utilizzo di avoparcina come integratore alimentare in zootecnia. Il divieto di utilizzare tale composto era coinciso, negli anni successivi, con la scomparsa di ceppi di *E. faecium* resistenti ai glicopeptidi, isolati da materiali patologici. A testimonianza che non esiste un'unica causa che determina la resistenza batterica agli antibiotici, sta il fatto che in questi ultimi due anni, pur rimanendo il divieto di utilizzare avoparcina, si incominciano di nuovo ad isolare ceppi di *E. faecium* resistenti ai glicopeptidi.

Verso nuove scoperte

Il tema dell'uso degli antibiotici in zootecnia - con il possibile impatto sull'insorgenza di batteri antibiotico-resistenti nell'uomo - era già presente verso la fine degli anni '60.

La presenza di batteri antibiotico-resistenti è stata dimostrata negli animali da allevamento con forte esposizione agli antibiotici, nei prodotti alimentari associati, negli ambienti contaminati dai loro residui e negli operatori della catena alimentare.

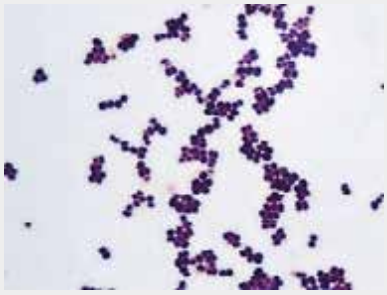
L'uso degli antibiotici può intervenire sullo sviluppo delle resistenze in ambito umano sia mediante la selezione diretta di batteri resistenti in seguito a terapie antibiotiche, ma anche mediante esposizione a residui antibiotici nel cibo, oppure in seguito alla selezione di patogeni resistenti, responsabili di zoonosi che interessano anche l'uomo o mediante la colonizzazione dell'intestino umano di batteri commensali di provenienza animale resistenti agli antibiotici.

Poichè i batteri si scambiano geni, ceppi commensali animali antibiotico-resistenti possono scambiare geni con batteri che colonizzano l'uomo ed occasionalmente causare infezioni opportunistiche. Come esempio di resistenza trasferita dall'animale all'uomo ricordiamo *Staphylococcus aureus* MRSA (= resistente alla meticillina) per un diverso gene *MecA* e indicato come *LA-MRSA* (*livestock-associated* MRSA).
In ambito clinico i maggiori problemi a livello di resistenze si osservano con *Acinetobacter baumannii e Pseudomonas aeruginosa,* seguiti da alcuni ceppi di *Klebsiella pneumoniae* ed *Escherichia coli*. Le resistenze possono essere dovute a degradazione enzimatica dell'antibiotico, alterazioni dei canali della parete cellulare e da pompe di efflusso.
Se si pensava che con i carbapenemi si potessero combattere le diverse forme di resistenza dei batteri soprattutto Gram-negativi, attualmente abbiamo constatato che i germi hanno sviluppato meccanismi di resistenza anche verso questa famiglia di antibiotici.
Per potenziare l'azione dei farmaci si è ricorso in questi ultimi anni all'associazione ceftazidime/avibactam e ceftolozane /tazobactam, molecole che oltre ad esercitare una buona attività antibatterica hanno anche lo scopo di alleggerire la pressione selettiva che nel recente passato è stata esercitata sui carbapenemi, determinandone lo sviluppo di ceppi resistenti.
Nell'ambito dei Gram-positivi (come *S. aureus*) è stata introdotta nella pratica clinica la ceftarolina, che rappresenta l'unica cefalosporina in grado di esercitare attività antibatterica nei confronti di ceppi MRSA.

NON TUTTI I GERMI SONO CATTIVI — Batteri

Probiotici e protecnologici: i batteri che si fanno in quattro per noi

Lactobacillus delbrueckii



Per secoli *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* hanno trasformato il latte in *yogurt,* ovviando alla mancanza dei frigoriferi. Poi si è aggiunto il *Bifidobacterium bifidum*, che ha migliorato la composizione di questo prodotto benefico per la flora intestinale.
Dall'idea dello *yogurt* la ricerca ha selezionato specie con proprietà superiori, i "**probiotici**" come *Lactobacillus plantarum* (nella foto) e *sakei*.

PuraFlor® **Pfizer**
Bifidobacterium longum
Lactobacillus acidophilus
Lactobacillus plantarum

ForMidabil™ **Sandoz**
Lactobacillus paracasei
Bifidobacterium lactis
Lactobacillus acidophilus
Lactobacillus plantarum

Biovestin® **VESTA**
Bifidobact. longum

Il latte era un alimento prezioso a portata di mano fino dall'antichità e l'uomo ha imparato che aggiungendo dei germi particolari i formaggi miglioravano le loro qualità organolettiche. Li chiamano innesti o *stater*, ma restano comunque degli *chef* formidabili per la stagionatura dei latticini e dei salumi.
Tra i protagonisti che si fanno in quattro per noi si trovano *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbruekii* (nella foto, in alto), *Lactobacillus curvatus*, *Micrococcus luteus* (nella foto, in basso).

Lactobacillus acidophilus

Yogurt

Salumi e formaggio

Lactobacillus rhamnosus

La **fermentazione lattica** avviene nelle cellule animali in assenza di ossigeno (anaerobiosi). Questa reazione (detta glicolisi) trasforma il glucosio (o altri carboidrati) in acido piruvico. Da qui, con l'intervento del NADH (nicotinamide-adenin-dinucleotide idrogenato), si forma acido lattico:

$$CH_3\,CO\,COO^- + (NADH + H^+) \rightarrow CH_3\,HCOH\,COO^- + NAD^+$$

(Piruvato + NADH → Lattato + NAD^+)

Il NAD^+ che si libera permette il ripetersi della reazione, che viene sfruttata da batteri e lieviti per ricavare energia dagli alimenti a loro graditi.Un tipo di fermentazione lattica è quella praticata, ad esempio, da lattobacilli e streptococchi che trasformano il latte in ***yogurt*** e **formaggi**. Questi processi di fermentazione interessano anche altri prodotti, ad esempio i **salumi**. Abbiamo due tipi di batteri nelle fermentazioni lattiche:

Omofermentanti: producono quasi esclusivamente acido lattico; gli zuccheri presenti vengono trasformati al 90% in questo acido;

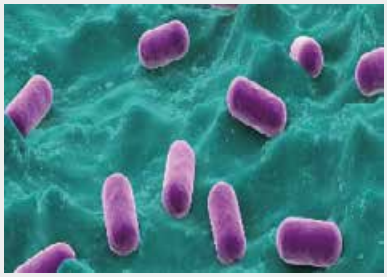
Eterofermentati: qui gli zuccheri vengono metabolizzati al 50% in acido lattico, mentre la restante percentuale di prodotti di fermentazione è rappresentata da etanolo, acido acetico e CO_2.

Abbassando il pH e producendo batteriocine, i batteri lattici rendono sempre più inospitale l'ambiente per altri germi e muffe indesiderati e creano le condizioni ideali per la proliferazione di altri batteri lattici, conferendo all'alimento gusto e sapore piacevole. Nell'industria alimentare i microrganismi che entrano in gioco vengono chiamati genericamente "**protecnologici**".

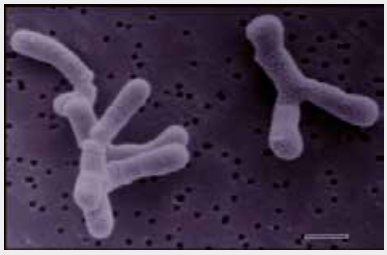
Qualche notizia in più su probiotici e protecnologici

I probiotici sono entrati in uso anche nella **Medicina Veterinaria**. La flora normale del cane e del gatto adulti è composta prevalentemente da *Actinobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Firmiculites*, *Fusobacteria* e *Protobacteria*. Sebbene i maggiori *phyta* si conservino nel microbioma intestinale, **soprattutto nei gatti** possono avvenire sostanziali modificazioni che contribuiscono all'insorgenza di enteropatie croniche con aumento del siero-D-lattato. L'uso di probiotici provoca l'allontanamento di microrganismi patogeni, formazione di sostanze antibatteriche nell'intestino, miglioramenti della funzionalità nella barriera intestinale e nell'assorbimento di micronutrienti, modulazione della risposta immunologica enterica e innata (Jugan *e Coll*., 2017).

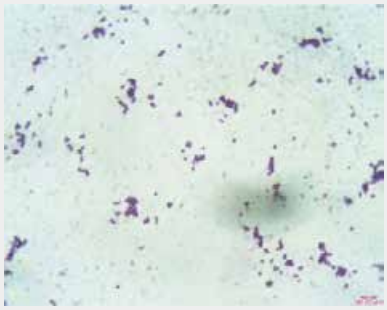
Ad esempio, per la prevenzione di diarree in cani e gatti è stato sperimentato con successo un particolare ceppo di *Enterococcus faecium* SF68® da Bybee *e Coll*. (2011) della *Colorado State University* (USA)* commercializzato in prodotti dietetici per animali d'affezione, tra cui FortiFlora® di Purina. La valutazione degli effetti di ***E. faecium* SF68®** e di alcuni ceppi di *Lactobacillus* nei cani e gatti sani ha mostrato che questi microrganismi modificano positivamente la flora batterica intestinale.



Lactobacillus plantarum (al microscopio elettronico)



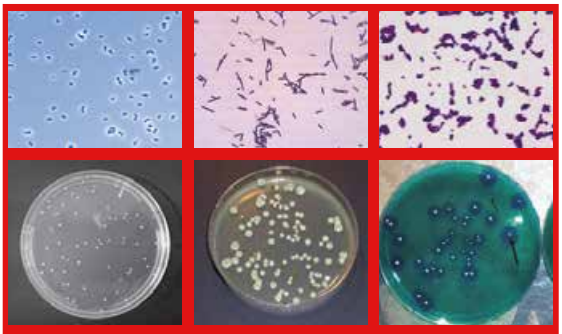
Bifidobacterium bifidum



Kocura spp.

Per esempio, *E. faecium* SF68® ha mostrato di aumentare il numero di *Bifidobacteria* e Lactobacilli fecali e di ridurre il numero di *Clostridia*. Inoltre, sia *E. faecium* sia *L. acidophilus* sembrano esercitare effetti benefici sul sistema immunitario del cane e del gatto sano.

I batteri lattici *starter* (SLAB) sono tra i **protecnologici** più conosciuti e utilizzati nelle prime fasi della produzione dei **derivati del latte**, indicati anche come *colture primarie* e più recentemente come *microbiota primario*. Da un punto di vista funzionale gli SLAB sono definiti come "colture in grado di determinare un'acidificazione del latte tale da portare il pH a valori inferiori a 5.3 in 6 h a 30-37°C".



Lactococcus lactis ***Lactobacillus delbrueckii*** ***Streptococcus thermophilus***

Anche nell'**industria della carne** vengono utilizzati dei microrganismi *starter*, principalmente nella produzione dei salumi che sono, per ordine di importanza: i batteri lattici e i cocchi Gram-positivi catalasi-positivi (GCC+), tra cui *Kocura* e *Pediococcus*. Gli *starter* quindi giocano un ruolo essenziale anche in questo settore, in quanto nella fermentazione producono acido lattico, che agisce sulle proteine della carne modificando la loro capacità di trattenere l'acqua, contribuendo così alla consistenza, al contenuto di umidità, al sapore e all'aroma dei prodotti. Essi agiscono definitivamente sulla sicurezza microbiologica del prodotto.

A caccia di antibiotici, ricercando nemici comuni nei cibi

Esistono dei germi che non crescono *in vitro* in presenza di quantità anche minime di antibiotici. Alcuni sono stati scelti per evidenziare in laboratorio i residui di numerose molecole antibatteriche, che, se rimangono nei cibi, possono diventare dannose per la salute o mascherare microbi patogeni preesistenti. Nelle analisi uno o più germi-*test*, inglobati in un terreno solido* e messi a contatto con il campione, mostrano un alone chiaro d'inibizione della crescita in caso positivo. Possono anche fornire indicazioni sul tipo di antibiotico. Due attori nostri alleati contro gli **antibiotici residui** sono il *Bacillus subtilis* (nella foto) e il *Bacillus stearothermophilus*.

*Standard II Nutrient ®Agar Merck modificato da Zavanella *e Coll.* (1986) con spore di *Bacillus subtilis* BGA, consigliato per le carni (incubazione 18-24 ore a +37°C)

*Kundrat Agar Medium Merck con spore di *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, consigliato per il latte (incubazione 45' a +65°C)

NON TUTTI I GERMI SONO CATTIVI… — Muffe e lieviti

Amici del farmacista, fabbricano difese per altri esseri viventi

Produzione di antibiotici in fermentatori e, a destra, muffe al microscopio

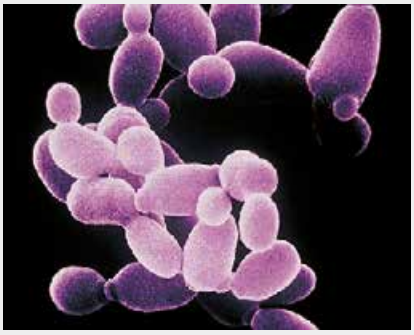
Gli **antibiotici** li conoscevano i Cinesi 2500 anni fa ed oggi sono più di 100 le specie di **muffe** che li producono nei fermentatori. Solo nel 1877 Pasteur notò la loro azione sul batterio del carbonchio. Esistono anche quelli di sintesi, ma le muffe che in 3-5 giorni ne generano a quintali sono gli alleati storici dell'uomo e degli animali (ma anche delle piante) contro molte malattie infettive di origine batterica.

Niente pane (e botti vuote) senza uno di loro

Sarebbe stata una scoperta da Nobel, ma purtroppo non sappiamo chi ha usato per primo il **lievito** naturale. Non un lievito qualsiasi, ma il ***Saccaromyces cerevisiae*** (detto anche "lievito da fornaio" o "lievito di birra") che da secoli regala all'uomo beni presi (e non a caso) quali simboli del divino.

Nella foto: la storica birreria *Hofbräuhaus*, Monaco di Baviera, Germania

Nella storia dell'umanità i primi **alimenti fermentati** sono nati quasi sicuramente per caso, ma l'uomo ha imparato rapidamente a manipolare le condizioni che favorivano le fermentazioni, sviluppando le numerose tipologie di prodotti fermentati che conosciamo oggi. Gli antichi Egizi producevano pane e vino già nel 4000 a.C. e le prime notizie storiche sulla produzione di birra in Mesopotamia risalgono al 1750 a.C.
In un certo senso, la **fermentazione** può essere definita come un *processo di deterioramento di un alimento che produce risultati desiderabili*.
Se le condizioni sono favorevoli per il loro sviluppo, i microrganismi "buoni" crescono rapidamente e prendono il sopravvento, limitando la crescita di quelli indesiderati (patogeni, putrefacenti, etc.). Il ruolo dei microrganismi nelle fermentazioni alimentari è stato scoperto solo di recente (a partire dal 1860), ma negli ultimi 150 anni la scienza ha fatto passi da gigante nella conoscenza della tassonomia, ecologia, fisiologia e genetica dei microrganismi importanti nelle fermentazioni alimentari. I **microrganismi** responsabili dei processi fermentativi possono essere batteri, lieviti o muffe (Rodato, da "I microrganismi, i vegetali e l'uomo", Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, 2014).



ALCUNI FRA I PRINCIPALI MICRORGANISMI TECNOLOGICI IN CAMPO ALIMENTARE

Organismo	Tipo	Prodotto
Saccaromyces cerevisiae	Lievito	Lievito per panificazione, vino, birra, *sake*
Saccaromyces carlsbergensisi	Lievito	Birra
Saccaromyces rouxii	Lievito	Salsa di soia
Streptococcus thermophilus	Batterio	*Yogurt*
Lactobacillus bulgaricus	Batterio	*Yogurt*
Propionibacterium shermanii	Batterio	Formaggio svizzero
Gluconobacter suboxidans	Batterio	Aceto
Penicillium roqueforti	Muffa	Gorgonzola, *Roquefort*
Penicillium camembertii	Muffa	Formaggi *Camembert* e *Brie*
Aspergillus oryzae	Muffa	*Sake*
Rhizopus	Muffa	*Tempeh*
Mucor	Muffa	*Tofu*
Monascus purpurea	Muffa	*Ang-kak* (riso rosso)

I **lieviti** vivono in ambienti dove vi sia disponibilità di zuccheri. Mentre alcuni lieviti utilizzano esclusivamente la respirazione aerobica, altri, in assenza di ossigeno, possono utilizzare un processo diverso chiamato **fermentazione alcolica**, nella quale, grazie ad enzimi particolari, producono energia convertendo gli zuccheri in anidride carbonica ed etanolo. Nella fermentazione delle **bevande alcoliche** è utile la produzione dell'etanolo, mentre nella lievitazione del **pane** l'anidride carbonica gonfia la pasta e l'alcol (etanolo) evapora durante la cottura.

$$C_3H_4O_3 \rightarrow C_2H_4O + CO_2$$

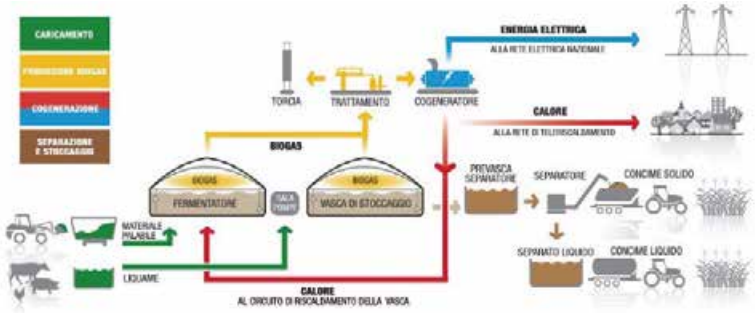
Acido piruvico → Acetaldeide + Anidride carbonica

$$C_2H_4O + (NADH + H^+) \rightarrow NAD^+ + C_2H_6O$$

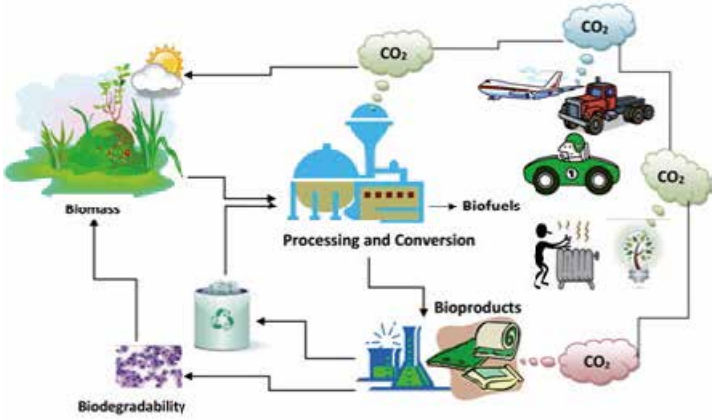
Acetaldeide + Nicotinammide adenina dinucleotide ridotto → Nicotinammide adenina dinucleotide ossidato + Etanolo

Biogas e *biofuel*: due importanti produzioni industriali sostenute da batteri

Il ***biogas*** è una miscela di vari tipi di gas, composti principalmente da metano, prodotti dalla **fermentazione batterica in assenza di ossigeno** dei residui organici provenienti da rifiuti vegetali o animali. l processo di produzione del biogas avviene all'interno di appositi "digestori", nei quali la biomassa introdotta (il cosiddetto "substrato") viene demolita in percentuali variabili tra il 40 e il 60%. Un primo gruppo di batteri dà il via al processo di degradazione, trasformando la sostanza organica in composti intermedi, come idrogeno, acido acetico e anidride carbonica. Un secondo gruppo di batteri, formato da **microrganismi metanigeni,** porta a termine il lavoro producendo il metano.



I ***Biofuel*** sono carburanti di nuova generazione ottenuti da batteri geneticamente modificati. Per ottenere queste 'fabbriche' naturali di carburante i ricercatori hanno sfruttato la naturale capacità dei batteri ***Escherichia coli*** di trasformare gli zuccheri in grasso per costruire le loro membrane cellulari e li hanno poi aiutati a trasformare i grassi in carburante inserendo nel loro DNA i geni del metabolismo prelevati da altri due tipi batteri: il ***Photorhabdus luminescens*** e il cianobatterio ***Nostoc punctiforme***. Le molecole prodotte sono strutturalmente e chimicamente identiche a 10 tipi di carburante diesel comunemente in commercio.



I MICRORGANISMI CHE SANNO FARE DI PIÙ: QUELLI CHE COOPERANO CON L'UOMO NELLA LOTTA BIOLOGICA AI PARASSITI

La natura stessa ha selezionato nel corso dell'evoluzione numerosi microrganismi tra cui batteri, funghi e virus che possono trovare pratica applicazione nella lotta contro larve e parassiti. Questa opportunità presenta dei vantaggi, in quanto è possibile effettuare una distribuzione sulla vegetazione con pompe a volume normale, con irrigazione o con palo iniettore.

Il ***Bacillus thuringienis*** è tra gli insetticidi biologici più diffusi; è un batterio Gram-positivo aerobio, sporigeno. Fu segnalato per la prima volta in Giappone all'inizio del secolo scorso e confermato da Berliner in Turingia (Germania). Produce dei cristalli parasporeali contenenti endotossine responsabili dell'azione insetticida. Sono disponibili diversi ceppi specifici, ad esempio contro le larve della dorifora della patata.

Tra i funghi entomopatogeni, oltre alla ***Beauveria bassiana*** esiste il ***Metarhizium anisopilae*** che trova impiego contro le larve dei maggiolini o dell'oziorrinco. Tra i virus si annoverano i ***Baculovirus*** noti per la lotta alla Carpocapsa (*Cydia pomonella*), un insetto che penetra nei frutti rendendoli inutilizzabili.

Esiste anche un batterio che combatte l'inquinamento marino da idrocarburi…

Oleispira antarctica RB-8, un batterio Gram-negativo, mobile, aerobio, psicrofilo isolato nel 1999 nell'Oceano Antartico, è in grado di degradare gli idrocarburi anche a bassa temperatura (4-6°C, suo *optimum* di crescita). Potrebbe essere utilizzato per la decontaminazione dei fondali marini e delle aree polari in quanto non è in grado di ottenere carbonio da una fonte diversa dal petrolio.

Sembrano *scoop* di una serie televisiva, ma sono semplicemente episodi della natura che vince. "**Il mondo non finisce**" (di **Ettore Tito**, Biennale di Venezia del 1909), un dipinto raffigurante bambini che giocano vicino al mare, **interpreta la vita che – nonostante tutto – riprogramma se stessa**.

COSA SIGNIFICA BIODIVERSITÀ E COOPERAZIONE?

Nel trattato "*Biodiversity: concepts, patterns and measurement*" (Princeton University Press, 2009) **Robert K. Colwsell** afferma che all' interno di ogni ecosistema biologico esiste una varietà di specie ciascuna delle quali assolve a differenti esigenze funzionali.

Biodiversità è la varietà degli esseri viventi che popolano la Terra e si misura a livello di geni, di specie, di popolazioni e di ecosistemi. Una varietà incredibile di organismi, esseri piccolissimi, piante, animali ed ecosistemi tutti legati l'uno all'altro, tutti indispensabili. Anche noi facciamo parte della biodiversità e sfruttiamo i servizi che ci offre: grazie alla biodiversità la Natura è in grado di fornirci cibo, acqua, energia e risorse per la nostra vita quotidiana.
Batteri, farfalle, balene e foreste tropicali, insetti e grandi carnivori, papaveri e orchidee sono solo alcuni dei componenti della biodiversità della Terra, l'immensa varietà delle forme viventi che rende il nostro pianeta unico. Alcuni ambienti sono particolarmente ricchi di biodiversità: le barriere coralline, le foreste tropicali e gli estuari dei fiumi ospitano circa la metà degli essere viventi del Pianeta, anche se ricoprono solo il 6% della superficie terrestre. La biodiversità garantisce la sopravvivenza della vita sulla Terra. L'uomo non ha il diritto di estinguere specie viventi. Invece ha il dovere di preservare l'ambiente e le risorse della Terra per le generazioni future (https://www.wwf.it).

WWF

Due volti dello stesso ambiente: il *Canal Grande* (foto Elena Turla) e il *Lio Piccolo*, entrambi nella *Laguna di Venezia*.

La terraferma, 150 Km di litorali sabbiosi, spezzati da tre grandi lagune

Un'escursione di marea inferiore a 2 metri e i sedimenti trasportati dai fiumi e dalle correnti marine hanno formato le lagune di Grado, Caorle e Venezia, ambienti estremamente eterogenei, con fondali che emergono nelle basse maree (*velme*) e superfici fuori dall'acqua ricoperte da una vegetazione tipica (*barene*). Gli agglomerati urbani, contenuti e ben inseriti nel paesaggio, rispecchiano la vocazione agricola e peschereccia di sempre.

La costa è soggetta a cambiamenti di natura fisica, chimica e biologica per scarsa profondità dei fondali, apporto di scarichi agricoli, industriali e abitativi attraverso fiumi importanti, pressioni da traffico marittimo e balneare, scambio di acque con la laguna attraverso le bocche di porto. L'erosione è state storicamente contrastata attraverso opere difensive (murazzi e moli foranei alle bocche di porto) specialmente in funzione della salvaguardia di Venezia dal fenomeno dell'acqua alta. Esistono ancora ambienti quasi selvaggi che celano resti di insediamenti ormai abbandonati.

Velme e barene al Lio Piccolo (Laguna di Venezia).

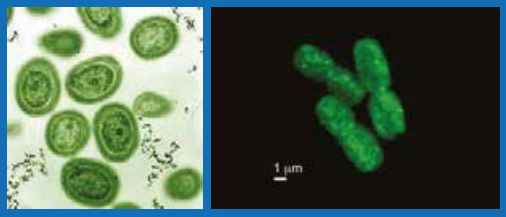
Centro storico di Caorle

Le dune nell'Oasi Naturale del WWF e l'ex-colonia sorta nel 1894 a Ca' Roman (Isola di Pellestrina, Venezia).

Le acque

Abbondano le acque di transizione, corpi idrici superficiali in prossimità di acque interne, che sono parzialmente di natura salina a causa della loro vicinanza alle acque costiere, ma sostanzialmente soggette al rimescolamento di acque dolci ed acque marine, per cui le acque salate, più dense e pesanti, si incuneano al di sotto delle più leggere acque dolci fluviali (fenomeno chiamato *cuneo salino*).

Nella pletora di esseri microscopici che vivono nelle acque marine si trovano nomi di batteri già noti (*Vibrio*, *Pseudomonas*) ma soprattutto nomi nuovi di microrganismi nitrificanti (*Nitrobacter*, *Nitrospira*) oppure ossidanti (*Salinispora*, *Beneckea*) oltre che di numerosi Cianobatteri (alghe azzurre fotosintetiche) tra cui *Prochlorococcus* e *Synechoccus*. Di norma la concentrazione dei microrganismi nei mari è bassa, ma può aumentare nel caso di inquinamentio da batteri fecali o da proliferazione abnorme di alghe nelle cosiddette "*maree rosse*" (*red bloom*). In tutti questi eventi si possono registrare effetti negativi sulla sopravvienza di altri animali e sulla balneazione con la comparsa di fenomeni allergici (dermatiti) oppure tossici nell'uomo.



Prochlorococcus e Synechoccus (impiegato nella produzione di biodiesel)

Difatti nelle **valli da pesca**, costituite da porzioni di laguna arginate, viene praticato simultaneamente l'allevamento di specie ittiche marine e lagunari. Lo scambio continuo e periodico delle acque marine con quelle lagunari fa si che i parametri chimico-fisici delle medesime (salinità, temperatura, ossigeno, pH) subiscano variazioni giornaliere e stagionali. Gli ecosistemi lagunari racchiudono differenti *habitat*, popolati da soggetti adattati alla frequente mutabilità delle condizioni e pertanto caratterizzati da una **elevatissima biodiversità.** Nonostante un valore di salinità intorno a 34 per mille (dato principalmente dai cloruri di sodio e di magnesio), l' acqua dell' Alto Adriatico, come di tutti i mari, alberga varie specie di microrganismi alotolleranti (vedi *box*).

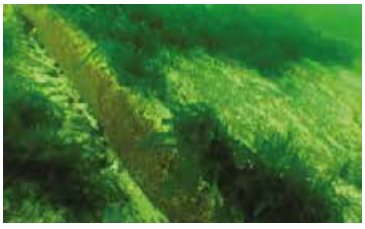
Nelle acque costiere e di transizione il D.Lgs. 116/2008 prevede che mensilmente siano effettuate su ogni punto di prelievo rilevazioni ***di parametri ambientali*** (temperatura aria e acqua, vento, onde, ecc.), ***ispezioni di natura visiva*** (residui bituminosi, vetro, plastica, gomme, altri rifiuti) e prelievi di ***campioni di acqua*** *per l'****analisi batteriologica in laboratorio*** (con limiti di ***Escherichia coli*** < 500 UFC/100 ml ed Enterococchi fecali < 500 UFC/100 mj).

L'avifauna

Biodiversità nell'Oasi del WWF di Ca' Roman: tra le specie sedentarie si osservano il **Martin pescatore**, il **Gabbiano comune**, il **Gabbiano reale** ed il **Gabbiano corallino**. Tra gli ospiti estivi spiccano il **Succiacapre**, l'**Assiolo** e il **Gruccione**. Nel periodo invernale lo **Sparviero**, il **Falco pellegrino** ed il **Falco di palude** battono Ca' Roman all'incessante ricerca di prede, mentre, nel mare e nella laguna che circondano l'Oasi, sono presenti numerosi uccelli provenienti dal nord Europa, lo **Svasso piccolo**, lo **Svasso maggiore** e lo **Smergo minore**, l'**Occhiocotto** e lo **Zigolo nero**.

Le isole di Pellestrina e del Lido tra Cavallino a Chioggia separano la laguna di Venezia dal mare in uno degli ambienti più integri di tutto l'alto Adriatico che vanta, nonostante le ridotte dimensioni, una straordinaria ricchezza faunistica. È situato, infatti, su una delle più importanti rotte migratorie d'Italia e moltissime specie d'uccelli (190 censite complessivamente sino al 2012) lo utilizzano in autunno e primavera per riposarsi e nutrirsi prima di riprendere il viaggio.

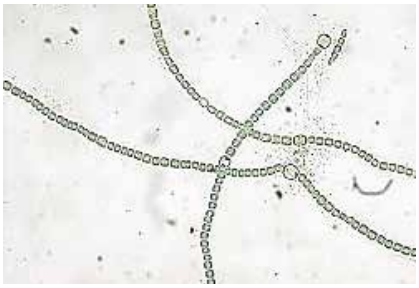
Sopra e sotto il mare



I vegetali che popolano le *velme* sono per lo più alghe verdi, la ***Zostera***, chiamata dialettalmente «*àlega*», la Lattuga di mare (***Ulva***) e l' ***Enteromorpha***. Le barene presentano un suolo limo-argilloso, definito «salso» per la elevata concentrazione di cloruri. Le piante che vivono in questo terreno, che offre condizioni severissime, hanno adottato differenti strategie per sopravvivere. Vi crescono *Juncus maritimus, Artemisia caerulescens, Aster tripolium, Sakdola kali, Suaeda maritima, Triglochin maritimum* e molte altre.

Nei fondali a 10-40 metri di profondità si trovano irregolarità rocciose, le ***Tegnùe***, paragonate alle barriere coralline, che si estendono per tutto l'arco costiero regionale e che costituiscono un ambiente di grande rilevanza biologico-naturalistica, ospitando numerose specie di molluschi, crostacei ed echinodermi, oltre a **microalghe planctoniche**. Stagionalmente si osserva l'abbondate sviluppo di queste ultime, che rappresentano gran parte del ***fitoplancton***, il cibo per lo zooplancton, a sua volta alimento per moltissimi organismi bentonici filtratori e sospensivori, che in genere dominano le comunità delle Tegnùe.

La **COOPERAZIONE** fra microrganismi è stata poco studiata - scrivono Wingreen & Levin in *"Cooperation among Microorganisms"* (PLos Biol. 2006, *4*, 299) - perché il fenomeno è così vasto che non è stato ben compreso. Eppure si sa che parecchie specie batteriche formano *biofilm* su svariate superfici (dai denti dell'uomo alle radici delle piante) e che per far questo si consorziano. Ben lontano dal caso della competizione darwiniana tra viventi, i microrganismi e le cellule eucariote dell'ospite di turno cooperano in maniera perfetta.



La Riserva della Val Cavanata è un'oasi avifaunistica che si trova nella zona orientale della **Laguna di Grado** presso ***Fossalòn***. L'ampia valle da pesca comprende bacini salmastri, i canali di marea, il canale profondo dell'Averto e alcune barene (terreni di forma tabulare tipici delle lagune, periodicamente sommersi dalle maree) con una vegetazione molto varia. È stata dichiarata zona umida di valore internazionale per le oltre 260 specie di uccelli (tra i quali 216 sono i migratori e 21 rapaci).

Grado (Gorizia)

L'**intestino umano** è rivestito da una mucosa estesa su una superficie calcolata di circa 200 m^2, colonizzata da almeno 400 specie batteriche. Si tratta in prevalenza di **Bifidobatteri** (germi anaerobi del colon) ma anche di aerobi (**Lattobacilli**) nel tenue, con larga presenza di ***Escherichia coli***. Si possono trovare inoltre **Clostridi** anaerobi, funghi, lieviti e virus. Questo "consorzio" di microrganismi vive in uno stato di "**simbiòsi**" con l'ospite, che mette a loro disposizione i nutrimenti ingeriti con il cibo. I rapporti non sono unidirezionali, in quanto entrambe le parti traggono benefici dalla pacifica convivenza. Innanzitutto la flora batterica garantisce l'integrità della mucosa intestinale, formando acidi grassi a corta catena, che creano un "effetto barriera", assieme a sostanze antibatteriche che allontanano eventuali germi patogeni. Ma non basta. I batteri che albergano in uno stato di armonia (**eubiòsi**) fabbricano nell'intestino vitamina B_{12} e vitamina K, alcuni aminoacidi importanti (arginina, glutamina, cisteina) e intervengono su acidi biliari e bilirubina. Per comprendere l'importanza della flora intestinale sulla salute, basta ricordare che, se viene meno la sua funzione trofica, la permeabilità intestinale viene alterata, consentendo l'assorbimento di molecole non gradite dall'ospite, che provocano uno stato di "**disbiòsi**" caratterizzato da disturbi digestivi accompagnati da conseguenze anche gravi (allergie, tossicità, malattie autoimmuni).

Anche **le piante** sane e asintomatiche convivono con batteri e funghi, che nel complesso formano il cosiddetto "*microbiota vegetale*". Benchè si siano evolute per sopportare da sole *stress* biotici e abiotici, le piante non potrebbero sopravvivere senza dei *partner* microbici che le difendono da attacchi esterni di batteri e funghi. Inoltre i microrganismi conviventi su foglie (fillosfera) e radici (rizosfera) stimolano le difese immunitarie del vegetale al fine di fargli superare le avversità ambientali. L'interazione fra pianta e microbi simbionti non è a senso unico, in quanto anche i microrganismi ricevono dei benefici, cominciando dalle nicchie specializzate che il vegetale mette a loro disposizione, oltre a uno scambio di metaboliti che essi non potrebbero sintetizzare (Hassani M.A. *e Coll.*, *Microbial interactions within the plant holobiont*, Microbiome 2018, *6*, 58). Nel **pomodoro**, ad esempio, si stabilisce una cooperazione con ***Bacillus, Pseudomonas, Rhizobium***. Questi germi promuovono la crescita della pianta mobilizzando con enzimi il fosforo del suolo, oltre a fornire un elemento essenziale, l'azoto. Così fa il

cianobatterio ***Anabaena***, che forma lunghe catenelle in acque salmastre e dolci. Una cellula ogni dieci (chiamata *microcisti)* si differenzia dalle altre e si dedica alla fissazione dell'azoto a vantaggio di altri organismi coi quali vive in simbiosi.

Oasi naturalistica del WWF di Ca' Roman (Laguna di Venezia)

Gli **insetti** sono probabilmente il gruppo animale di maggior successo sulla base dell'elevatissimo numero di specie esistenti e in considerazione dell'abbondanza di esemplari per ciascuna specie. Parte del successo degli insetti deve però essere attribuita ai numerosi batteri che vivono come simbionti obbligati o facoltativi all'interno degli insetti (endosimbionti) o al loro esterno (ectosimbionti) fornendo enzimi, aminoacidi essenziali ed antibiotici che "facilitano" la vita degli insetti. ***Philantus triangulum***, una vespa europea che fa il nido nel terreno, ospita i batteri in una struttura unica all'interno delle proprie antenne e le femmine utilizzano questi simbionti batterici per proteggere le larve dai funghi patogeni.

Ma non è sempre così. Una cicala (ha la parte terminale dell'addome di colore giallo) convive con un fungo microscopico, ***Massospora cicadina***, che la "controlla" producendo un'amfetamina con attività allucinogena. Questo alcaloide modifica il comportamento dell'insetto che viene spinto a un'attività sessuale frenetica, fino alla morte, contagiando anche gli altri individui della stessa specie.

NOTA DI REDAZIONE

Creazione in lana, cotone e creta, espressione di sintesi fra il mondo animale, vegetale e umano (B.N.Z.)

Nelle pagine seguenti vengono trattati in sintesi alcuni problemi sanitari che possono emergere dalla convivenza con batteri, miceti e virus. Sono questi gli "attori" che in particolari circostanze possono essere causa di malattie nell'uomo, negli animali e nelle piante, dando per di più qualche preoccupazione per la nostra salute se presenti nei cibi che consumiamo. Non sempre però essi sono da temere: anzi, può verificarsi il contrario. Con tutto questo si vuole sottolineare la "*trasversalità*" dei protagonisti, in quanto non è difficile individuare microrganismi dotati di comportamenti uguali o simili nei tre regni. Non è assurda l'ipotesi che prevede una migrazione continua degli esseri viventi da un posto all'altro, fatto che fa nascere sempre nuove situazioni. Forse è questo il "fenomeno" della vita…

Ilaria Capua nel suo ultimo libro "***La salute circolare***" (ed. EGEA, Milano, 2019) dice che "*bisogna vedere la salute come un bene che scorre, come una linfa vitale che connette fra loro gli uomini, gli animali, le piante e l'ambiente. Di fatto, uomini, animali e piante altro non sono che vasi comunicanti. Per capirlo fino in fondo dobbiamo espandere le nostre conoscenze trasversali e affrontare i problemi nella loro complessità, non possiamo limitarci a un approccio verticale*".

Capitolo 1

GENERALITÀ

BATTERI

Sono microrganismi con un'organizzazione cellulare relativamente semplice e primitiva. Hanno dimensioni tra 0,4 e 1,5 micrometri (= millesimi di millimetro, μm) e forma sferica (cocchi), bastoncellare (bacilli), a virgola (vibrioni), a spirale (spirilli, treponemi), filamentosa. Si esaminano al microscopio con obiettivo ad immersione (500 ÷ 1000 ingrandimenti) dopo colorazioni semplici o complesse. In questo modo non mostrano particolari strutture interne, se non le spore. La forma e la dimensione dei batteri possono variare, per esempio da bastoncini corti diventare filamenti lunghi. Questo fenomeno, detto **pleomorfismo**, avviene soprattutto in laboratorio su colture vecchie o in presenza di sostanze antagoniste (penicillina, glicina, litio cloruro, sodio cloruro, acidi organici, *p*H acido).

I batteri possono essere parassiti oppure saprofiti. Sono ***parassiti*** quando albergano sopra o dentro un animale o una pianta, traendone nutrimento. Sono ***saprofiti*** quando non hanno necessariamente bisogno di un ospite vivente, potendo assorbire le sostanze nutritive anche da cellule morte di piante o da escreti di animali.

Parassiti e saprofiti si dicono ***eterotrofi***, in quanto, per ottenere carbonio ed energia, abbisognano di sostanze organiche.

Altri batteri, chiamati ***autotrofi*****,** ricavano il nutrimento da prodotti inorganici, carbonio, CO_2 dell'aria e l'energia mediante ossidazione di composti contenenti azoto, zolfo, ferro. Un'ultima categoria di batteri, detti ***fotosintetici***, ottiene il carbonio dalla CO_2 dell'aria e l'energia dalla luce solare.

Classificazione	Denominazione	Fonti nutritive ed energetiche
ETEROTROFI (nutrimento da sostanze organiche)	Parassiti Saprofiti	Animali o piante Corpi morti o escreti
AUTOTROFI (nutrimento anche da inorganici)	Autotrofi Fotosintetici	CO_2 e composti contenenti N, S, Fe CO_2 e sole

Avendo un'organizzazione molto semplice, i batteri sono chiamati organismi ***procarioti***, mentre le cellule degli organismi più complessi sono chiamate ***eucarioti***.

Principalmente i batteri non hanno nucleo, nucleolo, cromosomi ben distinti dal citoplasma, mitocondri o cloroplasti interni. Pertanto, gli enzimi respiratori si trovano a ridosso della membrana cellulare, che è rigida e formata essenzialmente da mucopeptidi (sono il bersaglio delle sostanze antibatteriche penicillina e lisozima).

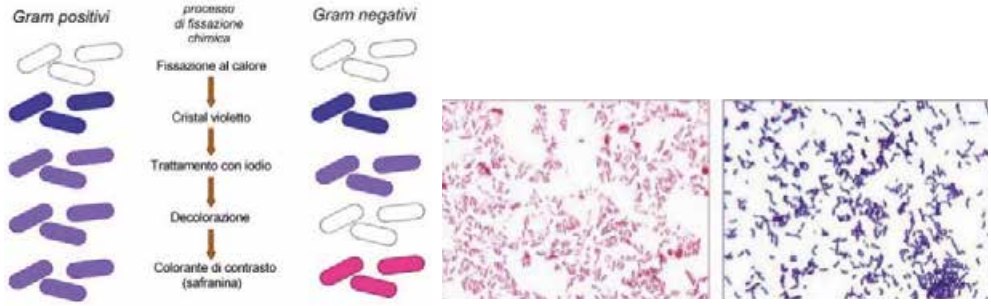
I batteri possono contenere parassiti detti ***batteriofagi*** **o** ***fagi***, che sono particolari tipi di *virus*. Un batterio che porta in sé un *fago* latente si dice ***lisogenico***.

Morfologia batterica

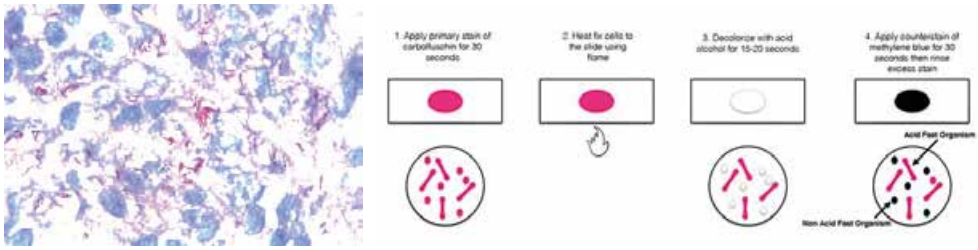
Si osservano i batteri al microscopio per rilevarne forma, dimensione, raggruppamento, presenza di spore, capsule o granuli intracellulari. Osservazioni microscopiche senza colorazione vengono talvolta allestite per verificare la mobilità (esame a fresco in goccia pendente) o il contorno (esame in campo oscuro o a contrasto di fase). Più frequentemente, si usa, dopo

fissaggio alla fiamma, effettuare le colorazioni su vetrino, che possono essere semplici (ad esempio, con blu di metilene) o complesse (ad esempio, Gram o Ziehl-Neelsen).

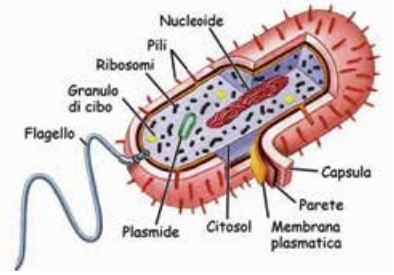
Mediante **colorazione di Gram** si distinguono batteri che si colorano in violetto (**Gram-positivi**) e altri che si decolorano con trattamento mediante acetone e alcool, preceduto dallo iodio, e che si colorano in rosa (**Gram-negativi**) dopo applicazione di un secondo colorante (fucsina o safranina). La proprietà dei Gram-positivi di trattenere il violetto sembra legata alla diversa permeabilità della membrana cellulare. Alcuni Gram-positivi possono perdere la capacità di trattenere il colorante viola e appaiono, di conseguenza, colorati in rosa.



Nella **colorazione di Ziehl-Neelsen**, certi batteri (detti alcool-acido resistenti) si colorano con fucsina basica a caldo e resistono alla decolorazione con acido solforico e alcool. Comprendono i micobatteri tubercolari. La capacità di colorarsi è legata al contenuto lipidico della membrana.



Costituzione della cellula batterica

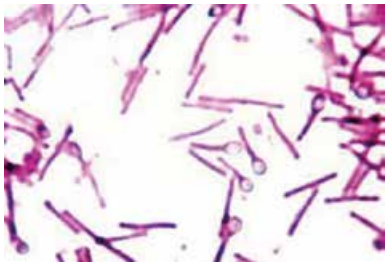


Con particolari colorazioni si può dimostrare che i batteri hanno un nucleo centrale contenente DNA e che si dividono per fissione trasversale semplice, senza evidenza di mitosi o di cromosomi. In realtà essi hanno dei geni su un filamento lineare o circolare che equivale ad un singolo cromosoma. Nel citoplasma dei batteri non c'è un reticolo endoplasmatico, ma solo numerosi granuli, detti ***ribosomi***. Si possono trovare, inoltre, granuli di volutina (come nei difterici) che si colorano in rosso con blu di metilene (colorazione metacromatica) oppure granuli lipidici (come nel *Bacillus cereus*) che si colorano con Sudan nero, o, ancora, granuli di amido o di glicogeno (colorabile con lo iodio).

Certi batteri, oltre alla membrana cellulare, hanno una **capsula** colorabile con il Gram o con inchiostro di china; si tratta di un fattore di virulenza. È presente in pneumococchi, streptococchi piogeni, *Bacillus anthracis*.

I batteri che si muovono attivamente (mobili) hanno una o più **ciglia** (o **flagelli**) che escono dalla cellula e che si vedono al microscopio elettronico. La mobilità attiva va distinta da quella passiva (movimenti *browniani*). Col movimento i germi migrano verso un ambiente più ricco di sostanze nutritive o di ossigeno. Le ciglia o flagelli sono formati da sostanze antigeniche che hanno importanza diagnostica. Certi batteri (in particolare gli enterobatteri) hanno dei filamenti corti detti ***fimbrie***, che si vedono solo al microscopio elettronico. Danno al germe la capacità di aderire alle cellule della mucosa intestinale dell'ospite (proprietà detta **adesività**), come nel caso di *Escherichia coli*, salmonelle, shigelle, *Vibrio cholerae*. Si possono rivelare con il *test* di emo-agglutinazione su globuli rossi di cavia o umani, con o senza aggiunta di mannosio.

Moltiplicazione



Di norma la cellula batterica si allunga e si divide in due metà pressoché uguali. Il tempo di riproduzione è brevissimo (20 minuti) e una cellula può formare un miliardo di cellule in dieci ore. Bacilli e clostridi sviluppano all'interno della cellula vegetativa una spora che successivamente germina, dando origine a una nuova cellula vegetativa. **La formazione di spore** (sporulazione) avviene in condizioni sfavorevoli di sopravvivenza dei batteri.

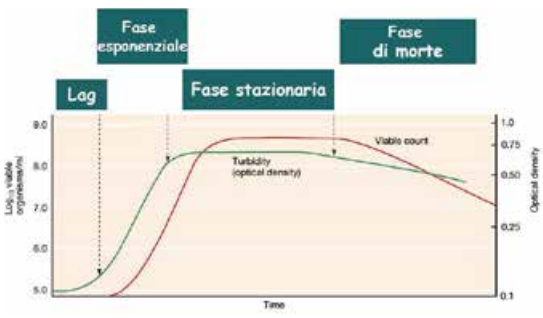
La germinazione avviene quando le condizioni ambientali (umidità e nutrimento) ritornano favorevoli. Nel momento della germinazione si ha formazione di tossine, come nel caso del *Clostridium perfringens*. I germi che formano un micelio sviluppano spore all'esterno della cellula.

Sviluppo dei batteri

La moltiplicazione dei germi viene studiata in laboratorio mediante il conteggio delle unità formanti colonia (U.F.C.) su appositi terreni. Nella moltiplicazione si distinguono quattro fasi: *lag* (non c'è apprezzabile moltiplicazione); *log* (crescita esponenziale velocissima); *stazionaria* (cessa la crescita per accumulo di sostanze tossiche e diminuzione del nutrimento); di *declino* (morte delle cellule per autolisi o cambiamenti profondi di struttura).

Nutrimento dei batteri

La composizione chimica dei batteri è simile: 80% del peso secco è dato da composti ad alto peso molecolare (proteine, acidi nucleici, polisaccaridi, lipidi); 10% da composti a basso peso molecolare (enzimi, ecc); 10% da acqua e sali minerali. I batteri assumono il nutrimento attraverso la membrana cellulare e necessitano di carbonio (proveniente da carboidrati, aminoacidi, lipidi), azoto (proveniente da aminoacidi), idrogeno, vitamine e sali inorganici. Sono capaci



di produrre sostanze tossiche (o tossine) che per lo più vengono liberate all'esterno (esotossine). Alcuni germi formano tossine termolabili (salmonelle, vibrioni ecc.), altri termostabili (stafilococchi), altri ancora di entrambi i tipi (coli).

Coltivazione dei batteri

Possono essere coltivati in laboratorio su substrati artificiali. È quasi scomparso l'uso di altri substrati (ad esempio, uova embrionate). Attualmente, si usano terreni semi-sintetici e sintetici solidi (contenuti in provette o in piastre di Petri) e liquidi (detti brodi). Sui terreni solidi è possibile apprezzare la crescita dei microrganismi sotto forma di patina colturale o di colonie staccate. Questa possibilità è utilizzata a scopo diagnostico, essendo apprezzabili sulle colonie i caratteri di forma, colore, consistenza. Nei terreni liquidi, si può osservare il tipo di intorbidamento del brodo (superficiale, diffuso, profondo), ma non l'aspetto delle colonie. A partire dalle colonie in terreno solido, è possibile isolare una popolazione omogenea (coltura pura) di batteri e procedere all'identificazione di genere e di specie con opportune prove biochimiche e sierologiche.

Colture batteriche in terreno liquido e su terreni solidi

Fattori fisici che condizionano la crescita batterica

1. Temperatura - Nella tabella è riportata la suddivisione dei germi in base alle esigenze di temperatura.

	Optimum di crescita	Intervallo di crescita	Esempi
PSICROFILI	20-25 °C	0-25 °C	*Pseudomonas, Aeromonas*
MESOFILI	30-37 °C	20-45 °C	Enterobatteri, pasteurelle, stafilococchi
TERMOFILI	50-55 °C	45-70 °C	Lattobacilli, streptococchi, clostridi

***2.* pH** La maggior parte dei germi richiede un *p*H compreso tra 5,6 e 7,5. Pochi microrganismi (muffe e lieviti) possono sopravvivere sotto *p*H 4 e sopra 9.

3. Contenuto di umidità - In gran parte i germi richiedono un'umidità relativa superiore al 91%. Il reciproco (diviso per 100) dell'umidità relativa è chiamato A_W (attività dell'acqua, *water activity*) ed esprime il contenuto di acqua libera disponibile per la sopravvivenza dei

microrganismi. Per ridurre l'acqua libera si ricorre all'aggiunta di sale o di zucchero. I germi che si sviluppano in presenza di concentrazioni elevate di sale sono detti ***alofili***.

4. Potenziale di ossido-riduzione - Si chiama *eH* e si misura in *millivolt* (mV). Al disotto di 250 mV sviluppano solo gli anaerobi. Tra 250 e 200 mV sviluppano i microaerofili e sopra i 200 i germi aerobi.

5. Presenza di gas - Sostituendo l'atmosfera normale con miscele di aria e anidride carbonica al 5÷10% si favorisce la crescita di certi germi detti ***microaerofili***. Tra questi, i lattobacilli, le brucelle, i *Campylobacter*, gli emofili.

Da sinistra: pHmetro e misuratore di A_w (HANNA Instruments), misuratore di potenziale Redox (Rotronic AG)

NOTA TECNICA – COME SI PREPARANO I TERRENI BATTERIOLOGICI

Scioglimento e sterilizzazione

È preferibile preparare partite piccole, per esempio da 300-500 ml. Occorre un recipiente di volume almeno doppio della quantità da preparare, nel quale versare la pesata di terreno disidratato. Dopo aggiunta di acqua demineralizzata si fa sciogliere la polvere, agitando il recipiente per alcuni minuti entro un bagnomaria bollente.
La scomparsa dei granuli di polvere, che inizialmente aderiscono alla parete del recipiente, indica che si può passare alla sterilizzazione. Quasi tutti i terreni vanno autoclavati, solitamente a +121 °C per 15 minuti se di volume inferiore a un litro. Per ogni litro aggiunto occorrono circa 5 minuti in più. Un rapido raffreddamento a circa +50 °C consente, poi, di aggiungere sterilmente i supplementi termolabili (sangue, siero, antibiotici) sterilizzati a parte mediante filtrazione (escluso il sangue).

KLIGLER IRON AGAR

Estratto di carne 3 g, estratto di lievito 3 g, peptone 15 g, peptone proteose 5 g, lattosio 10 g, glucosio 1 g, sodio cloruro 5 g, solfato ferroso 0,2 g, sodio tiosolfato 0,3 g, rosso fenolo 0,024 g, agar-agar 12 g, acqua distillata 1000 ml, pH finale = 7,4 ± 0,2.

Distribuzione finale in contenitori

I brodi vanno distribuiti a 10 ml in provette 16 mm x 160 mm, a 25 ml in provettoni 20 mm x 200 mm. I terreni solidi a becco di clarino si distribuiscono a 6 ml in provette 16 mm x 160 mm (7 ml per Kligler Iron Agar), a 15 ml in provettoni 20 mm x 200 mm. Nelle piastre Petri da 90 mm di diametro i terreni solidi si distribuiscono in volumi di 15 ml. Una volta distribuiti in provetta o in piastra, i terreni solidi vanno fatti asciugare a temperatura ambiente per 24-48 ore, fino a scomparsa della condensa.

Conservabilità

Il periodo di validità in frigorifero a +4 °C ± 0.2 è il seguente:
– terreni liquidi in provetta: 1 mese
– terreni liquidi in bottiglia chiusa ermeticamente: 3 mesi
– terreni solidi in provetta o in piastra (chiusi in sacchetto di politene): 3 settimane (con alcune rare eccezioni, riguardanti terreni da non autoclavare, che vanno utilizzati in giornata)
– terreni solidi in bottiglia (terreni da far sciogliere in bagnomaria e da distribuire): 90 giorni

Controlli di qualità

L'uso ormai molto diffuso di terreni disidratati (o pronti in piastre e provette) non esclude alcune verifiche presso il laboratorio che li adopera per accertare la qualità al momento dell'arrivo o in prossimità della scadenza.
Le ditte produttrici consigliano di eseguire i seguenti controlli su ciascun lotto di terreno acquistato:
a) Controlli fisici: trasparenza (ove prevista), consistenza (per i terreni agarizzati), colore, *p*H, sterilità.
b) Controlli qualitativi di fertilità e di corretto funzionamento biochimico del terreno.
c) Controlli quantitativi di recupero dei germi seminati, da eseguire in parallelo sul terreno in esame e su un terreno di riferimento.

Difetti di preparazione

Se il terreno preparato manifesta qualche anomalia, riconoscibile il più delle volte dall'aspetto, non va utilizzato. Prima di preparare un altro lotto è opportuno scoprire le cause dell'inconveniente, che possono trovarsi fra queste:

DIFETTO	1	2	3	4	5	6	7	8	CAUSA PIÙ PROBABILE
Colore diverso dal solito	☹	☹	☹						1 = polvere deteriorata
Colore bruno (= zuccheri caramellizzati)	☹			☹	☹	☹			2 = recipiente mal lavato
Si è formato un precipitato	☹	☹	☹	☹	☹	☹			3 = acqua non depurata
Polvere non sciolta completamente					☹				4 = pesata polvere errata
Non si solidifica l'agar (nei terreni solidi)				☹	☹	☹		☹	5 = scarsa miscelazione
Le colonie crescono stentatamente	☹		☹	☹	☹	☹	☹	☹	6 = troppo riscaldamento
Non cresce nulla		☹	☹						7 = scioglimento ripetuto
Perdita di reazioni biochimiche		☹							8 = pesata troppo diluita

Due fasi della preparazione di un terreno colturale: scioglimento degli ingredienti in polvere e distribuzione finale in piastre di Petri.

Cosa contiene un terreno per batterilogia?

1) *SOSTANZE NUTRIENTI* La carne bovina bollita, usata per produrre terreni liquidi o brodi, è stata sostituita da idrolisati, estratti di carne o di lievito (a 10-20 grammi/litro).
2) *SOSTANZE ENERGETICHE* Principalmente il glucosio (1-5 grammi/litro).
3) *IONI ESSENZIALI* Alcuni ioni macro-componenti (Na, Ca, Mg, Fe) in quantità di pochi grammi/litro, altri detti micro-componenti (Zn, Mn, Cu) in quantità di alcuni mg/litro.
4) *SOSTANZE TAMPONANTI* Sono soprattutto i fosfati a mantenere il *p*H a valori compatibili con la crescita.
5) *SOSTANZE SELETTIVE* Si trasformano in selettivi i terreni che non lo sono cambiando il *p*H, la concentrazione di sale o aggiungendo sostanze tossiche per le specie indesiderate, come gli antibiotici.
6) *SOSTANZE METABOLIZZABILI* Sono carboidrati o aminoacidi.
7) *SOSTANZA GELIFICANTE* Oggi è rappresentata dall'agar-agar di tipo batteriologico, che fonde a circa +80 °C e solidifica a circa +38 °C. Aggiunto a un brodo al 15 per mille, lo trasforma in terreno solido e, al 3 per mille, in semi-solido.
8) *ALTRE SOSTANZE* Principalmente si tratta di sangue defibrinato di montone o siero equino al 5%. Alcuni germi esigenti (emofili, actinobacilli, ecc) richiedono la presenza dei fattori X e V. Il fattore X è assimilabile all'emina del sangue, il fattore V può essere fornito, *in vitro,* sotto forma di NAD (nicotinamide-adenina-dinucleotide) o coltivando in presenza di *S. aureus*.
9) *ACQUA* Viene raccomandata l'acqua distillata, ma è sufficiente acqua demineralizzata.

Il suo nome è *Gracilaria*. Si tratta di un'alga rossa (*Rhodophyta*) che cresce nei mari temperati di tutto il mondo e che, essiccata e ridotta in polvere, viene trasformata in ***agar-agar*** (una parola malese). Si tratta di un polisaccaride con elevate proprietà gelificanti, adoperato nella cucina indonesiana. Fu convertito all'uso in microbiologia da **Angelina Fanny Hesse** (1850-1934), biologa del New Jersey che ne aveva apprese le qualità dalle amiche. Walther Hesse, un biologo tedesco assistente all'Università di Dresda, spiegò al suo professore, Robert Koch, quanto aveva visto fare dalla moglie Fanny mentre preparava con l'*agar-agar* delle torte alla frutta. Da lì nacque nel 1881 l'idea di sostituire la gelatina dei terreni in provetta destinati alle ricerche sulla tubercolosi. Fu una trovata geniale, in quanto l'*agar-agar* solidifica raffreddandosi ad una temperatura ideale per incubare i terreni in termostato a +37°C (non consentita invece dalla gelatina, che fondeva).

Coltivare i batteri in laboratorio

Gran parte della microbiologia tradizionale si basa sulla coltivazione e sull'identificazione dei germi. Tutto questo ha permesso di costruire il patrimonio storico di conoscenze in batteriologia. E continua ad essere praticato per i vantaggi che offre (non da ultimo la possibilità di **effettuare l'antibiogramma** nel caso di diagnosi cliniche.

Fondamentale è la disponibilità di terreni colturali:

I terreni ***semplici*** permettono lo sviluppo di un largo numero di specie, affini per esigenze colturali, e servono per far crescere indistintamente i microrganismi presenti nel campione.

Gli ***arricchimenti*** sono terreni liquidi che, sopprimendo la flora competitiva, esaltano la crescita della specie desiderata. Il loro uso può essere preceduto da altri terreni liquidi, solo con funzioni rivitalizzanti, detti *pre-arricchimenti*.

I terreni ***selettivi***, contenendo certe sostanze, consentono la crescita solamente alle specie che le tollerano e inibiscono le altre specie.

Sono ***differenziali*** i terreni che consentono di distinguere le specie attraverso variazioni di colore delle colonie ottenute da reazioni biochimiche.

Alcuni terreni, chiamati ***selettivi e differenziali***, lasciano crescere solo poche specie e queste, in seguito a reazioni biochimiche, presentano colonie con caratteristiche diverse.

Esistono anche terreni ***di trasporto***, semisolidi, privi di sostanze nutritive, destinati a far sopravvivere i microrganismi nei campioni durante il trasporto.

Pochi strumenti necessari per realizzare una coltura

L'**ansa** (in plastica monouso o in nichel-cromo, diametro preferibile di 3 mm)

Le **pipette graduate** sterili (da 1,2, 5, 10 e 25 ml) in plastica monouso servono per seminare quantità ridotte (ad esempio, 0,1-0,2 e più ml) di un campione liquido o sospeso in diluente fisiologico con opportuna omogeneizzazione. Dotate di tappo di cotone, si usano abbinate ad una propipetta (per evitare, per motivi di sicurezza, di pipettare a bocca).

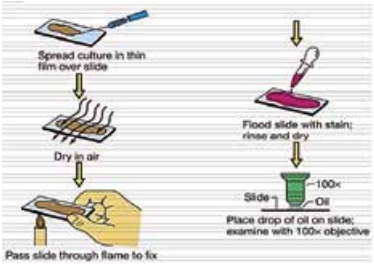
Le **micropipette** a volume fisso o variabile, con puntale sterile di plastica, sono molto utili se adoperate con cautela per evitare contaminazioni crociate fra i campioni.

Le **spatole a L sterili per batteriologia** servono per distribuire il materiale sull'intera superficie di un terreno in piastra, specialmente quando il campione (liquido) viene deposto con una pipetta al centro.

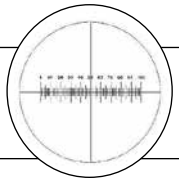
I **tamponi** di prelievo (con o senza terreno di trasporto) vengono seminati su terreno solido in piastra, con modalità simili all'ansa. Se si presentano disidratati, è opportuno bagnarli in una minima quantità di soluzione fisiologica sterile entro una provetta.

Vetrini porta-oggetti e microscopio per vedere i batteri

Gli esami microscopici *diretti* sono quelli allestiti da organi, sangue, urine, latte, essudati, biopsie e tamponi mediante striscio su vetrini portaoggetti, fissati alla fiamma (oppure con acetone a freddo per 15 minuti) e colorati con vari metodi. Negli **esami da colture**, causa le dimensioni ridotte e l'indice di rifrazione vicino a quello dell'acqua, i batteri non sono ben visibili, per cui è preferibile colorarli. Si usano, di preferenza, coloranti basici, che si legano alla cromatina del nucleo (cristal-violetto, fucsina basica, blu di metilene). Oltre alle tecniche di colorazione già ricordate, è molto diffusa la colorazione **lattofenolo-blu cotone** per i funghi e i lieviti.



Nell'immagine: una colorazione semplice, con l'applicazione di un solo colorante.



SI POSSONO MISURARE I BATTERI?

Sì, disponendo di un micrometro oculare per il microscopio, in cui una divisione corrisponde a 0,1 mm

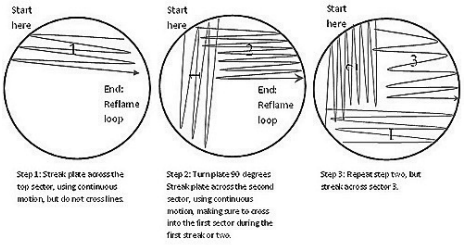
NOTA TECNICA – COME SI OTTENGONO LE COLTURE BATTERICHE

Realizzazione di una coltura "pura"

Ottenere colture pure di microrganismi usando terreni liquidi è molto difficile, se non impossibile. L'avvento dei terreni solidi, soprattutto dopo l'introduzione dell'**agar-agar** in batteriologia, ha determinato una svolta nella microbiologia.

Oggi è impensabile fare ricerca su colture miste, formate cioè da più specie.

Pertanto, uno degli obiettivi primari del batteriologo è quello di selezionare una popolazione omogenea originata da una singola colonia. In pratica, si tratta di seminare in serie alcune piastre con una sospensione contenente i germi da ricercare, mirando a far nascere delle colonie distanziate fra loro. Sarà così possibile, in un secondo momento, toccare con l'ansa o con l'ago una sola colonia avente le caratteristiche desiderate (si dice colonia "sospetta") e trapiantarla in un altro terreno, creando così una discendenza "pura".



Esistono due tecniche di semina delle piastre di terreno:

- *a) per successione di piastre*. Si preleva con l'ansa una piccole quantità di materiale in esame o di patina batterica e si strisciano in successione tre piastre, procedendo a *zig-zag*, in modo da far compiere all'ansa il percorso più lungo possibile sulla superficie del terreno.
- *b) per flambatura*. L'inoculo viene strisciato con movimento a *zig-zag* sul quadrante di una sola piastra e steso per seminare gli altri due quadranti come in figura, raffreddando l'ansa all'inizio di ogni passaggio.

Incubazione

La maggior parte dei germi patogeni per l'uomo e per gli animali è formata da microrganismi mesofili che crescono in **termostato** a +37 °C, con alcune "eccezioni":

– le Listerie, ad esempio, sviluppano meglio a +30 °C
– le specie psicrofile esigono +20°C in frigo-termostato
– i batteri termofili richiedono +50°C

L'atmosfera normale non basta in due casi:

1. ***Colture in micro-aerofilia.*** Un certo numero di specie (tra cui *Brucella* e *Campylobacter*) cresce meglio in presenza di anidride carbonica al 5-10% in appositi contenitori.
2. ***Colture in anaerobiosi.*** I germi che esigono un'atmosfera priva di ossigeno (formata da azoto, idrogeno, anidride carbonica) crescono in recipienti nei quali si crea l'anaerobiosi per via chimica.

Per proteggere il campione dall'ossigeno esistono sistemi di trasporto specifici e terreni che contengono sostanze riducenti. Quando l'isolamento risulta difficile a causa di inquinanti Gram-positivi presenti in numero elevato, si rende necessaria la pasteurizzazione del campione (+80 o +85 °C per 10-15 minuti) prima della semina.

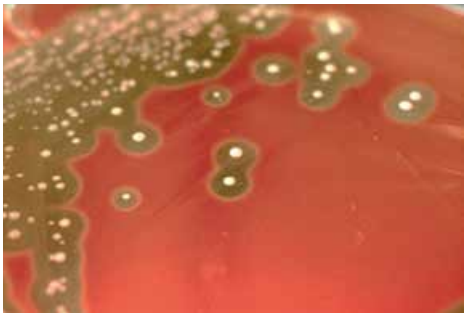
Lettura

Le colonie isolate su piastra vanno esaminate (in controluce e luce incidente) per:
dimensione (diametro in millimetri) – forma (puntiforme, circolare, irregolare) – rilievo (piatta, convessa) – margine (netto, frastagliato) – colore (incolore o dello stesso colore del terreno, bianco, giallo, produzione di pigmenti) – trasparenza (traslucida, opaca) – consistenza (cremosa, mucosa, filante, secca) – odore – emolisi (su terreni al sangue: *alfa* = incompleta con parziale trasparenza o riflessi verdi, *beta* = completa, *alfa-beta* = con doppio alone).

Nelle brodocolture si può rilevare la tendenza a sviluppare in superficie (germi aerobi), o in profondità (facoltativamente anaerobi).

NOTA - Non si seminano i campioni su terreni solidi, ma in un brodo, quando:

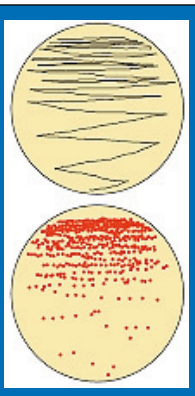
- il terreno liquido offre prestazioni superiori (ad esempio, nelle emocolture), sia per maggior quantità di materiale esaminabile che per migliore capacità di recupero del mezzo liquido rispetto al solido;
- si tratta di selezionare un patogeno in mezzo alla flora concorrenziale predominante (ad esempio, isolamento delle salmonelle o delle listerie). Questo avviene con i cosiddetti "*arricchimenti*".



Trapianti

Significa trasferire asetticamente un microrganismo da un terreno colturale, sul quale si è già sviluppato, in un nuovo terreno. Si opera per striscio, mediante l'ansa.

Da osservare: nella piastra è cerchiata in rosso una colonia staccata dalle altre. Va scelta per effettuare il trapianto che darà luogo ad una "coltura pura", cioè SICURAMENTE della stessa specie.



La semina di un campione può iniziare con la deposizione di una piccola quantità del medesimo (ad esempio, 10-20 mcl) con una micropipetta. Segue la distribuzione del liquido con l'ansa sterile da batteriologia, seguendo un percorso a *zig-zag* molto stretto, in modo da ottenere la distribuzione del materiale come illustrato nella terza immagine in alto.
Dopo incubazione delle piastre in termostato, si procede alla lettura, esaminando le colonie sviluppate per dimensione, forma, colore, consistenza.
Da una singola colonia si possono quindi fare dei trapianti con l'ansa su altre piastre per ottenere una coltura pura del germe.

Identificazione biochimica "storica" - Nel 1972 **King-Weaver** hanno proposto un metodo di identificazione per riconoscere generi e specie che ha avuto larga diffusione.

La chiave d' inizio è la colorazione di Gram, dopo di che per i germi Gram-positivi necessitano le seguenti prove: fermentazione del glucosio, catalasi, ossidasi, formazione di spore, mobilità. Per i Gram-negativi, invece, occorrono: utilizzazione del glucosio, catalasi, ossidasi, mobilità, crescita su Mac Conkey Agar.

1) La **fermentazione del glucosio** viene saggiata abitualmente in terreno liquido per carboidrati.

2) Il *test* della **catalasi** (enzima che favorisce la scissione del perossido d'idrogeno in ossigeno e acqua) può essere fatto su vetrino (stemperando in una goccia di acqua ossigenata al 3% una piccola quantità di patina colturale e osservando la formazione di bolle di ossigeno) oppure in provetta (aggiungendo alcune gocce della soluzione di acqua ossigenata). Questa seconda possibilità evita la formazione di *aerosol* pericolosi con germi patogeni. L'aggiunta del reattivo impedisce comunque ulteriori trapianti.

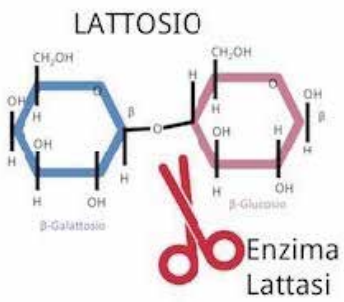
3) Il *test* dell'**ossidasi** (enzima che favorisce la riduzione dell'ossigeno ad acqua e perossido d'idrogeno) può essere fatto su carta assorbente, stemperando in una goccia di tetrametil-para-fenilendiamina in soluzione acquosa all'1% una piccola quantità di patina colturale e osservando il viraggio al violetto entro un minuto oppure su coltura a becco di clarino (*slant)* aggiungendo alcune gocce della medesima soluzione.

4) La verifica della **formazione di spore** si pratica al momento dell'esame microscopico della coltura, attraverso uno striscio colorato con Gram.

5) La prova della **mobilità** può essere effettuata con un esame microscopico a fresco, in goccia pendente su apposito vetrino, oppure con una semina in BHI Agar al 3 per mille (in provetta con tubo di Craigie) e lettura dopo incubazione a +37 °C per 48-72 ore.

6) L'**utilizzazione del glucosio**, per distinguere se avviene per fermentazione o per ossidazione esige una metodica particolare. Il terreno è un agar semisolido in alto strato di colore verde (Hugh-Leifson). Si semina la patina colturale con l'ago, per infissione, in due provette. A una provetta si aggiungono 2 ml di olio di vaselina sterile, per creare l'anaerobiosi. Dopo incubazione a +37 °C per 24 ore, un viraggio al giallo in entrambe le provette indica "fermentazione" (F), un viraggio nella sola provetta senza olio indica "ossidazione" (O), una crescita microbica senza viraggi indica negatività alla saccarolisi (-).

DALLA NATURA AL LABORATORIO: poche le differenze

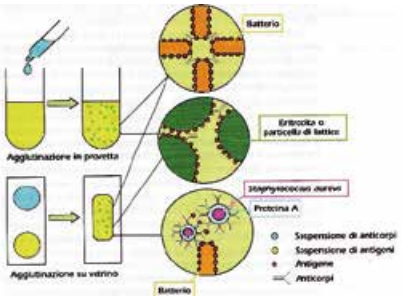


Anche gli organismi più piccoli cercano le condizioni migliori di vita. Lo fanno attraverso reazioni chimiche che avvengono grazie a dei mediatori, gli ENZIMI. Tra questi ci sono la CATALASI, che permette di scindere il perossido d'idrogeno (H_2O_2) in ossigeno ed acqua; la COAGULASI, che aiuta certi batteri a non essere fagocitati dalle cellule del sangue. E ancora, la NITRATO-REDUTTASI, che serve a catturare azoto (cioè materia prima per crescere) dall'ammoniaca. Altri enzimi consentono di rompere molecole complesse di carboidrati (lattasi, ecc) per renderli digeribili. La lista degli enzimi è molto lunga. Eppure organismi minuscoli possono contenere anche JALURONIDASI, OSSIDASI, UREASI, LIPASI, DECARBOSSILASI ed altro. Quanto avviene in natura è riproducibile in laboratorio, dove le reazioni biochimiche catalizzate dagli enzimi batterici sono utilizzate come *test* per fini diagnostici.

Quando la sierologia viene in aiuto nell'identificazione dei batteri

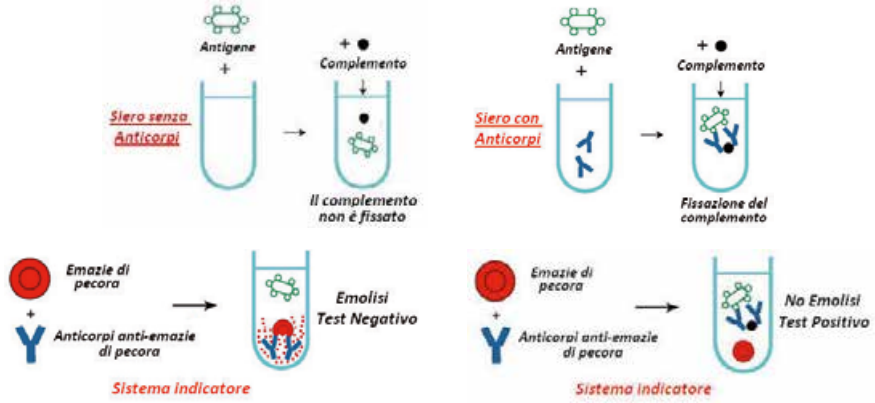
Agglutinazione – Anticorpi specifici fanno unire le cellule per i poli, formando aggregati visibili ad occhio nudo. La reazione può essere amplificata in presenza di particelle di lattice che si legano al complesso antigene-anticorpo con l'interposizione della proteina A dello stafilococco (*Latex Agglutination Test*), come avviene in molti *kit* commerciali da eseguire su vetrino oggi disponibili, anche nella variante della *Reverse Passive Latex Agglutination* (RPLA).

Nello schema a destra: reazione di agglutinazione in varie versioni. Sotto: *test* rapido su vetrino.

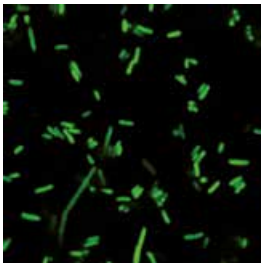


Precipitazione in agar-*gel* (AGID) - Nel *test* di **doppia diffusione di Outcherlony** (un batteriologo svedese che mise a punto il metodo nel 1940), se esiste corrispondenza antigene-anticorpo si formano, dopo migrazione in piastra, linee di precipitazione al punto d'incontro tra i reagenti posti in pozzetti scavati nell'agar. Si può accertare anche se due antigeni sono uguali, ponendoli a triangolo verso un siero diagnostico. In caso positivo, le bande di precipitazione si dispongono a V, fondendosi, mentre, in caso negativo, si incrociano.

Fissazione del complemento (FDC) - Questa reazione è basata sul principio che il complemento, presente nel sangue, viene "fissato" se si mette a contatto un antigene con il suo anticorpo omologo. Se a questo complesso si aggiunge un sistema rivelatore, formato da globuli rossi ed emolisina anti-globuli rossi, non si avrà lisi, in quanto il complemento non è più disponibile. La prova può essere impiegata in due sensi, per ricercare anticorpi nel sangue oppure per riconoscere un germe (ad esempio, il vibrione del colera usando un siero anti-colera) (vedi APPENDICE).



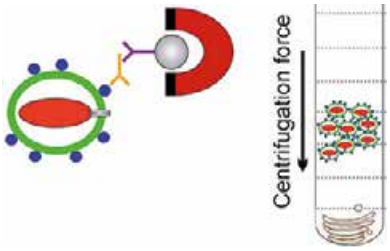
Immunofluorescenza (*Fluorescent Antibody*, FA) - Si avvale di globuline immuni combinate con un colorante fluorescente. L'anticorpo "coniugato" si fissa sull'antigene corrispondente (batterico o virale), dando origine a un complesso fluorescente visibile al microscopio a luce ultravioletta. Il fenomeno dipende dalla natura del colorante (isotiocianato di fluoresceina) che assorbe la luce a bassa lunghezza d'onda e la emette ad una lunghezza superiore nel campo del visibile. **La tecnica prevalente è indiretta**, dove un anticorpo + antigene + secondo anticorpo coniugato anti-specie dà, in caso positivo, fluorescenza.



ELISA - Nel metodo "**non competitivo**" la reazione avviene direttamente fra l'antigene da diagnosticare, eventualmente contenuto nel campione, e un anticorpo specifico per quel germe, adeso ai pozzetti di una piastra *microtiter*. Interviene, dopo incubazione e lavaggio, un secondo anticorpo (contro quello primario) coniugato con un enzima (una fosfatasi alcalina o una perossidasi) che scinde un substrato cromogeno successivamente addizionato. La sostanza colorata liberata si legge a vista o si misura con uno spettrofotometro (da www.old.iss.it).

Nel metodo "**competitivo**" nei pozzetti della piastra si trovano adesi un antigene noto + un anticorpo primario contro quell'antigene. Si introduce il campione, il cui antigene (da diagnosticare) compete con l'antigene immobilizzato per legarsi all'anticorpo. Dopo incubazione e lavaggio, si aggiunge un secondo anticorpo (marcato con un enzima) che va a legarsi all'anticorpo primario. Dopo un altro lavaggio si si aggiunge un reagente che, dopo incubazione, si colora dove esiste l'unione enzima + complesso antigene-anticorpo immobilizzato sulla piastra.

L'**immuno-separazione magnetica** è basata su un fenomeno di adesione dei batteri – in quanto antigeni – sopra particelle magnetiche, sulla cui superficie si trovano attaccati degli anticorpi monoclonali (colorate in blu) specifici per quel genere di batteri. Per fare un esempio pratico di reazione, un campione posto ad incubare entro un terreno liquido libera le cellule batteriche in esso contenute, che cominciano a moltiplicarsi. Le microsfere magnetiche, introdotte nel brodo, catturano i batteri per effetto di legami antigene-anticorpo.



Successivamente si applica un campo magnetico per attirare e raccogliere le microsfere in uno spazio ristretto. Mediante centrifugazione si raccoglie poi l'antigene.

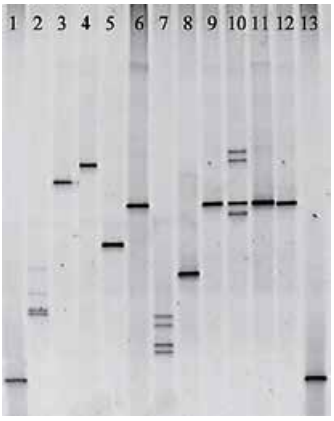
La conferma della natura dei batteri catturati può essere fatta seminando le microsfere così concentrate su un terreno (per esempio, su piastre selettive) oppure usando altri mezzi (osservazione microscopica, misurazione dell'ATP, ecc).

Per analizzare materiale pesantemente contaminato da saprofiti, viene consigliato, invece, di seminare le sferette in un brodo d'arricchimento che, dopo incubazione, va piastrato su un terreno selettivo e/o differenziale.

Questo metodo – che può essere applicato alla ricerca di numerose altre sostanze antigenicamente attive – offre notevoli potenzialità diagnostiche in quanto, almeno per i batteri, consente di isolarli più facilmente, anche se si tratta di poche cellule nel campione. I suoi limiti – evidenti per quanto riguarda la ricerca dei patogeni – stanno nella scarsità di reagenti disponibili commercialmente e nella possibilità di false reazioni positive conseguenti alla presenza di cellule morte nel campione.

Nuovi scenari con l'avvento della biologia molecolare *(vedi anche cap. 3, virologia)*

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) - Corti frammenti di DNA (*probes* o *primers*) vengono ibridati con specifiche sequenze-bersaglio (*template*) sul DNA dei batteri e quindi enzimaticamente amplificati dalla *Taq*-polimerasi, sotto variazioni termiche generate da un apparecchio (*Thermocycler*). I frammenti amplificati vengono sottoposti a elettroforesi su *gel* di agarosio. Le bande ottenute, colorate con bromuro di etidio e visualizzate in luce ultravioletta, vengono fotografate e interpretate per confronto con bande di referenza note.



Esempio di lettura:
Linea 1 e 13 = *Escherichia coli;*
linea 2 = *Mycoplasma agalactiae*;
linea 3 = *Mycoplasma ovipneumoniae*

I reagenti indispensabili nella PCR sono quindi:
- una quantità, anche minima, del segmento di DNA che si desidera riprodurre (*probes*);
- una quantità opportuna di nucleotidi liberi per costruire i nuovi filamenti;
- opportuni "inneschi", detti *primer*, formati da brevi sequenze di DNA (oligonucleotidi)
- una DNA polimerasi termo-resistente (ad esempio, *Taq*-polimerasi);
- un tampone per ottenere un ambiente adatto alla reazione;
- ioni magnesio indispensabili per il corretto funzionamento della DNA polimerasi;
- acqua per portare a volume la soluzione.

Il ciclo di funzionamento della PCR può essere semplificato come segue:
1. La miscela contenente DNA da replicare, desossi-ribo-nucleotidi, ioni magnesio, *primer* e *Taq*-polimerasi viene portata a 95 °C. La doppia elica del DNA si divide ed i due filamenti di cui essa è composta diventano liberi (fase di *denaturazione*).
2. Successivamente la temperatura viene abbassata a 55-60 °C al fine di permettere il legame dei *primer* alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati (fase di *annealing*).
3. Infine la temperatura viene alzata fino a 72 °C per massimizzare l'azione della *Taq*- polimerasi che determina un allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA (fase di *prolungamento*).

Questo procedimento viene ripetuto 25-40 volte.

Riguardo l'isolamento e l'identificazione dei batteri

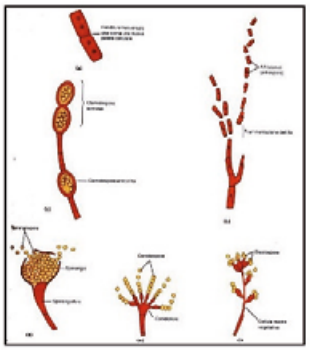
Nei capitoli che seguono si trovano indicati, in corrispondenza dei singoli microrganismi, metodi tradizionali e metodi alternativi di ricerca in laboratorio.
I primi (ai quali è stata data priorità) sono diventati patrimonio storico nell'esperienza dei microbiologi e vengono riportati perché indispensabili per una vera cultura professionale.
Verso la fine del secolo scorso, una grossa serie di innovazioni ha cambiato l'approccio al lavoro di isolamento e di identificazione in batteriologia (e non solo).
Due differenti "filoni tecnologici" hanno in buona misura sostituito lo storico esistente, grazie anche ai progressi raggiunti nell'informatica: si chiamano (con sigle oggi familiari) ELISA e PCR.
Queste procedure sono state accolte come la soluzione di tutte le difficoltà incontrate in passato, da Pasteur in poi. Però, come sempre accade, ogni novità deve essere valutata con attenzione. Vediamo perché.

Le tecniche **ELISA** non competitive sono più sensibili di quelle competitive.
Nei *test* competitivi diretti, la sensibilità dipende dal grado di purezza e dalla stabilità dei reagenti marcati con l'enzima.
Quando si esaminano campioni biologici (siero, urina, feci) possono essere presenti proteine in grado di modificare gli enzimi (proteasi), oppure di inibirne l'attività.
Con la tecnica ***PCR*** *vengono rivelati contemporaneamente microrganismi vivi e morti. Inoltre, a differenza della coltura, non è possibile effettuare l'antibiogramma.*
In ogni caso, il *golden-test*, cioè il metodo di referenza, rimane l'isolamento in coltura (qualitativo oppure quantitativo) del microrganismo da diagnosticare.

MICETI

Funghi, muffe e lieviti. I **funghi** sono organismi chemio-eterotrofi privi di clorofilla e non fotosintetici, quindi non classificabili nel regno piante. I **lieviti** sono unicellulari e **microscopici** a differenza di **muffe e funghi** a cappello che invece sono pluricellulari e macroscopici.

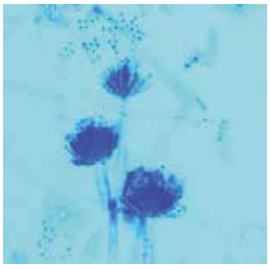
Qui la morfologia è importante ai fini dell'identificazione, soprattutto nella disposizione delle spore e nella riproduzione da esse garantita, per cui è utile disporre di un atlante fotografico**.** Inoltre, la colorazione di base dei preparati microscopici non è il Gram (anche se la maggior parte dei funghi e dei lieviti reagisce positivamente), ma la colorazione **lattofenolo-blu cotone.**



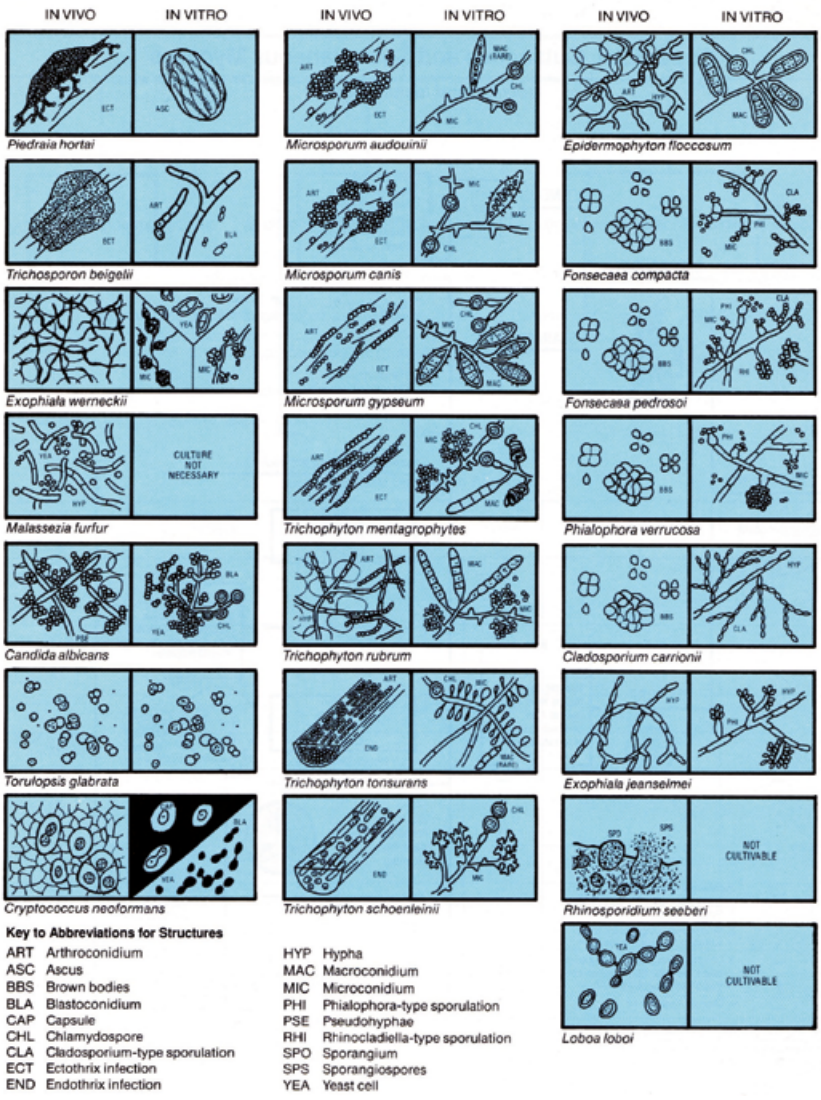
Un'altra differenza con i batteri sta nel **pH acido** dei terreni colturali (ad esempio, Sabouraud Dextrose Agar a pH 5.6) oppure nell'aggiunta di **antibiotici** che non intaccano i miceti come nel Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (*nella foto*).

L'aspetto al microscopio dei **funghi correlati, rispettivamente, con micosi superficiali, cutanee, sottocutanee e micosi sistemiche o profonde**, è illustrato nei due quadri seguenti, presi dal *Manual of BBL® Products and Laboratory Procedures*, 1988.

Nota tecnica
LA COLORAZIONE PIÙ INDICATA PER I MICETI

Lattofenolo-blu cotone	Su un vetrino portaoggetti si pone una goccia di alcool 70%, in cui, con l'ago da batteriologia sterile si trasferisce una piccola quantità della colonia fungina da esaminare, facendo attenzione a minimizzare la frammentazione del materiale. Si aggiungono 1-2 gocce del colorante e si copre il preparato con un vetrino coprioggetti. Si osserva al microscopio con obiettivo 40x.	

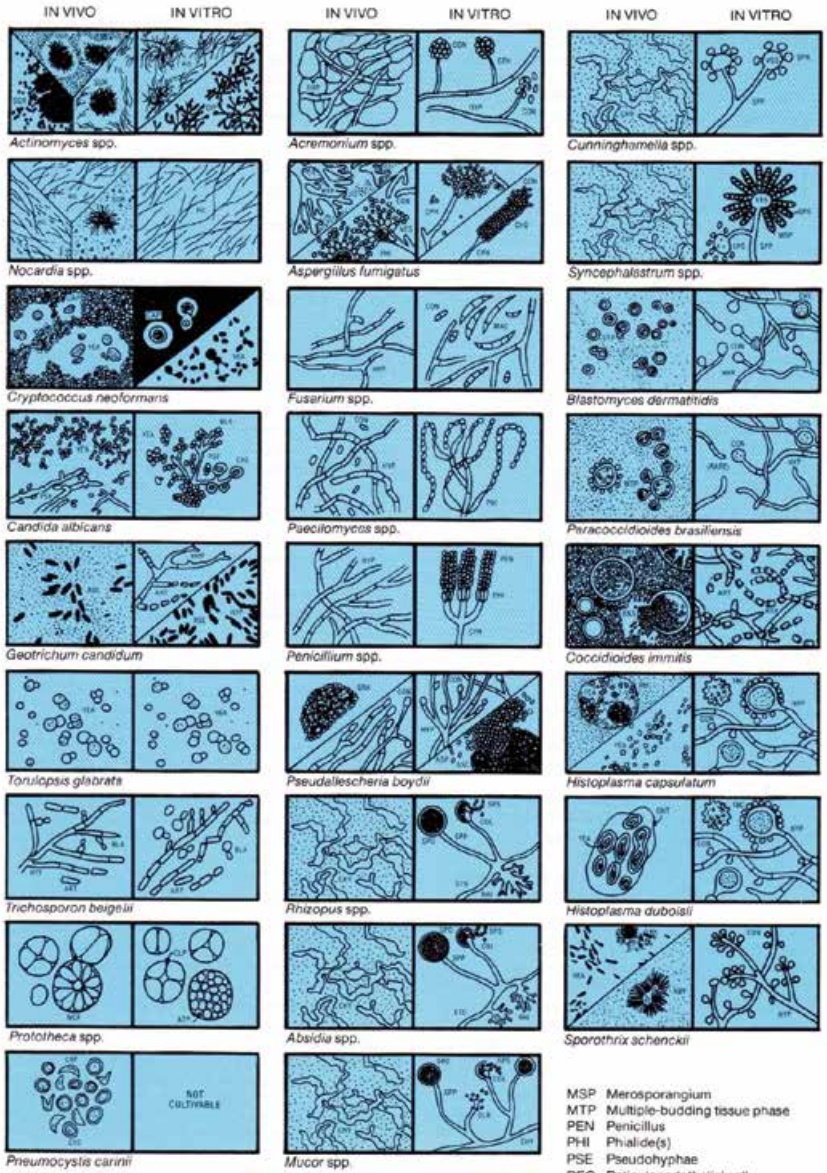
Micosi superficiali, cutanee e sottocutanee



Key to Abbreviations for Structures

ART	Arthroconidium
ASC	Ascus
BBS	Brown bodies
BLA	Blastoconidium
CAP	Capsule
CHL	Chlamydospore
CLA	Cladosporium-type sporulation
ECT	Ectothrix infection
END	Endothrix infection
HYP	Hypha
MAC	Macroconidium
MIC	Microconidium
PHI	Phialophora-type sporulation
PSE	Pseudohyphae
RHI	Rhinocladiella-type sporulation
SPO	Sporangium
SPS	Sporangiospores
YEA	Yeast cell

Micosi sistemiche e profonde



Key to Abbreviations for Structures

ABY	Asteroid body
ART	Arthroconidium
ASC	Ascocarp
ASP	Ascospore
ATP	Autospore
BLA	Blastospore
CAP	Capsule
CHD	Columnar head
CHL	Chlamydospore
CHY	Coenocytic hypha
CLP	Cleavage plane
CLR	Collarette
COL	Columella
CON	Conidium(ia)
CPH	Conidiophore
CRF	Crescent form
CYS	Cyst form
DIP	Diphtheroids
ENS	Endospores
FIL	Filaments
GNT	Giant Cell
GRA	Grain
HYP	Hypha
MAC	Macroconidium
MOF	Morula form
MSP	Merosporangium
MTP	Multiple-budding tissue phase
PEN	Penicillus
PHI	Phialide(s)
PSE	Pseudohyphae
REC	Reticuloendothelial cell
RHI	Rhizoid
RSC	Rectangular-shaped cells
SGR	Sulfur granule
SPH	Spherule
SPO	Sporangium
SPP	Sporangiophore
SPR	Spore
SPS	Sporangiospore
STO	Stolon
STP	Single-budding tissue phase
TBC	Tuberculate macroconidium
VES	Vesicle
YEA	Yeast cell

VIRUS

(MATTIA CECCHINATO – GIOVANNI FRANZO)

Struttura Virale

Dalle raffigurazioni egizie e dallo studio delle mummie sembra documentato che circa 1100 anni a.C. il faraone Ramsete V morì di **vaiolo** e un suo sacerdote avesse contratto la **poliomielite**. Sono occorsi secoli per arrivare al "contatto" fisico con i virus, attraverso l'ultracentrifugazione o la filtrazione su colonna di Sephadex, che permettono oggi di separare le particelle.

I virus sono parassiti intracellulari obbligati in quanto necessitano dell'apparato cellulare di un organismo ospite per poter replicare. Si può quindi intuire come, per assicurarsi la sopravvivenza, i virus debbano portare a termine due compiti: 1) proteggere il genoma e la componente proteica durante la loro permanenza nell'ambiente; 2) moltiplicarsi all'interno di un ospite e facilitare la trasmissione a quello successivo. Sebbene gruppi virali differenti adottino strategie molto eterogene (e le caratteristiche genomiche nonché la morfologia e la struttura delle componenti virali siano estremamente diversificate), alcuni principi e caratteristiche sono condivisi dalla maggior parte dei virus. Fra questi, risalta in particolare la capacità di auto-assemblarsi in strutture relativamente complesse a partire da un numero ridotto di geni virali.

Uno dei fattori che ha, fino agli ultimi anni dell'800, precluso la scoperta di questi patogeni, sono state le loro piccole dimensioni, al di sotto della risoluzione minima del microscopio ottico. Negli ultimi anni la scoperta di *Megavirus* e dei *Mimivirus* (e più recentemente dei *Pandoravirus* e dei *Pithovirus,* le cui dimensioni genomiche e morfologiche possono raggiungere rispettivamente alcuni milioni di basi 1.5 μm di diametro) ha parzialmente scalzato questo paradigma. Tuttavia, sebbene rilevanti dal punto di vista biologico, rappresentano delle eccezioni, di nessuna rilevanza in ambito veterinario o umano.

Componenti virali

Rispetto ad altri organismi, i virus si caratterizzano per essere composti da un insieme di strutture relativamente semplici e ripetitive. La particella virale infettante, detta *virione*, è costituita essenzialmente dal *genoma*, racchiuso in un rivestimento proteico detto *capside*. Un certo numero di proteine addizionali, tipicamente con funzione enzimatica, possono essere incluse in tale struttura. In alcune famiglie virali questa componente, detta *nucleo-capside*, è circondata da un ulteriore rivestimento lipidico, *l'envelope*, nel quale sono inserite una varietà di proteine virali. Fra le due strutture può inoltre essere presente una ulteriore componente proteica, la *matrice*. Il numero di proteine virali può variare da 1, per i virus più semplici, a circa 200, come nel caso dei Poxvirus e Herpesvirus (i più grandi virus con rilevanza clinica), fino alle più di 2.500 dei Pithovirus. In ogni caso, il numero è di gran lunga inferiore rispetto a quelle implicate nei processi virali dei batteri (>5.000) e degli eucarioti (fra le 250.000 e 1.000.000).

Acido nucleico virale

Il genoma virale può essere costituito sia da DNA che da RNA. Entrambe queste molecole possono essere a singolo o a doppio filamento, monopartito (i.e. una singola molecola) o multipartito (detto anche segmentato, i.e. più molecole di acido nucleico codificanti per geni differenti). Tutti i genomi virali sono aploidi, con la sola eccezione dei Retrovirus.

Genomi a DNA - Tutti i genomi di virus a DNA sono monopartiti e a doppio filamento, con l'eccezione dei Parvovirus, Anellovirus e Circovirus, che sono a singolo filamento. A seconda della famiglia virale, i genomi possono essere lineari o circolari, anche se è necessario sottolineare come anche nel caso dei genomi lineari siano presenti degli elementi che ne facilitino una conformazione circolare, necessaria durante la fase di duplicazione del materiale genetico. Come precedentemente accennato, le dimensioni del genoma possono essere estremamente variabili, dalle circa 1.7kb dei *Circovirus*, alle 200kb di *Herpes* e *Poxvirus*, sino a >2.8mb dei *Pandora* e *Pithovirus*. Sebbene genomi più grandi codifichino tendenzialmente per un maggior numero di proteine, vi sono una serie di fattori che possono alterare questa relazione. In primo luogo, similmente a quando accade per le cellule eucariote, genomi più grandi spesso contengono elementi ripetitivi (il che comporta una sovrastima della capacità codificante). Al contrario, specialmente in virus piccoli, il medesimo tratto genomico può essere letto in 3 diversi *frame* di lettura, producendo diverse proteine. Inoltre, non è inusuale che geni diversi siano sovrapposti. Un'ulteriore strategia per massimizzare l'efficienza dell'informazione genetica consiste nel fatto che talvolta entrambi i filamenti genomici (positivo e negativo) possono essere codificanti. Infine, un'ulteriore espansione del *pool* di proteine virali può essere generata tramite *splicing* alternativo dei trascritti e modifiche post-traduzionali (e.g. taglio da parte di proteasi virali o dell'ospite) delle proteine virali.

Conversazione scientifica sui virus

Oltre alle regioni codificanti, i genomi virali contengono anche regioni implicate nel regolare il ciclo replicativo e l'espressione genica, quali promotori, siti di iniziazione della replicazione del DNA, di *splicing*, di iniziazione e terminazione della traduzione, etc.

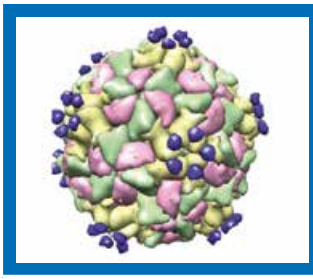
Genomi a RNA

Con l'eccezione dei *Reovirus*, *Birnavirus* e *Picobirnavirus*, il genoma dei virus a RNA è a singolo filamento, mono o multipartito. In quest'ultimo caso, ciascun segmento di RNA comprende uno, o un numero limitato, di geni. I genomi a singolo filamento di RNA sono caratterizzati da complesse strutture secondarie che giocano un ruolo rilevante nel regolare la replicazione, trascrizione, traduzione e *packaging* dell'acido nucleico. I genomi a RNA possono essere a polarità positiva, quando presentano lo stesso senso dell'mRNA (e possono quindi essere utilizzati direttamente per la sintesi proteica), o negativa, quando ne sono complementari. Indipendentemente dalla polarità, i virus a RNA devono necessariamente codificare per una RNA-polimerasi RNA-dipendente per la replicazione del loro genoma, in quanto gli eucarioti non presentano questo enzima. Fanno eccezione i *Retrovirus* e gli *Hepadnavirus*, che in funzione del loro particolare ciclo biologico, codificano per una DNA-polimerasi RNA-dipendente. Le dimensioni dei genomi sono meno eterogenee in questi virus, essendo comprese fra le 1.7kb e le 32kb nei virus a RNA a singolo filamento, e fra le 18kb e le 27kb in quelli a doppio filamento. Di conseguenza, il numero di proteine codificate è di gran lunga inferiore, spesso meno di una dozzina.

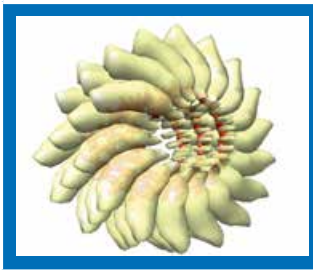
Proteine virali

Sebbene spesso ciascuna proteina virale assolva a più di una funzione, queste vengono generalmente suddivise in due gruppi: le proteine strutturali (costituenti il capside, l'*envelope* e altre componenti del virione) e quelle non-strutturali, non presenti nel virioni, ma con diverse funzioni nel ciclo replicativo. Quest' ultime sono infatti coinvolte nella replicazione, trascrizione e traduzione delle proteine virali, oltre che nel contrastare la risposta immunitaria dell'ospite.

Proteine capsidiche - Il capside è costituito dall'assemblaggio di una serie di sub-unità strutturali identiche, dette *capsomeri*, tenute assieme da legami deboli, non covalenti. La disposizione dei capsomeri condiziona il tipo di simmetria virale, che può essere icosaedrica o elicoidale.



Modello tridimensionale di un virus nudo a simmetria icosaedrica.
Le diverse proteine costituenti il capside sono state evidenziate con colori diversi.



Modello tridimensionale di un virus nudo a simmetria elicoidale.
In trasparenza è possibile osservare la disposizione del genoma virale (in rosso).

Nel caso della simmetria icosaedrica, ciascun *capsomero* è a sua volta costituito da un numero variabile di sub-unità strutturali di un unico peptide o di più peptidi differenti.

Per i virus più semplici, tutti i *capsomeri* sono identici, mentre per i più complessi si identificano 2 tipi di *capsomeri*: i *pentoni*, che costituiscono i vertici dell'icosaedro, e gli *esoni*, che costituiscono il resto del capside. La complessità nella composizione e nell'arrangiamento di queste strutture varia considerevolmente a seconda dei gruppi virali e fa si che morfologicamente alcuni gruppi virali abbiano una struttura marcatamente icosaedrica mentre altri appaiano sferici. In entrambi i casi, però, ad una maggiore ingrandimento è possibile individuare protrusioni e proiezioni (spesso contenenti siti di legame per la cellula ospite ed epitopi neutralizzanti) e depressioni, *canyon* e fessure (anche questi spesso fungenti da ligandi per la cellula ospite, ma più raramente da epitopi).

La simmetria elicoidale è invece tipica di diversi virus a RNA, i cui capsomeri si auto-assemblano formando un'elica, al cui interno su dispone a spirale l'RNA, formano il *nucleo-capside*. In tutti i virus dei vertebrati con simmetria elicoidale (e.g. *Rhabdovirus* e *Paramyxovirus),* il *nucleo-capside* è a sua volta rivestito da una seconda spira proteica ed è racchiuso in un *envelope*.

*Envelope virale - V*iene acquisito quando i virus vengono estrusi da una delle membrane cellulari, in un processo detto *budding*. Ciascun gruppo virale matura in diversi compartimenti cellulari, quali citoplasma, organelli o nucleo. Conseguentemente, la composizione lipidica rispecchia quella della rispettiva membrana cellulare da cui gemmano. A prescindere dall'origine, nel doppio strato lipidico dell'*envelope* sono inserite diverse proteine o glicoproteine virali, chiamate *peplomeri* o *spikes,* spesso assemblati in dimeri o trimeri. Anche proteine dell'ospite possono rimanere incluse nell'*envelope* virale, portando a conseguenze talora inattese sulla patogenesi e sull'esito di alcuni *test* diagnostici. Internamente all'*envelope* alcune famiglie virali presentano un'ulteriore componente proteica, la *matrice*, che contribuisce a determinare le caratteristiche strutturali del virus, oltre a svolgere un ruolo fondamentale nell'assemblaggio del virione e nell'interazione fra le strutture dell'*envelope* e del *nucleo-capside*.

Qualsiasi tentativo di riassumere la molteplicità di funzioni svolte dalle proteine strutturali risulta sicuramente parziale e riduttivo. Queste infatti servono sia a proteggere il genoma virale che a mediare la grande varietà di interazioni con la cellula ospite.

In estrema sintesi però, è possibile affermare che queste devono ottemperare ad alcune funzioni principali (in alcuni casi anche di concerto con proteine non-strutturali): adesione alla cellula *target*, fusione delle membrane, svestimento virale, trasporto intracellulare e modulazione della risposta dell'ospite.

Stabilità e infettività virale

La struttura condiziona grandemente la stabilità virale in diverse condizioni ambientali. La conoscenza della capacità di un virus di resistere ai diversi agenti chimici e fisici è fondamentale, sia per poterne preservare l'infettività ai fini diagnostici e/o sperimentali, sia per poterli inattivare efficacemente nell'ambito dei processi di disinfezione e sterilizzazione.

A tal proposito, è importante sottolineare come i processi di inattivazione virale non siano dei fenomeni tutto-niente, ma seguano delle cinetiche ben precise. In altre parole, una popolazione virale in un campione perderà progressivamente di infettività ad un tasso che dipende dalle condizioni ambientali. Conseguentemente, il tempo necessario per una completa inattivazione dipenderà sia dal titolo iniziale che dall'agente impiegato. La principale condizione ambientale in grado di influenzare negativamente l'infettività virale è la temperatura. Solitamente, le proteine dell'*envelope* vengono denaturate anche da brevi esposizioni a temperature di 55-60°C, mentre quelle capsidiche sono leggermente più resistenti.

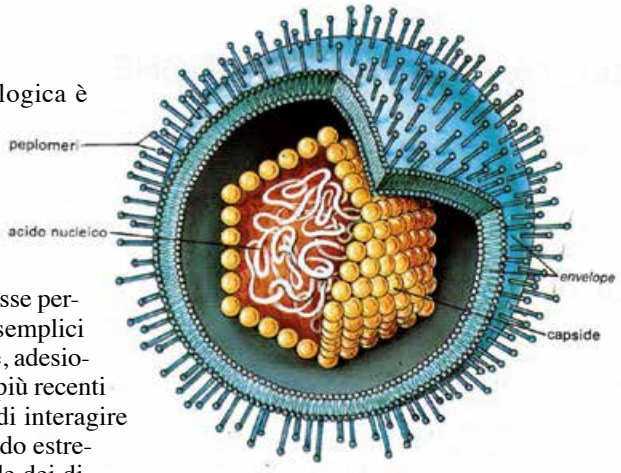
Volendo generalizzare, si può ritenere che l'emivita dei virus sia dell'ordine dei secondi a +60°C, dei minuti a +37°C, delle ore a +20°C, dei giorni a +4°C ed degli anni a -70°C. Anche processi di congelamento-scongelamento possono essere deleteri, probabilmente a causa della distruzione delle membrane lipidiche causata dalla formazione di cristalli di ghiaccio. Qualora si voglia tentare di isolare un agente virale, è opportuno, come vedremo di seguito, **trasportare il campione refrigerato al laboratorio nel minor tempo possibile,** ove potrà essere immediatamente processato o, se necessario, conservato tramite congelamento rapido (-70°C o -196°C) o liofilizzazione (disidratazione di una sospensione virale congelata, in condizioni di vuoto).

I virus sono in genere suscettibili anche a pH non fisiologici sebbene alcuni, in particolare gli *Enterovirus*, resistano a pH acidi senza perdere di infettività.

I virus non sono particolarmente resistenti ai biocidi ma deve essere fatta una distinzione tra virus con *envelope* e quelli che non lo possiedono. I solventi e detergenti dei lipidi sono infatti particolarmente efficaci nei confronti di virus dotati di *envelope*. I virus senza *envelope*, che contengono solo un rivestimento proteico, sono più resistenti e infatti pochi biocidi agiscono contro di essi.

Replicazione virale

Il fine ultimo di qualsiasi entità biologica è quello di trasmettere il proprio patrimonio genetico alle generazioni successive. I virus rappresentano un esempio estremo di questo principio, essendo ogni loro componente e struttura evoluti a questo fine. Sebbene in passato si ritenesse che tale obiettivo venisse perseguito mediante processi estremamente semplici (i.e. protezione del genoma nell'ambiente, adesione e invasione della cellula ospite), studi più recenti hanno evidenziato la capacità dei virus di interagire e sovvertire i meccanismi cellulari in modo estremamente fine. Una regolazione temporale dei diversi processi cellulari sembra infatti caratterizzare tutti i virus, sebbene con modalità e gradi diversi in funzione del gruppo virale.



(Da Poli *e Coll.*, Microbiologia Medica, UTET, Torino, 1993)

Ciclo replicativo virale

Ogni famiglia virale sfrutta una peculiare strategia di replicazione, riassunta e semplificata dalla classificazione di Baltimore, che definisce 6 classi sulla base della composizione genomica e dei *pathways* usati per la sua replicazione e trascrizione.

Adesione

Per poter iniziale l'infezione, il primo *step* è rappresentato dall'adesione alla cellula. Questo comporta l'interazione fra un ligando (proteine di adesione virale) e un recettore (cellulare). La complessità di questo processo può essere molto variabile. Ad esempio, nel caso degli Herpesvirus diverse glicoproteine virali e recettori cellulari sono implicati nel determinare l'adesione e quindi il tropismo per i diversi tessuti, nonché nel supportare l'alternanza di fasi di latenza e recrudescenza. Sebbene ci sia un certo grado di specificità nel recettore riconosciuto da particolari virus, non è infrequente che membri di diverse famiglie virali usino lo stesso recettore e membri della stessa famiglia o genere usino recettori differenti.

Di grande rilevanza e attualità è la possibilità di ampliare il tropismo cellulare o d'ospite a seguito di mutazioni in domini rilevanti delle proteine implicate nell'adesione. L'esempio forse più noto riguarda l'emoagglutinina degli *Influenza A virus*. Nei virus che affliggono gli uccelli questa mostra una maggiore affinità per gli acido-sialici legati al galattosio con un legame α2-3, mentre in quelli che colpiscono l'uomo l'affinità è maggiore nei confronti di quelli con legame α2-6. Tale differenza rispecchia la rispettiva abbondanza di queste molecole nelle specie *target*. Tuttavia, singole o comunque minime mutazioni amino-acidiche nel sito recettoriale possono modificarne l'affinità, e quindi l'epidemiologia e il tropismo d'ospite.

Penetrazione e svestimento

Molti virus (sia con che senza *envelope*) sfruttano i processi di endocitosi mediata da recettori, continuamente in atto nella membrana cellulare. Sebbene, come prevedibile, vi sia una certa variabilità, all'adesione recettoriale seguono solitamente modificazioni di membrana (spesso clatrino-mediata) che portano alla formazione di vescicole. La successiva acidificazione di quest' ultime porta ad alterazioni nella conformazione di alcune proteine virali che

permettono la fusione fra le membrane virali e quelle dell'endosoma e il conseguente rilascio nel nucleo-capside nel citoplasma. In alcune famiglie virali, come i Paramixovirus, questo processo avviene a pH neutro e coinvolge direttamente la membrana plasmatica, grazie alla presenza di specifiche proteine di fusione. Alcuni virus sprovvisti di *envelope* (e.g. Poliovirus e Adenovirus) sfruttano meccanismi di "entrata diretta". Ossia, l'interazione fra proteine del capside e le membrane endosomiche determina cambiamenti conformazionali del capside virale che esitano nella formazione di canali e nel rilascio del genoma nel citoplasma.

Successivamente, affinché il genoma virale diventi accessibile ai complessi enzimatici necessari per la sua replicazione e trascrizione, almeno una parte delle proteine ad esso associate deve essere rimossa: un processo che prende il nome di "svestimento".

Replicazione del genoma

La replicazione del genoma virale avviene secondo modalità largamente differenti in funzione della famiglia virale considerata e alcune peculiarità possono caratterizzare anche livelli tassonomici inferiori. Un'accurata discussione di questi processi esula quindi dallo scopo del presente libro. Ciononostante, alcuni tratti comuni possono essere identificati.

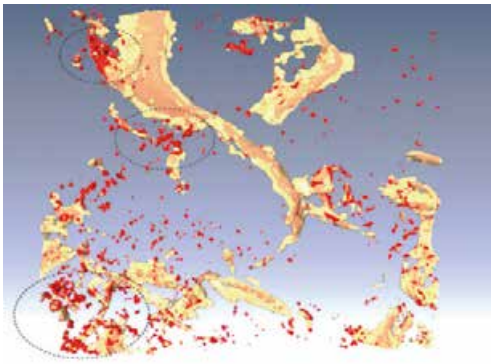
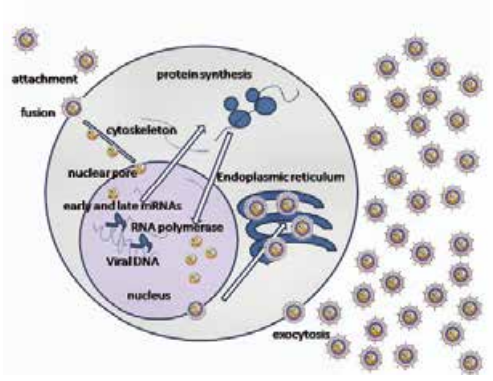


Immagine di replicazione virale da: Isabel Fernández de Castro *e Coll*., Three-dimensional imaging of the intracellular assembly of a functional viral RNA replicase complex, Journal of Cell Science 2017, *130*, 260-268.

Nel caso dei virus a DNA, la duplicazione del genoma è spesso mediata da polimerasi cellulari, la cui attività viene diretta a favore della replicazione virale. Tuttavia, diverse proteine virali sono spesso coinvolte nell'ausiliare e guidare questo processo. Casi estremi sono rappresentati da virus complessi, come gli Herpesvirus o i Poxvirus, che codificano per molte o tutte le proteine necessarie alla replicazione del loro genoma, inclusa la DNA-polimerasi, oltre che a diverse elicasi, primasi e altre proteine deputate all'interazione con il DNA.

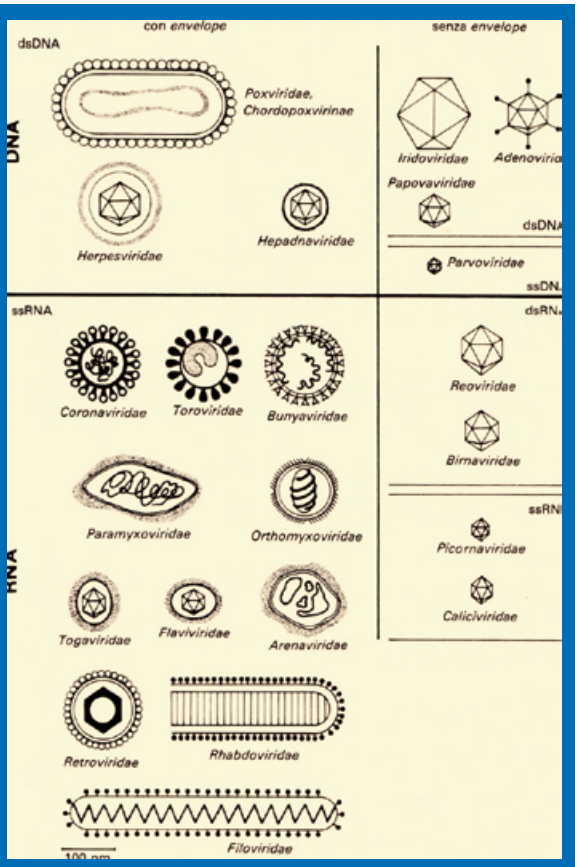


In un certo senso, qualcosa di simile avviene nel caso dei virus a RNA. La sintesi di un filamento di RNA a partire da un modello a RNA è un fenomeno peculiare del mondo virale e gli ospiti non possiedono il corrispettivo macchinario cellulare. Ne consegue che tutti i virus a RNA devono codificare per una loro RNA-polimerasi. Questa deve in primo luogo permettere la sintesi di un filamento complementare, che sarà successivamente usato per la produzione delle varie copie di RNA genomico virale. In aggiunta questa polimerasi è spesso necessaria per la sintesi di trascritti sub-genomici che fungano da mRNA per la sintesi proteica. Nel caso dei virus a RNA a polarità positiva, il genoma può fungere direttamente da mRNA, permettendo la sintesi di questa polimerasi dopo la penetrazione del virus nella cellula. Nel caso di virus a RNA a doppio filamento o a singolo filamento a polarità negativa questa opzione non è percorribile e

conseguentemente il virione dovrà contenere questa, ed eventualmente altre proteine necessarie all'iniziale sintesi di nuove molecole. Un caso particolare, ma di grande rilevanza dato il loro ruolo in ambito clinico, è rappresentato dai Retrovirus. Questi virus hanno un genoma diploide (caso unico nei virus) a singolo filamento di RNA a polarità positiva. Tuttavia, a differenza di altri virus a RNA, sfruttano un intermedio replicativo a DNA, che deve essere sintetizzato da una retro-trascrittasi associata al virus. Questo enzima media la sintesi di una molecola a doppio filamento di DNA che viene poi integrato, grazie a *integrasi* virali, nel genoma dell'ospite. È a partire da questo *template* che avverranno le successive fasi di trascrizione dell'RNA virale.

Espressione dei geni virali

La regolazione dell'espressione genica nei virus è sicuramente meno complessa che negli eucarioti. Tuttavia, è evidente come la rapida sintesi di alcune proteine virali rappresenti un momento fondamentale nel ciclo replicativo, permettendo di modificare i fisiologici processi cellulari, alterare al risposta immunitaria e permettere la successiva sintesi delle ulteriori componenti virali. Come sempre, le modalità con cui questo si concretizza variano molto in funzione del gruppo virale e della complessità del suo genoma e ciclo replicativo. Nei virus più semplici un numero limitato di proteine viene sintetizzato contemporaneamente, o come entità indipendenti o come poli-proteina, clivata poi da proteasi virali o dell'ospite. In alti casi invece la sintesi proteica segue un *timing* e un programma preciso, più finemente regolato. I primi geni ad essere trascritti sono i cosidetti *early viral genes,* i quali ottemperano a tre principali funzioni: alterare la sintesi di acidi nucleici e proteine cellulari, regolare l'espressione di altri geni virali, favorire la replicazioni dell'acido nucleico virale. In tale ambito grande interesse viene rivolto allo studio delle regioni non codificanti del genoma virale, che svolgono un ruolo fondamentale della regolazione della sintesi proteica. Fra queste rientrano i siti di iniziazione della trascrizione e regioni promotrici, che regolano l'espressione di singoli o gruppi di geni.



(Da Poli *e Coll.*, Microbiologia Medica, UTET, Torino, 1993).

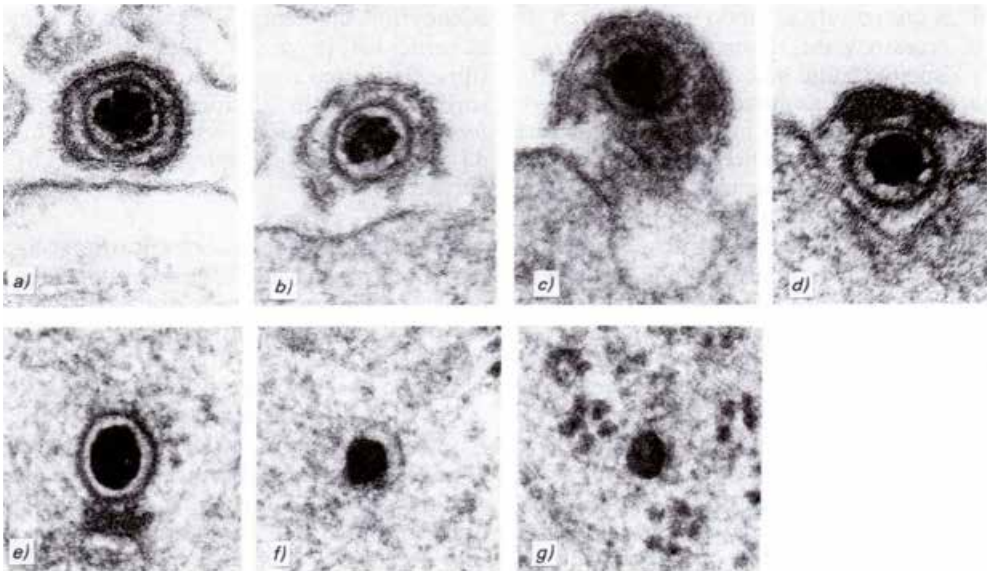
Un'ulteriore modulazione può essere mediata da regioni *enhancers,* attivate dal legame con proteine virali o cellulari. Queste complesse interazioni portano, più tardivamente, all'espressione dei *late viral genes,* codificanti principalmente per le proteine strutturali virali. Specialmente per i virus con un ciclo replicativo lento e che portano ad infezioni persistenti o croniche, è di fondamentale importanza la produzione precoce di proteine in grado di rendere inefficace la risposta immunitaria dell'ospite. Fra queste, alcuni virus codificano per delle *virokine*, che fungono da omologhi di citochine, fattori di crescita o fattori del complemento dell'ospite.

Nel caso dei virus a RNA, i processi di regolazione della trascrizione sono generalmente meno complessi e la separazione fra geni precoci e tardivi è spesso meno definita.

Nei casi più semplici, un unico mRNA poli-cistrionico (contenente più geni) viene tradotto in una poli-proteina. Questa viene successivamente tagliata nelle diverse proteine virali, prodotte quindi in quantità equimolari. Alcune forme di regolazione nella produzione delle diverse proteine sono comunque possibili. Nel caso di alcuni virus a singolo filamento di RNA a polarità negativa la disposizione dei geni svolge un ruolo importante in tal senso. La trascrizione inizia infatti a partire dall'estremità 3' del genoma. Tuttavia, a causa dalla progressiva diminuzione nell'efficienza di questo processo, il quantitativo di mRNA prodotto diminuisce progressivamente in direzione 5', modulando di conseguenza la produzione delle rispettive proteine.

Un meccanismo relativamente simile è sfruttato da alcune famiglie di virus (e.g. *Coronaviridae*), che modulano la produzioni di mRNA sub-genomici di differente lunghezza, ciascuno codificante per una sola proteina.
Una soluzione particolare è rappresentata dai virus con genoma segmentato, ove ciascuna molecola di RNA codifica tipicamente per uno o un numero limitato di proteine.
È importante sottolineare come quelle sopra descritte rappresentino solo un minimo spaccato delle strategie messe in atto dai diversi gruppi virali e spesso più di un meccanismo sussista nella medesima regione genomica. Inoltre, la presenza di *overlapping reading frames*, *alternative splicing*, siti di *frameshift* ribosomiale, siti multipli di iniziazione della traduzione e taglio post-traduzionale di poliproteine, ampliano enormemente il potenziale codificante e di regolazione della sintesi proteica anche nel caso di virus con un genoma di dimensioni ridotte.

Modificazioni post-traduzionali - La maggior parte delle proteine virali subisce varie tipologie di modificazioni post-traduzionali. Sebbene alcune di queste alterazioni possono essere mediate da altre proteine virali (e.g tagli proteolici), la maggior parte è ascrivibile ai normali *pathways* intra- o extra-cellulari. Come le altre proteine dell'ospite, dopo la sintesi anche quelle virali vengono trasportate in specifici comparti cellulari, definiti grazie a "peptidi segnale" che regolano il *trafficking* cellulare. Nell'economia della cellula, ciascun organello è deputato a compiti specifici ed è quindi caratterizzato da un particolare corredo enzimatico, in funzione del quale differiranno anche le modificazioni apportate alle proteine virali. Fra le più importanti troviamo il taglio enzimatico. Come precedentemente accennato, questo processo può essere mediato anche da proteine virali. Non è inusuale che, dopo la sintesi, grandi poli-proteine vengano clivate nelle unità funzionali ad opera di altre proteine virali o dell'attività auto-catalitica di alcuni domini della poli-proteina stessa. In aggiunta, varie proteasi dell'ospite (tripsin-, papain-, pepsin-*like*, etc) possono svolgere un ruolo fondamentale nella maturazione delle proteine virali; il clivaggio dell'emoagglutinina nei virus influenzali è forse il più celebre, ma sicuramente non l'unico esempio.



Adsorbimento (a) e penetrazione (b,c,d) di un virus con *envelope* (*Herpes simplex*) in cellule HeLa. Si può notare una "digestione" locale della membrana virale e di quella cellulare e la loro finale fusione che consente la liberazione del nucleocapside nel citoplasma (d). Il nucleocapside (e) viene quindi disgregato (f) lasciando libero il *core* virale, costituito da DNA e proteine (da Poli *e Coll*., Microbiologia Medica, UTET, Torino, 1993).

Di fondamentale importanza è inoltre la glicosilazione. L'estremità N terminale di alcune proteine dell'*envelope* presenta un peptide segnale che ne permette il passaggio nel lume del reticolo endoplasmatico. Qui, oligosaccaridi vengono aggiunti con un *N-linkage* ad alcuni residui di asparagina (o più raramente tramite in *O-linkage* a residui di serina o treonina). Ulteriori modifiche a queste strutture avvengono poi a seguito del trasporto di queste glicoproteine nel Golgi. Conseguentemente, il particolare profilo di glicosilazione dipende non solamente dalla sequenza e della struttura terziaria delle proteina, ma anche delle specifiche glicosil-trasferasi attive nei tipi cellulari ove avviene la replicazione cellulare.

Assemblaggio e rilascio - Tutti i virus privi di *envelope* dei vertebrati hanno una simmetria icosaedrica. Le proteine strutturali dei virus icosaedrici si assemblano spontaneamente per formare i capsomeri, che a loro volta si auto-assemblano nel capside includendo l'acido nucleico. Spesso questo processo si accompagna a modifiche strutturali e ulteriori tagli proteolitici che portano alla maturazione del virione nella sua forma definitiva. La maggior parte dei virus nudi si accumulano nel citoplasma o nel nucleo e vengono poi rilasciate in seguito a lisi cellulare.

Al contrario, tutti i virus con simmetria elicoidale e alcuni virus a simmetria icosaedrica maturano acquisendo un *envelope*, "gemmando" attraverso una delle membrane cellulari, siano esse quelle dei vari organelli o della membrana plasmatica. La gemmazione avviene a livello di *patches* della membrana ove si vanno accumulando glicoproteine virali caratterizzate da dominio idrofilico che proietta sul versante esterno della membrana, un dominio idrofobico transmembrana e un dominio idrofilico sul versante interno della membrana. Nel

caso dei virus icosaedrici, le componenti del *nucleocapside* interagiscono direttamente con quest'ultimo dominio. Nel caso dei virus a simmetria elicoidale, questa interazione è tipicamente mediata da proteine di matrice.

I virus che acquisiscono l'*envelope* all'interno della cellula sono poi trasportati entro vescicole cellulari sino alla membrana plasmatica. Il rilascio di virus dotati di *envelope* solitamente non comporta dei danni rilevanti alla membrana plasmatica; conseguentemente il rilascio di questi virus può protrarsi per ore o giorni in assenza di significativi danni cellulari.

Molte tipologie cellulari presentano una polarizzazione, ossia una differente specializzazione delle superfici apicali e basali che si associa a differenze chimiche e fisiologiche. Il rilascio dei virus può essere limitato ad una sola di queste superfici, con rilevanti implicazioni in termini di patogenesi (e.g. virus a tropismo respiratorio vs. virus sistemici).

Diversità genetica virale - Sebbene non possano essere considerati a rigore degli organismi viventi, i virus sono accomunati a quest'ultimi dalla necessità di trasmettere il proprio patrimonio genetico alle generazioni successive e dall'essere sottoposti a forme di selezione naturale. Come per tutti gli organismi, questa agisce sulla variabilità genetica che caratterizza le popolazioni, favorendo i soggetti più adatti ad un determinato ambiente.

Le mutazioni sono la fonte primaria di questa variabilità e sono ascrivibili ad errori commessi durante la duplicazione del patrimonio genetico. Il tasso con cui questi errori avvengono, sebbene generalmente più elevato di quello di procarioti ed eucarioti, varia enormemente a seconda del gruppo virale considerato, con un *range* che va dalle 1.5×10^{-3} mutazioni per nucleotide per replicazione genomica (mut/nt/rep) nel caso dei virus a singolo filamento di RNA, sino alle 1.8×10^{-8}mut/nt/rep nei grandi virus a doppio filamento di DNA. Sebbene le cause di questa variabilità siano complesse, in massima parte sono spiegabili dalla differente "fedeltà" delle polimerasi usate durante la replicazione. Infatti le RNA-polimerasi dipendenti da RNA hanno un tasso di errore intrinsecamente più elevato delle DNA polimerasi. Inoltre, non va dimenticato che, trattandosi di un meccanismo replicativo, sussistono rilevanti implicazioni in termini di patogenesi (e.g. virus a tropismo respiratorio vs virus sistemici).

ANTIBIOTICI E VIRUS

Le differenze strutturali fra batteri e virus causano l'**inefficacia degli antibiotici verso i virus**, almeno nella stragrande maggioranza dei casi. Di conseguenza, la medicina ha orientato le terapie antivirali verso le vaccinazioni, in grado di indurre una protezione immunitaria. I farmaci antivirali sono pochi e mirati contro alcuni agenti eziologici (*Herpes*, epatite, HIV). Mimano strutturalmente i nucleosidi, inducendo il virus a costruire con questi materiale genetico inattivo.

Circondato da antibiotici, il virus si comporta come la ballerina

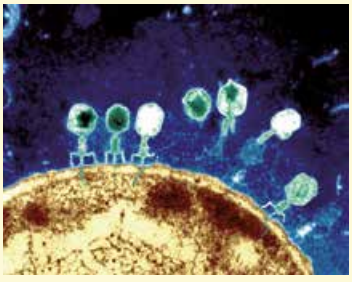
NOTA DI REDAZIONE

Istituto di Batteriologia a Tbilisi, in Georgia

Salvatore Luria, medico e biologo torinese (1912-1991)

I meccanismi con cui i virus vengono trasmessi all'uomo, agli animali o alle piante sono fantastici, ma forse per questo motivo molto difficili da descrivere e da trasferire in immagini.
Al contrario, esiste un esempio di meccanismo virale molto "concreto" (si potrebbe definirlo "da *film*"). Quello dei batteriofagi.
La loro esistenza è stata scoperta da **Twort** nel 1915 e da **D' Hérelle** nel 1917, che avevano notato un fenomeno strano in laboratorio: la torbidità delle colture batteriche in brodo spariva misteriosamente dopo qualche giorno di sviluppo. Anche sui terreni solidi la patina batterica si riempiva di "placche di lisi", cioè di aree trasparenti. Peraltro, la presenza invisibile dei batteriofagi (che si vedono solo al microscopio elettronico, essendo dei virus) era stata sospettata dai casari, che vedevano vanificarsi l'azione degli innesti batterici nella fabbricazione dei formaggi. Il latte non coagulava più.
Lo studio approfondito dei batteriofagi fece sperare in una loro possibile applicazione terapeutica per distruggere i germi patogeni, tanto da portare alla creazione di un apposito Istituto in Georgia nel 1923 con **George Eliava**, microbiologo russo (1882-1937). Questo avveniva prima della scoperta degli antibiotici.
Il "fenomeno batteriofagi" fu ampiamente descritto da **Salvatore Luria**, che nel 1969 ottenne il premio Nobel per la Medicina grazie ai suoi studi fondamentali per le biotecnologie.
Oggi l'interesse per i batteriofagi si è spostato sulle biotecnologie per modificare il DNA dei batteri ingegnerizzati a scopi tecnologici oppure sullo studio nella trasmissione di geni responsabili della patogenicità o dell'antibiotico-resistenza da un batterio all'altro.
In diagnostica i batteriofagi servono per identificare ulteriormente in *fagotipi* i ceppi batterici isolati, aldilà della tipizzazione sierologica.

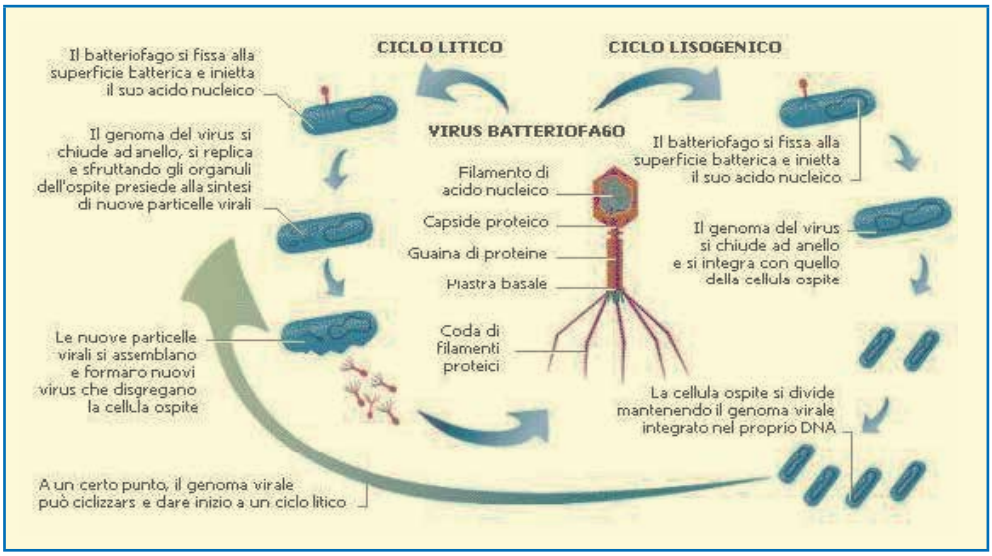
ANCHE I BATTERI POSSONO "PRENDERE UN VIRUS"



I **batteriofagi** (o *fagi*) sono dei virus che si moltiplicano a spese dei batteri. In pratica il batteriofago durante un *ciclo litico* farà produrre al batterio (destinato a morire per lisi) nuove particelle fagiche, frammentandone i nucleotidi per sintetizzare nuovi fagi oppure durante un *ciclo lisogenico* inserirà il suo acido nucleico nel cromosoma del batterio (*profago*), replicandosi ogni volta che il batterio (detto *lisogeno*) si moltiplica, senza ucciderlo. Questa seconda possibilità viene scelta, di solito, quando i batteriofagi assalgono in grande numero un batterio.

La struttura dei batteriofagi può variare, ma in prevalenza essi mostrano un *capside* icosaedrico fatto di proteine, un *collare* e almeno 4 o 5 filamenti terminali uniti da una *piastra basale*, con i quali si attaccano all'ospite, perforandone la membrana aiutati da enzimi (lisozima). L'acido nucleico (DNA o RNA) contenuto nella testa viene iniettato nel batterio mediante contrazioni. Il numero di geni di un batteriofago può variare da quattro a diverse centinaia.

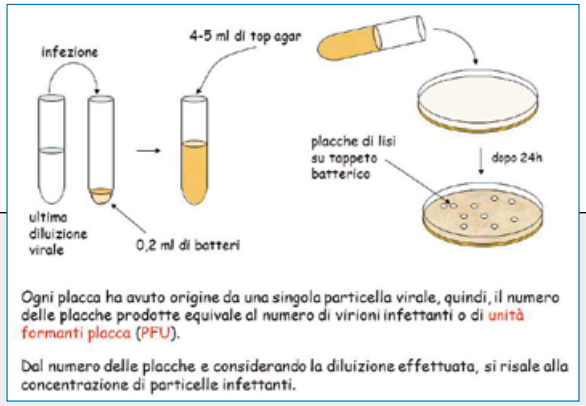
(da http://curba.racine.ra.it)



(da http://curba.racine.ra.it)

Il problema dell'**antagonismo con i batteri lattici** è uno degli aspetti dei batteriofagi più studiati. Conoscere la resistenza ai fagi è fondamentale per i produttori di *starter* destinati alla fermentazione del latte nell'**industria casearia**. La conferma sperimentale dell'azione distruttiva sui batteri arrivò nel 1939 con **Ellis** e **Delbrück**, che svilupparono la *tecnica delle placche* per valutare la quantità di fagi presenti. Nell'impiego di colture *starter* selezionate è importante che esse siano costituite da più ceppi microbici a diversa sensibilità ai fagi e che sia adottata in caseificio una strategia di avvicendamento delle colture ("*rotazione fagica*").

Scopo della rotazione degli innesti è di mantenere a livelli costantemente bassi tutti i possibili biotipi fagici presenti in quell'ambiente, per garantire le *performance* produttive. Oggi nella fabbricazione industriale di *yogurt* e formaggi si usa abbinare la rotazione degli *starter* all'inoculo diretto della coltura *starter* in caldaia per ridurre al massimo la possibile contaminazione da fagi. La selezione di lattobacilli fago-resistenti è basata su un essenziale pre-requisito, cioè ottenere ceppi resistenti ai fagi ma in possesso delle medesime attitudini tecnologiche del ceppo originario. Molto spesso si ricorre alla selezione in laboratorio, che consiste nel porre a contatto il ceppo di interesse con uno o più fagi attivi sul ceppo stesso e, dopo incubazione e lisi, nel cercare di isolare in piastra cloni di lattobacilli resistenti.



Tecnica delle placche di lisi - Ammettendo che ciascuna placca abbia origine da un singolo batteriofago, tenuto conto della diluizione allestita, si stima la quantità di fagi (o *unità formanti placca*, PFU) pari al numero delle placche contate.

Il conteggio dei batteriofagi nel **settore lattiero-caseario o delle carni fermentate** si effettua solitamente in terreno solido (MRS o altro terreno agarizzato similare) sulla base del numero di placche di lisi formatesi addosso alla coltura del ceppo sensibile. Un problema si presenta con i fagi di lattobacilli termofili, che spesso non formano placche di lisi, rendendone difficile la conta. Purtroppo la maggior parte delle tecnologie prevede l'utilizzo di colture lattiche termofile (*optimum* di sviluppo a +37 /45°C), formate da *S. thermophilus* da solo o in associazione con altri lattobacilli termofili (*L. helveticus, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e subsp. *lactis*; *Lactobacillus fermentum*, ecc.) (www.lattenews.it)

A sinistra è riprodotto un fago temperato[1] di *Lactobacillus delbrueckii* visto al microscopio elettronico. Alcuni batteriofagi (ad esempio, del biotipo T o del biotipo λ, *lambda*) sono stati presi a modello di studio più di altri.

A destra, una piastra di Petri con una coltura di batteri lattici risultata infetta da batteriofagi, resi visibili dalla formazione di placche circolari di lisi trasparenti.

La tipizzazione fagica delle salmonelle e la ricerca nelle acque

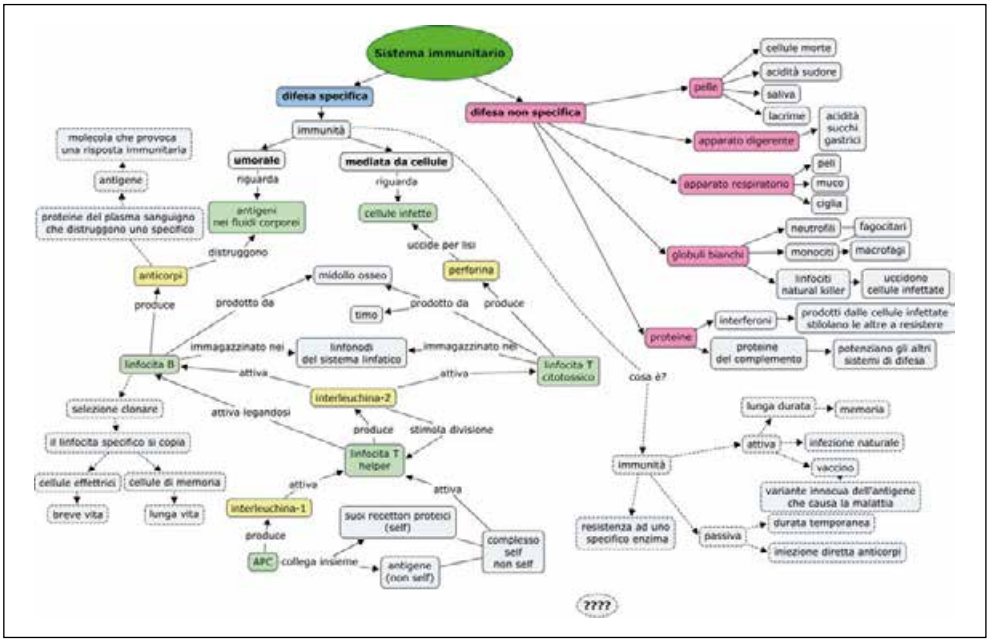
L'utilizzazione dei sieri non è sufficiente a differenziare i diversi tipi all'interno della stessa specie, in quanto essi possono avere lo stesso mosaico antigenico somatico e ciliare. Si ricorre allora aIla tipizzazione fagica, soprattutto per alcuni sierotipi particolarmente diffusi o interessanti sotto il profilo epidemiologico, come è avvenuto inizialmente per la *S. Typhi*, seguita dalla *S. Paratyphi B,* dalla *S. Typhimurium* e dalla *S. Wien*. Di un certo valore epidemiologico è anche la **ricerca dei batteriofagi anti-salmonella nelle acque** di scarico o di superficie, dalle quali con opportuni ceppi marcatori è possibile isolare i batteriofagi. Questo tipo di ricerca è utile quando si voglia controllare l'efficacia dei trattamenti di potabilizzazione delle acque per valutare il grado di abbattimento dei microorganismi più resistenti ai trattamenti stessi (da Ann. ISTISAN 1977, *12*, 537-540).

NOTA INTRODUTTIVA ALLE PAGINE SEGUENTI

Gli argomenti di Microbiologia e di Virologia trattati in questo quaderno non potevano andare disgiunti da quanto l'Immunologia ha scoperto negli ultimi cento anni. Pertanto si è ritenuto **opportuno introdurre alcune nozioni sul sistema immunitario nell'uomo**, prendendo il materiale da www.my-personaltrainer.it e da L.P. GARTNER & J.L. HIATT, *Color Atlas and Text of Histology*, Wolters Kluver/Lippincott Willam & Wilkins ed., Philadelphia, USA , 2014

[1] I batteriofagi "*temperati*" possono interrompere il loro *ciclo lisogenico*, spontaneamente o per effetto di trattamenti (come il calore o i raggi UV) e iniziare un *ciclo litico*.

IL SISTEMA IMMUNITARIO



(da https://medicinaonline.co)

Ha lo scopo di difendere l'organismo dagli invasori esterni (**virus, batteri, funghi** e **parassiti**), che possono penetrare al suo interno attraverso l'aria inalata, il cibo ingerito, i rapporti sessuali, le ferite ecc., oltre ai patogeni (microrganismi potenzialmente in grado di provocare malattia).

Il sistema immunitario ha tre funzioni principali: • protegge l'organismo dagli agenti patogeni (invasori esterni che causano malattie) • rimuove le cellule ed i tessuti danneggiati o morti ed i globuli rossi invecchiati • riconosce e rimuove le cellule anomale, come quelle tumorali (neoplastiche) • Nel suo insieme rappresenta una complessa rete integrata costituita da tre componenti essenziali che contribuiscono all'immunità:	• **organi** • **cellule** • **mediatori chimici**

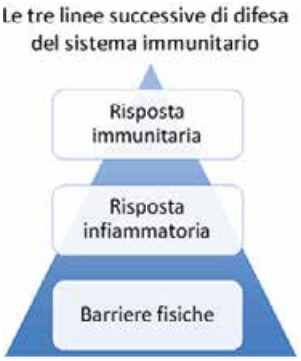
1. **organi** localizzati in diverse parti del corpo (milza, timo, linfonodi, tonsille, appendice) e tessuti linfatici. Si distinguono:
   a) **organi linfatici primari** - Il midollo osseo e, nel caso dei linfociti T, il timo costituiscono la sede in cui i leucociti (globuli bianchi) si sviluppano e maturano.
   b) **organi linfatici secondari** - Catturano l'antigene e rappresentano la sede in cui i linfociti possono incontrare ed interagire con esso; mostrano un'architettura reticolare che intrappola materiale estraneo presente nel sangue (milza), nella linfa (linfonodi), nell'aria (tonsille ed adenoidi) e nel cibo o acqua (appendice vermiforme e placche di Peyer nell'intestino).
   I linfonodi svolgono un ruolo molto importante nell'elaborazione della risposta immunitaria.

2. **cellule isolate presenti nel sangue e nei tessuti**: le principali sono i globuli bianchi o leucociti eosinofili, basofili/mastociti, neutrofili, monociti/macrofagi, linfociti/plasmacellule) e le cellule dendritiche.
3. **sostanze chimiche che coordinano ed eseguono le risposte immunitarie**: tramite queste molecole, le cellule del sistema immunitario sono in grado di interagire scambiandosi segnali che ne regolano reciprocamente il livello di attività; tale interazione è permessa da specifici recettori di riconoscimento e dalla secrezione di sostanze, genericamente note come **citochine**.

Linfociti	Mediano l'immunità acquisita, combattono specifici agenti virali e cellule tumorali (linfociti T citotossici) e coordinano l'attività dell'intero sistema immunitario (linfociti T *helper*)
Monociti	Maturano divenendo macrofagi dotati di attività fagocitaria e di stimolo nei confronti dei linfociti T
Neutrofili	Fagocitano i batteri e rilasciano citochine
Basofili	Rilasciano istamina, eparina (un anticoagulante), citochine ed altre sostanze chimiche coinvolte nella risposta allergica ed immunitaria
Mastociti	Globuli bianchi basofili coinvolti nella risposta allergica, nell'asma e nella resistenza nei confronti dei parassiti
Eosinofili	Combattono i parassiti e partecipano alle reazioni allergiche
Cellule dendritiche	Globuli bianchi che attivano il sistema immunitario catturando gli antigeni ed esponendoli all'azione delle cellule "*killer*" (i linfociti T). Si concentrano a livello dei tessuti che fungono da barriera con l'ambiente esterno.

L'attività protettiva del sistema immunitario viene esercitata attraverso una triplice linea difensiva che garantisce l'**immunità**, cioè la *capacità di difendersi dalle aggressioni di, batteri, virus ed altri patogeni, per evitare malattie*.

1. Barriere Meccaniche e Chimiche
2. Immunità Innata o Aspecifica
3. Immunità Acquisita o Specifica



Barriere Meccaniche e Chimiche

Il primo meccanismo di difesa dell'organismo è rappresentato dalle barriere meccanico-chimiche, che hanno lo scopo di impedire la penetrazione degli agenti patogeni nell'organismo.

Cute integra	La cheratina presente nella porzione più superficiale dell'epidermide (strato corneo) non è digeribile né oltrepassabile dalla maggior parte dei microrganismi.
Sudore	Il pH acido del sudore, conferito dalla presenza di acido lattico, associato ad una piccola quota di anticorpi, ha un'efficace azione antimicrobica.
Lisozima	Enzima presente in lacrime, secrezioni nasali e saliva, in grado di distruggere la membrana cellulare dei batteri.
Sebo	L'olio prodotto dalle ghiandole sebacee esercita un'azione protettiva sulla cute, accrescendone l'impermeabilità ed esercitando una lieve azione antibatterica (potenziata dal pH acido del sudore).
Muco	Sostanza viscosa, biancastra, secreta delle membrane mucose dell'apparato digerente, di quello respiratorio, urinario e genitale. Protegge dai microrganismi inglobandoli e mascherando i recettori cellulari con i quali interagiscono.

Epitelio ciliato	È in grado di fissare e trattenere i corpi estranei, filtrando l'aria. Inoltre, facilita l'espulsione del **catarro** e dei microrganismi in esso inglobati.
pH acido dello stomaco	Ha funzione disinfettante, poiché distrugge molti microrganismi introdotti con gli alimenti.
Microorganismi commensali intestinali	Impediscono la proliferazione dei batteri patogeni, sottraendo il loro nutrimento, occupando i possibili siti di adesione alle pareti intestinali e producendo sostanze antibiotiche attive.
Spermina	Le secrezioni prostatiche hanno azione battericida.
Microorganismi commensali vaginali	In condizioni normali nella vagina è presente una flora batterica saprofita che, insieme al pH leggermente acido, previene l'eccessiva crescita di germi patogeni.
Temperatura corporea	La temperatura inibisce la crescita di alcuni patogeni, specie in presenza di febbre, la quale stimola anche l'intervento delle cellule immunitarie.

La risposta immunitaria

Se le prime barriere difensive falliscono ed il patogeno penetra nell'organismo si attiva la **risposta immunitaria** interna, di due tipi:

- **risposta immunitaria innata (o aspecifica)**: meccanismo di difesa generale, presente sin dalla nascita, che agisce rapidamente (minuti od ore) ed indiscriminatamente contro qualsiasi agente esterno;
- **risposta immunitaria acquisita (o specifica o adottiva)**: si sviluppa lentamente dopo il primo incontro con uno specifico agente patogeno (nell'arco di alcuni giorni), ma conserva una certa memoria per agire più rapidamente in seguito ad ulteriori esposizioni.

Immunità innata	**Immunità specifica**
• Non dipende dall'esposizione ad agenti infettivi o a molecole estranee • Aspecifica • Riconosce strutture comuni • Sempre operativa • Sempre uguale, previene l'infezione • Rapidamente attivabile	• È indotta dall'esposizione ad agenti infettivi o molecole estranee • Specifica • Riconosce strutture specifiche • Consegue al contatto • Potenziata da contatti ripetuti • Richiede l'infezione • Attivazione più lenta
Cellule dell'immunità innata	**Cellule dell'immunità specifica**
• Macrofagi • Granulociti – Neutrofili – Basofili – Eosinofili • Linfociti *natural killer*	• Linfociti – Linfociti B – Immunità Umorale (anticorpi) – Linfociti T – Immunità Cellulo-Mediata

Entrambi i tipi di risposta immunitaria sono strettamente interconnessi e coordinati; la risposta *innata* è rinforzata dalla risposta *acquisita* antigene-specifica, che ne aumenta l'efficacia. Nell'insieme la risposta immunitaria risultante procede secondo le seguenti fasi:

1. FASE DI RICONOSCIMENTO DELL'ANTIGENE: individuazione ed identificazione della sostanza estranea
2. FASE DI ATTIVAZIONE: comunicazione del pericolo alle altre cellule immunitarie; reclutamento di altri componenti del sistema immunitario e coordinamento dell'attività immunitaria complessiva
3. FASE EFFETTRICE: attacco e distruzione dell'agente patogeno.

Immunità innata (o naturale o aspecifica)

Questo meccanismo è attivo verso tutti i microrganismi (riconosce, per esempio, il lipo-polisaccaride della membrana batterica dei Gram-negativi). Presente fin dalla nascita e per questo detta innata, l'immunità aspecifica non ha alcun tipo di memoria nei confronti di precedenti incontri con patogeni. Inoltre, non si rafforza in seguito a nuovi ed ulteriori contatti con lo stesso patogeno. Non appena i microrganismi riescono ad oltrepassare le barriere meccanico-chimiche, l'immunità aspecifica si attiva rapidamente e contribuisce a neutralizzarli bloccando molte infezioni ed impedendone l'evoluzione in malattia. Questa capacità è legata alla presenza:

1. di particolari cellule, come i **granulociti** neutrofili e i **monociti**;
2. di alcune sostanze particolari da essi prodotte che richiamano altre cellule del sistema immunitario.

Cos'è un antigene: la funzionalità stessa del sistema immunitario implica la capacità di distinguere le cellule innocue da quelle pericolose, risparmiando le prime ed attaccando le seconde. La distinzione tra l'inoffensivo ed il pericoloso è permessa dal riconoscimento di particolari macromolecole di superficie, dette antigeni, che hanno una struttura unica e ben definita, per esempio, il lipo-polisaccaride della parete batterica.
Gli antigeni sono sostanze riconosciute come estranee (*non self*) e per questo in grado di indurre una risposta immunitaria e di interagire con il sistema immunitario.

- L'**epitopo** è la porzione specifica di un antigene, riconosciuta dall'anticorpo.
- L'**aptene** è un antigene in grado di indurre una risposta immunitaria solo se coniugato ad un *carrier*.
- L'**allergene** è un elemento estraneo all'organismo di per sé non-patogeno, ma comunque in grado di causare malattia allergica in alcuni individui come conseguenza dell'induzione di una risposta immunitaria; ne sono esempi gli acari della polvere, i pollini e le muffe.
- Gli **auto-anticorpi** sono anticorpi anomali diretti contro una o più sostanze proprie dell'organismo; sono un elemento fondamentale delle malattie autoimmuni.

1) Fattori cellulari

Le cellule dell'immunità innata

1. Fagociti, ovvero Macrofagi e Neutrofili: Fagocitano detriti/patogeni.
2. *Natural Killer*: Colpiscono le cellule infettate da virus e quelle tumorali.
3. Cellule dendritiche: presentano l'antigene (cellule APC) attivando i linfociti T citotossici
4. Eosinofili: agiscono sui parassiti.
5. Basofili: simili ai Mastociti. Coinvolti nelle reazioni infiammatorie ed allergiche.

LE CELLULE DEL SANGUE (da Gartner & Hiatt, 2014)

Elemento	*Diametro Mm*	*Numero/Mm³*	*% Sui Leucociti*	*Granuli*	*Nucleo*	*Funzione*
Eritrociti	7-8	$5x10^8$ (maschi) $4.5x10^8$ (femmine)	-	Nessuno	Nessuno	Trasporto O_2 e CO_2
Linfociti	8-10	1.500-2.500	20-25	Solo azzurrofili	Largo, rotondo, eccentrico	Risposta immunitaria
Monociti	12-15	200-800	3-8	Solo azzurrofili	Largo, a forma di rene	Fagocitosi

Neutrofili	9-12	3.500-7.000	60-70	Azzurrofili e piccoli, specifici (neutrofili)	Polimorfo	Fagocitosi
Eosinofili	10-14	50-400	2-4	Azzurrofili e larghi, specifici (eosinofili)	Bilobato (a forma di salsiccia)	Fagocitosi dei complessi antigene-anticorpo e controllo delle malattie parassitarie
Basofili	8-10	50-100	0.5-1	Azzurrofili e larghi, specifici (basofili)	Largo, a forma di S	Talvolta fagocitosi
Piastrine	2-4	250.000-400.000	-	granulomeri	Nessuno	Agglutinazione e coagulazione

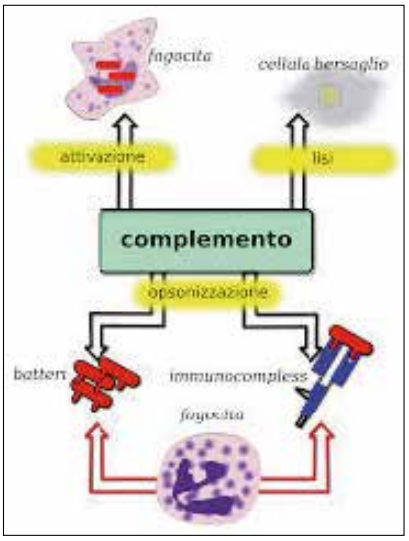
1. **Fagociti**: riconoscono gli invasori tramite specifici recettori di superficie, li inglobano e li distruggono digerendoli nei ***lisosomi*** (*fagocitosi*); inoltre, richiamano altre cellule del sistema immunitario secernendo *citochine*.
   I principali fagociti sono i macrofagi tissutali ed i neutrofili.
   - **Macrofagi**: dotati di spiccata attività fagocitaria, derivano dai monociti prodotti nel midollo osseo e circolanti nel sangue. Sono presenti in tutti i tessuti e particolarmente concentrati in quelli più esposti a possibili infezioni, come gli alveoli polmonari. I **neutrofili**, invece, circolano nel sangue e penetrano solo nei tessuti infetti. I Macrofagi, dopo aver fagocitato e demolito le particelle estranee, ne rielaborano alcuni frammenti presentandoli poi sulla loro superficie assieme alle proteine del *complesso maggiore di istocompatibilità (MHC-II)*; per questo, appartengono al gruppo delle cosiddette APC, cellule presentanti l'antigene.
   - **Granulociti Neutrofili o Leucociti (polimorfo) nucleati (PMN)**: sono cellule ematiche capaci di uscire dai vasi per migrare nei tessuti dove si è verificata l'infezione e fagocitare, distruggendoli, microrganismi, detriti e cellule cancerose. Sono capaci di agire anche in condizioni di anaerobiosi. Muoiono nel sito di infezione formando pus.
2. **Linfociti NK - Sinonimi: *cellule natural Killer* (NK)**: vengono così definiti i Linfociti T che, una volta attivati, emettono delle sostanze in grado di neutralizzare le cellule infettate da virus e quelle tumorali. Stimolati da alcune citochine, i linfociti *natural killer* fanno sì che le cellule infettate da virus od anomale si "suicidino" secondo un meccanismo noto come apoptosi. I linfociti NK hanno anche la capacità di secernere varie **citochine antivirali**, tra cui gli **interferoni**.
   A differenza degli altri tipi di linfociti (B e T), caratteristici della risposta immunitaria acquisita, il linfociti NK non riconoscono specificamente l'antigene (non hanno recettori specifici) e per questo fanno parte dell'immunità innata.
3. **Cellule dendritiche**: a differenza dei macrofagi e dei neutrofili, non sono in grado di fagocitare l'antigene, ma lo catturano e lo espongono sulla propria superficie in seguito all'interazione con esso (per questo appartengono al gruppo delle cellule APC, presentanti l'antigene). In questo modo l'antigene esternalizzato viene riconosciuto delle cellule "*killer*", i linfociti T citotossici che danno via alla risposta immunitaria specifica. Non a caso, le cellule dendritiche si concentrano a livello di quei tessuti che fungono da barriera con l'ambiente esterno, come la pelle ed il rivestimento interno di naso, polmoni, stomaco ed intestino.

Dopo aver ricoperto il ruolo di "sentinelle" (intercettando gli antigeni ed esponendoli sulla loro superficie), le cellule dendritiche migrano nei linfonodi dove avviene l'incontro con i linfociti T.

NOTA - Le cellule dell'immunità innata esprimono in modo costitutivo sulla loro superficie più recettori, ognuno dei quali riconosce più di una ben definita struttura microbica; da qui derivano le loro capacità di riconoscimento multiplo aspecifico.

2) Fattori umorali

- **Chemiotassine**: attirano altri fagociti, alcune stimolano la proliferazione di linfociti B e T, altre producono sonnolenza.
- **Prostaglandine**: producono l'aumento della temperatura corporea a un livello intollerabile ai patogeni e che stimola le difese, tra cui la febbre.
- **Il complemento**: contiene proteine plasmatiche prodotte dal fegato, normalmente presenti in forma inattiva; sono assimilabili a messaggeri che sincronizzano le comunicazioni tra le varie componenti del sistema immunitario. Le citochine circolano nel sangue e vengono sequenzialmente attivate, con un meccanismo a cascata (l'attivazione di una innesca quella delle altre) in presenza di stimoli appropriati. Quando si attivano, le citochine scatenano una serie di reazioni enzimatiche a catena che fanno acquisire ad alcuni componenti del sistema immunitario particolari caratteristiche. Per esempio, attirano i fagociti e i linfociti B e T nel sito di infezione tramite un meccanismo detto chemiotassi. Il sistema del complemento possiede inoltre una capacità intrinseca di ledere le membrane degli agenti patogeni provocando su di esse pori che portano alla lisi. Infine, il complemento ricopre le cellule batteriche «etichettandole» (*opsonizzazione*) come patogene, facilitando l'azione dei fagociti (macrofagi e neutrofili) i quali le riconoscono e le distruggono. L'attivazione del complemento è un meccanismo comune sia all'immunità innata che a quella acquisita. Esistono infatti tre vie distinte di attivazione del complemento: 1) la via classica, mediata dagli anticorpi (immunità specifica); 2) la via alternativa, attivata direttamente da alcune proteine delle membrane cellulari dei microbi (immunità innata); 3) la via lectinica (utilizza il mannosio come sito di attacco alle membrane dei patogeni).



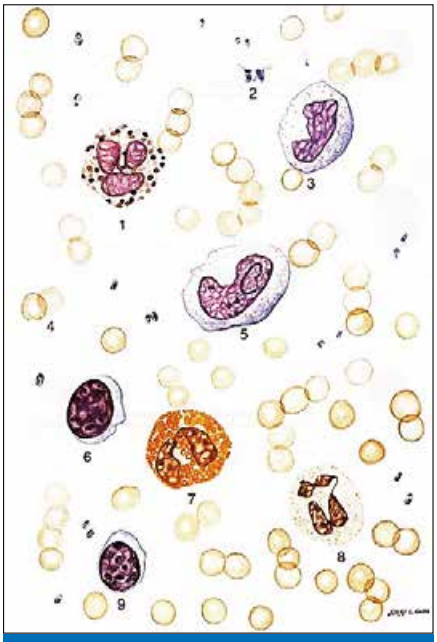
- Le **opsonine** sono delle macromolecole che, se rivestono un microrganismo, aumentano enormemente l'efficienza della fagocitosi in quanto vengono riconosciute da recettori espressi sulla membrana dei fagociti. Oltre alle opsonine derivanti dall'attivazione del complemento (il più noto è il **C3b**), uno dei sistemi di opsonizzazione più potenti è rappresentato dagli anticorpi specifici che ricoprono il microrganismo e che sono riconosciuti dal recettore per Fc dei fagociti. Gli anticorpi (o immunoglobuline) rappresentano il meccanismo di difesa umorale dell'immunità acquisita.

- **Sistema degli interferoni (IFN)**: citochine prodotte dai linfociti NK e da altri tipi di cellule, così chiamate per la loro capacità di interferire con la riproduzione virale. Gli interferoni facilitano l'intervento delle cellule che partecipano alla difesa immunitaria e alla reazione infiammatoria.
  Esistono vari tipi di **interferone** (IFN-α IFN-β IFN-γ), prodotti da alcuni linfociti T dopo il riconoscimento di un antigene. Gli interferoni sono attivi contro i virus, ma non li attaccano direttamente, bensì stimolano le altre cellule a resistere ad essi; in particolare:
  – agiscono sulle cellule non ancora infettate inducendo uno stato di resistenza all'attacco virale (interferone alfa ed interferone beta);
  – contribuiscono ad attivare le cellule *natural killer* (NK);
  – stimolano i macrofagi ad uccidere le cellule tumorali o infettate da virus (interferone gamma);
  – inibiscono la crescita di alcune cellule tumorali.
- **Interleuchine**: fungono da messaggeri chimici "a corto raggio d'azione", agendo specialmente tra cellule adiacenti:
- **Fattori di necrosi tumorale**: secreti dai macrofagi e dai linfociti T in risposta all'azione delle interleuchine IL-1 e IL-6; permettono di alzare la temperatura corporea, dilatare i vasi sanguigni ed aumentare il tasso catabolico.

L'**infiammazione** è una reazione caratteristica dell'immunità innata, molto importante per combattere l'infezione in un tessuto danneggiato:

1. attrae le sostanze e le cellule immunitarie nel luogo dell'infezione;
2. produce una barriera fisica che ritarda la diffusione dell'infezione;
3. ad infezione risolta, promuove processi di riparazione del tessuto danneggiato.

La **risposta infiammatoria** è scatenata dalla cosiddetta *degranulazione dei mastociti*, cellule presenti nel tessuto connettivo che in seguito all'insulto liberano istamina ed altre sostanze chimiche, le quali aumentano il flusso sanguigno e la permeabilità dei capillari e stimolano l'intervento dei globuli bianchi. I sintomi tipici dell'infiammazione sono l'arrossamento, il dolore, il calore e il gonfiore dell'area infiammata. Oltre che dalle infezioni, la risposta infiammatoria può essere innescata anche da punture, ustioni, lesioni ed altri stimoli che danneggiano i tessuti. I principali attori cellulari del sistema immunitario che intervengono nell'infiammazione sono i neutrofili ed i macrofagi.



1 = basofili **2 = piastrine** **3 = monociti**
4 = eritrociti **5 = monociti** **6 = linfociti**
7 = eosinofili **8 = neutrofili** **9 = linfociti**

Immunità specifica o acquisita o adattativa

La terza linea difensiva è rappresentata dall'immunità specifica. Al contrario della precedente, non è presente alla nascita, ma viene acquisita con il passare del tempo. È inoltre specifica per un determinato microrganismo, in particolare verso alcune molecole ben precise (antigeni) del patogeno.

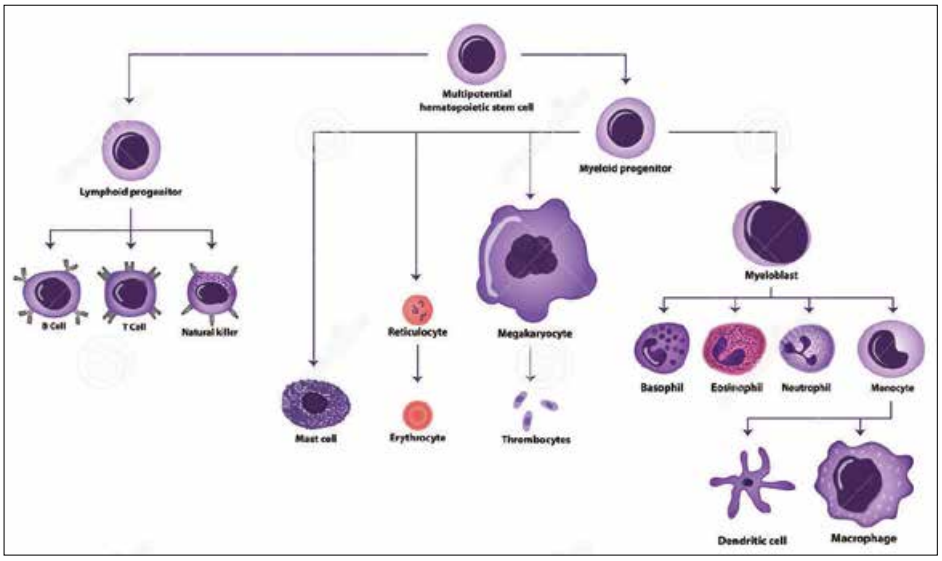
L'immunità acquisita si rafforza a seguito di ulteriori contatti con lo stesso patogeno (comparsa di memoria del riconoscimento effettuato). Interviene soltanto quando le altre linee di difesa non sono riuscite a contrastare efficacemente il patogeno. Essa si sovrappone all'immunità innata potenziando la risposta immunitaria: le citochine infiammatorie richiamano linfociti nella sede della reazione immunitaria e questi ultimi rilasciano poi le proprie citochine alimentando e potenziando la risposta infiammatoria specifica. Si distinguono due tipi di risposta immunitaria acquisita:

- **immunità umorale** (o mediata da anticorpi): è **mediata da linfociti B** che **si trasformano in plasmacellule che sintetizzano e secernono anticorpi**
- **cellulo-mediata** (o mediata da cellule): **mediata principalmente dai linfociti T** che attaccano direttamente l'antigene invasore (intervento dei linfociti T *helper* e citotossici)

L'immunità umorale acquisita può anche essere suddivida in *attiva* (è l'organismo stesso a produrre anticorpi in risposta all'esposizione agli agenti patogeni) e *passiva* (gli anticorpi vengono acquisiti da un altro organismo, ad esempio dalla madre durante la vita fetale o tramite vaccinazione).

1) Fattori umorali

- **Immunoglobuline (anticorpi):** alcuni microrganismi hanno sviluppato degli stratagemmi per alterare i propri marcatori di superficie, divenendo "*invisibili*" agli occhi dei fagociti e perdendo la capacità di attivare il complemento. Per combattere questi patogeni il sistema immunitario produce anticorpi specifici contro di essi, etichettandoli come pericolosi agli occhi dei fagociti (*opsonizzazione*). Gli anticorpi rivestono gli antigeni facilitandone il riconoscimento e la fagocitosi da parte delle cellule immunitarie. La funzione degli anticorpi è quindi quella di trasformare le particelle non riconoscibili in "*cibo*" per i fagociti.



Gli anticorpi fanno parte delle globuline (proteine plasmatiche globulari) presenti nel sangue e prendono il nome di immunoglobuline. Vengono catalogati in 5 classi, ovvero: **IgA, IgD, IgE, IgG e IgM**. Gli anticorpi possono anche legare ed inattivare alcune tossine batte-

riche e concorrono ad alimentare l'infiammazione attivando il complemento ed i mastociti. Gli antigeni immunogeni sono molecole in grado di stimolare la sintesi di anticorpi; in particolare tutte queste molecole presentano una piccola parte in grado di legarsi al suo specifico anticorpo. Tale porzione, detta *epitopo*, differisce generalmente da antigene ad antigene. Ne consegue che ogni anticorpo riconosce ed è sensibile solo ad uno o più epitopi specifici e non all'intero antigene.

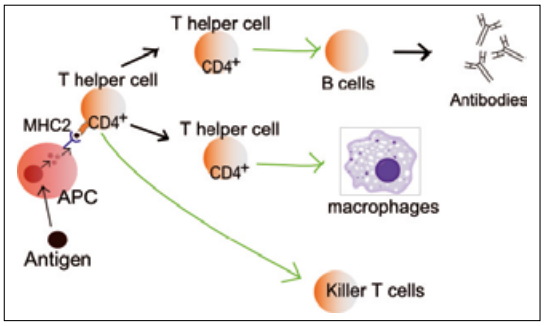
2) Fattori cellulari

Le cellule principalmente coinvolte nell'instaurarsi dell'immunità acquisita sono le cellule che presentano l'antigene (le cosiddette APC, *Antigen-Presenting-Cells*) e i linfociti.

Linfociti

- **Linfociti B e T**: i linfociti B originano e maturano nel midollo osseo, mentre i linfociti T originano nel midollo osseo, ma migrano e maturano nel timo. Tali organi vengono chiamati organi linfoidi primari e, oltre alla produzione, sono deputati anche alla maturazione di questi linfociti. Durante il proprio sviluppo, ogni linfocita sintetizza un tipo di *recettore di membrana* che può legarsi solo ad un determinato antigene. Il legame tra antigene e recettore dà dunque luogo all'attivazione del linfocita, che a quel punto comincia a dividersi ripetutamente; si formano in questo modo linfociti con recettori identici a quello che aveva riconosciuto l'antigene: tali linfociti sono detti **cloni** e il processo con il quale si formano è detto *selezione clonale*. in seguito all'attivazione dei linfociti si formano sia **cellule effettrici** che parteciperanno attivamente alla risposta immunitaria sia **cellule della memoria**, che hanno il compito di riconoscere l'antigene in caso di eventuale successiva invasione:
  – **cellule effettrici**: pronte ad affrontare il nemico e a distruggerlo
  – **cellule della memoria:** non attaccano l'agente estraneo ma entrano in uno stato di quiescenza, pronte ad intervenire ad un successivo attacco dello stesso identico antigene.

  Milza, tonsille, linfonodi e tessuto linfoide associato alle mucose degli apparati respiratorio e digerente costituiscono gli organi linfoidi secondari. Essi ospitano macrofagi e linfociti T e B che stazionano temporaneamente in questa sede durante il processo di circolazione del sangue. I linfociti T e B entrano in contatto con gli antigeni proprio durante la loro permanenza negli organi linfoidi secondari.



  I Linfociti B esprimono immunogobuline (Anticorpi, *Ab*), mentre i Linfociti T esprimono recettori; entrambi fungono da recettori di membrana.
- **Linfociti B**: riconoscono direttamente l'antigene tramite anticorpi di superficie; una volta attivati vanno incontro in parte a proliferazione e maturazione in cellule specializzate che secernono gli anticorpi (dette **plasmacellule**, vere e proprie "*fabbriche di anticorpi*") e in parte in *cellule della memoria* (che hanno la stessa funzione delle precedenti, ma sono più longeve e per questo continuano a circolare per periodi molto più lunghi rispetto alle plasmacellule, a volte anche per tutta la vi-

ta dell'organismo). Le cellule della memoria garantiscono una rapida produzione di anticorpi qualora si ripresentasse un certo agente patogeno per la seconda volta. Ogni linfocita B esprime sulla propria membrana qualcosa come 150.000 anticorpi (recettori) identici e specifici per lo stesso antigene. Il legame antigene-anticorpo è estremamente specifico: esiste un anticorpo per ogni possibile antigene. Una plasmacellula matura può produrre fino alle 30.000 molecole di anticorpi al secondo.
L'attivazione dei linfociti B richiede lo stimolo dei linfociti T *helper*. I linfociti B riconoscono l'antigene in forma nativa, mentre i linfociti T riconoscono l'antigene processato da cellule accessorie (APC).

- **Linfociti T**: interagiscono direttamente con le cellule del nostro corpo che risultano infettate o alterate. Essi contribuiscono all'eliminazione dell'antigene:
  – direttamente, con attività citotossica nei confronti delle cellule infettate da virus;
  – indirettamente, attivando Linfociti B o i macrofagi. Sono presenti in due principali sottopopolazioni: T *helper* (T_H) ($CD4^+$) e T citotossici (T_C) ($CD8^+$).

– I **linfociti T *helper*** presiedono alla regolazione di tutte le risposte immuni per mezzo del rilascio di citochine che aiutano i linfociti B ed i linfociti T citotossici. Hanno quindi una funzione di coordinamento:
  - presentano i recettori di membrana CD4;
  - riconoscono antigeni presentati dal MHC II;
  - inducono differenziamento dei linfociti B in plasmacellule (quest' ultime produttrici di anticorpi);
  - regolano l'attività dei linfociti T citotossici;
  - attivano i macrofagi;
  - secernono le citochine (interleuchine);
  - esistono diversi sottotipi di linfociti T *helper*; ad esempio i Th1 sono importanti nel controllo dei batteri patogeni intracellulari tramite l'attivazione di macrofagi.

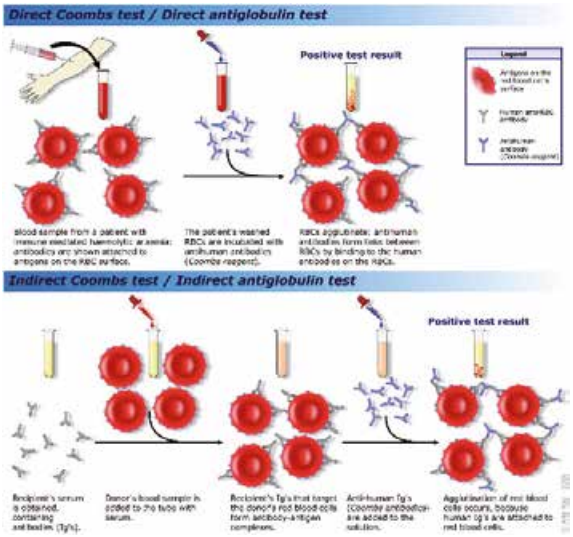
– I **linfociti T citotossici** (T_C) ($CD8^+$) presiedono alla risposta immune cellulo-mediata ed esercitano un'azione tossica contro le loro specifiche cellule bersaglio (cellule infettate e cellule tumorali). Hanno quindi una funzione di **demolizione di cellule estranee**:
  - presentano la molecola di membrana CD8;
  - riconoscono gli antigeni presentati dal MHC I;
  - colpiscono selettivamente cellule infettate da virus e cancerogene;
  - sono regolati dai T *helper*.

I linfociti T citotossici liberano anche potenti sostanze chimiche, le **linfochine**, che attirano i macrofagi e stimolano e facilitano la fagocitosi (attaccano direttamente la cellula estranea provocando dei fori, che facilitano il lavoro dei macrofagi). Quando un'infezione è stata sconfitta, l'attività del linfociti B e T viene bloccata grazie all'azione di altri **linfociti T detti soppressori** che, appunto, sopprimono la risposta immunitaria: tuttavia, questo processo non è del tutto chiaro. I linfociti B riconoscono antigeni in fase solubile, mentre i linfociti T non possono legarsi agli antigeni a meno che essi non esibiscano sulle loro membrane cellulari sequenze proteiche MHC di classe I. I linfociti T, pertanto, riconoscono antigeni presentati dalle «APC» (*Antigen-Presenting-Cells*).

Gli strumenti del sistema immunitario acquisito per riconoscere i specifici antigeni sono quindi tre:

- **Immunoglobuline** o **Anticorpi**
- Recettori delle **cellule T**
- Complesso maggiore di istocompatibilità e proteine **MHC** su **APC** (cellule che presentano l'antigene).

Da tre secoli l'Immunologia parla molto *british*



Edward Jenner (1749-1823) è riuscito a provare l'efficacia della vaccinazione contro il vaiolo inoculando un bambino con il virus bovino (1796)

Alexander Glenny (1882-1965) presso i laboratori di ricerca della Wellcome riferisce sui vantaggi dell'allume, un adiuvante-chiave nell'immunizzazione contro la difterite (1926)

Delphine Parrott (1928-2016) ha chiarito definitivamente la funzione delle cellule T, studiando il timo (fra il 1960 e il 1980)

Rodney & **Gerald Edelman** hanno scoperto che la specificità dell'anticorpo è dovuta a una struttura comune di base con milioni di variazioni possibili, prodotte dalle sequenze aminoacidiche nelle braccia del cromosoma Y, ricevendo il premio Nobel (1972)

Brigitte Askonas (1923-2013) ha trovato che i linfociti B producono anticorpi come componente della risposta immunitaria ed ha aumentato la comprensione circa l'immunità umorale e cellulare (1965-1970)

Robin Coombs, Arthur Mourant e Rob Race mettono a punto un *test (*che prende il nome da Coombs) per riconoscere gli anticorpi nelle malattie emolitiche immuno-mediate, essenziale anche nelle prove **di compatibilità pre-trasfusionale** (1975)

Milstein, Kohler e **Niels Jerne** hanno diviso il premio Nobel per la scoperta degli anticorpi monoclonali (1984)

Il *test* di Coombs, è una prova di laboratorio utilizzata per rilevare la presenza di anticorpi fissati alla superficie dei globuli rossi (*test* di Coombs diretto) oppure di anticorpi liberi nel siero (*test* di Coombs indiretto).

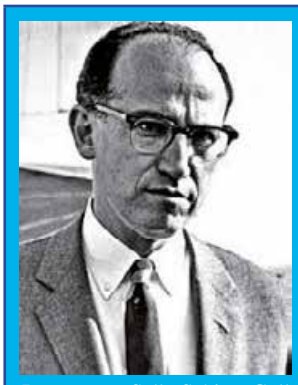
Cellule che presentano l'antigene (APC)

- I fagociti (macrofagi e neutrofili) presentano una modesta abilità intrinseca di legarsi direttamente a batteri e ad altri microrganismi. Tuttavia la loro attività fagocitaria si fa particolarmente pronunciata se il il batterio ha attivato il complemento (grazie alle opsonine C3b). I microrganismi che non attivano il complemento, vengono opsonizzati (etichettati) dagli anticorpi che possono legarsi al recettore *Fc* del fagocita. Gli anticorpi possono anche attivare il complemento e, se sia gli anticorpi che il complemento (C3b) opsonizzazno il patogeno, il legame diventa ancor più solido (l'opsonizzazione, indipendentemente dalla sua origine, aumenta enormemente l'efficienza della fagocitosi).
- Dalla fagocitosi delle molecole estranee originano dei frammenti di antigene che, all'interno del fagocita, vengono combinati con particolari proteine appartenenti al cosiddetto "*complesso maggiore di instocompatibilità*" (**MHC,*Major Histocompatibility Complex***, che nell'uomo viene chiamato **HLA,** *Human Leukocyte Antigen*). È stato scoperto perché coinvolto nell'attecchimento e nel rigetto dei trapianti d'organo e permette di riconoscere il *self* dal *non self*.
- Si tratta di proteine ubiquitarie che hanno la capacità di legarsi a molecole interne alla cellula ed esporle sull'esterno della membrana. I complessi molecolari (frammenti di antigene + molecole MHC II) vengono esposti sulla superficie di alcune cellule, che per questo vengono chiamate **cellule che presentano l'antigene (APC)**. Le cellule APC

(cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B) possono essere paragonate a delle navette che presentano sulla superficie cellulare frammenti proteici derivati dalla digestione di proteine internalizzate dai fagociti combinati con il complesso maggiore di istocompatibilità di classe. Esistono due tipi di molecole MHC:

– le molecole **MHC di classe I** si trovano sulla superficie di quasi tutte le cellule nucleate e fanno in modo che le cellule del corpo "anomale" siano riconosciute dai recettori CD8 dei linfociti T citotossici; è quindi possibile "evitare una strage" cioè impedire che i linfociti citotossici attacchino le cellule sane dell'organismo. Ad esempio, i linfociti *natural killer* riconoscono come *non-self* le cellule con bassa espressione di MHC-I (cellule tumorali), mentre i linfociti T citotossici attaccano soltanto le cellule che presentano complessi antigeni virali MHC-I.
– Le molecole **MHC di classe II**, invece, si trovano solo sulle cellule APC del sistema immunitario, principalmente su macrofagi, linfociti B e cellule dendritiche. Le MHC di classe II presentano peptidi esogeni (derivati dalla digestione dell'antigene) e vengono riconosciute dai recettori CD4 dei linfociti T *helper*.

I peptidi esposti sulla superficie cellulare grazie alle MHC vengono passati al vaglio delle cellule del sistema immunitario, le quali intervengono soltanto se riconoscono tali complessi come "*non-self*".
Dopo l'esposizione del complesso antigene-MHC, le cellule migrano attraverso i vasi linfatici verso i linfonodi, dove attivano altri protagonisti del sistema immunitario; in particolare: Se una cellula T citotossica incontra una cellula-bersaglio che espone frammenti di antigene sul suo MHC-I (cellule nucleate tumorali o infettate da virus) la uccide per prevenirne la riproduzione; Se una cellula T *helper* incontra una cellula bersaglio che espone frammenti di antigene esogeni sul suo MHC-II (fagociti e cellule dendritiche) secerne citochine aumentando la risposta immunitaria (ad esempio attivando il macrofago o il linfocita B che ha presentato l'antigene).



Da sinistra: Salk, Sabin e Gallo

Jonas Edward Salk (1914 – 1995) medico e scienziato statunitense, batteriologo e virologo, realizzatore del primo vaccino antipoliomielite
Albert Bruce Sabin (1906 – 1993) medico e virologo polacco naturalizzato statunitense, famoso per aver sviluppato il più diffuso vaccino orale contro la poliomielite
Robert Charles Gallo (1937) medico, biologo e accademico statunitense, noto soprattutto per aver scoperto nel 1983 il virus HIV di tipo 1, insieme al francese Luc Montagnier

VACCINARE SI PUÒ

Nell'uomo

Il Italia per tutti i **nuovi nati** è prevista la vaccinazione obbligatoria (il cui ciclo inizia di norma nel terzo mese di vita con successivi richiami) contro **difterite**, **tetano**, **poliomielite** ed **epatite B**. Con D.L. 19/05/2017 a queste si sono aggiunte:

– pertosse
– meningite (*H. influenzae* B; meningococco B e C)
– morbillo
– rosolia
– parotite
– varicella

Per gli **adulti**, esistono vaccinazioni (obbligatorie per determinate categorie di persone più a rischio) contro tifo, morbillo/ parotite/rosolia, difterite/ tetano, papillomavirus, influenza, *Herpes zoster*. Per recarsi in determinati paesi in cui è possibile contrarre altre malattie sono necessarie vaccinazioni specifiche, come anti-colera, rabbia, epatite A, febbre gialla ecc.

non è *varicella*

Negli animali

Bovino: rinotracheite infettiva (IBR), diarrea virale (BVD), virus respiratorio sinciziale (BRSV), parainfluenza 3 (PI3), pasteurellosi, rotavirus, coronavirus, clostridiosi, rabbia, *bluetongue* (BTV)
Suino: sindrome riproduttiva e respiratoria (PRRSV), influenza (H1N1 e H3N2), infezione da circovirus-2 (PCV-2), parvovirosi, *Aujeszky disease*, mal rosso, rinite atrofica (*P. multocida* e *B. bronchiseptica*), pleuropolmonite (*A. pleuropneumoniae*), polmonite enzootica (*M. hyopneumoniae*), colibacillosi, leptospirosi
Cavallo: rinopolmonite (EHV-1,4), influenza (H3N8), arterite (EAV), tetano, adenite equina, west nile disease
Ovini e caprini: *bluetongue* (BTV), *lumpy-skin disease*, clostridiosi, clamidiosi, micoplasmosi

Specie aviarie: malattia di Newcastle (NDV), rinotracheite del tacchino (TRT), malattia di Marek (MDV), laringotracheite (ILTV), bronchite infettiva (IBV), corizza, encefalomielite aviaria, malattia di Gumboro (*infectious bursal disease*) (sierotipo 1 IBVD), anemia dei pulcini (CAV), virus della EDS'76, micoplasmosi, *Salmonella Enteritidis* e *Typhimurium*, coccidiosi, influenza aviaria (AI).
Cane: cimurro, parvovirus, epatite infettiva (adenovirus), leptospirosi, parainfluenza, rabbia, leishmaniosi, babesiosi, borreliosi
Gatto: rinotracheite, calicivirosi, gastroenterite infettiva (panleucopenia), leucemia, clamidiosi.

Dopo le esperienze di vaccinazione contro i virus fatte da Jenner, Louis Pasteur ha dato impulso all'immunoprofilassi verso molte importanti patologie infettive degli animali.
Grandi progressi sono stati fatti con il metodo di **Frenkel** (1951) nella produzione del vaccino contro l'afta epizootica *e* contro la poliomielite da **Salk** (1955) e da **Sabin** (1962). Ancor oggi la maggior parte dei vaccini in veterinaria contro virus e batteri sono derivati da ceppi attenuati in laboratorio e prodotti spesso su colture di tessuto. Si deve tuttavia tenere presente che non vi sono ancora vaccini perfetti, soprattutto nel caso dei virus che, come quello dell'influenza, vanno frequentemente incontro a mutazioni geniche, con conseguentie impossibilità di adeguare tempestivamente gli immunogeni protettivi.

(*da* **Patel**, **J. R. & Heldens J. G. M.** , Immunoprophylaxis against important virus diseases of horses, farm animals and birds. *Vaccine 2009, 27, 1797-1810)*

Vaccini

Le malattie infettive possono essere prevenute con mezzi diversi dai farmaci, ad esempio isolando gli individui sospetti di contagio (**quarantena**) o **bonificando le cause** dell'infezione (zanzare della malaria). Tuttavia, si ritiene oggi che i migliori risultati vengano raggiunti con l'**immunizzazione vaccinale** dell'individuo o dell'intera popolazione. Ciò significa stimolare il sistema immunitario a produrre anticorpi attraverso la somministrazione dell'antigene considerato agente causale della malattia.

L'immunizzazione può essere *passiva* (oggi poco usata) se indotta con l'inoculazione di **siero** contenente anticorpi purificati (globuline) o *attiva* se praticata con **vaccini**.

Questi possono contenere uno o piùà **antigeni vivi** (come per il vaiolo e altre malattie virali) oppure **attenuati**, cioè

Vaccini Glaxo SmithKline

Un esempio della gamma di vaccini disponibili in Italia

- Vaccino tetanico adsorbito
- Vaccino meningococco B, multicomponente
- Vaccino difterico adsorbito / pertossico adsorbito / tetanico adsorbito
- Vaccino papillomavirus umano
- Vaccino epatitico B
- Vaccino epatite b da dna ricombinante
- Vaccino influenzale virus frammentato
- Vaccino epatitico A
- Vaccino *Haemophilus influenzae* B coniugato al tossoide tetanico
- Vaccino difterico / pertossico acellulare / tetanico
- Vaccino difterico / epatitico B ricombinante / *Haemophilus influenzae* B coniugato e adiuvato / pertossico acellulare / poliomielitico inattivato / tetanico
- Vaccino meningococcico gruppo A, C, W-135 e Y coniugato con tossoide tetanico
- Vaccino difterico / pertossico / poliomielitico / tetanico
- Vaccino (adsorbito) anti difterico, tetanico, pertossico (componente acellulare) e anti-poliomielite (inattivato)
- Vaccino morbillo / parotite / rosolia
- Vaccino rabbico uso umano da colture cellulari
- Vaccino rotavirus
- Vaccino pneumococcico saccaridico coniugato adsorbito
- Vaccino epatite A inattivato / epatite B da DNA ricombinante

composti da mutanti meno virulenti (ottenuti da passaggi su colture cellulari o su uova e quindi meno pericolosi, come il vaccino orale Sabin contro la polio o i vaccini contro morbillo, rosolia, parotite, varicella).

I più usati sono oggi i **vaccini inattivati** con prodotti chimici (formaldeide) o trattamenti termici e potenziati con un adiuvante (sali di alluminio) che aumenta la produzione di IgA nell'organismo ospite.

Tra i vaccini inattivati più presenti nella profilassi si trovano quelli contro polio (Salk), epatite A, influenza, rabbia.

I vaccini anti-influenzali assommano un *pool* di ceppi apparsi nell'ultimo anno e quindi non sempre proteggono da varianti di nuovo arrivo.

Esistono anche **vaccini vivi formati da sub-unità,** rappresentate da componenti immunogene proteiche o polisaccaridiche (sole o in combinazione) isolate da virus (epatite B) o da batteri, come nel caso dei tossoidi[2] della difterite o del tetano, e inoltre nel caso della *Neisseria meningitidis* e dello *Streptococcus pneumoniae*.

Spesso i vaccini batterici sono fatti con cellule uccise (**vaccini spenti**) (*Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*) che proteggono anche dall'azione patogena delle rispettive tossine. Il futuro sta forse nello sviluppo di **vaccini da DNA ricombinante**, ottenibili con l'inserimento di un plasmide batterico (vettore) codificante per una proteina in grado di stimolare nell'ospite una risposta protettiva.

(creazione B.N.Z.)

LE TRE GRAZIE

Se l'ispirazione è chiara (la *Primavera* del Botticelli, del 1482), non altrettanto facile è il significato allegorico delle tre fanciulle raffigurate nel celebre quadro esposto nella Galleria degli Uffizi a Firenze.

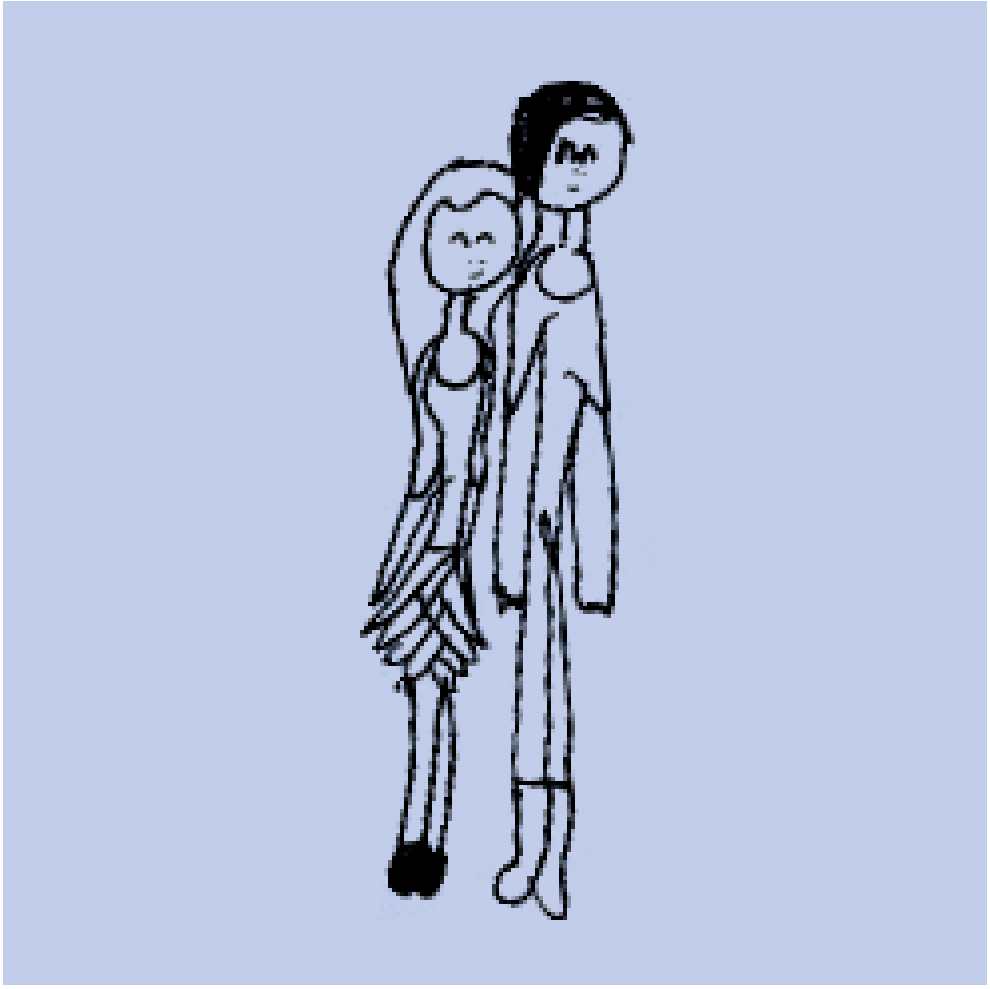
"*Noi siam qui ninfe e nel ciel siamo stelle*"

Una rappresentazione che mise in crisi anche Giorgio Vasari. Le tre grazie senza dubbio mostrano la **gioia**, la **salute** e l'**armonia** della vita.
Tutto questo, a ben riflettere, si trova nel giardino dell'Eden di Dante.

[2] Un'anatossina o **tossoide è** una **tossina** batterica che, mediante trattamento con formaldeide, **è** stata privata del potere tossico, ma non di quello immunogeno. Le **tossine**, invece, sono sostanze biologiche aventi azione dannosa, anche a minime dosi, sugli organismi viventi e che possono avere varia origine: microbica, vegetale o animale.

Capitolo 2

UOMO



MALATTIE DA BATTERI

Principali famiglie e generi di interesse sanitario

ORDINE	FAMIGLIA	GENERE
Pseudomonadales	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas*
	Spirillaceae	*Vibrio, Spirillum*
Eubacteriales	*Achromobacteriaceae*	*Alcaligenes*
	Enterobacteriaceae	*Escherichia, Aerobacter, Proteus, Klebsiella, Salmonella, Shigella*
	Brucellaceae	*Pasteurella, Bordetella, Brucella, Haemophilus, Actinobacillus, Moraxella*
	Bacteroidaceae	*Bacteroides, Fusobacterium*
	Micrococcaceae	*Staphylococcus, Micrococcus*
	Neisseriaceae	*Neisseria*
	Lactobacillaceae	*Diplococcus, Streptococcus, Lactobacillus*
	Corynebacteriaceae	*Corynebacterium, Listeria, Erysipelothrix*
	Bacillaceae	*Bacillus, Clostridium*
Actinomycetales	*Mycobacteriaceae*	*Mycobacterium*
	Actinomycetaceae	*Actinomyces*
	Streptomycetaceae	*Nocardia*
Spirochetales	*Spirocheaceae*	*Borrelia, Treponema, Leptospira*
Mycoplasmatales	*Mycoplasmataceae*	*Mycoplasma*

Ordine I
PSEUDOMONADALES

Forma a bastoncino o spirale, Gram-negative, non sporigene, aerobie, mobili (per presenza caratteristica di un ciglio polare). Nella famiglia delle *Pseudomonadaceae* si trovano bastoncini Gram-negativi che producono spesso pigmenti idrosolubili. Nella famiglia delle *Spirillaceae* si trovano forme incurvate a spirale.

Ordine IV
EUBACTERIALES

Comprende le specie patogene più numerose: hanno forma di bastoncino o cocco-bacillo, sono aerobie facoltative, quasi sempre sono mobili mediante ciglia peritriche. Nella famiglia delle *Achromobacteriaceae* si trovano bastoncini Gram-negativi, non sporigeni, aerobi facoltativi, che raramente attaccano il glucosio, solitamente saprofiti del suolo e dell'acqua.

Nella famiglia delle *Enterobacteriaceae* si trovano bastoncini Gram-negativi, non sporigeni, aerobi facoltativi, che fermentano il glucosio e talvolta il lattosio con produzione di gas e sono parassiti del tratto intestinale di uomo e animali. Nella famiglia delle *Brucellaceae* si trovano cocco-bacilli di piccole dimensioni, Gram-negativi, non sporigeni, esigenti dal punto di vista nutritivo, richiedendo terreni arricchiti con siero o sangue, scarsamente fermentativi, aerobi, parassiti obbligati, patogeni. Nella famiglia delle *Bacteroidaceae* sono presenti bastoncini non sporigeni, Gram-positivi o negativi, aerobi o microaerofili. Nella famiglia delle *Micrococcaceae* si trovano cocchi Gram-positivi, disposti a gruppi di 4 (tetradi) o di 8 elementi. Appartengono alle *Micrococcaceae* gli stafilococchi e i micrococchi.

Nella famiglia delle *Neisseriaceae* si trovano cocchi Gram-negativi, disposti a coppie, immobili, non sporigeni. Crescono stentatamente senza liquidi organici. Nella famiglia delle *Lactobacillaceae* sono compresi cocchi e anche bastoncini Gram-positivi, che di solito formano catene. Fermentano gli zuccheri producendo acido lattico (omofermentativi). La crescita viene facilitata dalla presenza di carboidrati. Appartengono alle *Lactobacillaceae* i lattobacilli e gli streptococchi. Nella famiglia delle *Corynebacteriaceae* si trovano bastoncini Gram-positivi, non sporigeni, talvolta a forma di clava, che si colorano irregolarmente col Gram e che possono presentare all'interno granuli metacromatici (cioè che assumono un colore diverso da quello usato per la colorazione). Nella famiglia delle *Bacillaceae* si trovano bastoncini Gram-positivi, sporigeni.

Ordine V - ACTINOMYCETALES

Si tratta di elementi che presentano ramificazioni tipo micelio. In alcune specie le ife danno alle colonie lo stesso aspetto delle muffe. Nella famiglia delle *Mycobacteriaceae* sono presenti bastoncini non sporigeni, resistenti alla colorazione di Ziehl-Neelsen. Nella famiglia delle *Actinomycetales* si trovano elementi ramificati che formano un vero e proprio micelio che si segmenta in bacilli o cocchi. Possono formare spore. Nella famiglia delle *Streptomycetaceae* il micelio rimane indiviso e si tratta di germi sporigeni.

Ordine IX - SPIROCHAETALES

Sono presenti elementi di forma a spirale, non ramificati. Nella famiglia delle *Treponemataceae* si trovano elementi a spirale, lunghi da 4 a 16 micrometri, che si muovono ruotando attorno all'asse longitudinale e anche con contrazioni attive del corpo batterico, hanno filamenti terminali, sono aerobi facoltativi, non crescono nei comuni terreni di coltura artificiali.

Ordine X - MYCOPLASMATALES

Sono germi molto piccoli che rappresentano forme di transizione tra batteri e rickettsie.

Per dare un significato ai risultati analitici raccolti con indagini batteriologiche, è necessario conoscere quali microrganismi sono normalmente reperibili nel contesto esaminato. Si considerano semplicemente ospiti i microrganismi nella seguente tabella.

Localizzazione	Gruppo di germi	Specie
Pelle	Gram-positivi	*Staphylococcus epidermidis, Micrococcus, Corynebacterium, Propionibacterium, Brevibacterium*
	Gram-negativi	*Neisseria*
	Funghi	Dermatofiti
Cavità orale	Gram-positivi	*Streptococcus mutans* (denti) *Streptococcus sanguis* (mucose), *Lactobacillus*
	Gram-negativi	*Bacteroides, Fusobacterium, Veillonella*
Tratto gastrointestinale	Gram-positivi	*Lactobacillus, Enterococcus, Clostridium*
	Gram-negativi	*Escherichia, Proteus, Klebsiella, Enterobacter, Bacteroides, Fusobacterium, Veillonella*
Vagina	Gram-positivi	Streptococchi, lattobacilli, clostridi
	Gram-negativi	Coliformi, *Bacteroides*
	Lieviti	*Candida*
	Spirochete	
Tratto urinario superiore (reni, vescica)	Normalmente assenti	-
Polmoni	Normalmente assenti	-
Cavità nasali e naso-faringe	Gram-positivi	Stafilococchi, streptococchi
	Gram-negativi	*Moraxella, Neisseria, Haemophilus, Bacteroides, Fusobacterium*

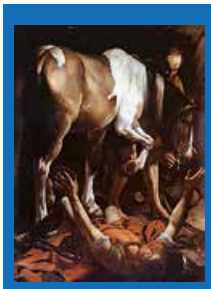
BREVE DESCRIZIONE DEI BATTERI GRAM-POSITIVI

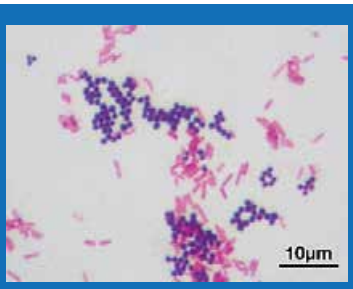
• COCCHI GRAM-POSITIVI •

Stafilococchi

Anaerobi facoltativi, catalasi positivi, ossidasi negativi, fermentativi, immobili. Sei le specie principali (*aureus*, *epidermidis*, *haemolyticus*, *hyicus*, *intermedius*, *saprophyticus*). Le infezioni causate sono elencate nella tabella seguente. La specie più importante dal punto di vista sanitario è *S. aureus*, capace di elaborare esotossine (A-F) termoresistenti attive a dosi modeste (1 μg), causa di intossicazioni alimentari in seguito al consumo di prodotti di gastronomia e di piatti manipolati dopo cottura o non conservati a temperature di sicurezza (<7°C oppure >65°C). Possiede enzimi particolari (emolisine, ecc) con significato clinico e valenza diagnostica. È sensibile a lisostafina e furazolidone, resiste a lisozima e bacitracina. L'intervallo di crescita è compreso fra +7 e +65°C, con *optimum* a +37°C. Tollera *p*H fra 4 e 9, sodio cloruro fino al 20%, A_w fino a 0,86.

S. aureus sviluppa sui comuni terreni batteriologici con colonie rotonde, incolori, lisce, lucide, di 2-3 mm di diametro a 24 ore. Dopo incubazione prolungata, si può notare comparsa di pigmentazione gialla. Su Agar sangue è visibile attorno alle colonie un alone di doppia emolisi (esterna incompleta = *alfa*, interna completa = *beta*). Fermenta il mannitolo. In microbiologia clinica, la ricerca dello stafilococco avviene frequentemente su portatori sani, mediante prelievo con tampone faringeo.

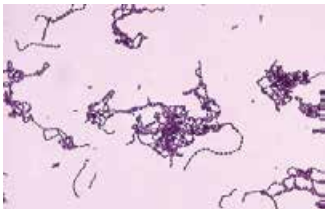




Ricercatori francesi e italiani dell'Ospedale di Marsiglia hanno pubblicato uno studio su *Lancet* da cui risulta che Michelangelo Merisi (detto il **Caravaggio**, 1571-1610) morì di setticemia da stafilococco in seguito ad una ferita da spada in una rissa.

	Specie batterica	Test Coagulasi	Malattia
Nell'uomo	*S. aureus*	+	Piodermiti, ferite suppurative, infezioni da irruzione secondaria (chirurgiche), intossicazioni alimentari
	S. epidermidis	-	Infezioni a valvole cardiache, *liquor*, reni dializzati, protesi ortopediche
	S. saprophyticus	-	Ferite infette, infiammazioni del tratto urinario
	S. haemolyticus	-	Endocardite, peritonite
Negli animali	*S. aureus*	+	Piodermiti, mastiti, pioemia (agnelli), metriti, sinovite (polli), botriomicosi (cavalli), sepsi piogenica in organi e ferite
	S. epidermidis	-	Mastite (bovini)
	S. intermedius	+	Otite (cani), piodermiti, ascessi, mastiti, infezioni uro-genitali
	S. hyicus	±	Epidermite essudativa, poliartrite settica (suini), mastite (bovini)

Streptococchi



Cocchi Gram-positivi, non sporigeni, anaerobi-facoltativi, immobili, catalasi-negativi. Fermentano il glucosio con produzione di acido lattico. Non vengono lisati dalla bile. Se coltivati in brodo, assumono la tipica disposizione a catena. Formano una capsula solo *in vivo*. Coagulano il latte con successiva digestione rapida del coagulo.

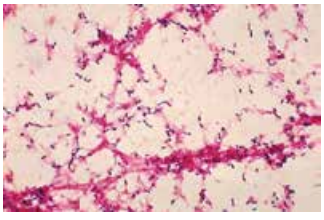
Sviluppano in brodo formando fiocchi in profondità, mentre su terreni agarizzati crescono con colonie lisce o ruvide, oppure mucose, spesso inferiori a 1 mm di diametro dopo 24 ore. Su Agar sangue, hanno un comportamento vario, per cui si distinguono streptococchi α-emolitici, o viridanti (= emolisi incompleta verdastra), β-emolitici (= emolisi completa classica), γ-emolitici (= nessuna emolisi). La proprietà di lisare i globuli rossi dipende da antigeni proteici (emolisine, capaci di evocare anticorpi), dal tipo di sangue (preferibile quello di pecora) e da altri fattori.

Alcuni streptococchi (come *Str. agalactiae*) diventano chiaramente beta-emolitici su Agar sangue solo se sviluppano in presenza della beta-tossina stafilococcica, per effetto di un'azione emolizzante sinergica nota sotto il nome di fenomeno di CAMP (acronimo degli Autori), sfruttato nell'omonimo *test*. Formano anche altre sostanze capaci di stimolare anticorpi: streptochinasi o fibrinolisina, DNA-asi, jaluronidasi (sostanza che scioglie la capsula). Vengono classificati mediante precipitazione (metodo di Lancefield) o per via chimica. Animali da laboratorio sensibili sono il topo e il coniglio (particolarmente suscettibile se inoculato sottocute). La virulenza dei ceppi viene esaltata da passaggi successivi sulla stessa specie animale.

Specie	Gruppo	Emolisi	Animali e uomo
pyogenes	A	β	varie specie (sepsi)
agalactiae	B	α, β, γ	varie specie (mastite), uomo (sepsi, meningite)
zooepidemicus	C	β	suino (cervicite, metrite, aborto, artrite settica, setticemia), bovino (cervicite, metrite, mastite)
equisimilis	C	β	uomo, suino, bovino, cane, pollame (infezioni varie)
equi	C	β	cavallo (mastite, infezioni genitali)
dysgalactiae	C	α, β, γ	bovino (mastite), agnello (poliartrite)
uberis	-	α, β, γ	bovino (mastite)
gruppo E	E	β	suino, pecora (sepsi)
gruppo L	L	β	suino, bovino (mastite)
gruppi P, R, S, T	P, R, S, T	β	suino (polmonite, setticemia, artrite, endocardite)

Le principali malattie causate dagli streptococchi nell'uomo e negli animali sono riportate in tabella. Alcuni streptococchi molto diffusi in natura non sono patogeni. Si tratta di commensali del tratto respiratorio, genitale, alimentare e della pelle (come *Str. mitis*, *salivarius, ecc)*. Nel latte sono presenti streptococchi **lattici** forniti di proprietà benefiche, sfruttate nella preparazione di formaggi, *yogurt,* ecc. tra cui gli streptococchi *lactis, cremoris, thermophilus*.

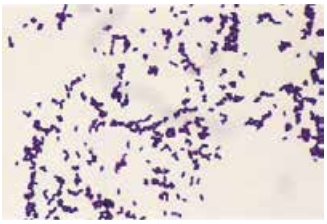
I cosiddetti "**streptococchi fecali**" sono attualmente classificati a parte come **enterococchi**. Si differenziano in quanto crescono in Brodo + sodio cloruro al 6,5% e sviluppano a 45°C. Le specie principali sono: *Str. faecalis, Str. faecium, Str. durans, Str. bovis*. Alcune specie di enterococchi sono patogene. L'identificazione degli streptococchi avviene principalmente mediante prove biochimiche e prove sierologiche (tra cui si ricordano agglutinazione, precipitazione in agar-gel, immunofluorescenza).



***Streptococcus pneumonae* (già denominato *Diplococcus pneumoniae* o bacillo di Fraenkel) è il principale agente negli adulti della polmonite lobare (perché interessa generalmente un solo lobo nel polmone). I ceppi virulenti possiedono una capsula polisaccaridica. Può causare patologie non invasive o forme gravi a carico di vari organi. Esige terreni contenenti sangue per crescere in laboratorio.**

• BACILLI GRAM-POSITIVI NON SPORIGENI •

Listeria



Il genere *Listeria* è formato da più specie, tra cui *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*. La specie più importante è *L. monocytogenes*, considerata potenzialmente patogena. Si tratta di un microrganismo diffuso dappertutto, isolato spesso da acqua, suolo, liquame, feci umane e animali, alimenti, a forma di bastoncino Gram-positivo, aerobio e facoltativamente anaerobio, mobile a 20-25°C, resistente a pH 4,8-9 e ad A_w >0.93. Viene neutralizzato dai comuni disinfettanti, dalla pastorizzazione e dagli antibiotici. Può provocare malattie negli animali (leucocitosi nei conigli e meningite nelle pecore) e nell'uomo (aborto, meningite).

Si distinguono due forme di malattia, una nervosa e l'altra viscerale. La forma nervosa, caratterizzata da micro-ascessi nel cervello con meningite, avviene più frequentemente nei bovini, pecore, capre e talvolta nei cavalli, nei cani e nell'uomo.

La forma viscerale mostra necrosi epatica ed è propria di conigli, cavie, cincilla, suini, agnelli; in forma epizootica colpisce polli e tacchini, nei quali si notano focolai necrotici nel fegato e nel pericardio. Altre manifestazioni sono l'aborto nelle vacche e nelle pecore, con presenza del germe anche nel latte.

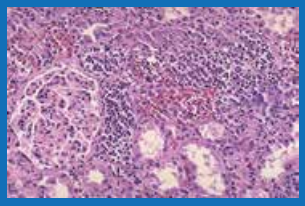
Nell'uomo si assiste a episodi di meningo-encefalite in età neonatale e adulta, a infezioni genitali, a endocardite valvolare, ad aborto e a forme enteriche con eventuali complicanze a carico del sistema nervoso, oltre che ad altre localizzazioni meno frequenti (listeriosi cutanea, oculo-ghiandolare, polmonare e cervico-ghiandolare, granulomatosi settica). La listeriosi è una malattia a incidenza piuttosto modesta, ma accompagnata da una percentuale relativamente alta di mortalità. Il periodo d'incubazione varia da 3 a 21 giorni. Si ritiene veicolata (oltre che dal contagio interumano) da latte crudo, verdure, derivati del latte (gelati, formaggi), carni crude. I casi di malattia di origine alimentare sono relativamente pochi (uno per milione di persone), ma spesso gravi (anche con mortalità, specie negli individui a rischio).

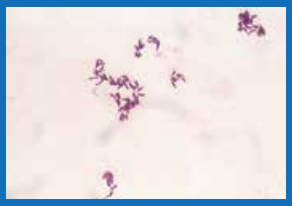
Biochimica delle listerie

Specie	CAMP *test* (*S. aureus*)	CAMP *test* (*R. equi*)	Xilosio	Ramnosio	Metil-D-mannoside
L. monocytogenes	+	-	-	+	+
L. ivanovii	-	+	+	-	-
L. innocua	-	-	-	+	+
L. welshimeri	-	-	+	v	+
L. seeligeri	+	-	+	-	-

Corinebatteri

Quando una diagnosi istologica conferma la microbiologia



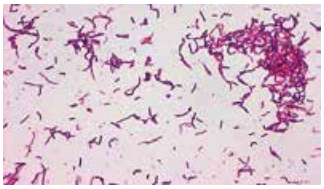


Quadro di pielonefrite nel bovino da *Corynebacterium* renale

Si tratta di un genere molto ricco di specie, poche delle quali sono patogene per l'uomo o gli animali. È formato da bastoncini Gram-positivi non sporigeni, di differente lunghezza, disposti talvolta in forme geometriche. La specie più importante è *Corynebacterium pyogenes*, che causa processi infiammatori purulenti e infezioni latenti. Si isola da pus, latte, secrezioni, tamponi mucosali. Forma una tossina emolizzante letale per il topo e necrotizzante per la cavia inoculata sottocute. Altre specie patogene (soprattutto per gli animali) sono *C. renale* (ruminanti), *C. pseudotuberculosis* (ovini), *C. equi* o *Rhodococcus equi* (bovini, suini, equini, ovini, uomo), *C. suis* (suini).

L'isolamento di questi germi è avvantaggiato da terreni ricchi (Agar sangue, Agar sangue cioccolato), eventualmente antibiotati (acido nalidixico, novobiocina) e incubati in atmosfera addizionata del 10% di anidride carbonica. Il riconoscimento è basato soprattutto su aspetto delle colonie, emolisi, caratteri biochimici.

Erysipelothrix

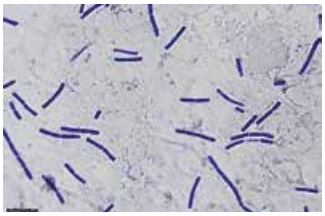


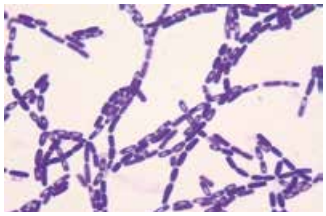
Germe ubiquitario che dà malattia nel suino (forme acute e croniche), pecore, tacchini, oche, pesci. Può interessare anche l'uomo, specie se di categorie professionalmente a rischio, con possibili complicazioni (artrite, meningite, endocardite). Il microrganismo è un sottile bastoncino immobile, talvolta curvato o allungato in filamenti (fase R), facilmente decolorabile, facoltativamente anaerobio.

Dopo 48 ore a +37°C su Agar sangue, dà colonie di 0,5-1 mm di diametro, grigiastre, con leggera emolisi. Esiste un terreno selettivo contenente sodio azide, fenolo, kanamicina e saccarosio. La crescita è favorita da siero (5%), glucosio (1-2%), CO_2 (5-10%). In brodo, le forme S intorbidano uniformemente; quelle R danno crescita flocculare e precipitato. Fermenta galattosio, fruttosio e lattosio. Non produce indolo, non scinde l'urea. Produce tossine termolabili, una jaluronidasi e una neuraminidasi. Con agar-gel precipitazione, è stato diviso in sierotipi (da A a O) e in numerosi sottogruppi. Nella diagnosi di laboratorio, il topo, inoculato sottocute, muore in 2-5 giorni e il germe viene reisolato dalla milza. I ceppi virulenti sono riconoscibili dalla reazione infiammatoria prodotta per scarificazione cutanea nel suino.

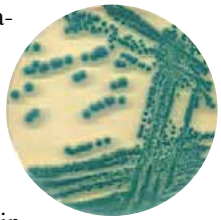
• BACILLI GRAM-POSITIVI SPORIGENI •

Bacilli





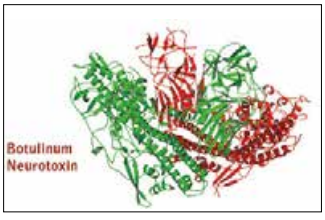
Bacillus anthracis provoca il carbonchio o antrace in bovini, ovini, equini e nell'uomo. Sono meno sensibili gli uccelli e i suini (forme subacute o croniche). È un bastoncino aerobio, immobile, capsulato *in vivo*, isolato o disposto in corte catene di 2-5 cellule con estremità convesse (a canna di bambù). Sviluppa spore in presenza di ossigeno e temperatura >12°C. Su Agar sangue a +37°C cresce in 24-48 ore con colonie non emolitiche, bianco-grigiastre, a bordo indefinito, formate da tanti filamenti radialmente disposti a partire dal centro della colonia (testa di medusa). In brodo forma un sedimento cotonoso con soprastante limpido. Liquefa lentamente la gelatina. Fatto crescere su un terreno contenente 0,5 U.I. di penicillina, assume forma sferica (*pearl string test*). L' antigene batterico, rimasto nei tessuti (ma non negli alimenti) dopo la lisi cellulare può essere ritrovato sierologicamente con la termo-precipitazione di Ascoli o la precipitazione in *agar-gel*. Il topo, infettato sottocute, muore in 2-4 giorni con edema gelatinoso al punto d'inoculo.



Bacillus cereus è ubiquitario, generalmente non patogeno, ma capace di provocare, nell'uomo e negli animali, edema polmonare, pleurite emorragica, ingrossamento della milza e del fegato, meningite. Dà, inoltre, tossinfezioni alimentari nell'uomo, nel cane e nel gatto, attraverso la produzione di tossine termolabili (emetica e diarroica). Assomiglia al bacillo del carbonchio, ma è mobile e non possiede la capsula. Contiene spore ovali e granuli lipidici colorabili con Sudan nero, ma non cristalli parasporali colorabili con fucsina a caldo (presenti, viceversa, in *B. cereus mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*). Cresce con larghe colonie piatte e compatte, ruvide, fortemente emolitiche, provviste attorno di un precipitato bianco (da lecitinasi), se il terreno contiene tuorlo d'uovo.

Clostridi

Sono grossi bacilli Gram-positivi, sporigeni, anaerobi, prevalentemente mobili e capaci di decomporre le proteine. Il loro *habitat* è il suolo e l'intestino dell'uomo o degli animali. Alcuni sono patogeni, in quanto provocano intossicazioni (botulismo, tetano), enterotossiemie, gangrene gassose, colite.

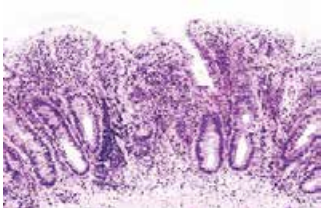


Cl. botulinum agisce attraverso sette tipi di tossine (A-B-E-F-G nell'uomo, C-D negli animali) inattivate dopo 20 minuti a 100°C, evidenziabili nel siero degli ammalati e nei residui alimentari attraverso inoculazione *i.p.* in topini (che muoiono entro le 24 ore), con successiva conferma mediante siero-neutralizzazione *in vivo*.

Oltre alla prova biologica, la ricerca della tossina si avvale dell'emo-agglutinazione passiva, dell'ELISA e del *test* radioimmunologico.

Cl. tetani libera dalle cellule vegetative una tossina neurotropa, neutralizzabile anche *in vitro* (a fini diagnostici) da un'anti-tossina.

Cl. perfringens causa infezioni invasive in ferite e produce un'enterotossina quando, ingerito in numero elevato, sporula nell'intestino, causando diarrea. La diagnosi si basa sull'isolamento del germe (conteggio), seguito da prove di identificazione e sulla dimostrazione della tossina nelle feci (ELISA, agglutinazione inversa passiva al lattice). Le prove di identificazione consentono la differenziazione di altri clostridi causa di gangrene (*novyi*, *histolyticum*, *septicum*).



Cl. difficile produce due tossine ritrovabili nelle feci di pazienti colpiti da colite pseudomembranosa. I clostridi sono isolabili su terreni solidi (Agar sangue, Agar cioccolato, SPS, SFP, ecc) incubati in anaerobiosi per 48-72 ore. Formano colonie generalmente di piccole dimensioni, emolitiche, nere in presenza di solfiti (germi solfito-riduttori). Trapianti in terreni liquidi riducenti (CMM, Brodo tioglicolato, ecc) consentono di avviare l'identificazione biochimica, previo passaggio in un terreno privo di carboidrati.

Biochimica dei clostridi

Clostridium	emolisi	spore	rigonfiamento da spore	proteolisi	gelatinolisi	nitrati	indolo	glucosio	lattosio	Saccarosio	salicina	H_2S	lecitinasi
chauvoei	+	s	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
septicum	+	s	+	-	+	+	-	+	+	-	-	v	-
perfringens	+	cst	-	-	+	+	-	+	+	+	-	v	+
novyi (A, B)	+	cs	+	-	+	+	v	+	-	-	-	+	+
sordellii	+	cs	-	+	+	v	+	+	-	-	+	+	+
bifermentans	+	cst	+	+	+	-	+	+	-	-	v	+	+
sporogenes	+	s	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
hystoliticum	+	st	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-

c = centrale t = terminale s = subterminale v = variabile

Micobatteri

Le specie che interessano in medicina sono *Mycobacterium tuberculosis* (umano[1]), *M. bovis* (bovino, infetta animali e uomo), *M. avium* (aviario; in realtà è formato da un complesso di specie, riguardanti volatili, mammiferi e soggetti umani immunocompromessi). Esiste poi una lunga lista di specie che danno raramente malattie simil-tubercolari a localizzazione prevalentemente polmonare (*simiae*, *marinum*, *ulcerans*, *africanum*, *xenopi*, *kansasii*, *fortuitum*, ecc). Sono stati classificati come "micobatteri atipici" da Runyon, che li ha suddivisi in quattro gruppi (fotocromogeni, scotocromogeni, non cromogeni, a rapida crescita).

[1] Spesso si usa l'abbreviazione "BK" = bacillo di Koch.

I micobatteri hanno esigenze di isolamento e di coltura speciali. Innanzitutto, richiedono un trattamento di decontaminazione del materiale patologico in cui si trovano, detto anche "arricchimento", da effettuarsi (ad esempio) alcalinizzando con NaOH al 4% per 20 minuti, neutralizzando con acido ossalico al 5% per 20 minuti e poi centrifugando il campione. Si usano poi per l'isolamento terreni specifici, diversi da quelli abituali. Esistono terreni solidi, a base di uovo coagulato, glicerolo, amido, verde malachite (Lowenstein-Jensen, Petragnani, IUTM) oppure a base di agar-agar, acido oleico, sali, vitamine, albumina (Middlebrook 7-H-10), e terreni liquidi, contenenti asparagina, sali minerali e Tween 80 (Dubos, Middlebrook 7-H-9). Questi terreni possono diventare selettivi con l'aggiunta di antibiotici e, solitamente, per il primo isolamento si abbina un terreno solido ad uno liquido.
I micobatteri (oltre 50 specie, molte saprofite) crescono sui terreni in aerobiosi a +37°C, in tempi variabili da pochi giorni fino a 2-3 settimane. I saprofiti crescono solitamente in tempi brevi e anche a temperatura ambiente, mostrando talvolta pigmentazioni. Abitualmente, su terreni solidi i micobatteri presentano colonie secche caratteristiche (forma eugonica) o umide (forma disgonica) simili ai comuni batteri, talvolta accompagnate da pigmentazioni gialle o rosse. Nei terreni liquidi, sviluppano dispersi in tutto il mezzo o raccolti in una pellicola superficiale. Il tempo d'incubazione e l'aspetto delle colonie sono molto indicativi per riconoscere le specie di micobatteri isolati. Questi germi hanno la particolarità di lasciarsi colorare con il metodo di Ziehl-Neelsen (proprietà dell'alcool-acido resistenza), attribuita all'elevato contenuto di cere della membrana batterica. Si possono effettuare anche esami in fluorescenza su vasti campi microscopici, utilizzando obiettivi 50x. I micobatteri sono colorabili con fluorocromi tipo auramina e rodamina. Una completa identificazione può essere fatta con *test* biochimici o, in alcuni casi, con sonde genetiche. Sono possibili riconoscimenti di sierotipi, all'interno delle varie specie, mediante agglutinazioni rapide.

Caratteristiche dei principali micobatteri

Test	*M. tuberculosis*	*M. bovis*	*M. avium*	M. atipici
Tempo di crescita	> 5 giorni	> 5 giorni	> 5 giorni	talvolta < 5 giorni
Tipo di crescita	eugonica	disgonica	eugonica	disgonica
Pigmenti	-	-	-	±
Richiesto glicerolo	+	-	+	+
Niacina	+	-	-	-
TCH	-	+	-	-
Nitrati	+	-	-	-
Urea	+	+	-	-
Amidasi	+	-	+	-
Patogeno per cavia	+	+	-	-
Patogeno per topo	-	-	-	+

Era considerato un *castigo divino* la **tubercolosi**, endemica in una zona geograficamente vicina, ma fortunatamente oggi scomparsa, grazie al miglioramento del tenore di vita e al progresso industriale.

DAL BOVINO ALL' UOMO:
STORIA DELL' EVOLUZIONE DELLA TBC IN VENETO, VISTA DAL SANATORIO DI GALLIERA

L'Ospedale rimase in funzione dal 1929 al 1978 nella Villa Cappello, conosciuta anche come "Villa Imperiale" perché dimora estiva dal 1858 di Ferdinando I° d'Asburgo e della consorte, l'Imperatrice Maria Anna di Savoia. Il parco che la circonda, spesso citato come uno tra i più belli d'Italia, è oggi aperto al pubblico, accogliendo al suo interno i servizi sociali della località. Si trova in provincia di Padova, a poca distanza da Cittadella.

La villa, costruita da una nobile famiglia veneziana nel 1508, fu ristrutturata dall'architetto Francesco Bagnara all'inizio dell' '800. Dopo varie vicende, divenne un sanatorio che curava annualmente in media 500 malati di tubercolosi. La TBC in queste zone era endemica a causa delle condizioni economiche non fiorenti della popolazione (da ricordare la diffusione della "pellagra" nelle campagne), nonché conseguenza del lavoro praticato - in condizioni igieniche inadeguate - nelle concerie che trattavano il pellame bovino spesso contaminato da micobatteri. Si narra di "*vite bruciate dai veleni respirati e assorbiti, di mani corrose dagli acidi, di volti ingrigiti da un mestiere oscuro e massacrante*". Storicamente, la lavorazione delle pelli (che occupava qualche migliaio di persone in aziende di piccole dimensioni sparse nel territorio veneto) era incentrata attorno ad Arzignano, nella valle del Chiampo, in provincia di Vicenza.
Una flessione di questa attività negli anni '70 per concorrenza estera ebbe come conseguenza una contrazione del lavoro e quindi del contagio.
A partire dagli anni '60, inoltre, era subentrata una maggiore sensibilità sulla salute dei lavoratori ed erano stati avviati trattamenti con farmaci di nuova generazione tra cui cicloserina, pirazinamide, viomicina, Isoxyl®.
Questi antibiotici presero il sopravvento su farmaci divenuti meno efficaci per fenomeni di resistenza, come PAS (acido para-amino-salicilico), INH (idrazide dell' acido isonicotinico) e streptomicina.
L' evoluzione tecnologica degli anni seguenti permise il superamento definitivo dei problemi delle concerie in Veneto, portando le aziende a standard di sicurezza del massimo livello. La produzione del distretto della Valle del Chiampo rappresenta un' eccellenza mondiale del *made in Italy* (da *Repubblica*, 2018).

• BATTERI GRAM-NEGATIVI OSSIDASI-POSITIVI E FERMENTATIVI •

(Pasteurella, Actinobacillus, Vibrio, Aeromonas)

Pasteurelle

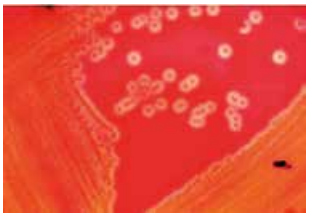
Questo genere è formato da cocco-bacilli Gram-negativi di piccole dimensioni, aerobi, ossidasi positivi, immobili. Le specie più importanti sono *multocida*, *haemolytica*, *pneumotropica*, *anatipestifer*, *aerogenes*, *ureae*. *P. anatipestifer* (patogena per le anatre e altri uccelli) è molto diversa dalle altre pasteurelle, perché è microaerofila e non fermentante.

Prove e risultati predominanti					
Genere o famiglia	*O/F test glucosio*	*MacConkey*	*catalasi*	*ossidasi*	*mobilità*
Enterobacteriaceae	F	+	+	-	±
Yersinia	F	+	+	-	+
Pseudomonas	O	+	+	+	+
Flavobacterium	O	+	-	-	-
Aeromonas	F	+	+	+	+
Pasteurella	F	-	+	+	-
Actinobacillus	F	+	+	+	-
Bordetella	-	+	+	+	+
Brucella	-	-	+	+	-
Haemophilus	-	-	+	+	-
Campylobacter	-	-	+	+	+
Moraxella	-	-	V	+	-
Alcaligenes	-	+	-	-	+
Acinetobacter	-	+	+	-	+

Le pasteurelle interessano essenzialmente la medicina veterinaria. *P. multocida* causa malattie del tratto respiratorio in bovini, suini, ovini, conigli, cani e gatti. È inoltre l'agente eziologico del colera aviario del pollo. Può anche causare mastite nei bovini e nelle pecore. *P. haemolytica* provoca polmonite in bovini, suini, pecore, capre, mastite nelle pecore e setticemia negli agnelli. *P. pneumotropica* riguarda i roditori, *P. ureae* i suini.

Nell'uomo le malattie da *Pasteurella* sono rare. Si tratta per lo più di casi conseguenti a morsicature di cani e gatti o contatto professionale con animali infetti (veterinari, macellai). Ugualmente sono rare le forme setticemiche da *P. ureae*.

La diagnosi di laboratorio avviene mediante semina per strisciamento di pezzi di organi vari su piastre di Agar sangue da incubare a 37°C per 24 ore. *P. multocida* cresce con colonie non emolitiche di 1 mm circa di diametro, rotonde, grigiastre, raramente larghe e mucose, con odore caratteristico. Si possono avere colonie in fase liscia (ritenuta più virulenta), ruvida e mucosa. La formazione di capsula si evidenzia col *test* della jaluronidasi. Può essere suddivisa in biotipi (A-D) con le prove della jaluronidasi sulla capsula, dell'emo-agglutinazione indiretta, della flocculazione in acriflavina e della patogenicità sul topo inoculato sottocute. Sono riconoscibili antigeni O e K mediante reazioni di agglutinazione e precipitazione in agar-gel. *P. haemolytica* cresce con colonie rotonde, grigiastre, talora più piccole della specie precedente, circondate da un alone di beta-emolisi. L'emolisi è talvolta così modesta che è necessario togliere con l'ansa la colonia per vedere la zona chiara sottostante. La reazione può essere inibita da anticorpi del sangue usato (è preferibile il sangue bovino). Dalle colonie sospette si allestisce una colorazione di Gram e si trapianta su provette di BHI Agar + siero 5% da incubare a +37°C per 18÷24 ore, con successiva semina delle prove biochimiche differenziali, da leggere dopo 24 ore a +37°C.



P. haemolytica

Actinobacillus

Cocchi e bacilli associati, sembrano al microscopio lettere dell'alfabeto Morse. Si tratta di aerobi-anaerobi facoltativi. *A. lignieresi* si trova in bovini e pecore, meno frequentemente in cavalli, cani, gatti e nell'uomo. Attacca i tessuti molli. A. *equuli* dà nefrite e setticemia nelle cavalle. *A. suis* provoca setticemia nei suinetti e forme subacute o croniche nei suini svezzati. Altri actinobacilli, inizialmente inclusi negli emolfili per le particolari esigenze nutrizionali e poi associati alle pasteurelle (*P. haemolytica*-like), sono citati tra gli emofili. La specie di maggior interesse è *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Le **zoonosi** sono infezioni che vengono trasmesse all' uomo da animali infetti e viceversa. Non in tutti i casi si tratta di animali malati: il più delle volte costituiscono il serbatoio naturale dell' infezione. Sono considerate eventi "accidentali" dal punto di vista epidemiologico. Dal graffio del gatto dipende la trasmissione della ***Bartonella bacilliformis***, dal morso del cane e del gatto l'infezione da ***Pasteurella multocida***, entrambe bacilli Gram-negativi. La malattia da graffio del gatto consiste in una linfoadenopatia acuta che si instaura principalmente nei linfonodi che drenano la zona colpita.

Caratteristiche dei principali Gram-negativi ossidasi-positivi fermentativi

Proprietà	***Pasteurella***	***Actinobacillus***	***Aeromonas***	***Vibrio***
Morfologia	cocco-bacilli bipolari	bacilli con inclusioni	bacilli in coppie	bacilli curvi
Mobilità	-	-	+	+
Colonie	liscie, umide	secche, adese	grigio-incolori	incolori-giallastre
Optimum temperatura	+37 °	+37 °	+25-28 °	+25 °
Urea	v	+	-	-
Gelatina	-	v	+	+
O/129			-	+

Vibrio

V. parahaemolyticus causa tossinfezioni alimentari da pesce e mitili consumati crudi. *V. metschnikovii* dà infezioni colera-simili nei volatili. *V. anguillarum* infetta i pesci d'acqua dolce. Il rappresentante più famoso di questo genere è *V. cholerae*.

Questi germi vengono isolati arricchendo il campione in acqua peptonata alcalina (addizionata del 3% di NaCl per ricercare i batteri di origine marina), con successiva

piastratura su TCBS Agar, un terreno selettivo e differenziale. L'identificazione è possibile attraverso prove biochimiche. Sono in genere sensibili al *Vibriostat* (O/129), proprietà verificabile con dischetti impregnati con questo reattivo, da posizionare su terreno TCBS appena seminato.

Aeromonas

Il genere comprende *A. salmonicida* (cresce a 22-25°C, immobile, patogena per i pesci) e *A. hydrophila punctata* (cresce a 28-37°C, mobile, differenziata nelle specie *caviae*, *hydrophila* e *sobria*).

La specie più nota è *A. hydrophila*, presente nelle acque e nelle feci. Può provocare nell'uomo infezioni conseguenti a ferite, malattie urinarie ed enteriche. Produce adesine e citotossine. Viene considerata un potenziale patogeno alimentare. Appartiene alla categoria dei batteri Gram-negativi responsabili della degradazione delle carni e dei derivati del latte.

Per prevedere la durata di un alimento deperibile o per valutare la degradazione di un prodotto, è possibile, in laboratorio, contare con un unico terreno batteriologico la carica di *Aeromonas* e di *Pseudomonas* a +25°C per 72 ore. Il terreno selettivo di Kielvein (GSPA) inibisce i Gram-negativi (con la penicillina) e le muffe (con la pimaricina), seleziona *Aeromonas* e *Pseudomonas* (con il sodio glutammato) e li differenzia (con amido e rosso fenolo come indicatore), in modo da ottenere colonie gialle (*Aeromonas*) e colonie viola (*Pseudomonas*). Il conteggio viene completato dal controllo di alcune colonie sospette mediante esame microscopico), *test* dell'ossidasi (+) ed eventuali prove biochimiche adatte per microrganismi ossidativi non-enterobatteri.

Pseudomonas aeruginosa

Bacillo ubiquitario, presente soprattutto nel suolo, nelle acque di scarico, nei depuratori, dove usa i nitrati come sorgente di energia per la respirazione anaerobia. È stato isolato da soluzioni iniettabili, flebolisi, cosmetici, disinfettanti, rubinetti, tubi dell'acqua calda, incubatrici, biberon, cateteri, attrezzature da sala operatoria, apparecchi per rianimazione, strumenti chirurgici e, addirittura, dal cherosene per aerei. Negli ambienti sanitari è stato sempre collegato a eventi infausti anche di notevole gravità (responsabile del 50% delle infezioni ospedaliere). È un patogeno opportunista, incapace di provocare malattia in individui sani immunocompetenti. Può provocare congiuntiviti, otiti, sinoviti e infezioni gravi a carico del sistema respiratorio e riproduttivo (uomo, volatili, animali da pelliccia, pesci). Degrada i cibi proteici refrigerati (carni, pesce, latte, uova), con produzione di pigmentazioni e di odori anormali.

La maggior parte delle infezioni da ***P. aeruginosa*** si manifesta nei pazienti ospedalizzati, in particolare quelli debilitati o immunocompromessi. ***P. aeruginosa*** è una causa frequente di infezione nelle unità di terapia intensiva. I pazienti HIV-positivi, soprattutto quelli in fase avanzata, e i pazienti con fibrosi cistica sono a rischio di infezioni extraospedaliere da ***P. aeruginosa***. Le infezioni da ***Pseudomonas*** possono presentarsi in molte sedi anatomiche come cute, tessuti sottocutanei, ossa, orecchie, occhi, tratto urinario, polmoni e valvole cardiache. La sede varia a seconda della porta d'ingresso e della vulnerabilità del paziente. Nei pazienti ospedalizzati, il primo segno può essere quello di una gravissima sepsi da Gram-negativi.

Resiste a molti antibiotici (resistenza mediata da plasmidi o da cromosomi extracellulari) e possiede meccanismi di offesa non ancora del tutto chiariti. Si conoscono, oltre ai soliti fattori di adesività (pili e adesine), alcune emolisine, una neuraminidasi, un esoenzima S, una

esotossina A, elastasi e proteasi, il pigmento verde piocianina, il lipopolisaccaride di membrana LPS. Le specie *pseudomallei* e *mallei* sono state classificate separatamente come *Burkholderia*. Si tratta di germi che provocano, nell'uomo e negli animali, gravi malattie a localizzazione prevalentemente polmonare (melioidosi e morva). I serbatoi naturali sembrano localizzati, rispettivamente, nelle acque superficiali e negli equini.

Cresce con colonie larghe, verdastre. Colora di verde fluorescente il terreno circostante (piocianina e pioverdina), dà emolisi su Agar sangue con odore caratteristico alcoolico. È mobile, attacca lentamente i carboidrati in forma ossidativa, coagula il latte alcalinizzandolo. Si differenzia biochimicamente da altre specie di *Pseudomonas*.

• BATTERI GRAM-NEGATIVI OSSIDASI-POSITIVI E GLUCOSIO-INATTIVI •

(Acaligenes, Bordetella, Neisseria, Moraxella, Legionella, Brucella)

Alcaligenes

È un cocco-bacillo mobile, aerobio, non pigmentante, catalasi-negativo, indolo-negativo, non fermentante i carboidrati. È ubiquitario. La specie *A. faecalis* può provocare malattie respiratorie nei polli.

Bordetella

*S*i presenta come cocco-bacillo, spesso in coppie, mobile, con colonie, su Agar sangue, di 1,5 mm di diametro non emolitiche. È catalasi-positivo, indolo-negativo, inerte verso molti carboidrati. *B. pertussis* è l'agente eziologico della pertosse. Esige terreni arricchiti (Bordet-Gengou, Agar cioccolato, ecc) su cui cresce dopo 3-5 giorni a +37°C. Viene identificata mediante colorazione in immunofluorescenza o per agglutinazione con sieri diagnostici. *B. bronchiseptica* causa, insieme ad altri germi, la rinite atrofica nel suino. Produce una tossina dermo-necrotica per la cavia e delle emoagglutinine. Viene diagnosticata con sieri diagnostici in agglutinazione rapida.

Neisseria

È coccoide, spesso disposta a coppie, immobile, non emolitica su terreni al sangue (Thayer-Martin antibiotato, Agar cioccolato, ecc), dove cresce con colonie di 0,5-1 mm di diametro dopo 24-48 ore a +37°C con il 5% di CO_2. Le specie più note in medicina umana sono *N. gonhorroeae* (gonorrea) e *meningitidis* (meningite trasmissibile cerebrospinale). L'identificazione è possibile mediante colorazione in immunofluorescenza o agglutinazione con sieri diagnostici.

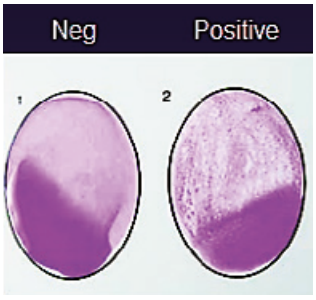
Moraxella

La denominazione è come *Moraxella* se bastoncellare (come *M. bovis*) o come *Branhamella* se coccoide (come *B. ovis*). Questi microrganismi si presentano come germi di piccole dimensioni, aerobi, dalle colonie emolitiche di 1-2 mm di diametro dopo 48 ore a +37°C, non pigmentanti e non fermentanti i carboidrati, sensibili alla penicillina. Possono provocare una serie di infezioni nell'uomo (congiuntiviti, meningiti).

Legionella

È un bastoncino che si colora debolmente col Gram. La specie principale è *L. pneumophila*, agente eziologico nell'uomo di infezioni respiratorie gravi. Richiede terreni specifici antibiotati (BCYE Agar) da incubare a +37°C con elevata umidità. Forma, dopo 72 ore, colonie rotonde, piatte, di colore variabile, catalasi e ossidasi positive, da identificare con immunofluorescenza.

Il contagio avviene per inalazione, respirando goccioline o vapori di acqua contaminata che poi scendono nei polmoni. È un batterio che si nasconde a livello degli alveoli polmonari e viene fagocitato dalle cellule sentinella, i macrofagi alveolari. A questo livello i germi prendono il sopravvento e provocano la malattia, la polmonite.
I sintomi, dopo un periodo di incubazione variabile da 2 a 10 giorni (in media 5-6 giorni) sono caratteristici: la legionella si manifesta come una polmonite infettiva. Nei casi gravi può insorgere bruscamente con febbre alta, dolore toracico, fatica a respirare, tosse e catarro. Tra le complicanze della legionellosi: ascesso, affanno respiratorio, ***shock***, emorragie. Si cura con una terapia antibiotica, ma sono quadri difficili da trattare.



Brucella

Sono piccoli bacilli Gram-negativi, immobili, aerobi o microaerofili, catalasi-positivi e ureasi-positivi (tranne *Br. ovis*), che non attaccano i comuni carboidrati. Sono germi patogeni, generalmente ospite-specifici (*Br. melitensis* per uomo e capre, *Br. abortus* per bovini, ecc). Si localizzano preferibilmente nell'apparato genitale (aborto), passano nel latte e, nell'uomo, provocano la febbre maltese.

Crescono su Agar sangue a +37°C in 2-4 giorni con colonie translucide, brunastre, del diametro <1 mm. Alcune specie richiedono il 10% di CO_2 per crescere. Si possono distinguere con agglutinazione rapida su vetrino mediante sieri specifici. Esistono diversi biotipi per ciascuna specie, differenziabili con prove biochimiche. La brucellosi è stata eradicata in alcuni paesi grazie al *Ring Test* sul latte (a sinistra) e all' *agglutinazione rapida* (a destra) sul siero di bovini e ovi-caprini.

Enterobacteriaceae

SALMONELLA	*SHIGELLA*	*ESCHERICHIA*
KLEBSIELLA	*ENTEROBACTER*	*CITROBACTER*
PROTEUS	*PROVIDENCIA*	*SERRATIA*

Test	*Salmonella*	*Shigella*	*Escherichia*	*Citrobacter*	*Klebsiella*	*Enterobacter*	*Proteus*	*Providencia*	*Serratia*
Mobilità	+	-	+	+	-	+	+	+	+
H_2S	+	-	-	+	-	-	+	-	-
VP	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Lattosio	-	-	+	+	+	+	-	-	d
Saccarosio	-	-	d	d	+	+	d	d	+
Citrato (Simmons)	+	-	-	+	+	+	d	+	+
Urea	-	-	-	d	+	-	+	-	d
Indolo	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Lisina decarbossilasi	+	-	d	-	+	+	-	-	+
ONPG	d	d	+	+	+	+	-	-	+

Le *Enterobacteriaceae* sono una famiglia di bacilli Gram-negativi ubiquitari. Comprende alcuni generi potenzialmente patogeni, a prevalente trasmissione oro-fecale, favorita da scarse condizioni igienico-ambientali. I generi hanno in comune caratteri fisico-chimici, antigenici e metabolici, essendo catalasi-positivi, ossidasi-negativi, resistenti ai sali biliari, generalmente mobili. Dal punto di vista sanitario, i più importanti sono quelli elencati in tabella. La famiglia presenta antigeni somatici O (polisaccaridi termostabili, evocano anticorpi IgM), flagellari H (aminoacidi termolabili, inducono anticorpi IgG) e capsulari K (prevalentemente lipoproteici termolabili). Parecchi antigeni sono comuni, per cui si verificano reazioni crociate usando sieri polivalenti OH di genere. Lo studio della struttura antigene consente di tipizzare i ceppi isolati in sierotipi. Alcuni generi elaborano esotossine. I coli, ad esempio, producono tossine LT (come le shigelle), ST, VT. Notoriamente *Salmonella* e *Shigella* inducono diarrea, *Klebsiella* infezioni polmonari, intestinali e meningee. *Citrobacter*, *Enterobacter, Proteus*, *Providencia* e *Serratia* sono stati riconosciuti causa di malattie extra-intestinali, soprattutto nell'uomo (infezioni urinarie e complicanze settiche in soggetti ammalati o con difese immunitarie ridotte).

Escherichia coli, ospite fisiologico dell'intestino, diventa patogeno in alcune circostanze, scatenando coliti in soggetti giovani (coli entero-invasivi, diarrea neonatale) o negli adulti (coli entero-tossici, diarrea dei viaggiatori). Altri ceppi danno gravi lesioni intestinali e renali (coli entero-emorragici, colite emorragica e SEU).

Schema di Kauffmann-White per la Tipizzazione delle Salmonelle aggiornato al 2003

Le salmonelle sono il patogeno enterico più famoso. Causano tossinfezioni alimentari legate soprattutto a cibi proteici non cotti. La diagnosi delle salmonellosi avviene in laboratorio. I metodi di indagine sono numerosi, tanto

che questo argomento è diventato un modello di riferimento in batteriologia, sia per l'isolamento che per l'identificazione (vedi schema). La loro struttura antigenica è stata descritta nello schema di Kauffmann-White.

AZIONE ENTEROPATOGENA DEGLI ENTEROBATTERI

Strumento utilizzato	Meccanismo	Lesione	Localizzazione Intestinale
Adesione	Fimbrie o pili	Distruzione microvilli	Intestino tenue
Invasione della mucosa	Moltiplicazione nelle cellule	Distruzione delle cellule	Colon
Tossine citolitiche	1 - inibizione sintesi proteica 2 – danno alle membrane	Distruzione delle cellule Distruzione dei microvilli	Colon
Enterotossine	Stimolazione adenilato-ciclasi	Diarrea senza danno cellulare	Tenue

• ALTRI BACILLI OSSIDASI-NEGATIVI •

Yersinia

Comprende *Y. pestis* (agente della peste), *Y. enterocolitica* (causa di tossinfezioni alimentari), *Y. pseudotuberculosis* (patogeno per animali da cortile e uccelli).

Sono germi che crescono su Agar sangue o su Mac Conkey Agar in 24 ore a +37°C e la cui identificazione può essere fatta rapidamente con sieri fluorescenti, oltre che con le prove biochimiche tradizionali.

Francisella tularensis

È un germe piuttosto raro, presente negli animali selvatici. Contagia l'uomo attraverso artropodi o per inalazione di *aerosol*, essendo particolarmente infettante (contagio da laboratorio). Colpisce i linfonodi e i polmoni, con complicanze gravi (tularemia).

Cresce su Agar sangue arricchito con glucosio e cisteina in 2-3 giorni a +37°C, con colonie puntiformi. Si riconosce con immunofluorescenza.

Acinetobacter

Bastoncino corto e tozzo, disposto spesso in coppia, immobile, H_2S-negativo, VP negativo, indolo-negativo, resistente alla penicillina. Si tratta di un saprofita occasionalmente patogeno, che colonizza ferite e protesi, dando seri problemi di infezioni ospedaliere, a causa di una straordinaria persistenza sulle superfici abiotiche (plastica, inox, vetro) e di una forte resistenza agli antibiotici.

Cresce su Mac Conkey a +37°C in 24 ore con colonie incolori e su Nutrient Agar anche a +42°C. Non fermenta i comuni carboidrati, tranne il glucosio. La specie principale è *A. baumannii* e corrisponde al gruppo *A. calcoaceticus* delle precedenti classificazioni.

Campylobacter

Bacilli isolati, talora curvi, mobili, microaerofili, ossidasi-positivi, inattivi verso i carboidrati. Numerose sono le specie patogene e i relativi ospiti. L'isolamento dei *Campylobacter* avviene seminando il materiale patologico su piastre di Agar sangue antibiotato (supplemento antibiotico di Skirrow) da incubare per almeno 48 ore a +37°C con il 5% di CO_2. Le colonie (non emolitiche, di circa 1 mm di diametro, incolori) vengono trapiantate e identificate biochimicamente. *C. jejuni* e *coli* vengono ricercati negli alimenti, facendo precedere alle piastre un arricchimento in Brodo selettivo da incubare a +43°C per 24 ore.

Specie e sottospecie	Patologie animali	Patologie umane
C. fetus subsp. *venerealis*	bovini e pecore: sterilità e aborto	infezioni generalizzate
C. fetus subsp. *fetus*	bovini, pecore, suini: aborto	enterite
C. jejuni	bovini: mastite; ovini: aborto; volatili: epatite infettiva	enterite
C. coli	suini: enterite	enterite
C. laridis	volatili: infezioni intestinali latenti	enterite
C. sputorum subsp. *sputorum*		infezioni cavità orale
C. sputorum subsp. *bubulus*	infezioni genitali latenti	
C. sputorum subsp. *mucosalis*	suini: infezioni intestinali	
C. fecalis	bovini e pecore: enterite	

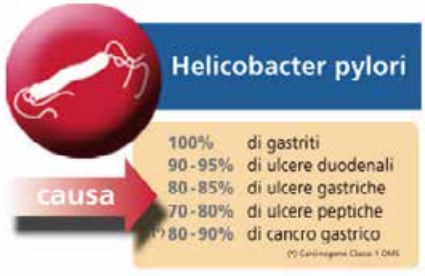
Haemophilus

L'importanza come agenti patogeni dei microrganismi appartenenti a questo genere si trova invece riassunta in tabella.

I microrganismi inseriti in questo genere sono cocco-bacilli immobili, con una stretta esigenza per terreni contenenti i fattori ematici X e V. Alcune specie sono state in un secondo tempo distinte e classificate separatamente (*Actinobacillus*, *Taylorella*). Crescono su Agar sangue o su Agar cioccolato, formando colonie piccole dopo incubazione per 24-48 ore a +37°C, meglio se con il 10% di CO_2. Il fattore X corrisponde all'emina, normalmente presente nell'Agar sangue.

Ospite	*Haemophilus*	Patologia
Suini	*parasuis*	artrite, polisierosite
	pleuropneumoniae (*Actinobacillus*)	pleuropolmonite infettiva
Bovini	*somnus*	Infezioni del SNC, dell'apparato respiratorio e degli organi sessuali
Polli	*paragallinarum*	coriza infettiva
Equini	*equigenitalis* (*Taylorella*)	infezioni degli organi genitali
Ovini	*ovis/agni*	broncopolmonite/setticemia
Pesci	*piscium*	infiammazione ulcerativa delle branchie e della bocca
Uomo	*influenzae*	meningite nei lattanti, polmoniti
	ducrey	ulcera molle

Il fattore V è invece presente nell'Agar cioccolato, oppure viene apportato aggiungendo il NAD o seminando lo *Staphylococcus aureus* (fenomeno di satellitismo). L'esigenza di uno o di entrambi i fattori, assieme ad alcune prove biochimiche, consente una differenziazione tra le specie.



Helicobacter

Principale rappresentante è l'*H. pylori*, germe spiraliforme ubiquitario, talvolta coccoide e non coltivabile. Si rinviene frequentemente nell'acqua. Colpisce, di prevalenza, l'uomo in condizioni igieniche e nutrizionali scadenti, provocando ulcera gastrica o duodenale. È correlato al linfoma dello stomaco. Si conoscono almeno altre ven-

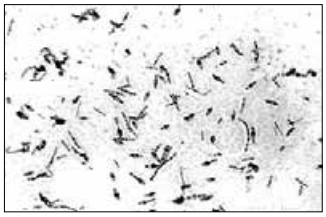
ti specie interessanti gli animali da compagnia (cani, gatti) e da reddito (bovini, suini, polli) che sviluppano patologie simili a quella umana.

La diagnosi colturale avviene per semina delle biopsie gastriche su Agar cioccolato (7% di sangue più antibiotici), dove si producono in 3-5 giorni a +37°C in condizioni di microaerofilia e umidità elevata colonie puntiformi da identificare con prove classiche (catalasi e ossidasi positive) o immunofluorescenza. Per la diagnosi clinica si usa l' *Urea Breath Test*.

• BATTERI GRAM-NEGATIVI ANAEROBI (BACTEROIDES) •

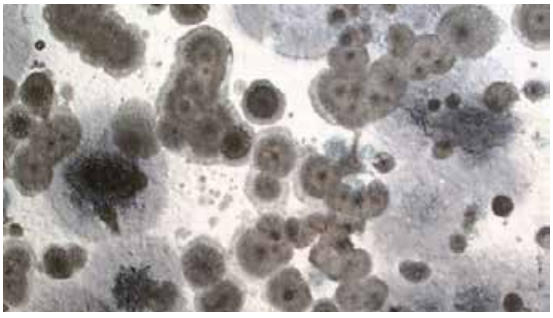
Bacteroides e *Fusobacterium*

*S*ono i generi principali della famiglia *Bacteroidaceae*, bacilli pleomorfi, generalmente allungati, anaerobi obbligati, immobili, non sporigeni. Sono commensali delle mucose (intestino, bocca, genitali), ma possono dare, nell'uomo e negli animali, infezioni purulente necrotizzanti, con formazione di ascessi, spesso in concomitanza con altri batteri. *Bacteroides fragilis* (foto) e *Fusobacterium necrophorum* formano tossine ed enzimi ad azione aggressiva, il cui effetto è dimostrabile per inoculazione sottocutanea nella cavia.



Crescono in Agar sangue antibiotato (terreno di Schaedler) in anaerobiosi e dopo 48 ore a +37°C; mostrano colonie rotonde (2-3 mm di diametro) differenziabili con prove biochimiche o con immunofluorescenza. *F. necrophorum* si riconosce anche con un *test* di inibizione dell'emo-agglutinazione.

• MICETI •



MUFFE E LIEVITI A CONFRONTO

Muffe

Sono organismi pluricellulari formati da filamenti (ife) riuniti in un ammasso (micelio). Hanno dimensioni maggiori dei batteri e crescono più lentamente di questi ultimi e, generalmente, a temperature più basse.

Si moltiplicano mediante la formazione di spore asessuate (sorrette da un'ifa detta conidioforo e aggregate in raggruppamenti di forma caratteristica per ciascuna specie, chiamati conidi) oppure sessuate, dalla struttura più complessa. Resistono a valori estremi di A_w (0,85), di pH (2-8,5) e di temperatura (-5/+60°C). Alcune specie producono potenti tossine (aflatossine).

Vengono genericamente chiamati "funghi". Se ne conoscono circa 50.000 specie, in maggioranza utili in natura per la degradazione e il riciclaggio di materiale organico, la produzione di cibi e bevande fermentate, la fabbricazione di antibiotici e farmaci. Poche centinaia di specie sono patogene. Si tratta di organismi unicellulari o pluricellulari, generalmente aerobi, dotati di un nucleo e di una membrana ben visibili al microscopio. Il sistema di riproduzione consente una grossa distinzione in muffe e lieviti. In medicina alcune decine di specie sono coinvolte nell'insorgenza di patologie specifiche dette micosi. Nella tabella seguente se ne trovano alcuni esempi.

Lieviti

Sono microrganismi unicellulari, rotondeggianti (grossi cocchi di circa 5-6 µm di diametro), raramente formano, aggregandosi, pseudo-ife somiglianti alle muffe. Si moltiplicano per gemmazione. Resistono ad A_w fino a 0,80. Crescono anche a pH 4-4,5 e a temperature fra 0 e +37°C. Alcune specie sono alofile (resistono al sale), altre osmofile (resistono allo zucchero). Il loro sviluppo negli alimenti può provocare odori e sapori sgradevoli.

Localizzazione	Agente eziologico	Micosi
Superficiale	*Malassezia furfur* *Exophiala werneckii*	Pitiriasi versicolor Tinea
Cutanea	*Trichophyton* *Candida albicans*	Dermatofitosi Candidosi (cute, mucose, unghie)
Sottocutanea	*Sporothrix schenkii* *Phialophora verrucosa*	Sporotricosi Cromoblastomicosi
Sistemica (primaria)	*Coccidioides immitis* *Histoplasma capsulatum* *Blastomyces dermatitidis*	Coccidiomicosi Istoplasmosi Blastomicosi
Varia (opportunisti)	*Candida albicans* *Cryptococcus neoformans* *Aspergillus fumigatus*	Candidosi sistemica Criptococcosi Aspergillosi

Metodi di laboratorio

Nella diagnostica clinica, le analisi comprendono l'esame microscopico diretto del campione, l'esame colturale, la ricerca di anticorpi circolanti. L'esame microscopico può avvenire a fresco, montando il preparato in KOH al 10% o previa colorazione (lattofenolo-blu cotone, Giemsa, bianco calcofluor, ecc). Nell'esame colturale, i terreni solidi (ad esempio, Agar Sabouraud) vengono incubati a temperatura ambiente (+20°C) per 3-5 giorni. Le colonie caratteristiche vengono osservate a basso ingrandimento con un microscopio stereoscopico. Le muffe sviluppano con colonie ramificate, cotonose, variamente colorate e di dimensioni tali da invadere l'intera piastra.

I lieviti crescono con colonie rotonde, convesse, a margine netto, del diametro di 2-4 mm dopo 72 ore, cremose, lucenti, bianche o colorate. Si possono talvolta confondere con quelle dei comuni batteri. Si possono anche allestire preparati da colorare. Per il riconoscimento di genere, è conveniente ricorrere alle immagini di un atlante.

Nella diagnostica riguardante gli alimenti, ha notevole significato la ricerca diretta delle tossine (micotossine) con metodi immunoenzimatici o chimici. Nella *routine*, si ricorre, di norma, al conteggio delle muffe e dei lieviti per pronosticare conseguenze dannose in caso di concentrazioni elevate. I terreni più usati sono l'Agar Ossitetraciclina-Glucosio-Estratto di lievito (OGYE) e l'Agar Cloramfenicolo-Rosa Bengala. Le piastre vengono incubate a temperatura ambiente per 5 giorni, con letture giornaliere a partire dal terzo giorno.

Le muffe più frequentemente riscontrate negli alimenti appartengono ai generi ***Penicillium***, ***Mucor***, ***Rhizopus***, ***Aspergillus***. I lieviti più comuni sono ***Candida*** e ***Saccharomyces***.

• SPIROCHETE •

(Borrelia, Treponema, Leptospira)

Sono sottili e molto più lunghe dei batteri comuni, spiraliformi, Gram-negative. Si muovono mediante contrazioni e rotazioni.

Penetrano attraverso lesioni cutanee o attraverso le mucose. Il *Treponema pallidum* è un germe microaerofilo che non si lascia coltivare sui comuni terreni batteriologici e che cresce stentatamente in coltura cellulare primaria. Per isolarlo bisogna ricorrere all'inoculazione su coniglio. Causa la sifilide, un'infezione sistemica cronica a trasmissione sessuale.

Le leptospire, essendo molto mobili, diffondono per via ematica in tutto l'organismo. Danneggiano il fegato e il rene (morbo di Weil) e penetrano nel SNC.

Si vedono al microscopio in campo oscuro, con contrasto di fase, con l'immunofluorescenza. A causa delle difficoltà nell'isolamento in coltura (sono richiesti terreni speciali e lunga incubazione e sono frequenti gli inquinamenti) ha molto seguito la diagnosi sierologica. Possono essere dimostrate anche per inoculazione nella cavia o *hamster*. Alcuni dei caratteri peculiari delle spirochete sono riportati in tabella.

Genere	Aspetto	Specie	Coltivabile	Malattia	Trasmissione
Borrelia	0,2-0,5 x 3-20 µm con 3-10 spire	*B. recurrentis*		febbre ricorrente nell'uomo	pidocchi
		B. burgdorferi	+	malattia di Lyme	zecche
		B. anserina		borreliosi tropicale e subtropicale, nei volatili	zecche, punture d'insetti
Treponema	0,1-0,4 x 3-20 µm con spire regolari	*T. pallidum*	-	sifilide nell'uomo e nella scimmia	venerea
		T. paraluis-cuniculi	-	sifilide nel coniglio, infezioni latenti in topo e cavia	venerea
		T. hyo-dysenteriae	+ (anaerobiosi)	dissenteria nel suino	contatto
		T. innocens	+ (anaerobiosi)	non patogena (?), dissenteria nei suini	contatto
Leptospira	0,1 x 6-12 µm, sottile e con spire regolari	*interrogans* (numerosi sierogruppi e sierotipi)	+	leptospirosi dell'uomo e degli animali	escreta nelle urine, per contatto con suolo o acqua

Leptospira *L. biflexa* non è patogena (vive nell'acqua e nel suolo). *L. interrogans* (patogena per l'uomo e gli animali) comprende 19 sierogruppi divisi in 180 sierotipi (*serovars*).

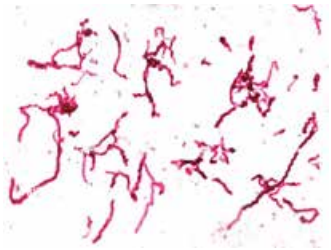
Nella tabella successiva sono mostrate le caratteristiche di patogenicità delle principali leptospire.

Le spirochete si lasciano agglutinare da sieri specifici dopo coltura in terreni liquidi supplementati con siero di coniglio (Stuart, Fletcher) o sieroalbumina bovina (EMJH) e antibiotati (acido nalidixico, vancomicina, polimixina). L'incubazione avviene a 28-30°C per 10-14 giorni. Il metodo diagnostico più usato è il *test* di agglutinazione-lisi, in cui diluizioni del siero vengono messe a contatto, a temperatura ambiente, con vari antigeni in piastra (2-4 ore) o su vetrino (15 minuti). Si osserva la reazione al microscopio (120 ingrandimenti) in campo oscuro e si considerano positivi titoli del siero superiori a 1:400. Altri metodi di ricerca degli anticorpi sono la fissazione del complemento, l'ELISA e le sonde geniche (*Western Blot*).

Patogenicità di alcune Leptospire

Sierogruppo	Sierotipo	Serbatoio naturale	Diffusione	Malattia
australis	*australis* *bratislava*			
autumnalis	*autumnalis*	?	uomo	febbre precipitale
ballum	*ballum*	topo	uomo	febbre, esantema, ittero
bataviae	*bataviae*			
bovis	*bovis*	bovino, volatili	uomo	febbre, prostrazione
canicola	*canicola*	cane	volpe, bovino, suino uomo	meningite asettica
grippotyphosa	*grippotyphosa*	topo, acqua	equino, suino, bovino, ovino, cane uomo	malattia di Marsh
hebdomadis	*hebdomadis*	ratto, topo	uomo	febbre dei 7 giorni
icterohaemorragiae	*copenhageni*	ratto, urine, acqua	uomo	morbo di Weil
javanica	*javanica*			
pomona	*pomona*	suino, bovino	uomo	malattia dei porcai
pyrogenes	*pyrogenes*			
sejroe	*sejroe* *hardjo* *saxkoebing*	suino	bovino	
tarassovi (hyos)	*tarassovi*	suino		

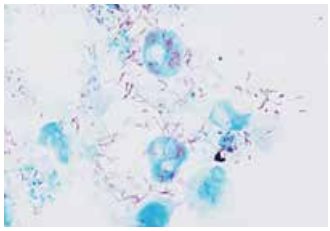
Treponema pallidum
Leptospira interrogans



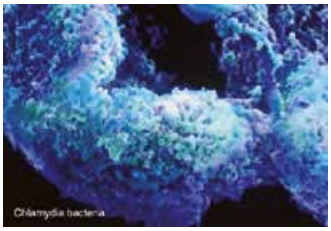
• RICKETTSIE E CLAMIDIE •

Sono microrganismi assimilabili ai batteri, ma con caratteristiche particolari.

Sono parassiti intracellulari obbligati; non crescono in laboratorio sui terreni; si possono isolare per inoculazione su uova embrionate o su colture cellulari; infettano gli animali da esperimento, cavie (Rickettsie) e topi (Clamidie) in cui producono anticorpi dimostrabili; la diagnosi è sierologica (fissazione del complemento, ELISA, immunofluorescenza); si colorano con Giemsa o con anticorpi fluorescenti. Nella tabella seguente sono riportate le caratteristiche di patogenicità di alcuni di questi microrganismi.



Rickettsia spp.

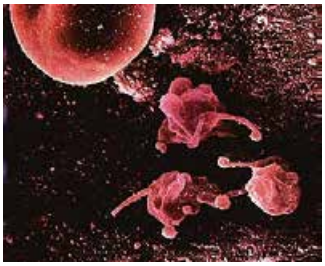


Chlamydia spp.

Patogenicità di alcune rickettsie e clamidie

Famiglia	Genere	Specie	Ospite	Malattia
Rickettsiaceae	*Rickettsia*	*conori*	Uomo, roditori, cane	Febbre bottonosa
	Coxiella	*burnetii*	Uomo, animali	Febbre Q
Chlamidiaceae	*Chlamidia*	*psittaci*	Uomo, volatili	Psittacosi/ornitosi
		trachomatis	Uomo, scimmia	Infezioni oculari, genitali e respiratorie
		pneumoniae	Uomo	Infezioni polmonari

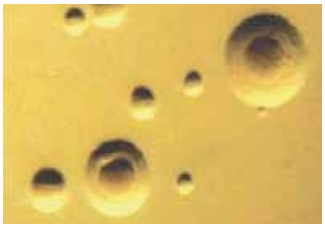
• MICOPLASMI •



Microrganismi di piccole dimensioni, coccoidi, senza membrana cellulare, capaci di passare attraverso i filtri da 0,45 μm, crescono su terreni appositi, si colorano col Giemsa. Il nome generico di "micoplasmi", in realtà, si riferisce a tre famiglie: *Mycoplasmataceae* (generi *Mycoplasma* e *Ureaplasma*), *Acheloplasmataceae* (genere *Acheloplasma*), *Spiroplasmataceae* (genere *Spiroplasma*).

Le prime due famiglie abitano, nell'uomo e negli animali, le mucose, soprattutto dell'apparato respiratorio e urogenitale, provocando talora malattie specie-specifiche. Si contano circa 65 specie. Le principali specie che rivestono importanza clinica sono riportate nella tabella seguente.

L'isolamento richiede terreni appositi, contenenti siero e antibiotici (quasi sempre è presente la penicillina). Le migliori prestazioni vengono offerte da terreni specifici, differenti a seconda della specie animale di provenienza del campione. Sono comunque molto usati il PPLO Broth (da incubare a 37°C per 10 giorni, con successive *sub*-colture su terreno solido) e il PPLO Agar (+37°C con il 5% di CO_2). Le colonie che si sviluppano sulle piastre possono essere riconosciute in base alla morfologia rilevata al microscopio a 60-120 ingrandimenti. Si presentano piccole (meno di 0,5 mm), con centro rilevato e periferia piatta (aspetto cosiddetto di "uovo fritto"). L'identificazione di genere può avvenire con trapianti in terreni per prove biochimiche. Ulteriori prove biochimiche sono state studiate per l'identificazione di specie. L'identificazione di specie può essere eseguita anche con prove di inibizione della crescita, immunofluorescenza, agglutinazione rapida su vetrino con sieri specifici. A causa delle difficoltà pratiche di isolamento in coltura (necessità di terreni complessi, lunga incubazione, facilità di inquinamenti) ha avuto successo la diagnosi sierologica, mediante prove di agglutinazione rapida con antigeni standard (ad esempio, per *M. gallisepticum*), la fissazione del complemento, l'emoagglutinazione indiretta, l'ELISA e le tecniche di biologia molecolare (PCR).



Specie	Ospite	Malattia
Mycoplasma pneumoniae	uomo	polmonite atipica
M. hominis	uomo	infezioni genito-urinarie
M. genitalium	uomo	NGU
M. fermentans	uomo	polmonite
M. mycoides	bovino ovino	pleuropolmonite bovina, mastite, artrite, polmonite
M. agalactiae	ovino	mastite, artrite, congiuntivite
M. bovis	bovino	mastite, artrite, polmonite
M. bovigenitalium	bovino	mastite, polmonite, vaginite
M. hyopneumoniae	suino	polmonite enzootica
M. hyosynoviae	suino	poliartrite, malattie respiratorie
M. gallisepticum	volatili	malattia respiratoria cronica
M. synoviae	pollo, tacchino	sinovite, bursite
M. meleagridis	tacchino	malattia respiratoria, artrite
Ureaplasma urealyticum	uomo	polmonite neonatale, infezioni genito-urinarie

• QUADRO SINTETICO DELLE ANALISI DI *ROUTINE* •

Un modello di organizzazione del laboratorio
(ANTONELLA TOSCA – GIUSEPPE RAVIZZOLA)

Batteriologia	Esami colturali	tratto gastroenterico tratto respiratorio tratto uro-genitale liquidi biologici sangue liquor raccolte varie
	Sierologia	ricerca antigeni batterici ricerca anticorpi
Micologia	Esami colturali	tratto gastroenterico tratto respiratorio tratto uro-genitale cute e annessi cutanei
	Sierologia	ricerca antigeni micotici ricerca anticorpi
Parassitologia	Esami microscopici	tratto gastroenterico tratto respiratorio tratto uro-genitale cute e annessi cutanei
	Sierologia	ricerca antigeni parassitari ricerca anticorpi
Virologia	Esami colturali	colture cellulari prove su cavia
	Sierologia	ricerca antigeni virali ricerca anticorpi

NOTE PRELIMINARI SUL PRELIEVO DEI CAMPIONI

- Il campione deve essere portato al laboratorio nel più breve tempo possibile.
- Qualsiasi campione biologico deve essere considerato potenzialmente infetto. Pertanto, è obbligatorio servirsi dei mezzi di protezione individuale per prevenire incidenti durante il prelievo.
- L'esterno dei contenitori non deve essere contaminato.
- Vanno applicate corrette procedure di prelevamento.
- Si deve chiedere consiglio al laboratorio nei casi di dubbio procedurale oppure in situazioni diverse dalla *routine*.
- Sui contenitori va scritto il nome del paziente e l'analisi richiesta.

• UNA FASE ANALITICA IMPORTANTE •
(forse la più importante)

Le analisi cominciano dal prelievo. Perciò si raccomanda di dare la massima importanza alla modalità di raccolta, al fine di ottenere risultati analitici veritieri. Essendo la letteratura sull'argomento pittosto scarsa, si è ritenuto utile richiamare l'attenzione su alcune avvertenze operative.
Per fare bene i prelievi, occorre competenza, rapidità, colloquio con il laboratorio.
Sussistendo questi requisiti, i tempi diagnostici si accorciano, si evitano accertamenti sierologici, si conosce prima la sensibilità ai farmaci.
Competenza significa possedere conoscenze tecniche e accuratezza. Si opera con cura obbedendo ad alcune regole generali.

- La compilazione del foglio d'accompagnamento del campione (con segnalazione dei trattamenti in corso) è obbligatoria.
- La Circolare n. 3 - 8 maggio 2003 - "Raccomandazioni per la sicurezza del trasporto di materiali infetti e campioni diagnostici" prevede al punto 3.1.1 l' utilizzo di un sistema a tre involucri.

INFEZIONI DELLE VIE RESPIRATORIE

PRELIEVI

Broncoaspirato
Materiale
Un *kit* di raccolta; soluzione fisiologica sterile, provette, guanti sterili.
Metodo
Solo in caso di scarsa secrezione, si immettono con sondino, prima del prelievo, 3-5 ml di soluzione fisiologica sterile. Il prelievo avviene comunque con sondino sterile endo-bronchiale, collegato al *kit* di raccolta. I campioni sono conservabili in frigorifero a +4°C fino a 24 ore.

Espettorato
Materiale
Un contenitore tipo raccolta urine.
Metodo
Un prelievo per polmonite batterica, tre prelievi mattutini consecutivi per sospetta infezione tubercolare o da miceti. Istruire il paziente per raccogliere l'espettorato direttamente nel contenitore, evitando la saliva, al mattino a digiuno, previo risciacquo del cavo orale. Specificare sul foglio d'accompagnamento il tipo di ricerca (germi comuni, *Legionella*, BK, miceti). I campioni sono conservabili a temperatura ambiente fino a due ore, in frigorifero a +4°C fino a 48 ore.

Ricerca	Terreno	Incubazione e lettura
1.Gruppo agenti eziologici di polmoniti batteriche*	Vedi tabelle cute e mucose superficiali e fluido cerebro-spinale	*idem*
2.*Mycobacterium* spp.	Loewenstein-Jensen Middlebrook-7-H-10-Agar Dubos o altro terreno liquido	+37°C fino a 8 settimane, con lettura a 48 ore e giornaliera a partire dalla seconda settimana
3.*Legionella*	BCYE Agar	+37°C per 48 ore e fino a 2 settimane

* *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes*, Gram-negativi anerobi

ANALISI

Patologie evidenziabili:
- polmoniti batteriche da agenti eziologici elencati in tabella, oltre a clamidie e micoplasmi
- infezioni da micobatteri in generale e da *Mycobacterium tuberculosis* in particolare
- infezioni da *Legionella*.

Raccolta del campione
- espettorato (possibilmente circa 10 ml di materiale, raccolti al mattino in recipienti speciali adatti per centrifuga con tappo a vite);
- bronco-aspirato o lavaggio bronchiale (vasetti sterili tipo raccolta urine).

Altri materiali:
- **urine**: per *Legionella* e pneumococco è possibile anche ricercare l'antigene solubile nelle urine
- **siero**: per *Legionella*, clamidie e micoplasmi si possono ricercare gli anticorpi nel siero con immunofluorescenza

Trasporto Immediato a temperatura ambiente; per la ricerca di *Legionella* è possibile refrigerare o congelare il campione.

Fase analitica (per batteri delle polmoniti):
1. valutazione dell'attendibilità dell'espettorato per l'esame batteriologico secondo Bartlett, in base al numero di leucociti e di cellule epiteliali in presenza di muco, mediante striscio e colorazione di Gram
2. Semina sui terreni specifici per **micobatteri**:
   - esame microscopico diretto (colorazione di Ziehl-Neelsen o fluorescenza)
   - digestione, decontaminazione e concentrazione del materiale
   - striscio dal centrifugato e colorazione di Ziehl-Neelsen
3. semina dei terreni selettivi per *Legionella*:
   - esame microscopico dopo striscio e colorazione con anticorpi fluorescenti
   - semina dei terreni selettivi

Identificazione
- Colorazione di Gram, prove biochimiche, PCR per **clamidie**
- Prove biochimiche, anticorpi fluorescenti, PCR
- Gram - : anticorpi fluorescenti, agglutinazione con sieri specifici

INFEZIONI DEL TRATTO GASTRO-INTESTINALE

PRELIEVI (***Coprocoltura***)

Materiale
Un contenitore sterile per feci con cucchiaio, oppure un tampone con terreno di trasporto (Amies).
Metodo
Dalle feci: prendere, preferibilmente accompagnando muco o sangue presente, una piccola quantità con cucchiaio.
Dal retto: introdurre per circa due centimetri il tampone, ruotare contro la mucosa, inserire nel terreno di trasporto.
Per ricercare la tossina di ***Cl. perfringens*** sono necessari due campioni. Vanno richieste specificatamente le analisi al di fuori di quelle eseguite di *routine* (***Salmonella***, ***Shigella***, stafilococco), di norma seguite da antibiogramma.
Conservabilità: feci in frigorifero a +4°C fino a 12 ore, tamponi a temperatura ambiente fino a 48 ore.

Patologie evidenziabili:
a) malattie di origine alimentare (germi responsabili: ***Enterobacteriaceae***, ***Staphylococcus aureus***, ***Clostridium perfringens***, ***Bacillus cereus***, ***Vibrio cholerae*** **e altri vibrioni correlati,** ***Listeria monocytogenes***, ***Campylobacter jejuni*** **e** ***coli***)
b) gastriti (germi responsabili: ***Helicobacter pylori***)
Prelievo dei campioni - Tamponi rettali con terreno di trasporto tipo Amies (per *Campylobacter* tipo Cary-Blair), feci (in barattolo con tappo a vite e cucchiaio), biopsie gastriche (in flaconcino sterile) e provetta-siero per *H. pylori*.
Trasporto - Tamponi a temperatura ambiente fino a 18-24 ore, feci in frigorifero a +4°C fino a 18-24 ore, biopsie consegna immediata al laboratorio.

Fase analitica
a) 1) striscio diretto su piastre di terreni selettivi e/o differenziali (vedi tabella);
2) semina in brodo d'arricchimento con successiva piastratura su terreno selettivo e/o differenziale (tabella).
b) 1) esame microscopico su striscio colorato con arancio d'acridina o con anticorpi fluorescenti;
2) coltura su terreno non selettivo;
3) ricerca dell'antigene solubile con agglutinazione inversa al lattice.

Identificazione - *Salmonella*: colonie incolori su MacConkey Agar e su Hektoen Enteric Agar (con centro nero), trapianti su Kligler Iron Agar, prove biochimiche e sierologiche; ***Shigella***: colonie incolori su MacConkey Agar e su Hektoen Enteric Agar, trapianti su Kligler Iron Agar, prove biochimiche e sierologiche.

Escherichia coli e ***Klebsiella***: colonie rosse su MacConkey Agar oppure arancio su Hektoen Enteric Agar
E. coli **O157:H7 (VTEC):** colonie incolori su MacConkey Sorbitol Agar.
S. aureus*:* colonie nere con doppio alone su Baird-Parker Agar, agglutinazione rapida con Staphyloslide®, *test* della coagulasi, produzione di tossina con agglutinazione inversa passiva al lattice.
Cl. perfringens: colonie nere su SFP Agar, esame microscopico (Gram+), prove biochimiche, anticorpi fluorescenti.
B. cereus: colonie secche tipiche, esame microscopico (Gram+), colorazione dei cristalli parasporali, prove biochimiche, anticorpi fluorescenti.
V. cholerae e altri vibrioni correlati: prove biochimiche, anticorpi fluorescenti.
L. monocytogenes: colonie marroni concave su Oxford Agar, esame microscopico (Gram+), emolisi (+), agglutinazione con sieri specifici.
Campylobacter jejuni e ***coli***: colonie piccole, esame microscopico (Gram-), catalasi (+), *test* dell' ippurato (*C. jejuni* +, *C. coli* -), prove verso acido nalidixico (sensibilità) e cefalotina (resistenza).
H. pylori: esame microscopico (Gram-), catalasi (+), anticorpi fluorescenti.

Ricerca	Terreno	Incubazione e lettura
1. *Enterobacteriaceae* (piastratura diretta) per dimostrazione di: *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Klebsiella*	MacConkey Agar Hektoen Enteric Agar	+37°C per 18-24 ore
Enterobacteriaceae (arricchimento) per dimostrazione di *Salmonella* e *Shigella*	Selenite Cystine Broth	+37°C per 18-24 ore, seguita da piastratura su Hektoen Enteric Agar
E. coli O157:H7 verotossico (VTEC)	MacConkey Sorbitol Agar	+37°C per 18-24 ore
2. *Staphylococcus aureus* (piastratura diretta)	Baird-Parker Agar	+37°C per 24-48 ore
3. *Clostridium perfringens* (piastratura diretta)	SFP Agar	+37°C in anaerobiosi per 24-48 ore
4. *Bacillus cereus*	Cereus Selective Agar	+30°C per 18-24 ore
5. *Vibrio cholerae* e altri vibrioni correlati (piastratura diretta)	TCBS Agar	+37°C per 18-24 ore
6. *Listeria monocytogenes* (piastratura diretta)	Oxford Agar	+37°C per 48 ore
Listeria monocytogenes (arricchimento)	Listeria Enrichment Broth	+30°C per 24 ore, seguita da piastratura su Oxford Agar
7. *Campylobacter jejuni* e *coli* (piastratura diretta)	Campylobacter Selective Agar (Skirrow)	+42°C con 5% CO_2 per 48-72 ore
Campylobacter jejuni e *coli* (arricchimento)	Campylobacter Enrichment Broth	+42°C per 24 ore
8. *Helicobacter pylori*	Chocolate Agar	+37°C con 5% CO_2 per 3-4 giorni

• UN GERME "DIFFICILE DA ISOLARE": IL CLOSTRIDIUM DIFFICILE •

Nell'uomo, la patologia da ***Cl. difficile*** interessa persone adulte e bambini nei primi due anni di vita. Fra gli animali, vengono colpiti suini, cani, puledri, criceti, conigli e cavie. Si tratta di un microrganismo ubiquitario opportunista, ospite abituale dell'intestino, di forma bastoncellare, Gram-positivo, sporigeno, anaerobio. Può causare diarrea da antibiotici, diarree neonatali e, nell'uomo, la colite pseudomembranosa.

L' azione patogena di questo microrganismo si esplica attraverso due enterotossine, chiamate A (colera-simile) e B (citotossina), che causano il rilascio di mediatori pro-infiammatori e di citochine, responsabili della secrezione di fluidi.

La diagnosi di laboratorio è necessaria, in quanto altri microrganismi e virus possono sortire gli stessi segni (coli enterotossici, *Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus*, *Giardia*, *Cryptosporidium*). La colite pseudomembranosa, inoltre, può dipendere da *Escherichia coli* enteroinvasivi o entero-emorragici, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella, Shigella* ed *Entamoeba histolytica*.

Cl. difficile può essere isolato dalle feci di soggetti sintomatici, ma la diagnosi completa esige la determinazione della tossina, in quanto l'agente eziologico può essere nel frattempo scomparso oppure trattarsi di portatori sani che albergano senza conseguenze questo micror-

ganismo. La coltura richiede fino a 72 ore e possiede una sensibilità del 95%. Ha il vantaggio di permettere l'allestimento dell'antibiogramma.

Le feci, appena raccolte o conservate refrigerate per 24-48 ore, possono essere seminate direttamente su terreni selettivi composti generalmente da una base contenente fruttosio, supplementata con cicloserina, cefoxitina e sangue equino. Dopo incubazione a +37°C per 48 ore in anaerobiosi, *Cl. difficile* cresce con colonie ruvide, rotondeggianti, bombate, grigio opaco, del diametro di 4-6 mm, a volte dai bordi filamentosi. L' identificazione degli isolati può avvalersi di prove biochimiche tradizionali, ribo-tipizzzione con *Polymerase Chain Reaction* (PCR), agglutinazione al lattice, immuno-fluorescenza ed ELISA.

INFEZIONI DEL TRATTO GENITALE

PRELIEVI

Essudato vaginale

Materiale
Un tampone d'alginato con terreno di trasporto di Stuart; tre tamponi sterili secchi; una provetta con 3 ml di soluzione fisiologica sterile; due vetrini portaoggetti.

Metodo
Dopo pulizia dei genitali esterni, bagnare nell'essudato tre tamponi secchi. Usarne due per fare altrettanti strisci su vetrino e introdurre il terzo nella provetta con soluzione fisiologica per la ricerca del *Trichomonas*. Prelevare un po' di essudato con il tampone d'alginato e introdurlo nel terreno di trasporto.
Il tampone può essere conservato, assieme ai vetrini, a temperatura ambiente fino a 24 ore e la provetta di soluzione fisiologica per 4-6 ore.

Tamponi cervicali e uretrali

Materiale
Tampone secco sterile; tampone con asta sottile d'alluminio e terreno di trasporto di Amies; un vetrino portaoggetti; un *kit* di prelievo per *Chlamydia*.

Metodo
Dopo pulizia dei genitali esterni, inserire il tampone con asta d'alluminio nell'endocervice, facendolo ruotare. Per prelievo nell'uretra, introdurre il tampone nel meato urinario per circa 1,5 centimetri. Le stesse operazioni vanno ripetute con un tampone secco per allestire un preparato microscopico su vetrino.
Le ricerche da eseguire devono essere specificate sul foglio d'accompagnamento (esame batterioscopico, germi comuni, gonococco, micoplasmi, *Chlamydia*).

Il tampone introdotto nel terreno di trasporto può essere tenuto a temperatura ambiente fino a 24 ore, con limitazione a 2 ore se si vogliono ricercare i micoplasmi. Il *kit* per *Chlamydia* è conservabile in frigorifero a +4°C per 48 ore.

Liquido seminale

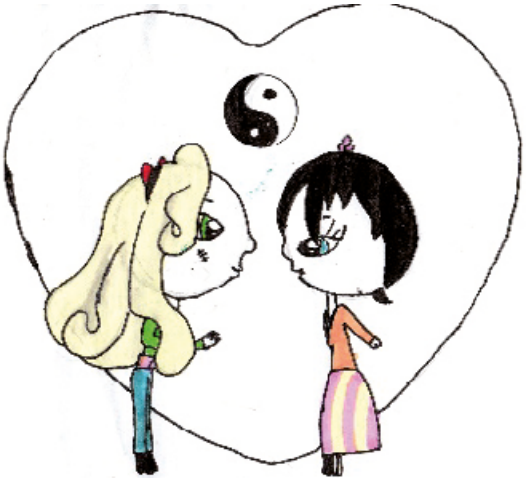
Materiale
Contenitore tipo urine.

Metodo
Far eseguire il prelievo dopo aver urinato e pulito esternamente i genitali, recapitando subito al laboratorio. In caso di spermiogramma, il prelievo deve avvenire dopo almeno tre giorni d'astinenza e giungere al laboratorio entro 45 minuti.

Patologie evidenziabili
Infezioni del tratto inferiore delle vie genitali (soprattutto femminili) con possibile estensione agli organi genitali (utero, tube, ovaie). I microrganismi più frequentemente coinvolti sono: ***Neisseria*, *Haemophilus*, *Gardnerella*, *Candida***, oltre a protozoi (*Trichomonas vaginalis*), spirochete (*Treponema pallidum*) e *virus*.
Raccolta del campione: secrezioni uretrali, vaginali, cervicali prelevate con tamponi di alginato muniti di terreno di trasporto (Amies con carbone) oppure con aspirazione mediante siringa. Trasporto a temperatura ambiente se entro due ore, refrigerato se entro 18-24 ore.
Fase analitica
1. strisci eseguiti dal materiale prelevato e successive colorazioni di Gram e Giemsa (per le inclusioni citoplasmatiche da *Chlamydia* e per la presenza di *Treponema pallidum*)
2. preparato a fresco per *Trichomonas*
3. semina diretta sui terreni in tabella

RICERCA	TERRENO	INCUBAZIONE E LETTURA
Neisseria	Chocolate Agar	+37°C con 5% CO_2 per 18-48 ore
Haemophilus ducreyi	Chocolate Agar	+30°C con 5% CO_2 per 7 giorni
Gardnerella vaginalis	V Agar	+37°C con 5% CO_2 per 48 ore
Funghi	Mycosel Agar	+20°C per 5 giorni e fino a 1 mese
Trichomonas vaginalis	Trichomonas Medium (Broth)	+37°C per 48 ore
Sreptococcus agalactiae (B) Blood Agar +37°C in anaerobiosi 24 ore (si apprezza meglio l'emolisi)	Blood Agar	+37°C per 48 ore
Candida	Sabouraud Dextrose Agar CAF	+37°C per 24-48 ore

Identificazione



1) Gram-negativo, ossidasi (+), maltosio: *N. gonohorroeae* (-), *N. meningitidis* (+)
2) Cocco-bacilli Gram-negativi in catene o ammassi, prove biochimiche
3) Cocco-bacilli Gram-variabili adesi a cellule epiteliali (cellule "guida"), beta-emolitici
4) Morfologia caratteristica delle colonie e su striscio dopo colorazione di Gram
5) Microrganismi flagellati mobili visibili nei preparati a fresco allestiti dal prelievo o dal brodo di coltura
6) Colonie circondate da netta emolisi alla colorazione di Gram positivi a catenella, prove di agglutinazione al lattice
7) Nel colorato Gram: in presenza di spore verificare in siero la produzione di ife, prove biochimiche

INFEZIONI DEL SISTEMA NERVOSO

PRELIEVI (***Liquor***)

Materiale
Provette sterili con tappo a vite, siringhe e aghi per prelievi, guanti sterili, disinfettanti.

Metodo
Disinfettare la cute, lasciar asciugare, introdurre l'ago della siringa, aspirare 3-5 ml da porre in due provette. La consegna al laboratorio deve essere immediata, per consentire la semina dei terreni già predisposti per le ricerche di pneumococco, meningococco, *Haemophilus*.

Patologie evidenziabili:

- meningiti acute (germi responsabili: *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus agalactiae (B), Listeria monocytogenes, Staphylococcus* spp., batteri Gram-negativi tipo *Flavobacterium e Citrobacter, Mycobacterium tuberculosis*)
- meningiti croniche (germi responsabili: *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida*, funghi, *Criptococcus neoformans*, *Nocardia*, *Actinomyces*, *Salmonella*, *Brucella*).

Raccolta del campione
Prelievo asettico di fluido cerebrospinale mediante puntura lombare e raccolta in almeno due provette
Trasporto a temperatura ambiente. Per ricerche virologiche è necessario il trasporto a +4°C

Fase analitica

1. congelamento immediato in laboratorio di una provetta per ricerca antigeni e virus (*Herpes, Entero-, Echo-virus*)
2. centrifugazione di una frazione prelevata a 1000-1500 g per 15-30 minuti
3. strisci con colorazioni dal sedimento (Gram, Ziehl-Neelsen per micobatteri, lattofenolo/blu cotone per funghi e *Criptococcus neoformans*)
4. inoculazione di provette e piastre con i terreni in tabella
5. eventuali trapianti da arricchimento su piastra

RICERCA	TERRENO	INCUBAZIONE E LETTURA
Flora generica (arricchimento)	Brodo tioglicolato	+37°C con lettura quotidiana fino a 5 giorni, Gram e trapianto sui terreni in piastra in caso di sviluppo
Haemophilus influenzae *Neisseria meningitidis*	Chocolate Agar	+37°C con 5% CO_2 e lettura quotidiana fino a 72 ore
Streptococcus pneumoniae *Streptococcus agalactiae* *Staphylococcus spp.* *Brucella* Bacilli Gram-negativi	Blood Agar	+37°C con 5% CO_2 e lettura quotidiana fino a 72 h
Germi enterici Gram-negativi	MacConkey Agar	+37°C fino a 72 ore
Micobatteri	Loewenstein-Jensen Medium - 7 H11Agar	+37°C fino a 8 settimane
Candida e funghi	Mycosel Agar	Temperatura ambiente per 4-6 settimane

Identificazione
Vedi descrizione nei precedenti distretti per le specie già incontrate e inoltre:
Str. agalactiae: colonie di circa 1 mm di diametro, beta-emolitiche, Gram (+), CAMP *test* (+)
Brucella: colonie puntiformi, non emolitiche, Gram (-), agglutinazione rapida con sieri specifici

INFEZIONI DEGLI ORGANI DI SENSO: BOCCA – ORECCHIO – OCCHIO

PRELIEVI

Tamponi faringei, nasali, auricolari, oculari

Materiale
Tamponi faringei: in alginato con terreno di trasporto di Stuart.
Tamponi nasali e oculari: con asta flessibile in alluminio e terreno di trasporto di Amies. Per l'occhio anche tamponi secchi sterili per allestire preparati microscopici estemporanei.

Metodo
Il laboratorio d'analisi deve essere preventivamente avvisato se si intende ricercare il meningococco e la *Bordetella pertussis*,
Operare con cura in modo da evitare la contaminazione del tampone dovuta a contatti con lingua, arcate dentarie, condotti uditivi, coane. Dall'umor vitreo prelevare con siringa sterile. Dall'occhio, usando un tampone secco, fare sempre uno striscio diretto su un vetrino, da fissare e colorare con Gram. Conservabilità dei tamponi con terreno di trasporto: fino a 48 ore a temperatura ambiente.

Kit speciale per ricerca dall'occhio di *Chlamydia trachomatis*

BOCCA

Patologie evidenziabili:
faringiti (germi responsabili: ***Streptococcus pyogenes***, ***Corynebacterium diphteriae***, ***Haemophilus influenzae***, ***Bordetella pertussis***); altre forme morbose sostenute da germi occasionalmente presenti (***Klebsiella pneumoniae***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Neisseria meningitidis***, ***Neisseria gonhorroeae***, ***Streptococcus pneumoniae***, ***Staphylococcus aureus***, ***Mycoplasma pneumoniae***).

Raccolta del campione
Tamponi con terreno di trasporto (Amies o Stuart senza o con carbone Charcoal). Trasporto a temperatura ambiente con consegna al laboratorio entro 18-24 ore dal prelievo.

Fase analitica
1) ricerca diretta dell'antigene *Streptococcus pyogenes* (gruppo A) con *kit*
2) ricerca diretta della *Bordetella pertussis* con immunofluorescenza
3) inoculazione delle piastre con i terreni in tabella.

Identificazione
1) Beta-emolisi (+), Gram (+), bacitracina (+), sieroagglutinazione rapida; 2) Gram (+), catalasi (+), nitrati (+), ureasi (-), glucosio (+), maltosio (-); 3) Fattori XV, satellitismo verso *S. aureus*, glucosio (+), saccarosio (-), lattosio (-); 4) Gram (-), ureasi (-), catalasi (-), glucosio (-).

RICERCA	TERRENO	INCUBAZIONE E LETTURA
Microflora generica	TSA + 5% di sangue di pecora	+37°C con 5% di CO_2 per 18-24 ore
Streptococcus pyogenes (A)	Selective Streptococcus Agar	+37°C in anaerobiosi per 18-24 ore
Corynebacterium diphteriae	Serum Tellurite Agar	+37°C in aerobiosi per 24 ore
Haemophilus influenzae	Chocolate Agar	+37°C con 5% di CO_2 per 24-48 ore
Bordetella pertussis	Bordet-Gengou Blood Agar	+37° C in aerobiosi lettura quotidiana fino a 7 gg.

ORECCHIO

Patologie evidenziabili:

- otite esterna (germi responsabili: ***Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, funghi, micoplasmi**);
- otite media (germi responsabili: ***Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Branhamella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-negativi enterici, anaerobi**);
- otite cronica e mastoidite (germi responsabili: anaerobi tipo ***Bacteroides* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus***).

Raccolta del campione

Tamponi con terreno di trasporto per germi aerobi; sistema di trasporto per germi anaerobi. Trasporto a temperatura ambiente con consegna al laboratorio entro 18-24 ore.

RICERCA	TERRENO	INCUBAZIONE E LETTURA
Flora generica (arricchimento)	Brodo tioglicolato	+37°C per 48 ore e fino a 2 settimane, con eventuale trapianto nei terreni elencati, se negativi alla semina diretta
Flora generica (piastratura diretta)	TSA + 5% sangue di pecora	+37°C con 5% di CO_2 per 24-48 ore
Gram-positivi *Streptococcus pyogenes* (A) *Streptococcus pneumoniae* (B) *Staphylococcus aureus*	Columbia CNA Agar	+37°C in anaerobiosi per 24-48 ore
Gram-negativi non esigenti *Proteus, P. aeruginosa* *Pseudomonas aeruginosa*	MacConkey Agar	+37°C per 24-48 ore
Gram-negativi esigenti *Hemophilus influenzae* *Branhamella catarrhalis*	Chocolate Agar	+37°C con 5% CO_2 per 34-48 ore
Batteri anaerobi *Bacteroides, Fusobacterium, Peptostreptococcus*	CDC Anaerobe Blood Agar	+37°C in anaerobiosi per 48 ore e fino a 7 giorni
Miceti	Sabouraud Dextrose Agar o Mycosel Agar	+25°C per 4-6 settimane

Fase analitica

1. esame microscopico diretto
2. inoculazione del brodo d'arricchimento e delle piastre con i terreni in tabella; eventuali trapianti da arricchimento su piastra.

Identificazione

1) Beta-emolisi (+), Gram (+), bacitracina (+), sieroagglutinazione rapida; 2) Alfa-emolisi (+), Gram (+), optochina (+); 3) Beta-emolisi (+), Gram (+), catalasi (+) ;agglutinazione al lattice (+); 4) Colonie incolori, ureasi (+); 5) pigmentazione blu-verde; 6) Richiesta fattori XV (satellitismo verso *S. aureus*), glucosio (+), saccarosio (-), lattosio (-); 7) Colonie opache, friabili, non adese; 8) Prove biochimiche.

OCCHIO

Patologie evidenziabili:

- congiuntiviti (germi responsabili: ***Chlamydia trachomatis***, ***Staphylococcus aureus***, ***Streptococcus pneumoniae***);
- cheratiti (germi responsabili: ***Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella lacunata*, *Neisseria* spp.**)
- infezioni oculari da germi di irruzione secondaria (germi responsabili: **micobatteri, *Nocardia*, anaerobi, funghi**).

Raccolta del campione

Tamponi con terreno di trasporto per germi aerobi; sistema di trasporto per germi anaerobi. Trasporto a temperatura ambiente con consegna al laboratorio entro 18-24 ore.

Fase analitica

1. esame microscopico diretto (colorazioni Gram, Ziehl-Neelsen, Giemsa)
2. esame microscopico diretto con anticorpi fluorescenti per *Chlamydia trachomatis*
3. inoculazione del brodo d'arricchimento e delle piastre con i terreni indicati in tabella
4. eventuali trapianti da arricchimento su piastra

RICERCA	TERRENO	INCUBAZIONE E LETTURA
Flora generica (arricchimento)	Brodo tioglicolato	+37°C per 48 ore e fino a 2 settimane, con trapianto nei terreni elencati, se negativo alla semina diretta
Flora generica (piastratura diretta)	TSA +5% sangue di pecora	+37°C con 5% di CO_2 per 24-48 ore
Gram-positivi *Streptococcus pyogenes* (A) *Streptococcus pneumoniae* (B) *Staphylococcus aureus*	Columbia CNA Agar	+37°C in anaerobiosi per 24-48 ore
Gram-negativi non esigenti *Proteus* *Pseudomonas aeruginosa*	MacConkey Agar Deoxycholate Lactose Agar Pseudosel Agar	+37°C per 24-48 ore
Gram-negativi esigenti *Hemophilus influenzae* *Neisseria*	Chocolate Agar Thayer-Martin Selective Agar	+37°C con 5% CO_2 per 24-48 ore +37°C con 5% CO_2 per 18-48 ore
Batteri anaerobi *Bacteroides, Fusobacterium, Peptostreptococcus*	CDC Anaerobe Blood Agar	+37°C in anaerobiosi per 48 ore e fino a 7 giorni
Mycobacterium *Nocardia*	Loewenstein-Jensen Medium Selective 7-H-11 Agar	+37°C fino a 8 settimane +37°C fino a 6 settimane
Miceti	Sabouraud Dextrose + CAF	+25°C fino a 8 settimane

Identificazione

1) Beta-emolisi (+), Gram (+), bacitracina (+), sieroagglutinazione rapida; 2) Alfa-emolisi (+), Gram (+), optochina (+); 3) Beta-emolisi (+), Gram (+), catalasi (+), agglutinazione al lattice (+); 4) Ureasi (+); 5) Pigmentazione blu-verde; 6) Fattori XV (satellitismo verso *S. aureus*), glucosio (+), saccarosio (-), lattosio (-), 7) Gram, ossidasi (+), glucosio (+), maltosio (+); 8) *kit* di prove biochimiche per anaerobi; 9) Striscio e colorazione per alcool-acido resistenti (Ziehl-Neelsen).

INFEZIONI DEL SANGUE E DI VARIE SEDI: ESSUDATI e DRENAGGI – CATETERI – BIOPSIE

Emocoltura

Materiale
Due flaconi contenenti brodo di coltura universale a temperatura ambiente; aghi; guanti e garze sterili; disinfettante per la cute.

Metodo

Prelevare, possibilmente prima dell'antibiotico-terapia o, almeno, prima della somministrazione di una nuova dose, adoperando, in questo caso, gli appositi terreni.
Sono consigliabili tre prelievi da zone diverse, distanziati di 15-30 minuti dal brivido o dal rialzo termico, oppure nei giorni successivi in casi di endocardite o di prolungata terapia antibiotica.
Sgrassare la cute con alcool al 70% e trattare con clorexidina o altro idoneo disinfettante.
Indossare guanti sterili per introdurre l'ago in vena. Raccogliere 5-8 ml per ciascun flacone, rispettivamente per germi aerobi e anaerobi, contraddistinti dall'etichetta, evitando di introdurvi aria e di riempirli completamente. Individuare i flaconi col nome del paziente e indicare sul foglio d'accompagnamento l'eventuale ricerca di brucelle o di criptococco. Si deve usare un terreno specifico per la ricerca (su 2,5 ml di sangue) dei micobatteri aviari in pazienti sospetti HIV.
Se il trasporto al laboratorio non è immediato, conservare i flaconi per non più di 48 ore a temperatura ambiente.
Identificazione: vedi descrizione nei precedenti distretti per le specie già incontrate. Patologie evidenziabili: batteriemia da infezioni sistemiche, sepsi neonatale. I germi che più frequentemente si isolano sono: *Brucella* spp., streptococchi beta-emolitici, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus* spp., pneumococchi e meningococchi, *Bacteroides* e *Clostridium* (anaerobi).

Raccolta del campione previa disinfezione della cute, prelievo, in doppio, di 5 ml di sangue con ago-cannula sterile fissata direttamente su due bottiglie da coltura sottovuoto contenenti un anticoagulante non tossico (SPS), PABA (neutralizzante i sulfamidici) e, rispettivamente, un brodo per germi aerobi e uno per anaerobi (vedi tabella).

Trasporto rapido a temperatura ambiente al laboratorio per incubare immediatamente.

RICERCA	TERRENO	INCUBAZIONE E LETTURA
Germi aerobi (semina diretta)	BHI Brodo + SPS + PABA + CO_2	7 giorni a +37°C 14 giorni a +20°C per funghi e lieviti
Germi anaerobi (semina diretta)	Anaerobic Thioglycollate Broth + SPS + emina + vitamina K_1 + CO_2	14 giorni a +37°C
in alternativa: per Brucelle (semina diretta)	Brucella Broth + SPS + CO_2	14 giorni a +37°C
Germi aerobi (*sub*-coltura)	Columbia Agar + sangue	24 ore a 37°C
Germi anaerobi (*sub*-coltura)	Columbia Agar + sangue	24 ore a 37°C in anaerobiosi
Miceti (*sub*-coltura)	Mycosel Agar	14 giorni a 20°C
Brucella spp. (*sub*-coltura)	Brucella Agar	7 giorni a +37°C con 5% CO_2

Fase analitica

1. se vengono adottati metodi manuali, incubazione delle due bottiglie a +37°C (una a +20°C in caso di sospetti miceti) per 14 giorni; se vengono usate apparecchiature automatiche, la lettura viene fatta ogni 10 minuti dallo strumento sulle 24 ore;
2. in caso di positività, prelievo con siringa di 0,1 ml di brodocoltura per semina su terreni non selettivi e selettivi (tabella)

Essudati e drenaggi

Materiale
Siringhe, tamponi con terreno di trasporto di Amies, flaconi con terreno per anaerobi.
Metodo
Essudati con versamento sottocutaneo: prelevare il liquido con siringa, previa disinfezione superficiale.
Essudati con fistola: disinfettare l'orifizio fistoloso e prelevare l'essudato con tampone.
Drenaggi: raccogliere il liquido di drenaggio con una siringa o con un tampone.
Per la ricerca di germi anaerobi, prelevare con siringa l'essudato o il liquido di drenaggio e seminare un flacone contenente l'apposito terreno. Specificare sul foglio d'accompagnamento il tipo di ricerca (germi comuni, anaerobi, miceti, BK).
Il **liquido in siringa** può essere conservato in frigorifero a +4°C, il tampone, introdotto nel terreno di trasporto, a temperatura ambiente fino a 24 ore.

Cateteri

Materiale
Piastre di Agar sangue oppure contenitore tipo urine con soluzione fisiologica sterile, pinze e forbici sterili.
Metodo
Pulire e disinfettare la parte prima di estrarre il catetere. Seminare direttamente, per striscio diretto, alcune piastre oppure, per una determinazione quantitativa, raccogliere nel contenitore 5 centimetri di catetere, staccati dalla punta con pinze e forbici. Consegnare subito al laboratorio.

Biopsie

Materiale
Contenitori sterili tipo urine, flaconi con terreno per anaerobi.
Metodo
Raccogliere metà del materiale dissecato in sede chirurgica. Consegnare subito i prelievi al laboratorio. Se impossibile, aggiungere 2-3 ml di soluzione fisiologica sterile ai pezzi nel contenitore, da conservare in frigorifero a +4°C per non più di 24 ore.

MEZZI DI RACCOLTA DEI CAMPIONI
1-8 = recipienti sterili monouso per urine e altri tipi di materiale
2 = recipiente non sterile per feci
3 = guanti sterili
4 = tampone in alginato con terreno Amies di trasporto
5 = tamponi di vario tipo (*swabs*)
6-7 = provette (*Vacutainer*®) e siringa sterile per prelievo sangue

INFEZIONI DELLE VIE URINARIE

RICERCA

Pseudomonas aeruginosa, *Proteus*, altre *Enterobacteriaceae*)	CLED Agar	+37°C per 18-24 ore
Gram-positivi	Columbia Agar	
Gram-negativi	MacConkey Agar	
Flora generica	Blood Agar	

INFEZIONI DELLA CUTE E DELLE MUCOSE SUPERFICIALI

PRELIEVI

Patologie evidenziabili:
infezioni ospedaliere e *post*-operatorie, ferite settiche e altre lesioni suppurative, micosi cutanee superficiali, dermatiti.
Raccolta del campione: raschiature raccolte in piastre di Petri sterili (previa disinfezione della parte con alcool 70%); tamponi con terreno di trasporto tipo Amies oppure Cary-Blair (per germi anaerobi).
Trasporto raschiati a +4°C, tamponi con terreno di trasporto a temperatura ambiente per non oltre 18-24 ore.

Fase analitica
1. esame microscopico dopo striscio e colorazione di Gram oppure con lattofenolo-blu cotone nel caso di lieviti o funghi; semina su piastre di terreni selettivi (tabella)
2. arricchimento in brodo e successiva piastratura.

RICERCA	TERRENO	INCUBAZIONE E LETTURA
Flora generica	TSA + sangue 5%	+37°C con 5% CO_2 per 48 ore
Staphylococcus spp.	Mannitol Salt Agar	+37°C per 48 ore
Pseudomonas aeruginosa	Pseudosel Agar	+37°C per 18-24 ore
Enterobacteriaceae	MacConkey Agar	+37°C per 24 ore
Anaerobi (piastratura diretta)	Blood Agar	+37°C in anaerobiosi per 48 ore
Anaerobi (arricchimento)	Thioglycollate Broth	+37°C per 48 ore e piastratura su Blood Agar
Muffe e lieviti (piastratura diretta)	Sabouraud Dextrose Agar	+20°C per 5 giorni e fino a 1 mese
Muffe e lieviti (arricchimento)	Trypticase Soy Broth (TSB)	+20°C per 2 settimane e piastratura su Sabouraud Dextrose Agar

Identificazione
Vedi descrizione nei precedenti distretti per le specie già incontrate.

Epidemia di colera a Bologna.
Da una stampa del 1855.

La peste nel
"*Trionfo della morte*".
Affresco a Palazzo
Abatellis - Palermo.

• FORTUNATAMENTE OGGI PER CONTRASTARE TANTE INFEZIONI ESISTONO GLI ANTIBIOTICI •

INHIBIT			CLASIFICATION	ANTIBIOTICS			
		Beta-Lactamase inhib.	Sulbactam	Clavulanic Acid	Tazobactam	Avibactam	
		Penicillins	*Penicinillase – Sensible*				
			Aminopenicillins (broad spectrum)	Ampicillin Amoxicillin			
			Natural Penicillins (narrow spectrum)	Penicillin G: Na, K, Procainic, Benzathine (IV, IM) Penicillin VK: VO			
			Penicinillase – Resistant (very narrow spectrum)				
			Nafcillin	Oxacillin	Dicloxacillin		
			Antipseudomonal (extended spectrum)				
			Carboxipenicillins	Ticarcillin	Carbenicillin		
			Ureidopenicillins	Piperacillin	Azlocillin	Mezlocillin	
		Cephalosporins	1° Generation	Cephalexine	Cefazolin	Cefadroxil	
				Cephradrine			
			2° Generation	Cefuroxime	Cefprozil	Cefaclor	
				Cefoxitin	Cefotetan	Loracarbef	
			3° Generation	Cefoperazone	Ceftriaxone	Cefixime	
				Cefpodoxime	Ceftizoxime	Cefotaxime	
				Cefdinir	Ceftibuten	Ceftazidime	
				Cefditoren			
			4° Generation	Cefepime	Cefpirome *		
			5° Generation	Ceftaroline	Ceftoluzane		
		Carbapenems	Meropenem	Ertapenem	Doripenem	Imipenem + Cylastatine	
		Monobactams	Aztreonam				
	No lactam	*Glycopeptides*	Vancomycin	Telavancin	Dalbavancin	Oritavancin	
		Other	Colistin	Polymyxin B	Daptomycin	Isoniazid	
Protein Synthesis	*30S*	*Amino-glycosides*	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin		
			Streptomycin	Neomycin			
		Tetracyclins	Doxycycline	Minocycline	Tigecyclin		
			Tetracyclin	Demeclocylin*			
	50S	*Oxazolidonones*	Linezolid	Tidezolid			
		Streptogramins	Quinupristin/Dalfopristin				
		Cloramphenicol					
		Macrolides	Erythromycin	Azithromycin	Clarithromycin		
		Lincosamides	Clindamycin	Lincomycin			
DNA topoisomerases	*Fluorquinolones*		Ciprofloxacin Norfloxacin	Moxifloxacin Ofloxacin	Levofloxacin Enofloxacin	Gemifloxacin Sparfloxacin	
	Quinolones		Nalidixic Acid				
Folic Acid Synthesis	*Sulfonamides*		Sulfamethoxazole (SMX)	Ag Sulfadiazine	Sulfasalazine	Sulfisoxazole	
	DHFR inhibitors		Trimethoprim (TMP)	Pyrimethamine			
DNA (damage)	*Nitroimidazoles*		Metronidazole	Tinidazole			
mRNA synth.	Rifampim						

NOTA TECNICA
ANTIBIOGRAMMA E CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC)

La suscettibilità di un germe a sostanze antimicrobiche può essere valutata in laboratorio con il metodo delle diluizioni del farmaco (per trovare la cosiddetta "concentrazione minima inibente, o MIC) oppure con il metodo della diffusione in piastra, standardizzato nel 1966 da W. Kirby e da A. Bauer.

Antibiogramma - La scelta di principio attivo ad azione antibatterica dipende dal tipo di batteri in causa, dalle possibilità di somministrazione, dalla distribuzione specifica negli organi, dagli effetti collaterali indesiderati, dalla tossicità. L'antibiogramma è un *test* di laboratorio in cui una serie di sostanze antibatteriche viene messa a contatto con il microrganismo ritenuto causa dell'infezione. I dati raccolti con l'antibiogramma consentono di mettere in pratica una *terapia mirata*, per la quale il clinico è orientato ad abbandonare i farmaci che non hanno effetto. Consiste nell'inoculare una brodocoltura del germe in esame (opportunamente diluita fino a una certa densità) sulla superficie del Mueller-Hinton agar (un terreno in piastra con determinato spessore dell'agar), sovrapponendo poi dei dischetti di carta impregnati con concentrazioni standard di antibiotici. Dopo incubazione in termostato, vengono misurati i diametri delle zone di inibizione alla crescita che si producono attorno ai dischetti.
Dal confronto dei diametri misurati in mm con una scala di lettura, si definisce il microrganismo sensibile (S), intermedio (I) , resistente (R). È stato dimostrato da Kirby-Bauer che i diametri di inibizione sono inversamente proporzionali alla concentrazione minima inibente (MIC) degli antibiotici.
Il metodo è applicabile ai germi aerobi, aerobi esigenti (supplementando il terreno con siero al 3% o sangue defibrinato al 5%) e microaerofili (incubando a 37°C col 5÷10% di CO_2). Non dà buoni risultati con i germi anaerobi.

Concentrazione minima inibente (MIC) - Esiste la possibilità di stabilire, per un dato farmaco, la quantità minima capace di inibire *in vitro* il microrganismo patogeno contro il quale è destinato.
Questa alternativa è preferibile all'antibiogramma, in quanto consente di minimizzare il dosaggio del principio attivo al livello indispensabile per mantenere l'efficacia, riducendo di conseguenza gli effetti indesiderabili (tossicità e induzione della resistenza).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	512	32	16	16	32	32	32	16	128	64	8/152	-
B	256	16	8	8	16	16	16	8	64	32	4/76	-
C	128	8	4	4	8	8	8	4	32	16	2/38	-
D	64	4	2	2	4	4	4	2	16	8	1/19	-
E	32	2	1	1	2	2	2	1	8	4	0.5/9.5	-
F	16	1	0.5	0.5	1	1	1	0.5	4	2	0.25/4.75	-
G	8	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.25	2	1	0.12/2.4	-
H	4	0.25	0.12	0.12	0.25	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.06/1.2	-

Colonne da 1 a 11 = vari antibiotici; 12 = nessun antibiotico
File di pozzetti da A ad H = concentrazioni decrescenti dell' antibiotico

R
I
S

Il metodo classico per stabilire la concentrazione minima inibente (MIC) prevede di saggiare una brodocoltura batterica contro diluizioni in provetta del farmaco.
Attualmente esistono sistemi miniaturizzati di diluizione in piastra "*microtiter*". Nei pozzetti di ogni colonna (cioè in verticale) sono contenute diluizioni scalari in base 2 di vari antibiotici liofilizzati.
Introducendo la brodocoltura del germe in esame opportunamente diluita nei pozzetti, si ricostituisce il principio attivo e dopo incubazione si legge lo sviluppo batterico dalla torbidità del mezzo.
Si prende in considerazione la diluizione più alta di antibiotico che denuncia, dalla trasparenza del pozzetto, assenza di crescita batterica. Questa diluizione (espressa in microgrammi di farmaco per ml) corrisponde alla concentrazione minima inibente (MIC) di quell'antibiotico verso quel germe.

MALATTIE DA MICETI

SONIA FLAMINIA LAVAGNOLI

MICOSI SUPERFICIALI

Pitiriasi versicolor - Malattia cosmopolita, più diffusa nelle zone tropicali e subtropicali, che colpisce uomo, animali domestici e selvatici, uccelli ed è sostenuta da lieviti lipofili appartenenti al genere *Malassezia*.

Malassezia spp. non si trovano come saprofiti in natura, ma fanno parte della normale microflora commensale cutanea e si localizzano principalmente nelle ghiandole sebacee, che forniscono i lipidi necessari per la loro crescita. Si comportano da patogeni opportunisti quando si verificano cambiamenti della superficie della pelle o negli individui immuno-depressi e sono trasmessi da una persona all'altra per contatto diretto o indiretto attraverso il materiale cutaneo infetto.

Le due specie principali sono *Malassezia furfur*, lievito lipido-dipendente che provoca malattia nell'uomo e *M. pachydermatis*, lipofila ma non lipido-dipendente, che interessa i carnivori domestici, in particolare i cani. Altre specie sono state isolate nell'uomo e negli animali, in particolare *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta, M. slooffiae*, *M. dermatitis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis* interessano la specie umana.

Le lesioni sono rappresentate da piccole macchie irregolari ipo- o iper-pigmentate, che possono essere presenti in tutte le zone del corpo, ma soprattutto in quelle ricche di ghiandole sebacee come viso, cuoio capelluto, collo e schiena (figura 1). In generale non si rileva sintomatologia clinica, ad eccezione talvolta di un leggero prurito. Dermatite seborroica, eczema atopico, follicolite e infezione sistemica nei neonati sono rare complicanze della malattia (Boekhout *et al*., 2010; Velegraki *et al*., 2015; Theelen *et al*., 2018).

Pitiriasi nera (Tinea nigra) - Feoifomicosi superficiale provocata da *Hortea werneckii*, fungo pigmentato diffuso nelle zone tropicali e subtropicali e soprattutto in Africa, Asia, Centro e Sud America. L'infezione viene trasmessa per inoculazione traumatica del micete negli strati superficiali della cute e si riscontra soprattutto nei bambini e nei giovani con un'alta incidenza nelle femmine.

Si manifesta generalmente con macchie di grandezza variabile, irregolari, spesso isolate, pigmentate (marrone, nere), solitamente localizzate sui palmi delle mani e sulle piante dei piedi. La malattia è asintomatica, non contagiosa, non genera reazione immunitaria da parte dell'ospite, né invade gli strati sottostanti a quello corneo dell'epidermide o i follicoli piliferi (Mondello, 2008).

a b c d

e f g

Figura 1 - **Pitiriasi versicolor**: macchie ipopigmentate (a) e iperpigmentate (b), **dermatite seborroica** (c) e **follicolite** (d); **Pitiriasi nera** (e); **Piedra bianca** (f); **Piedra nera** (g).

Piedra bianca (Tinea bianca) - Infezione superficiale dei capelli e dei peli, diffusa nelle aree tropicali e subtropicali, e causata da funghi lievitiformi naturalmente presenti sulla cute umana e appartenenti al genere *Trichosporon* (*T. inkin, T. cutaneum complex, T. ovoides, T. loubieri*).

Noduli soffici, morbidi al tatto, facilmente staccabili, di colore bianco o marrone chiaro sono presenti soprattutto su capelli e peli dei genitali, ma anche sui peli di ascelle, barba e sopracciglia. *Trichosporon* spp. è talora responsabile di infezioni superficiali, come l'onicomicosi, e anche di gravi infezioni opportunistiche (tricosporonosi) negli individui immunocompromessi (Colombo *et al*., 2011).

Piedra nera - Rara infezione dei capelli e dei peli causata dal fungo ascomicete *Pedraia hortae*, presente nelle aree tropicali dell'America Latina e dell'Africa centrale. I capelli e i peli presentano piccoli noduli scuri e duri costituti da ife immerse in una sostanza cementante. *P. hortae* colonizza il fusto del capello e provoca una progressiva debolezza e rottura dei capelli che, nei casi più gravi, può portare alla calvizie (Mondello, 2008).

MICOSI CUTANEE

Dermatofitosi - Complesso di malattie provocate da diverse specie di funghi filamentosi, noti come dermatofiti, appartenenti ai generi *Trichophyton*, *Epidermophyton, Microsporum*. Si tratta di miceti cheratofili e cheratolitici, in grado quindi di rompere la superficie cheratinizzata delle strutture cutanee e invadere l'epidermide e gli annessi cutanei di uomini e animali. *Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* ed *Epidermophyton floccosum* sono le specie di dermatofiti più diffuse nell'uomo.

a b c d

Figura 2 -*Tinea capitis* (a, b); *Tinea barbae* (c); *Tinea corporis* (d, e); *Tinea pedis* (f); *Tinea ungium* (g); **Onicomicosi** da *Scytalidium* spp. (h).

Le diverse specie vengono classificate, a seconda del loro *habitat*, in tre differenti categorie: geofili, zoofili, antropofili. I dermatofiti geofili vivono nel suolo e sono patogeni occasionali sia dell'uomo che degli animali. Quelli zoofili parassitano gli animali e possono essere trasmessi all'uomo. I dermatofiti antropofili infettano soprattutto l'uomo e possono essere trasmessi da persona a persona.

Questa classificazione è utile anche dal punto di vista clinico, in quanto le specie antropofile tendono a provocare infezioni croniche, non infiammatorie, difficili da curare, mentre le specie zoofile e geofile tendono a stimolare una profonda reazione infiammatoria dell'ospite con lesioni, ma che rispondono bene alla terapia e talvolta guariscono spontaneamente.

I dermatofiti sono ubiquitari, cosmopoliti e l'infezione è acquisita tramite contatto diretto con ife, artroconidi o squame cornee da un ospite infetto a uno sensibile, ma anche tramite contatto indiretto con materiale infetto.

Le varie forme di dermatofitosi (*Tinea* o tigna) sono classificate clinicamente in base alla localizzazione anatomica o alla struttura infettata: *tinea capitis* dei capelli, sopracciglia, ciglia; *Tinea barbae* della barba; *Tinea corporis* delle zone glabre della pelle; *Tinea cruris* dell'inguine; *Tinea pedis* del piede; *Tinea unguium* delle unghie (onicomicosi).

Sono sensibili all'infezione persone di tutte l'età e di entrambi i sessi, anche se *Tinea capitis è più comune in età prepuberale, Tinea cruris* e *Tinea pedis* sono più diffuse nei maschi adulti e *Tinea unguium* nei pazienti diabetici. Le infezioni sono generalmente endemiche, ma possono accadere episodi epidemici in situazioni particolari (*Tinea capitis* negli scolari). Una condizione igienica insufficiente, il contatto con animali infetti e malattie intercorrenti (diabete, difetti circolatori) rappresentano i fattori più comuni nell'epidemiologia delle tigne.

La sintomatologia e i segni clinici delle dermatofitosi variano a seconda della specie di dermatofita coinvolta, alla reazione immunitaria dell'ospite e al sito d'infezione.

La classica lesione è costituita da un'alterazione eritematosa, desquamativa, alopecica, pruriginosa, tipicamente circolare con margini ben delimitati e sollevati (*Tinea, ringworm*), che si estende in senso centrifugo, con guarigione al centro. A volte, l'eritema desquamativo è diffuso oppure sono presenti papule, pustule, vescicole e *kerion* (severa infiammazione suppurativa del follicolo pilifero) (figura 2). Infezioni della pelle glabra si presentano solitamente con eritema e chiazze di desquamazione che si espandono dal centro, ma con un'area centrale non lesionata. La dermatofitosi dei piedi e delle mani spesso è accompagnata da onicomicosi e distruzione dell'unghia (White *et al*., 2014; Hayette and Sacheli, 2015; Sharma *et al*., 2015).

Dermatomicosi - Infezioni delle unghie causata da miceti non dermatofiti quali *Microascus* (*Scopulariopsis*) *brevicaulis, Scytalidium dimidiatum, S. hyalinum, Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Candida* spp. (figura 2). Tra questi organismi *Microascus brevicaulis* e *Scytalidium* spp. sono agenti eziologici accertati di onicomicosi, mentre gli altri funghi potrebbero rappresentare semplicemente una colonizzazione saprofitica del materiale ungueale anormale (Abu-Elteen & Hamad, 2012).

Sporotricosi - Infezione cronica granulomatosa causata da *Sporothrix schenkii sensu lato*, micromicete dimorfo ubiquitario nei terreni ricchi di materiale organico in decomposizione. Sono conosciute diverse specie (*S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana*, *S. albicans*, *S. schenckii sensu stricto*) che differiscono per la loro distribuzione geografica. In particolare *S. globosa* e *S. schenckii sensu stricto* sono le specie a diffusione cosmopolita.

L'infezione viene trasmessa generalmente per inoculazione traumatica del materiale contaminato, anche se è possibile l'acquisizione dell'infezione per via inalatoria. Documentata, altresì, è la trasmissione zoonosica associata a morsi e graffi di gatti infetti. Nell'uomo, giardinieri e agricoltori sono i soggetti più a rischio.

a b c

Figura 3 - **Sporotricosi linfocutanea** (a); Lesioni su labbra e viso da *S. schenkii* per contatto con gatto infetto (b, c).

La malattia è caratterizzata da noduli sottocutanei, non dolorosi, che si sviluppano lungo il tragitto dei vasi linfatici e dai linfonodi (figura 3). Le lesioni nodulari possono ulcerare e gemere essudato purulento e necrotico. La disseminazione in altri siti corporei è rara e si manifesta nei soggetti immunocompromessi. Sono possibili localizzazioni a naso, bocca, rene, polmone, ossa, articolazioni, prostata, SNC e tratto gastrointestinale.

La malattia è prevalente nelle aree tropicali e subtropicali, endemica in Giappone, Nord e Sud America (Chakrabarti *et al*., 2015; Pal & Dave, 2017).

Cromomicosi - Infezioni cutanee e sottocutanee di tipo cronico, non contagiose, i cui agenti eziologici sono micromiceti dematiacei, melanino-pigmentati, appartenenti a numerosi generi e specie. Si tratta di funghi saprofiti, largamente diffusi nel suolo e nei vegetali in disfacimento, prevalentemente delle zone tropicali e subtropicali. Inducono infezione attraverso colonizzazione dei tessuti in corrispondenza di traumatismi.

Determinano diversi tipi di lesioni che vengono classificate, dal punto anatomo-clinico; in:

- Cromoblastomicosi: noduli o placche verrucoidi a lenta crescita localizzati in particolare su gambe e braccia più facilmente esposte a traumi. Come agenti eziologici sono implicati *Fonsecaea pedrosoi, Cladophialophora bantiana, Wangiella dermatitidis*, *Phialophora verrucosa*.
- Feoifomicosi sottocutanea: tumefazioni superficiali singole o disseminate, spesso necrotiche e ulcerate, in cui le forme fungine sono di tipo ifale nei tessuti infetti. Sono coinvolti in particolare *Exophiala jeanselmei*, *E. spinifera, Wangiella dermatitidis*, *Verruconis gallopava, Bipolaris spicifera*, *Phialophora verrucosa, Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata* e *A. infectoria;*
- Micetoma eumicotico (maduramicosi): granulomi multipli e ascessi, spesso ulcerati, che contengono grandi ammassi di ife noti come grani. Il processo è fortemente distruttivo del connettivo, del muscolo e dell'osso. Sono implicati soprattutto *Madurella mycetomatis*, *Pseudallescheria boydii*, *Curvularia geniculata* e *Setosphaeria rostrata*. Sono più frequentemente colpiti i soggetti di sesso maschile (figura 4) (Revankar & Sutton,2010; Douglas *et al*., 2016).

Entomoftoromicosi (zigomicosi sottocutanea)

Infezione cronica sottocutanea causata da zigomiceti dell'ordine *Entomophthorales*: *Conidiobolus coronatus*, *C. incongruous*, *C. lamprauges* e *Basidiobolus ranarum,* micromiceti saprofiti nel terreno e nei vegetali in disfacimento presenti soprattutto delle zone tropicali e subtropicali.

B. ranarum, responsabile della basidiobolomicosi, viene trasmesso per inoculazione traumatica ed è responsabile in soggetti immunocompetenti, particolarmente bambini e adolescenti di sesso maschile, della formazione di grossi noduli granulomatosi cutanei, ulcerati e fistolosi, su arti, glutei, schiena e torace. Raramente è coinvolto il tratto gastrointestinale con una sintomatologia simile al morbo di Crohn e con prognosi spesso infausta.

Conidiobolus spp. causano la conidio-bolo-micosi e vengono trasmessi per inalazione delle spore. Nei soggetti sani determinano lo sviluppo di lesioni granulomatose e necrotiche nelle cavità nasali, nei seni paranasali e nei tessuti molli facciali (forma rinofacciale) (figura 4). Nei soggetti immunocompromessi può manifestarsi la forma invasiva con endocardite, polmonite e disseminazione a diversi organi interni (El-Shabrawi *et al*., 2014; Seyedmousavi *et al*., 2015; Shaikh *et al*., 2016).

Lobomicosi

Rara infezione cronica granulomatosa della pelle e dei tessuti sottocutanei sostenuta da *Lacazia loboi*. La malattia è stata diagnosticata generalmente nelle aree tropicali, soprattutto nelle regioni amazzoniche e nei paesi dell'America meridionale e centrale, ma anche negli Stati Uniti, in Canada, Europa e Sud Africa. La lobomicosi non influisce sulla salute generale del paziente che spesso riferisce di un morso di serpente, di una puntura da artropode o di una ferita penetrante. Le lesioni sono rappresentate da noduli dermici, lenticolari o a placche, che possono essere iper- o ipo-pigmentati (figura 4). I noduli sono generalmente indolori, anche se prurito e disestesia vengono occasionalmente descritti (Seyedmousavi *et al*., 2015).

Rinosporidiosi

Infezione granulomatosa cronica, sporadica, sostenuta da *Rhinosporidium seeberi* (mesomicetozoi). Le lesioni, rappresentate da polipi rosati, rugosi e facilmente sanguinanti, sono rilevabili soprattutto sulla mucosa nasale. Se voluminosi possono ostruire le cavità nasali, estendersi al rinofaringe e presentarsi nella cavità orale (figura 4). Occasionalmente le lesioni si possono ritrovare sulla ghiandola lacrimale, sulla cute, sui genitali. Osservata di sovente nelle aree tropicali (India, Sri Lanka, Africa e Sud-America), l'infezione è favorita da traumi locali e non è ritenuta trasmissibile (Tiwari *et al*., 2015; Pal *et al*., 2016).

Pitiosi

Malattia provocata da *Pythium insidiosum*, oomicete acquatico che vive nelle acque dolci stagnanti e paludose e che colpisce uomo e animali (soprattutto equini). L'infezione può manifestarsi in forma sporadica ed epidemica ed è stata segnalata nelle regioni tropicali, sub-tropicali e, durante l'estate, anche nelle zone temperate. Rappresenta una malattia professionale di pescatori, agricoltori, allevatori di bestiame che lavorano a contatto con l'ambiente acquatico dove il micete vive come saprofita. Nell'uomo si osservano varie forme di malattia: cutanea/sottocutanea, oculare, vascolare e sistemica. Nella forma cutanea/sottocutanea si rilevano tumefazioni, ulcere solitamente localizzate sugli arti. La forma oculare, che consegue a traumi o abrasioni a livello dell'occhio, è caratterizzata da cheratite, ulcere corneali e, nei casi gravi, endoftalmite. La forma vascolare, la principale forma di pitiosi nell'uomo, si manifesta con febbre, prurito, parestesia, gonfiore delle gambe, zoppia intermittente cronica, dolorabilità a riposo, ulcerazione gangrenosa del piede o della gamba. Si registrano alcuni casi di pitiosi disseminata con coinvolgimento del tratto gastrointestinale, rino-sinusale e del cervello. È probabile che l'infezione gastro-intestinale si verifichi per consumo di acqua contaminata, mentre per inalazione avvenga l'invasione delle cavità nasali e, per contiguità, il coinvolgimento del SNC (Pal e Mahendra, 2014).

Figura 4 - **Cromoblastomicosi** (a, b, c); **Feoifomicosi sottocutanea** (d); **Micetoma eumicotico** (e); **Basidio-bolo-micosi** (f); **Conidio-bolo-micosi** (g); **Lobomicosi** (h); **Rinosporidiosi** (i); **Pitiosi** (l).

MICOSI SISTEMICHE CAUSATE DA FUNGHI DIMORFI

Blastomicosi - Malattia sostenuta da *Blastomyces dermatitidis* e *B. gilchristii*, miceti dimorfi in grado di infettare individui sani e immunocompromessi. Colpisce frequentemente l'uomo e il cane.

Blastomyces spp. prediligono i terreni umidi e il materiale vegetale in decomposizione (es. legname e foglie), sono stati isolati un po' in tutto il mondo e sono endemici nel Nord America.

L'uomo acquisisce l'infezione per via inalatoria e sviluppa diverse forme cliniche: infezione subclinica, polmonite acuta (simile a polmonite batterica), polmonite cronica (simil-tubercolare o neoplastica), sindrome da *stress* respiratorio acuto (ARDS) (figura 5). Può verificarsi anche disseminazione extra-polmonare alla pelle (forme verrucose), alle ossa, al tratto genitourinario e al SNC (ascesso). Non è una zoonosi, ma il riscontro di malattia nei cani e nei loro proprietari suggerisce la presenza di un'esposizione ambientale comune (Bradsher, 2014; McBride *et al*., 2017).

Istoplasmosi - Micosi polmonare causata da *Histoplasma capsulatum*, fungo dimorfo che vive nei luoghi contaminati dal guano di pipistrelli e uccelli (caverne, vecchi edifici, ponti). Esistono due varietà di *H. capsulatum* che sono patogene per l'uomo: *H. capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii*.

Sebbene *H. capsulatum* var. *capsulatum* sia cosmopolita, le infezioni sono più comuni in America, Africa, India e sud-est Asiatico (aree endemiche). Casi sporadici sono stati segnalati anche in Europa. *H. capsulatum* var. *duboisii* è invece presente solo in Africa.

La maggior parte delle persone sane infette sono asintomatiche. Gli episodi sintomatici si manifestano entro 3-17 giorni dopo l'esposizione. I pazienti immuno-competenti, esposti ad alti livelli di miceti, sviluppano prevalentemente una forma acuta polmonare caratterizzata da

sintomi respiratori aspecifici simil-influenzali (febbre, tosse, dolori al torace e articolari, eritema) e presentano reperti radiografici del torace insignificanti nel 40-70% dei casi. Soggetti con preesistente danno polmonare manifestano la forma cronica, con sintomatologia ricorrente, progressiva fibrosi e cavitazione polmonare e reperti simili alla tubercolosi o al cancro. Viene segnalata anche l'istoplasmosi disseminata, spesso fatale, con coinvolgimento di diversi organi e soprattutto grave retinite, epatosplenomegalia, linfoadenopatia e ingrossamento surrenale. I pazienti giovani o anziani o incapaci di sviluppare un'immunità cellulo-mediata efficace manifestano frequentemente episodi acuti/disseminati. Nei soggetti immunodepressi è possibile la riattivazione della malattia molti anni dopo l'infezione primaria (figura 5) (Ashbee *et al*., 2008; Abu-Elteen and Hamad, 2012).

Figura 5 - **Blastomicos***i*: polmonare acuta (a), polmonare cronica (b), lesioni cutanee (c, d); **Istoplasmosi**: polmonare acuta (e), polmonare cronica (f), oculare (g), cutanea diffusa (h), eritema nodoso per reazione allergica (i).

Coccidioidomicosi - Infezione tellurica, non contagiosa, provocata da *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*, miceti in grado di infettare molti mammiferi anche acquatici, alcuni rettili e uccelli. I funghi si trovano nel suolo delle zone aride degli Stati Uniti sud-occidentali, del Messico e dell'America centro-meridionale.

Sono colpiti sia individui sani che immunocompromessi. L'infezione viene assunta principalmente per via inalatoria, sebbene sia riconosciuta anche la trasmissione transcutanea. Raramente segnalata la trasmissione interumana.

Le infezioni polmonari primarie sono generalmente inapparenti o determinano sintomatologia simil-influenzale o broncopolmonite cronica. La maggior parte delle infezioni polmonari sono autolimitanti e non richiedono trattamento terapeutico. Tuttavia dal polmone l'infezione può diffondere a diversi organi e tessuti, in particolare cute, linfonodi, ossa e articolazioni, cervello e meningi, fegato, con sviluppo di sintomatologia variabile in relazione agli organi coinvolti e talvolta molto grave (figura 6) (Stockamp and Thompson, 2016; Pal & Kumar Pati, 2018).

Paracoccidioidomicosi - Micosi endemica/enzootica delle zone rurali dell'America Latina sostenuta da *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. L'infezione viene acquisita per inalazione o attraverso ferite infette di cute e mucose. La maggioranza dei soggetti infetti è asintomatica o presenta sintomatologia non specifica. Solo una piccola percentuale d'individui infetti manifesta la malattia che tuttavia può essere molto grave e talvolta mortale.

Si distinguono due forme cliniche principali. La forma acuta/subacuta ("giovanile") si verifica prevalentemente nei bambini e nei soggetti giovani, senza nessuna differenza di sesso, e si manifesta come polmonite acuta e/o subacuta, malattia sistemica generalizzata, linfo-adenomegalia frequentemente accompagnata da lesioni della pelle, della mucosa orale e intestinale, delle ossa e con epato-splenomegalia (figura 6).

La forma cronica ("adulta"), che rappresenta l'80-95% dei casi, di solito si evidenzia nei soggetti di età compresa fra 30-60 anni, prevalentemente di sesso maschile (> 90%), lavoratori agricoli, spesso malnutriti. In questo caso le lesioni sono localizzate a livello polmonare (polmonite cronica), alle vie respiratorie superiori, e, frequentemente, sulla mucosa orale e sulla pelle adiacente alla bocca e al naso (granulomi ulcerati) (figura 6). Alcuni pazienti presentano lesioni disseminative alle ghiandole surrenali, ai linfonodi e al cervello. Si ritiene che nella forma cronica la malattia possa manifestarsi molti anni dopo l'esposizione al micete (Lorenzetti Bocca *et al*., 2013; Martinez, 2017).

Figura 6 - **Coccidioidomicosi**: cavitazione polmonare (a), restringimento dello spazio articolare e versamento nell'articolazione del ginocchio (b), lesioni cutanee (c) e linfonodali (d); **Paracoccidioidomicosi**: lesioni orali (e), linfonodali (f), forma disseminata (g); **Penicilliosi**: aree miliari polmonari (h), lesioni cutanee *molluscum-contagiosum-like* (i).

Penicilliosi - Infezione causata da *Penicillium* (*Talaromyces*) *marneffei*, fungo dimorfo ritenuto attualmente un patogeno emergente e in grado di provocare malattia disseminata fatale negli individui HIV positivi. Sono colpite tutte le età ed entrambi sessi, anche se il 90% dei casi riportati in letteratura sono riferibili a persone di sesso maschile.

Il fungo ha come *habitat* naturale il suolo del sud-est Asiatico, della Cina meridionale e della Thailandia, dove è endemico. *T. marneffei* sembra avere come serbatoi animali il ratto del bambù (*Rhizomys sinensis*), altri roditori, come pure i cani, tuttavia non vi è alcuna prova di trasmissione diretta dagli animali all'uomo.

Nei pazienti immunocompromessi, la malattia è solitamente disseminata, con sintomatologia caratterizzata da febbre, lesioni cutanee e sulle mucose (noduli ombelicati), perdita di peso, anemia, tosse produttiva, diarrea, linfoadenopatia generalizzata ed epatosplenomegalia. Gli organi più frequentemente coinvolti sono fegato e polmoni, ma anche linfonodi, midollo osseo, pelle e intestino. La maggior parte dei pazienti presenta lesioni della pelle del viso e del collo, mentre le radiografie del torace mostrano chiazze d'infiltrazione e talvolta formazione di ascessi (figura 6).

Sempre più frequentemente sono colpiti i pazienti normali, nei quali tuttavia manca generalmente la febbre, la splenomegalia e le lesioni cutanee ombelicate, mentre più spesso si rileva la sindrome di Sweet (dermatosi neutrofila febbrile acuta) e infezioni alle ossa e alle articolazioni (Wong & Wong, 2011; Kawila *et al*., 2013).

MICOSI SISTEMICHE OPPORTUNISTE

Candidosi - Il gruppo più importante di patogeni opportunisti è costituito dal genere *Candida*. Sebbene più di 100 specie di *Candida* siano state isolate, circa il 95% di tutte le infezioni cliniche nell'uomo è dovuto a quattro specie: *C. albicans* (la prevalente), *C. glabrata, C. parapsilosis e C. tropicalis*. Il rimanente 5% è costituito da *C. krusei, C. lusitaniae, C. dubliniensis* e *C. rugosa*.

Candida spp. sono comuni nell'ambiente e fanno parte del microbiota umano della cavità orale, del tratto gastrointestinale e genitourinario. Si stima che il 25-50% dei soggetti sani siano portatori di *Candida* come flora normale della cavità orale, con una prevalenza d'isolamento dell'80-90% per *C. albicans*. Le percentuali di colonizzazione salgono nei bambini, negli anziani, nelle donne in gravidanza, nei pazienti oncologici, in quelli con infezione HIV, con diabete mellito scarsamente controllato, con protesi dentarie, sottoposti a trattamento prolungato con corticosteroidi e antibiotici a largo spettro.

Sebbene sia possibile la trasmissione esogena attraverso materiali o soluzioni contaminate, le infezioni sono di solito endogene, causate da ceppi che pre-colonizzano commensalmente l'ospite.

Infezioni superficiali della mucosa si verificano nelle cavità orale e vaginale degli ospiti immuno-competenti e immuno-compromessi.

Nella candidosi orale (mughetto) si evidenziano clinicamente placche bianche e confluenti sulla lingua, mucosa buccale e palato duro, al di sotto delle quali la mucosa è eritematosa (figura 7).

La candidosi vulvo-vaginale rappresenta un notevole problema per le donne in età fertile in tutto il mondo. Nella maggior parte dei casi (>80%) è sostenuta da *C. albicans* ed è associata a un'immunità compromessa e a un aumento dei livelli di estrogeni nel tratto riproduttivo. I sintomi comprendono prurito, bruciore, dolore e perdite vaginali anormale. Almeno il 75% di tutte le donne manifesta almeno una volta nella vita candidosi vaginale e il 5-7% di queste pazienti acquisterà una forma di candidosi cronica ricorrente che durerà per tutta la fase fertile. *Candida* spp. sono anche responsabili di otiti esterne, dermatiti, onicomicosi, infezioni del tratto urinario e respiratorio.

Soggetti debilitati, sottoposti a interventi chirurgici all'addome o con cateteri, pazienti oncologici, bambini prematuri e anziani, sono a rischio di candidemia, infezione molto grave e

spesso mortale (fino al 50%) per disseminazione di *Candida* spp. negli organi interni (fegato, reni, milza, cuore, cervello) (Abu-Elteen & Hamad, 2012; Jadhav & Pal, 2013).

Criptococcosi - Micosi sistemica sostenuta da lieviti capsulati appartenenti al genere *Cryptococcus*. Le due specie responsabili della criptococcosi umana sono *C. neoformans* (var. *neoformans* e var. *grubii*) e *C. gattii*. Le diverse specie e varietà vengono distinte ulteriormente in genotipi molecolari e sierotipi che variano per virulenza, distribuzione geografica e suscettibilità ai farmaci antimicotici.

C. neoformans var *neoformans è ubiquitario,* saprofita del suolo contaminato da escrementi aviari (piccioni in particolare), mentre *C. gattii* si riscontra nelle zone tropicali e subtropicali in associazione con gli alberi (soprattutto di eucalipto). Entrambe le specie provocano lo stesso tipo di malattia, ma le infezioni da *C. gattii* sono caratterizzate da una mortalità meno elevata e da più evidenti sequele neurologiche. *C. neoformans* var *neoformans* e var. *grubii* sono responsabili della maggior parte delle infezioni cliniche negli ospiti immuno-compromessi, mentre *C. gattii* causa malattia principalmente negli ospiti immuno-competenti.

Con l'eccezione di eventi di trasmissione iatrogeni o zoonosici, molto rari, l'infezione viene assunta per via inalatoria causando polmonite nei pazienti immuno-depressi. Negli individui immuno-competenti le cellule fungine vengono eliminate dal sistema immunitario o stabiliscono un'infezione latente asintomatica. Tuttavia, a un successivo episodio di immuno-soppressione, l'infezione latente può diventare manifesta e diffondersi ad altri tessuti, in particolare al sistema nervoso centrale. La malattia si manifesta quindi con una polmonite, da asintomatica a fulminante, a cui segue meningo-encefatite. Altre localizzazioni si rilevano a livello cutaneo, oculare (corioretinite, vitreite, nevrite oculare con invasione del nervo ottico), osseo e prostatico (figura 7).

Il decorso della malattia è variabile, talvolta fatale, e dipende dallo stato immunitario dell'ospite. Le lesioni granulomatose parenchimali (criptococcomi) sono rare nelle infezioni causate da *C. neoformans* var. *neoformans,* mentre sono più comuni nelle infezioni provocate da *C. gattii* in pazienti immunocompetenti. *C. neoformans* var. *neoformans è il patogeno opportunista più diffuso nei pazienti con AIDS (Mondello, 2008;* May *et al*., 2016; Pal & Dave, 2016).

Figura 7 - **Candidosi**: lesioni orali (a), intertrigine (b), onicomicosi (c); **Criptococcosi**: lesioni cutanee (d, e), oculari (f), polmonari (g) e cerebrali (h).

Tricosporonosi

I lieviti appartenenti al genere *Trichosporon* vivono nei terreni ricchi di substrati in decomposizione o di materiale organico (feci di uccelli) e colonizzano la cute umana e il tratto gastro-intestinale. Mentre *T. cutaneum*, *T. ovoides*, *T. inkin* e *T. loubieri* sono responsabili della Piedra bianca, *T. asahii*, *T. mucoides* e *T. asteroides* determinano infezioni profonde invasive e disseminate, con tassi di mortalità che variano tra il 60 e l'80% (figura 8). Pazienti immuno-depressi, con neoplasie ematologiche o esposti a multiple procedure mediche invasive, sono maggiormente a rischio di sviluppare tricosporonosi disseminata (Colombo *et al*., 2011).

Rodotorulosi

Rhodotorula mucilaginosa, *R. glutinis*, *R. rubra* e *R. minuta* sono lieviti commensali di cute e mucose. Possono essere causa di fungemia, meningiti, endocarditi, cheratiti ed endoftalmiti, peritoniti, linfoadeniti, onicomicosi, dermatiti e ulcere orali, con tassi di mortalità che raggiungono il 15-20% particolarmente nei pazienti neoplastici o immuno-compromessi. *R. mucilaginosa* rappresenta la specie più frequentemente isolata (75%) (figura 8) (Wirth & Goldani, 2012).

Geotricosi

Geotrichum candidum, frequente nel microbioma umano, può causare infezioni orali, vaginali, cutanee, intestinali e broncopolmonari derivanti da fonti endogene o esogene. *Magnusiomyces capitatus* (*Geotrichum capitatum*) è responsabile d'infezioni disseminate multiorgano (cervello compreso) in pazienti immuno-compromessi, in particolare nei soggetti con neoplasie ematologiche (figura 8). La malattia è rara, ma spesso fatale (mortalità 60-80%). *M. capitatus* è ampiamente distribuito in natura e può far parte della normale flora cutanea (Abu-Elteen & Hamad, 2012).

Saccaromicosi

Saccharomyces cerevisiae è ben noto nell'industria della panificazione e della produzione di birra ed è anche usato come probiotico nell'uomo. Tuttavia, è stata riportata nell'uomo fungemia per utilizzo di probiotici sia nei soggetti immuno-compromessi che in quelli immunocompetenti. Altre manifestazioni cliniche segnalate comprendono endocarditi, ascessi epatici, esofagiti, peritoniti, polmoniti ed empiema, infezioni del tratto urinario e vaginiti (Lamoth *et al*., 2019).

Pneumocistosi

Pneumocystis jiroveci (*carinii*) è responsabile di una malattia, nota come *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP), che rappresenta una delle principali cause di malattia e morte nelle persone con immunità ridotta. La malattia è stata descritta in pazienti immuno-compromessi, compresi focolai nei bambini malnutriti degli orfanotrofi in Iran negli anni '50. L'epidemia di AIDS, tuttavia, ha segnato l'inizio dell'impatto della malattia su un numero considerevole di pazienti. Il PCP è stato a lungo l'infezione opportunistica più grave e comune dei pazienti con AIDS negli Stati Uniti. Recentemente l'infezione da *Pneumocystis* è stata documentata anche in persone che sono lievemente immunocompromesse, fra cui pazienti con malattia polmonare cronica.
Non si conosce la sua nicchia ecologica in natura, tuttavia è noto che alcuni adulti sani sono portatori di *Pneumocystis* nei polmoni senza presentare alcuna sintomatologia e possono diffondere l'infezione ad altre persone. La pneumocistosi è tipicamente una polmonite interstiziale con consolidamento polmonare, anche se sono segnalate forme extra-polmonari tra i pazienti con AIDS (figura 8). La sintomatologia, non specifica, comprende febbre, tosse non produttiva, difficoltà respiratoria, affaticamento. La mortalità è alta nei soggetti HIV infetti (Lamoth *et al*., 2019).

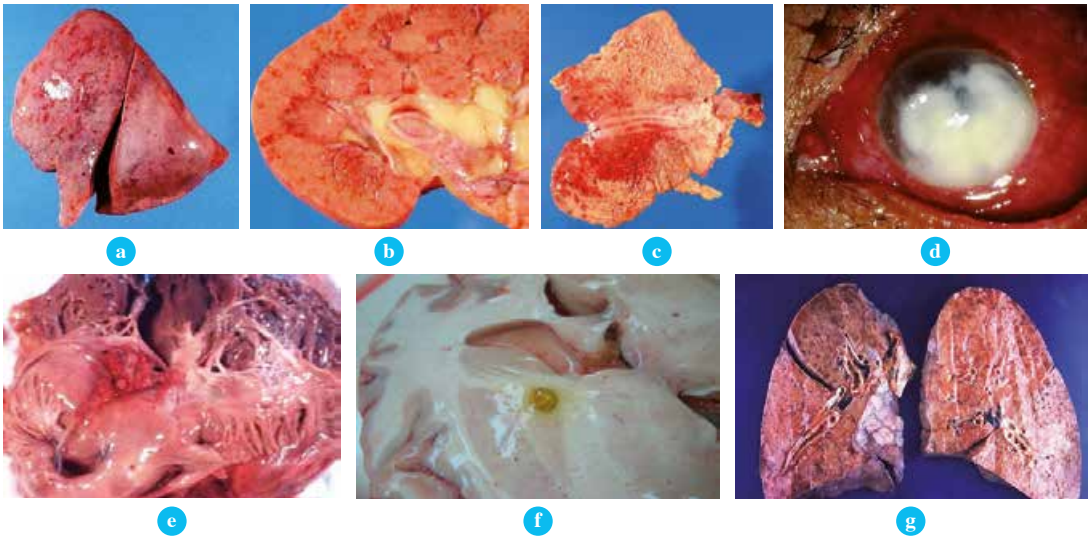


Figura 8 - **Tricosporonosi**: emorragie polmonari (a), ascessi miliari nel rene (b), emorragie gastriche (c); **Rodotorulosi**: cheratite (d), endocardite (e); Lesioni cerebrali da *M. capitatus* (f); Lesioni polmonari da *P. jiroveci* (g).

Aspergillosi - Il genere *Aspergillus* comprende micromiceti filamentosi, ubiquitari nell'ambiente e cosmopoliti, responsabili di un ampio spettro di malattie, a carattere tipicamente opportunistico, che colpiscono prevalentemente i polmoni.

L'insorgere dell'infezione e la gravità della malattia dipendono dallo stato immunitario dell'ospite, ma anche dalla specie di *Aspergillus* coinvolta: i ceppi riconosciuti patogeni per l'uomo appartengono ad *A. fumigatus* (90%), *A. flavus, A. niger*, *A. terreus* e *A. nidulans*.

Aspergillus spp. vengono trasmessi per inalazione e sono causa nell'uomo di diverse patologie: aspergillosi broncopolmonare allergica in individui ipersensibili; aspergilloma polmonare per colonizzazione non invasiva che si sviluppa in lesioni polmonari cavitarie già esistenti; aspergillosi polmonare necrotizzante cronica, malattia subacuta a carattere invasivo limitato, comunemente associata con malattie polmonari preesistenti, alcolismo o terapia cortico-steroidea; aspergillosi invasiva, malattia rapidamente progressiva, spesso fatale, che sopravviene in pazienti gravemente immunodepressi ed è caratterizzata da invasione fungina dei vasi sanguigni e disseminazione in vari organi corporei, in particolare fegato, rene e cervello (figura 9). Le forme più comuni sono l'aspergillosi polmonare cronica, l'aspergilloma e l'aspergillosi broncopolmonare allergica.

Altre manifestazioni cliniche non invasive comprendono la sinusite granulomatosa cronica, l'otite, la cheratite e l'onicomicosi (figura 9) (Bennett, 2010; Abu-Elteen & Hamad, 2012).

Ialoifomicosi - Le ialoifomicosi comprendono un gruppo eterogeneo di muffe ialine, non pigmentate, diverse tassonomicamente, che possono essere indistinguibili da *Aspergillus* spp. all'esame microscopico diretto. Fra queste, le più importanti, anche se rare, appartengono ai generi *Fusarium*, *Scedosporium*, *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*.

Fusarium spp. nei soggetti immuno-compromessi provoca comunemente polmonite, sinusite e fungemia con o senza lesioni cutanee. La forma disseminata, con alti tassi di mortalità, si rileva con maggiore frequenza nei pazienti neutropenici e sottoposti a trapianto ed è caratterizzata da emocoltura positiva (fino al 75%) e dalla comparsa di noduli cutanei purpurei con necrosi centrale. Tra gli ospiti immuno-competenti, cheratite e onicomicosi sono le infezioni più comuni.

Le specie più comunemente isolate dai campioni clinici sono *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioidis* e *F. moniliforme*.

Scedosporium apiospermum (teleomorfo, *Pseudallescheria boydii*) e *S. prolificans* sono onnipresenti funghi filamentosi che vivono nel suolo e nelle acque inquinate da materiale organico. Sono causa d'infezioni cutanee che possono estendersi ai tessuti circostanti (tendini, legamenti e ossa) e dare origine a micetoma. Si verificano anche infezioni disseminate negli organi interni, in particolare artrite settica, osteomielite, sindrome linfocutanea, polmonite, endocardite, peritonite, ascesso cerebrale, corioretinite ed endoftalmite. Negli individui immuno-depressi il tasso di mortalità varia tra 55-90%.

Le infezioni da *Acremonium* spp. sono in rapido incremento, soprattutto nei pazienti sottoposti a terapia prolungata con corticosteroidi, splenectomizzati e trapiantati. Polmonite, artrite, osteomielite, endocardite, meningite, peritonite e sepsi con fungemia sono segnalate nei pazienti immuno-compromessi, ma micetomi e infezioni della cornea si registrano anche in ospiti immuno-competenti. *A. strictum*, *A. kiliense* e *A. falciforme* sono le specie più comunemente isolate.

Paecilomyces variotii e *P. lilacinus* (*Purpureocillium lilacinus*) causano prevalentemente oculo-micosi, infezioni cutanee e sottocutanee, polmoniti granulomatose. Sono segnalate anche infezioni di vario tipo: sinusite, onicomicosi, otite media, endocardite, osteomielite, peritonite e fungemia correlata all'utilizzo di cateteri endovenosi.

Figura 9 - **Aspergillosi**: forma polmonare cronica (a), aspergilloma polmonare (b), lesione cerebrale (c) e cutanea (d); **Fusariosi**: lesioni cutanee (e), oculari (f) e onicomicosi (g); Micetoma (h) e ascesso tiroideo (i) da *S. apiospermum*; Micetoma da *A. strictum* (l); Lesioni cutanee (m) e cheratite (n) da *P. lilacinus*.; Lesioni orali da *T. longibrachiatum* (o).

Trichoderma spp., tradizionalmente impiegate nell'industria biotecnologica come fonti di enzimi e antibiotici e in agricoltura come promotori di crescita delle piante e biofungicidi, erano ritenute non patogene. Tuttavia, *Trichoderma longibrachiatum* e *T. citrinoviride* stanno emergendo come importanti patogeni opportunisti nei pazienti immuno-compromessi e nei pazienti sottoposti a dialisi peritoneale. In particolare *T. longibrachiatum* è stato riconosciuto come causa di malattia disseminata fatale in pazienti con neoplasie ematologiche. Si rilevano con maggiore frequenza infezione polmonare, sinusite invasiva, peritonite, endocardite e ascesso cerebrale.

Altre specie segnalate come patogeni emergenti sono: *Scopulariopsis brevicaulis*, che causa infezioni della pelle, micetomi, sinusiti invasive, cheratiti, endoftalmiti, polmoniti, endocarditi; *Rasamsonia argillacea*, responsabile d'infezione polmonare con malattia granulomatosa cronica in pazienti con fibrosi cistica, con coinvolgimento di ossa e SNC; *Schizophyllum* spp., isolati in casi di rinosinusite e broncopolmonite in soggetti immunocompetenti (figura 9) (Abu-Elteen and Hamad, 2012; Douglas *et al*., 2016; Lamoth *et al*., 2019).

Mucormicosi (Zigomicosi) - Infezioni sporadiche, ma cosmopolite, causate da funghi che appartengono all'ordine *Mucorales* (classe *Zygomycetes*). Diversi generi sono patogeni per l'uomo, come *Rhizopus* (*R. arrhizus*), *Mucor* (*M. circinelloides*), *Lichtheimia* (ex *Absidia corymbifera*), *Rhizomucor* (*R. pusillus*), *Saksenaea* (*S. vasiformis*), *Cunninghamella* (*C. bertholletiae*), *Syncephalastrum* (*S. racemosum*) e *Apophysomyces* (*A. elegans*).

Rhizopus e *Mucor* sono considerati gli agenti causali prevalenti nei casi di mucormicosi umana. Le infezioni sono rare, ma, quando presenti, sono generalmente acute e rapidamente progressive con mortalità variabile dal 70% al 100%. Interessano prevalentemente i pazienti ospedalieri, in particolare in soggetti sottoposti a trapianto di cellule staminali. Altri fattori predisponenti alla malattia includono terapia con corticosteroidi, chetoacidosi diabetica, danno renale, emopatie maligne, mielosoppressione.

Gli zigomiceti sono ubiquitari nel suolo e nel materiale organico in disfacimento. L'infezione avviene per inalazione, ingestione o contaminazione delle ferite con sporangiospore presenti nell'ambiente. Sono segnalati episodi di contaminazione nosocomiale tramite i sistemi di condizionamento ed episodi di mucormicosi primaria cutanea attraverso l'uso di bendaggi contaminati su ferite chirurgiche.
Gli zigomiceti sono tipicamente angioinvasivi e sono responsabili di diverse forme cliniche. La forma più comune è la rinocerebrale, infezione acuta invasiva della cavità nasale, dei seni paranasali, delle orbite oculari e delle strutture facciali, che coinvolge anche il SNC e la cavità orale con ulcere palatali a margini ben delimitati, spesso necrotiche. È riportata anche la forma periorbitale, mono o bilaterale, che interessa l'occhio e che si estende a palato e SNC. Molto comune è anche la forma polmonare, infezione primaria in pazienti neutropenici, può essere confusa con l'aspergillosi invasiva. L'esame radiografico del torace rivela una progressiva broncopolmonite o cavitazione e consolidamento dei lobi polmonari. Le lesioni polmonari sono infarcite di ife, con trombosi dei grandi vasi polmonari e possono essere presenti forme sferiche simili all'aspergilloma. In seguito all'invasione vascolare del fungo, si può avere emorragia polmonare, con emottisi fatale, e disseminazione dell'infezione in tutti gli organi.

La mucormicosi gastrointestinale per ingestione di zigospore è relativamente rara ed è caratterizzata da dolori addominali e sintomatologia aspecifica che può progredire in ulcerazione e melena.

La forma cutanea può essere un segno di disseminazione ematogena, con lesioni nodulari con ecchimosi, o derivare da contaminazione di traumi, ferite chirurgiche, ustioni. L'infezione può essere superficiale o estendersi rapidamente ai tessuti sottocutanei.

La mucormicosi invasiva è tipica dei pazienti con neoplasia ematologica o che hanno subito un trapianto e presenta tassi di mortalità del 90% (figura 10) (Waness *et al*., 2009; Abu-Elteen & Hamad, 2012; Douglas *et al*., 2016).

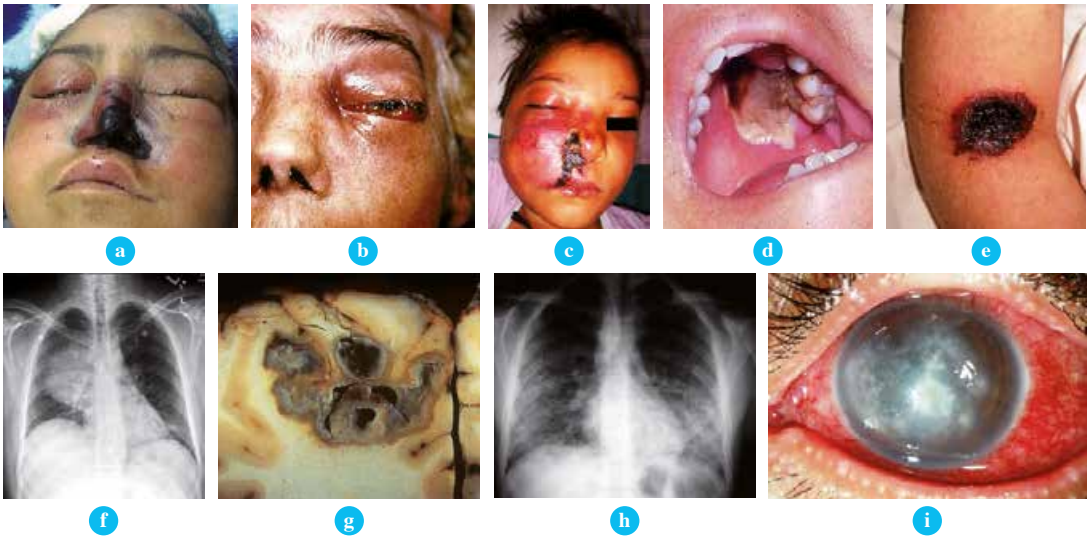


Figura 10 - **Mucormicosi**: rinocerebrale (a), periorbitale (b), rinofacciale (c), ulcera del palato (d), lesione cutanea (e) e cavitazione polmonare (f); Ascesso cerebrale da *Cladophialophora bantiana* (g); *Adiaspiromicosi polmonare* (h); Cheratocongiuntivite da *Enterocytozoon bieneusi* (i).

Muffe dematiacee (Feoifomicosi) - I funghi dematiacei possono causare una varietà d'infezioni cutanee e sottocutanee in ospiti immuno-competenti e infezioni invasive o disseminate in ospiti immuno-competenti e immuno-compromessi. Molte muffe colpiscono il sistema nervoso come *Cladophialophora bantiana*, *Bipolaris spicifera*, *Exophiala* spp., *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., *Exserohilum* spp., *Myrmecridium obovoideum, Verruconis gallopava* e *Chaetomium atrobrunneum*. La formazione di ascesso cerebrale è la presentazione più comune (figura 10). Tuttavia, *Bipolaris* spp. e le infezioni da *Exerohilum rostratum* possono inizialmente presentarsi come una sinusite per poi estendersi nel SNC (Douglas *et al*., 2016; Lamonth *et al*., 2019).

Adiaspiromicosi - Rara infezione polmonare causata da *Emmonsia crescens*, *E. parva*, *E. pasteuriana*. L'infezione è di solito localizzata e asintomatica, ma può svilupparsi una grave polmonite granulomatosa con interessamento dei linfonodi, a seconda del carico infettante e dell'immunocompetenza dell'ospite (figura 10) (Seyedmousavi *et al*., 2015).

Microsporidiosi - Le infezioni microsporidiali più comuni negli esseri umani sono dovute a *Enterocytozoon bieneusi* ed *Encephalitozoon intestinalis*. Entrambe le specie sono state rilevate in tutto il mondo, principalmente in pazienti affetti da HIV con diarrea cronica, ma anche in soggetti immuno-competenti con diarrea acuta autolimitante. *Encephalitozoon cuniculi* (ospite principale il coniglio) ed *Encephalitozoon hellem* (ospiti principali gli uccelli) sono

stati diagnosticati, con pochissime eccezioni, in pazienti immunocompromessi e come causa di infezioni locali (oculari, del tratto respiratorio e genitourinario) o disseminate (figura 10) (Seyedmousavi *et al*., 2018).

Tabella 1 - Principali micosi dell'uomo

MALATTIA	AGENTE EZIOLOGICO	TRASMISSIONE	SINTOMATOLOGIA E LESIONI	DIFFUSIONE
MICOSI SUPERFICIALI				
Pitiriasi versicolor	*Malassezia furfur, Malassezia* spp.	Endogena	Asintomatica, macchie irregolari ipo- o iperpigmentate, leggero prurito	Cosmopolita, soprattutto aree tropicali e subtropicali
Pitiriasi nera (*Tinea nigra*)	*Hortea werneckii*	Inoculazione traumatica	Asintomatica, macchie irregolari e pigmentate su palmi mani e piante piedi	Zone tropicali e subtropicali
Piedra bianca (*Tinea bianca*)	*Trichosporon cutaneum, Trichosporon* spp.	Endogena	Asintomatica, noduli bianchi, morbidi, facilmente staccabili su capelli e peli	Zone tropicali e subtropicali
Piedra nera	*Pedraia hortae*	Contatto diretto o indiretto con materiale infetto	Asintomatica, noduli neri attorno al fusto di capelli e peli	America Latina e Africa centrale
MICOSI CUTANEE				
Dermatofitosi	*Trichophyton, Epidermophyton, Microsporum* spp.	Contatto con ospite infetto o con materiale contaminato	Eritema desquamativo, alopecico, circolare, prurito, guarigione al centro	Cosmopolita
Dermatomicosi	*Microascus brevicaulis e Scytalidium* spp.	Contatto con materiale contaminato	Onicomicosi	Zone tropicali e subtropicali
Candidosi	*Candida albicans, Candida* spp.	Endogena	Placche biancastre confluenti o eritema su cute, mucose, unghie	Cosmopolita
MICOSI SOTTOCUTANEE				
Sporotricosi	*Sporothrix schenkii sensu lato*	Inoculazione traumatica, possibile via inalatoria	Noduli ulcerati, non dolorosi, su arti, lungo il tragitto dei vasi linfatici; rare altre localizzazioni e forma disseminata	Aree tropicali e subtropicali, endemica in Giappone, Nord e Sud America
Cromoblastomicosi	*Fonsecaea, Cladophialophora, Wangiella, Phialophora*	Inoculazione traumatica	Noduli o placche verrucoidi su braccia e gambe	Zone tropicali e subtropicali

Feoifomicosi	*Exophiala, Wangiella, Verruconis, Bipolaris, Phialophora, Cladosporium, Alternaria*	Inoculazione traumatica	Tumefazioni superficiali, spesso necrotiche e ulcerate, con ife nei tessuti	Zone tropicali e subtropicali
Micetoma (Maduramicosi)	*Madurella*, *Pseudallescheria*, *Curvalaria*, *Setosphaeria*	Inoculazione traumatica	Granulomi multipli e ascessi	Zone tropicali e subtropicali
Conidiobolomicosi	*Conidiobolus coronatus, C. incongruus, C. lamprauges*	Inalazione delle spore	Granulomi ulcerati nelle cavità nasali, rara forma disseminata nei soggetti immunocompromessi	Aree tropicali (Africa Occidentale, Sud America ed India)
Basidiobolomicosi	*Basidiobolus ranarum*	Inoculazione traumatica	Granulomi ulcerati e fistolosi su arti, glutei, tronco	Aree tropicali soprattutto Africa
Lobomicosi	*Lacazia loboi*	Inoculazione traumatica	Noduli verrucoidi, ulcerati, pigmentati, indolori	Zone tropicali americane
Rinosporidiosi	*Rhinosporidium seeberi*	Inoculazione traumatica	Polipi rosati nasali, facilmente sanguinanti, talora oculari, cutanei, genitali	Zone tropicali di Asia, Africa, sud America
Pitiosi	*Pythium insidiosum*	Inoculazione traumatica, consumo di acqua contaminata, inalazione	Tumefazioni ulcerate cutanee o oculari, forma vascolare necrotizzante, forma sistemica e gastrointestinale	Zone tropicali e subtropicali, anche temperate (estate)
MICOSI SISTEMICHE PRIMARIE				
Blastomicosi	*Blastomyces dermatitidis*, *B. gilchristii*	Inalazione	Infezione subclinica, polmonite acuta e cronica, ARDS, anche disseminazione extrapolmonare	Cosmopolita, endemica in Nord America
Istoplasmosi	*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e var. *duboisii*	Inalazione	Forma asintomatica, polmonare acuta e cronica, disseminata	Cosmopolita, endemica in America, Africa, Asia; var. *duboisii* solo in Africa
Coccidioidomicosi	*Coccidioides immitis, C. posadasii*	Inalazione, transcutanea	Forma asintomatica, polmonare acuta e cronica, disseminata	Stati Uniti sud-occidentali, Messico, America centro-meridionale
Paracoccidioidomicosi	*Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii*	Inalazione, transcutanea	Forma asintomatica e subclinica, forma polmonare acuta e cronica, muco-cutanea, disseminata	America Latina
Penicilliosi	*Talaromyces marneffei*	Inalazione	Forma disseminata soprattutto polmoni, fegato, cute, linfonodi	Sud-Est Asiatico, Cina, Thailandia

MICOSI SISTEMICHE OPPORTUNISTE				
Candidosi	*Candida albicans, Candida* spp.	Endogena	Infezione muco-cutanea; candidemia (sistemica)	Cosmopolita
Criptococcosi	*Cryptococcus neoformans, C. gattii*	Inalazione, rara transcutanea	Infezione asintomatica, polmonite, meningoencefalite, lesioni cutanee, oculari, ossee	*C. neoformans* cosmopolita, *C. gattii* zone tropicali e subtropicali
Aspergillosi	*Aspergillus fumigatus, A. flavus, A. niger, A. terreus, A. nidulans*	Inalazione	Broncopolmonite allergica, aspergilloma polmonare, forma polmonare cronica, aspergillosi invasiva	Cosmopolita
Mucormicosi	*Mucor, Rhizopus, Rhizomucor, Lichtheimia, Saksenaea, Cunninghamella, Syncephalastrum, Apophysomyces*	Inalazione, ingestione, transcutanea	Forma rinocerebrale, periorbitale, polmonare, gastrointestinale, cutanea, invasiva	Cosmopolita
Tricosporonosi	*Trichosporon asahii, T. mucoides, T. asteroides*	Endogena, esogena, iatrogena	Infezioni disseminate in pazienti immunodepressi	Cosmopolita
Rodotorulosi	*Rhodotorula mucilaginosa, Rhodotorula* spp.	Endogena	Infezioni disseminate in pazienti immunodepressi	Cosmopolita
Geotricosi	*Geotrichum candidum, Magnusiomyces capitatus*	Endogena	Infezioni localizzate e diffuse (immunodepressi)	Cosmopolita
Saccaromicosi	*Saccaromyces cerevisiae*	Orale	Infezioni disseminate per utilizzo di probiotici	Cosmopolita
Pneumocistosi	*Pneumocystis jirovecii* (*carinii*)	Inalazione	Polmonite interstiziale grave (PCP) soprattutto in soggetti con AIDS	Cosmopolita
Ialoifomicosi	*Fusarium, Scedosporium, Acremonium, Paecilomyces, Trichoderma, Scopulariopsis*	Inalazione, transcutanea	Infezioni disseminate in pazienti immunodepressi e localizzate in soggetti immunocompetenti	Cosmopolita
Feoifomicosi sistemica	*Cladophialophora, Curvularia, Fonsecaea, Verruconis, Wangiella, Bipolaris*	Transcutanea, inalazione	Ascesso cerebrale, infezioni polmonari e cuore	Cosmopolita
Adiaspiromicosi	*Emmonsia crescens, E. parva, E. pasteuriana*	Inalazione	Da asintomatica a grave polmonite granulomatosa	Cosmopolita
Microsporidiosi	*Enterocytozoon bieneusi, Encephalitozoon intestinalis*	Orale	Infezione gastrointestinale: diarrea cronica persistente, acuta autolimitante	Cosmopolita

MALATTIE DA VIRUS

SONIA FLAMINIA LAVAGNOLI

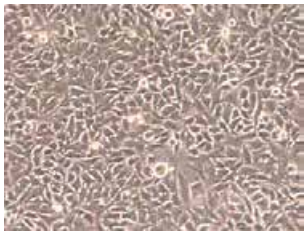
Coltivare un virus in laboratorio per studiarlo o produrre vaccini è stato il sogno di molti ricercatori, che solo alla fine dell' 800 sono riusciti a gettare le basi delle tecniche necessarie per raggiungere questi scopi. In pratica, essi hanno cominciato a realizzare le colture cellulari, unico substrato di mantenimento e moltiplicazione dei virus al di fuori degli organismi viventi.

Sydney Ringer ha composto nel 1882 una soluzione fisiologica capace di mantenere – almeno per un certo tempo - le funzioni vitali di alcuni tessuti animali. Wilhelm Roux nel 1885 riuscì a far sopravvivere in laboratorio delle cellule ricavate da embrioni di pollo entro una soluzione salina. Era l'inizio delle **colture primarie, isolate direttamente dal tessuto**. Si trattava di cellule eterogenee, simili a quelle del tessuto di origine, ma con limitate capacità di proliferazione e una precoce senescenza.

Il passo decisivo è stata la scoperta di **linee cellulari** permanenti, ottenute per sub-coltura da colture primarie, che possono essere rese immortali attraverso mutazioni spontanee o indotte e conservate mediante congelamento in azoto liquido (-195°C). Fra il 1910 e il 1923 Montrose Burrows e Alexis Carrel sviluppano la prima linea cellulare coltivando tessuti animali in un terreno composto da plasma, sali e siero.

Elementi necessari per coltivare le cellule in laboratorio

• Supporti in polistirene biologicamente inerti, non tossici e trasparenti • Termostato incubatore a +37°C con il 5% di CO_2, umidità relativa >98% • Terreno di coltura completo, contenente sali minerali, aminoacidi, glucosio, un tampone bicarbonato, un indicatore di pH (pH richiesto 7.2 – 7.5), siero, antibiotici; fra i terreni si citano: Eagle, Hanks, 199 Medium • Microscopio rovesciato per colture cellulari • Linea cellulare stabilizzata (HeLa, BHK, CHO, ecc.)



Il monostrato cellulare che aderisce spontaneamente al supporto plastico può essere osservato al microscopio rovesciato. Per mantenerlo vitale necessita di trapianti periodici. Il distacco delle cellule dalla superficie della plastica avviene mediante azione di una soluzione di tripsina/EDTA a temperatura ambiente per 5 minuti.

Nella manipolazione delle cellule è indispensabile la **sterilità**, da garantire con l'impiego di materiale monouso e della **cappa a flusso laminare verticale**.

Principali infezioni virali umane presenti in Europa

MALATTIA	EZIOLOGIA	SINTOMATOLOGIA	N. CASI 2017 [1]	N. MAX CASI/ ANNO	TRASMISSIONE
Chikungunya virus disease	*Alphavirus* (*Togaviridae*)	Febbre, dolori alle articolazioni che durano qualche giorno o più a lungo (settimane o mesi), anche dolori muscolari, mal di testa, affaticamento e *rash* cutaneo	548 (289)	1.461 (2014)	*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (zanzara tigre)
Dengue	*Flavivirus* (*Flaviviridae*)	Febbre alta, mal di testa acuti, dolori retrooculari, mialgia, artralgia, nausea e vomito, esantema cutaneo	2.026 (95)	2.821 (2016)	Zanzare (*Aedes*)
Infezione da Citomegalovirus	*Herpesviridae*	Normalmente asintomatica o lievi sintomi simil-influenzali. Infezioni congenite possono causare problemi a fegato, cervello, polmoni, sordità, cecità, ritardo mentale, convulsioni, morte	Sieropositivi 80% europei; 0,15-1% di infezione congenita		Diretto con sangue, fluidi corporei, saliva, urina, latte o transplacentare
Epatite A	*Hepatovirus* (*Picornaviridae*)	Normalmente asintomatica e benigna, sintomi gastroenterici con ittero, rara insufficienza epatica acuta (anziani), non esiste forma cronica	26.149 (3.766)	Nel 2017 picco di infezioni con morte di 10 soggetti	Via oro-fecale per contatto con persone infette o con alimenti (mitili) o acque contaminate
Epatite B	*Orthohepadnavirus* (*Hepadnaviridae*)	Normalmente asintomatica, sintomi gastroenterici spesso senza ittero, rara mortalità. La forma cronica (soprattutto nei giovani) può determinare cirrosi epatica o epatocarcinoma	26.565 (437)	31.027 (2016)	Sangue infetto o fluidi corporei, trasmissione verticale e sessuale
Epatite C	*Hepacavirus* (*Flaviviridae*)	Normalmente asintomatica, sintomi gastrointestinali e ittero, rara morte, ma spesso evoluzione cronica (85%) con possibile sviluppo di cirrosi (25%) e carcinoma. Non esiste vaccino	31.178 (182)	36.050 (2015)	Sangue infetto (tatuaggio e il *body piercing*)

Infezioni da Hantavirus	*Bunyaviridae*	Sintomi di malessere generale (febbre, cefalea, stato letargico, dolori addominali e lombari) che progrediscono in emorragie multi-organo e in gravi lesioni renali e polmonari con alta mortalità	4.239	4.683 (2012)	Inalazione di aerosol di escreti (urine, feci) di roditori
Infezioni da HIV e AIDS	*Lentivirus* (*Retroviridae*)	L'individuo sieropositivo da HIV può risultare asintomatico per anni fino a quando insorgono una o più malattie "indicative di Aids". L'Aids rappresenta la forma terminale	HIV 25.353 (3.443) AIDS 3.130 (690)	In Italia tra 1982-2015 70.000 casi di AIDS (2/3 morti)	Via ematica, materno-fetale e sessuale
Infezioni da Norovirus (virus di Norwalk)	*Caliciviridae*	Sintomi gastroenterici per 1-2 gg normalmente senza complicazioni	6550		Diretta tra persone infette o consumo di acqua o alimenti
Infezione da Papillomavirus	*Papillomaviridae*	Di solito transitoria e asintomatica. Se persiste determina varie lesioni di pelle e mucose (verruche) e il carcinoma del collo dell'utero	Infezione presente nel 3-15% delle donne		Via sessuale
Influenza	*Influenzavirus* (*Orthomixoviridae*)	Malattia stagionale. Febbre, spossatezza, brividi, dolori ossei e muscolari, mal di testa, mal di gola, raffreddore, tosse secca e congiuntivite; nei bambini nausea, vomito, diarrea	Presente nel 15% degli adulti e nel 30% dei bambini	Colpisce ogni anno 50 milioni di persone con 15-70 mila decessi	Via aerogena (tosse, starnuti), contatto diretto con persone infette
Tick-borne encephalitis	*Flavivirus* (*Flaviviridae*)	Andamento bifasico: prima sintomi aspecifici di malessere generale, poi (1/3 dei pazienti) meningite, meningoencefalite	2.550 (24)	2.904 (2013)	Zecche (*Ixodes*), latte e prodotti caseari non pastorizzati
West Nile disease	*Flavivirus* (*Flaviviridae*)	Uomo ospite accidentale che non trasmette virus. Normalmente asintomatica o lieve forma simil-influenzale. Negli anziani febbre, mal di testa, debolezza, tremori, disorientamento, convulsioni, fino a paralisi, coma e morte	212 (56) con morte di 25 soggetti	Nel 2018: 2083 casi di cui 606 in Italia e morte di 181 soggetti	Zanzare (*Culex*), trasfusioni, trapianti, transplacentare
Infezioni da Zika virus	*Flavivirus* (*Flaviviridae*)	Normalmente asintomatica, sintomi simil-influenzali con *rash* maculo-papulare. Complicanze: sindrome di Guillain-Barré, microcefalia congenita	274 (25)	2.119 (2016)	Zanzare (*Aedes*)

MALATTIE DELL'INFANZIA					
Morbillo	*Morbillivirus* (*Paramyxoviridae*)	Malattia infantile (soprattutto 1-3 anni). Inizia come un raffreddore, poi febbre alta ed esantema cutaneo (punti rosso vivo) prima dietro le orecchie e sul viso, e poi su tutto il corpo. Durata 10-20 giorni. Possibili complicanze (encefaliti, polmoniti, otiti)	Dati 2018: 12.266 (2.632)	Nel 2018 picco di infezioni con morte di 35 soggetti (7 in Italia)	Via aerogena (starnuti, tosse). Contagiosa fino a 5 gg dopo l'esantema, massima quando c'è la febbre
Parotite	*Rubulavirus* (*Paramyxoviridae*)	Malattia infantile (5-9 anni di età), spesso asintomatica e benigna. Rigonfiamento delle ghiandole parotidi, febbre moderata e malessere. Complicanze soprattutto negli adulti: encefaliti, meningiti, sordità, pancreatiti, orchiti. Aborto nel primo trimestre	13.693 (829)	215.513 (2004)	Via aerogena (tosse, starnuti). Contagiosa nei 6 gg precedenti i sintomi e per i 9 gg successivi
Rosolia	*Rubivirus* (*Togaviridae*)	Malattia dell'età infantile, spesso asintomatica, pericolosa durante la gravidanza (aborto, morte e malformazioni del feto). Eruzioni cutanee (piccole macchie rosa), febbre, malessere generale	Dati 2018: 584 (22)	Dal 2003 in costante diminuzione in tutta l'Europa	Via aerogena. Contagiosa 7 gg prima eruzione cutanea nei 4 gg seguenti
Infezione da Rotavirus	*Reoviridae*	Malattia stagionale (inverno). Colpiti soprattutto neonati e bambini sotto 5 anni. Febbre, vomito, diarrea acquosa, disidratazione	Colpisce lo 0,5% dei bambini sotto 5 anni	Mortalità elevata nei Paesi del Sud del mondo	Via oro-fecale, contatto diretto e via respiratoria
Varicella	*Alfaherpesvirus* umano 3 (virus *Varicella zoster*)	Malattia dell'infanzia (5-10 anni). Febbre non elevata, malessere, *rash* cutaneo a ondate successive, con papule rosa pruriginose che evolvono in vescicole, pustole e infine in croste. Complicazioni: polmonite, hepes zoster (fuoco di Sant'Antonio), trasmissione al feto	(60.000)	100.000 casi annui in Italia fino al 2008	Via aerogena o contatto diretto con lesione (fino alla comparsa delle croste), via transplacentare
MALATTIE SPORADICHE					
Coriomeningite linfocitica	*Mammarenavirus* (*Arenaviridae*)	Sintomi simil-influenzali e nervosi (meningite asettica o encefalite), alti livelli di linfociti nel liquido cerebrospinale	0	3 (2016)	Urina dei topi per aerosol o per contatto con ferite/ abrasioni
Crimea-Congo febbre emorragica	*Nairovirus* (*Bunyaviridae*)	Sintomi iniziali simil-influenzali, poi emorragie diffuse organi interni, *rash* cutaneo o ematomi, ematuria, ematemesi, ingrossamento e dolori del fegato. Mortalità 30%	2	14 (2008)	Puntura zecche (*Hyalomma*) o contatto con tessuti, sangue di animali infetti

Ebola	*Filovirus* (*Filoviridae*)	Inizialmente sintomi simil-influenzali, seguono prostrazione, danni a diversi organi e apparati, emorragie e sanguinamenti diffusi. Letalità 25-90%	0	8 (2014)	Sangue, organi o fluidi corporei di persone e animali infetti
Rabbia	*Lyssavirus* (*Rhabdoviridae*)	Forma furiosa (75% dei casi) con aggressività, perdita orientamento, iperestesia, allucinazioni, delirio, idrofobia; forma paralitica (25%)	1	1 (2016), 3 (2014)	Saliva di animali infetti
Rift Valley fever	*Phlebovirus*, (*Bunyaviridae*)	Sintomi simil-influenzali, raramente coinvolgimento epatico con ittero, emorragie (soprattutto della retina), meningoencefalite	2 (2016)	9 (2008)	Sangue e organi di animali infetti; zanzare (*Aedes* e *Culex*)
Yellow fever	*Flavivirus* (*Flaviviridae*)	Sintomi da lievi a gravi. Febbre mal di testa, artralgia e mialgia, ittero (segno infausto), emorragie diffuse, ematemesi, insufficienza renale, delirio. Mortalità fino all'80%	1	1 (2009)	Zanzare (*Aedes*)

(1) Tra parentesi i casi rilevati in Italia

L'**Istituto Superiore di Sanità (ISS)** a Roma, ente di diritto pubblico che, in qualità di organo tecnico-scientifico del Servizio Sanitario Nazionale, svolge funzioni di ricerca, sperimentazione, controllo, consulenza, documentazione e formazione in materia di salute pubblica.

Fonti: ECDC: https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx e https://ecdc.europa.eu/en/all-topics;
ISS: https://www.epicentro.iss.it/index/MalattieInfettive

Il Lazzaretto Vecchio

Il Lazzaretto Nuovo

A quell'epoca il servizio postale (efficientissimo!) era gestito da messaggerie private, di stanza attorno al ponte di Rialto, con personale in gran parte proveniente dalle valli bergamasche.
Nella disinfezione della corrispondenza sbarcata dalle navi, le lettere venivano perforate in quattro punti con un attrezzo speciale (il "*rastrello*") e fumigate, per cui il disinfettante (vapori di zolfo, generalmente) riusciva a penetrare all'interno senza aprirle, quindi marcate con ceralacca e consegnate.
L'ipotesi che ci fossero dei microrganismi causa di malattie infettive gravi (li chiamavano "*semi di peste*": non era stato ancora inventato il microscopio!) doveva essere ben radicata nella sensibilità della Serenissima, che stabilì dei Presidi Sanitari anche sulla terraferma, ad esempio a Verona e ad Orsenigo per vigilare verso il Milanese e la Germania.

(*La sanità nella storia illustrata da documenti postali, Venezia, Isola del Lazzaretto Nuovo, ed. Elzeviro, Padova, 2011*).

Il "cordone sanitario" della Serenissima Repubblica di Venezia

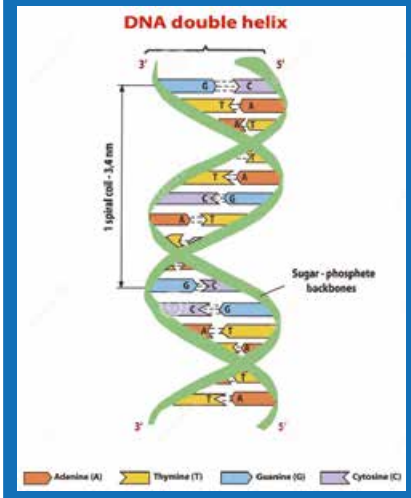
Sino alla fine del secolo scorso la paura di malattie importate da paesi lontani condizionava non poco la vita delle città con dei porti sul mare.
Il rischio di essere contagiati da equipaggi, animali o merci infette provenienti dall'Oriente era molto elevato. Si temevano specialmente **peste, colera, vaiolo, tifo**. Gravissime (si vide poi) sarebbero state le conseguenze sulla popolazione colpita da due epidemie di peste, quella detta "di San Carlo" (1576) e quella descritta dal Manzoni (1629), nonchè di colera nel 1835. L'idea di costruire un "***cordone sanitario***" attorno ai maggiori porti dl Mediterraneo ha inizio nel **1423**, a **Venezia**.
Sotto il Doge Foscari, il Senato della Repubblica decretò l'istituzione di alcuni *Presidi di Sanità* per le navi in arrivo soprattutto dalla Dalmazia, da Cipro e dall'Egitto.
Il "filtro sanitario" per le navi dirette a Venezia era doppio: il primo a Caorle, distante meno di 50 miglia dalla città lagunare e il secondo all' imboccatura del Canal Grande, nella *Dogana da Mar*. Da qui i mercantili indenni, in possesso della "*Fede di Sanità*" potevano proseguire per lo sbarco.

Punta della Dogana, oggi

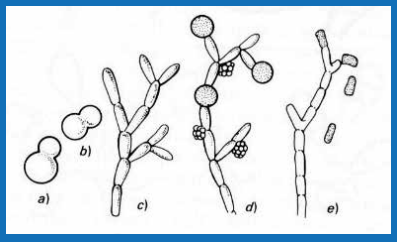
Nei casi sospetti, invece, le navi dovevano attraccare al **Lazzaretto Vecchio**, un isolotto poco discosto dal Lido, intitolato a Santa Maria di Nazareth, chiamato quindi "*Nazaretum*", da cui deriva il termine "*Lazzaretto*".
Nel 1468 viene sostituito dal **Lazzaretto Nuovo**, sull'isola a 3 Km da Venezia, di fronte a S. Erasmo. La sosta obbligata dura 40 giorni e verrà perciò chiamata "***quarantena***".
Nel Lazzaretto Nuovo, all'interno di un capannone lungo più di 100 metri che ricorda le Corderie dell'Arsenale (la "*Teza Grande*") si controllano e disinfettano ("*espurgano*") scrupolosamente tutte le merci in stato contumaciale, compresa la **posta cartacea**.

Riflessione sui "prodigi d'efficienza" nei più piccoli esseri viventi

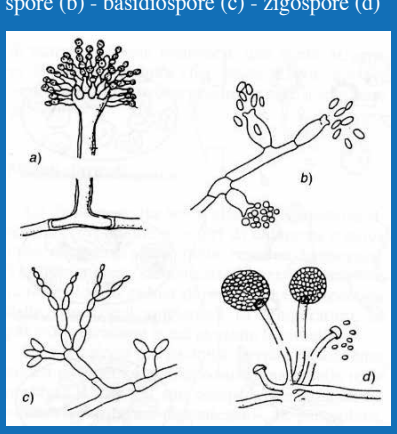
Meccanismi perfetti in grado di stupire come in uno spettacolo



Struttura del DNA



Spore asessuate: blastospore (a,b,c) - clamidospore (d) - artrrospore (e)
Spore sessuate: spore dei lieviti (a) – ascospore (b) - basidiospore (c) - zigospore (d)



Spore asessuate riunite in conidiofori (a, b, c) e in sporangiofori (d)

① REPLICAZIONE DEL DNA – L'unico cromosoma batterico contiene tutte le informazioni che definiscono le caratteristiche della cellula. Quando il batterio si moltiplica (per lo più dividendosi in due e, nei Gram-positivi, formando eventualmente spore) un enzima apre la doppia elica del DNA, mentre un altro enzima sintetizza i *primer* che per merito della *polimerasi* copieranno entrambi i filamenti del DNA. Tutto ciò assomiglia molto alla tecnica di laboratorio chiamata PCR (*Polymerase Chain Reaction*)!

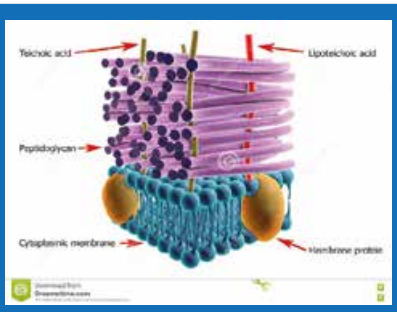
② CONTROLLO DELLA TRASCRIZIONE – I batteri hanno sviluppato meccanismi per adeguarsi velocemente alle modificazioni ambientali, in particolare la mancanza di "cibo". Agendo con degli enzimi chiamati *operoni* sintetizzano ciò che manca, ad esempio alcuni aminoacidi (triptofano) o zuccheri essenziali (glucosio, scindendo il lattosio).

③ RIPARAZIONE A MUTAZIONI DEL DNA – Le mutazioni sono cambiamenti nella sequenza delle basi del DNA che possono essre causate da eccessivo calore, radiazioni UV e X, ecc. I batteri sono in grado di riparare questi "danni" con appositi enzimi che agiscono sostituendo i filamenti di DNA alterati.

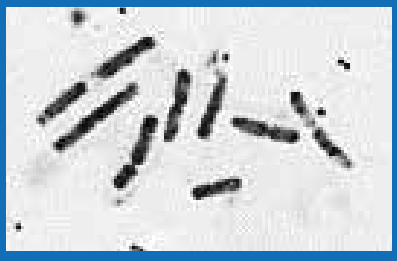
④ SCAMBIO DI GENI FRA BATTERI – Il passaggio di materiale genetico (DNA) da un germe all' altro porta alla nascita di nuovi ceppi. Questo avviene grazie a veri organi di "accoppiamento" (*plasmidi*) nella *coniugazione* o mediante virus trasportatori (i batteriofagi) nella *trasduzione*. Il materiale genetico può essere trasferito da una posizione all'altra della cellula batterica da elementi mobili di trasporto (*trasposoni*), che quindi scelgono quali geni trasmettere, ad esempio quelli della resistenza agli antibiotici o ai disinfettanti.

⑤ I RIBOSOMI E LA CATENA DI MONTAGGIO DELLE PROTEINE – Sono fino a 15.000 per cellula, hanno dimensioni piccolissime, sono fatti di RNA, necessario all' assemblaggio degli aminoacidi.

⑥ MUOVERSI E ATTACCARSI ALL' OSPITE – Parecchi batteri sono mobili (lieviti e muffe no) mostrando contrazioni simili a quelle delle amebe. Ma il movimento più disinvolto avviene con organi specifici che fuoriescono dalla membrana cellulare e sono chiamati *pili* (o *fimbrie*) e *flagelli* (se più lunghi, ma meno numerosi). Queste appendici (*adesine*) sono correlate a proprietà adesive e perciò forniscono al germe dei caratteri speciali di patogenicità. Molto studiate sono state le adesine di *Escherichia coli* (vedi CAPITOLO 4).

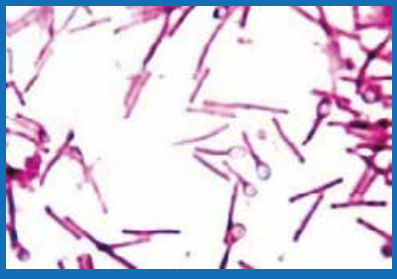


I principali costituenti della parete cellulare nei batteri:
– Peptidoglicano
– Acido teicoico (Gram+)
– Lipopolisaccaride, LPS (Gram-)



Capsula del *Bacillus anthracis*

Un batterio, circondato da numerosi *pili*, visto al microscopio elettronico



Spore del *Clostridium tetani*

⑦ TRIPLICE SCUDO A DIFESA – Le cellule batteriche sono protette da tre strati, che dall' esterno verso l'interno si chiamano *capsula*, *membrana* cellulare (nei Gram-negativi), *parete* cellulare. La capsula (di natura mucosa) non esiste in tutte le specie ed è importante elemento di pericolosità del germe che forma *biofilm*, come in *Bacillus anthracis* (carbonchio).

⑧ NEI MICETI: SI COMINCIA A PARLARE DI SESSO – Le ife dei funghi più evoluti (o "perfetti", come il *Cryptococcus*) producono spore sessualmente differenziate, raggruppate in formazioni specifiche (ascospore, basidiospore, zigospore). Ma esistono anche funghi "imperfetti" che hanno spore asessuate, anch'esse caratteristiche (blastospore, clamidospore, artrospore) raggruppate in contenitori di aspetto elegante (conidi nei generi *Aspergillus* e *Cladosporium*, oppure sporangi in *Mucor*).
Lieviti e batteri (specie se Gram-positivi anaerobi) si riproducono anch'essi mediante spore. La germinazione di questi elementi, cioè la riconversione in cellule vegetative fisiologicamente complete, richiede solo 90 minuti.

La microscopia elettronica ha giovato parecchio alla visibilità delle strutture cellulari più fini, come pili, plasmidi, ribosomi. Tuttavia, la microscopia ottica aveva già mostrato molto, adoperando colorazioni specifiche.

La ***capsula batterica*** può essere eidenziata meglio colorando gli strisci con blu di metilene o con inchiostro di china.

Le ***spore batteriche***, invece, che si trovano all'interno delle cellule in posizione centrale o terminale (si parla di endospore) risultano più visibili se colorate con il metodo di Schäffer.

Gli *organi riproduttori dei miceti* si possono ingrandire al microscopio (meglio se in contrasto di fase) in preparati a fresco (senza colorazioni) oppure trattati con coloranti specifici per micologia.

Le ***inclusioni citoplasmatiche***, infine, appaiono evidenti dopo applicazione di coloranti lipofili (come il Sudan III), come nel caso dei granuli metacromatici in *Bacillus cereus*.

Organi riproduttori di miceti *Aspergillus niger* (ife portanti = conidiofori e corpi fruttiferi = conidi, circondati da spore libere)

(da **Poli *e Coll.*, Microbiologia Medica, UTET, Torino, 1993**).

Capitolo 3

ANIMALI

MALATTIE DA BATTERI

(RICCARDO MULIARI – SALVATORE CATANIA)

Il laboratorio di microbiologia in diagnostica veterinaria

Nella diagnostica veterinaria la microbiologia riveste un'importanza notevolissima per una serie di ragioni, fra le quali vale senz'altro la pena ricordare il fatto che molti microrganismi isolabili dagli animali sono potenziali agenti zoonosici. Un percorso diagnostico che consenta di pervenire a una corretta identificazione dei microrganismi eventualmente responsabili della condizione patologica osservata, di conseguenza, risulta non solo essenziale al fine di predisporre gli interventi terapeutici e profilattici più opportuni, ma anche benefico se inquadrato in un'ottica di sanità pubblica.

Batteri negli animali

In linea generale, il risultato di un esame batteriologico risulta difficilmente interpretabile se non si ha un'adeguata conoscenza della composizione della flora microbica saprofitica che si può incontrare nei diversi distretti anatomici. Si tratta di una varietà di batteri e miceti che vivono in determinati distretti organici senza provocare malattia e contribuendo, nella maggior parte dei casi, al mantenimento delle condizioni fisiologiche di questi distretti.

La flora normale varia notevolmente. Si possono ricordare, a questo proposito, le differenze riscontrabili tra animali giovani e adulti, tra animali di aree geografiche diverse o con climi diversi, tra animali alimentati con diete diverse, ecc. Rimane da ricordare, inoltre, che la flora normale è solitamente costituita da differenti specie batteriche e fungine. Da ciò consegue che ogni rilievo, all'esame batteriologico, di una omogeneità di crescita rende sempre opportuno approfondire il possibile ruolo svolto dal germe riscontrato, dal momento che la presenza di un'unica specie batterica presuppone un'alterazione della flora microbica normale e, quindi, la possibilità di uno scostamento dalla situazione fisiologica.

Negli schemi che seguono, vengono proposte brevi elencazioni rispettivamente della flora batterica rilevabile normalmente e dei batteri considerati patogeni potenziali nelle diverse specie animali.

Principali microrganismi normalmente presenti negli animali

Localizzazione	Gruppi di germi	Specie batterica
Bocca, nasofaringe	Gram-negativi	Coliformi, pasteurelle, *Proteus*, *Haemophilus*
	Gram-positivi	Micrococchi, streptococchi alfa- e beta-emolitici, lattobacilli, difteroidi, pneumococchi, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Actynomices*
	Lieviti	*Candida albicans*
	Micoplasmi	Alcune specie
	Spirochete	Alcune specie
Intestino tenue	Poche specie	-
Intestino largo	Gram-negativi	*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus*, anaerobi Gram-negativi *Campylobacter jejuni* e *C. coli* (nelle specie avicole)
	Gram-positivi	Streptococchi fecali, *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, altri Clostridi, lattobacilli
	Spirochete	Alcune specie
Trachea, bronchi, polmoni	Poche specie di batteri e funghi	
Organi genitali femminili e maschili esterni	Gram-negativi	*Proteus*, coliformi, anaerobi
	Gram-positivi	Difteroidi, micrococchi, enterococchi
Organi genitali femminili e maschili interni (cervice, vagina parte anteriore)	Gram-negativi	Coliformi, *Proteus*
	Gram-positivi	Streptococchi alfa e beta-emolitici, difteroidi, lattobacilli
	Micoplasmi	Alcune specie
Pelle	Gram-positivi	*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, micrococchi
Latte	Gram-positivi	*Corynebacterium bovis*, micrococchi, stafilococchi, streptococchi non-emolitici, difteroidi

"Sano come un pesce"

Il detto popolare ha radici antiche, quando i pesci erano visti come esseri viventi che non si ammalavano mai. In verità anche i pesci si ammalano per colpa di batteri, funghi, virus e parassiti vari. Ma a causa della selezione naturale, difficilmente era possibile osservare un pesce gravemente malato.

Alcune fra le più comuni malattie da batteri e virus nei pesci sono brevemente trattate in APPENDICE, mentre quelle da miceti si trovano fra le MICOSI DEGLI ANIMALI al Capitolo 3.

Germi considerati potenzialmente patogeni negli animali

Localizzazione o lesione	Specie animale	Microrganismi sospetti (Gram -; Gram+, Mycoplasmi; lieviti e funghi)
Sistema respiratorio	Ruminanti	*Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica, Histophilus somnus, Bordetella bronchiseptica, Trueperella pyogenes, Nocardia asteroides, Mycoplasma bovis, Mycoplasma dispar, Mycoplasma mycoides subsp. mycoides, Mycoplasma* spp., *Aspergillus* spp.
	Solipedi	*Pasteurella multocida, Pasteurella caballi, Pseudomonas mallei, Actinobacillus equuli, Streptococcus equi, Rhodococcus equi, Fusobacterium necrophorum, Chlamydophila psittaci, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatiditis, Pneumocystis carinii, Candida* spp., *Aspergillus* spp.
	Suino	*Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis, Bordetella bronchiseptica, Actinobacillus suis, Fusobacterium necrophorum, Streptococcus suis, Mycoplasma hyopneumoniae, Mycoplasma hyosynoviae*
	Cane e gatto	*Pasteurella multocida, Bordetella bronchiseptica, Escherichia coli, Streptococcus canis, Streptococci emolitici, Staphylococcus aureus , Cryptococcus neoformans, Aspergillus* spp .
	Lagomorfi	*Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus aureus*
	Avicoli	*Pasteurella multocida, Avibacterium paragallinarum* (ex *Haemophilus paragallinarum), Ornithobacterium rhinotracheale, Bordetella avium, Reimerella anatipestifer, Gallibacterium anatis* biovar *haemolytica, Avibacterium gallinarum, Escherichia coli, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, Mycoplasma meleagridis, Chlamydia psittaci, Aspergillus* spp.
Tratto gastro-intestinale	Ruminanti	*Salmonella* spp., *Escherichia coli* (anche ceppi emolitici), *Yersinia enetrocolitica, Actinobacillus lignieresii, Campylobacter jejuni, Clostridium perfringens* (tossinotipi B, C, D), *Clostridium sordelli, Mycobacterium avium sub. paratuberculosis, Candida* spp.
	Solipedi	*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Rhodococcus equi*, *Actinobacillus equuli*, *Clostridium perfringens* (tossinotipi B, C), *Aspergillus fumigatus*
	Suino	*Escherichia coli (*ceppi emolitici*), Salmonella* spp., *Brachispira hyodysenteriae, Treponema hyodysenteriae, Clostridium perfringens* (tossinotipo B, C), *Lawsonia intracellularis* (solo PCR), *Candida* spp.
	Cane e gatto	*Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica, Campylobacter jejuni, Clostridium piliformis* (vedi lagomorfi), *Clostridium* spp., *Mycobacterium* spp., *Candida albicans, Histoplasma, Aspergillus*
	Lagomorfi	*Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis, Salmonella* spp,, *Clostridium perfringens, Clostridium spiroforme, Clostridium piliforme (*individuazione solamente mediante colorazione di Gram - ex *Bacillus piliformis*)
	Avicoli	*Salmonella* ceppi patogeni, *Escherichia coli, Clostridium perfringens* (tossinotipo A e C), *Clostridium colinum, Brachispira hyodysenteriae, Brachispira pilosicoli, Brachispira alvinipulli, Brachispira intermedia, Mycoplasma iowae, Mycoplasma meleagridis*

Ascessi e ulcere della pelle e sottocute		Coliformi, pseudomonadacee, stafilococchi, streptococchi, *Corynebacterium pyogenes, Clostridium perfrigens*
Infezioni dell'apparato genitale	Mammiferi	*Brucella, Pseudomonas aeruginosa, Pasteurella multocida, Klebsiella, Corynebacterium pyogenes,* stafilococchi, streptococchi, *Campylobacter fetus* sub. *fetus*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* spp., *Candida albicans*
	Avicoli	*Pasteurella multocida, Reimerella anatipestifer, Gallibacterium anatis biovar haemolytica, Escherichia coli, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, Mycoplasma meleagridis, Mycoplasma iowae, Chlamydophila psittaci, Aspergillus*
Sistema nervoso centrale	Mammiferi	*Listeria monocytogenes, Pasteurella multocida,* streptococchi, *Histophilus somnus, Chlamidya psittaci*
	Avicoli	*Escherichia coli* (ceppi setticemici), *Pasteurella multocida, Reimerella anatipestifer, Listeria monocytogenes*
Infezioni localizzate alle giunture	Mammiferi	*Escherichia coli, Brucella suis, Haemophilus suis, Erysipelothrix rhusiopathiae, Corynebacterium pyogenes, Staphylococcus aureus, Mycoplasma bovis*
	Avicoli	*Escherichia coli, Reimerella anatipestifer, Haemophilus suis, Erysipelothrix rhusiopathiae, Corynebacterium pyogenes, Staphylococcus aureus, Mycoplasma synoviae, Mycoplasma iowae*
Mastiti	Ruminanti	Coliformi, streptococchi, *Staphylococcus aureus, Actinomyces bovis, Actinobacillus lignieresi, Mycobaterium bovis, Mycoplasma agalatiae, Mycoplasma bovis, Prototheca*
Sistema urinario	Mammiferi	*Proteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomanas aeruginosa*, *Histophilus somnus,* Enterococchi, *Eubacterium suis*
Sistema muscolare	Ruminanti	*Clostridium chauvoei*

NOTA TECNICA

Tipi di prelievo su animali

PRELIEVI SULL'ANIMALE IN VITA	Prelievi aperti	Urine (*urinocoltura*) Feci (*coprocoltura)* Secrezioni mucose Sperma Ascessi aperti Latte
	Prelievi chiusi	Ascessi Sangue (*emocoltura*) Urina Liquido di essudati Liquido cefalo-rachidiano
PRELIEVI SULL'ANIMALE MORTO	Organi parenchimatosi	Organi cavi

Prelievi sull'animale in vita

Prelievi aperti

URINE - Il prelievo può essere eseguito con catetere o con la raccolta diretta e, in alternativa, mediante cistocentesi (vedi Prelievi chiusi). Se possibile, si pratica la pulizia esterna delle mucose e si raccoglie, in un recipiente (sterile, a bocca larga, con tappo a vite), il quantitativo di 10-20 ml di urine prelevate a metà minzione. Il campione dovrà essere prontamente refrigerato e inviato al laboratorio, preferibilmente in condizioni di refrigerazione e nel più breve tempo possibile, al fine di evitare l'alterazione della carica batterica (uno dei parametri più indicativi di infezione).

FECI - Vanno raccolte in recipiente sterile a bocca larga con tappo a vite provvisto di cucchiaio. Nelle diarree acute, il prelievo deve essere fatto nelle prime ore dopo la comparsa dei sintomi. Il campione deve essere prontamente refrigerato.

SECREZIONI MUCOSE - Si pratica il prelievo con tamponi sterili. Dal naso, si preleva in profondità nelle cavità nasali. Dall'occhio, si preleva dal sacco congiuntivale inferiore, senza toccare la parte esterna della palpebra. Dai genitali, si usa un tampone oppure un lavaggio con soluzione fisiologica sterile.

SPERMA - Nel bovino, dopo raccolta con vagina artificiale, il campione viene raccolto in due recipienti sterili, di cui il primo viene congelato per la ricerca di *virus* e clamidie, mentre il secondo viene refrigerato e consegnato al laboratorio entro le 24 ore, possibilmente con l'aggiunta di un terreno di trasporto.

Negli ovini, suini e cani valgono differenti metodi di raccolta, ma l'invio dei campioni segue le medesime modalità.

ASCESSI APERTI - Dopo pulizia e disinfezione della superficie esterna, ponendo particolare attenzione all'area circostante la soluzione di continuo, si procede con l'asportazione del materiale purulento superficiale. A questo punto, si infigge un tampone sterile in profondità, cercando di raggiungere la parete opposta. Infine, il tampone verrà introdotto in una provetta sterile, possibilmente provvista di terreno di trasporto. La ricerca riesce piuttosto difficoltosa, a causa della potenziale flora microbica contaminante.

LATTE - È consigliato il prelievo per singolo quarto in fase di premungitura. È comunque possibile eseguire l'esame su *pool* di quarti. Per effettuare un corretto prelievo si raccomanda di:

- lavare energicamente e asciugare la mammella.
- disinfettare i capezzoli con idoneo prodotto e pulire ogni singolo sfintere, procedendo con un ordine che non permetta di toccare due volte la stessa zona, attendere la completa asciugatura della mammella.
- usare per ciascun quarto un recipiente sterile diverso a bocca larga, aprendolo all'ultimo momento e tenendo in mano il coperchio, seguendo un ordine inverso a quello usato per la disinfezione.
- eliminare i primi getti di latte facendoli defluire a vuoto, e riempire per non oltre i 2/3 la provetta, al fine di evitare lo stapparsi della provetta in seguito a congelamento.
- identificare i flaconi ed inviarli al laboratorio refrigerati entro poche ore (24h)
- evitare per quanto possibile il congelamento; in alternativa ricorrere sempre ad un congelamento a -20°.

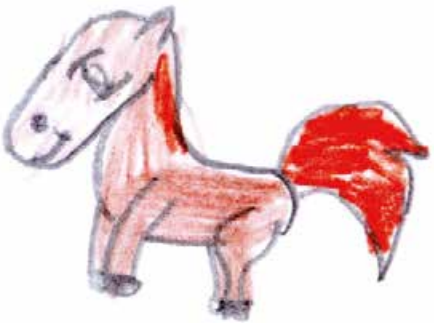
Prelievi chiusi

Tutti vanno effettuati dopo eventuale rasatura, pulizia dell'area soprastante e disinfezione con alcool o alcool iodato (o iodofori).

ASCESSI - Si usa una siringa sterile a perdere con ago di almeno 1 mm di diametro. Si invia al laboratorio la siringa senza ulteriori passaggi.

SANGUE - È opportuno fare più prelievi distanziati di alcune ore (per aumentare le probabilità di isolamento dei germi in circolo, essendo spesso la batteriemia intermittente) e cercare di prelevare durante una fase di ipertermia, possibilmente con l'animale a digiuno (per evitare la batteriemia *post*-prandiale fisiologica). Il prelievo migliore si esegue dalla vena giugulare, dividendo il sangue in due aliquote, da introdurre in due recipienti (uno per la ricerca dei germi aerobi, ad esempio un recipiente con terreno di Castaneda, l'altro per la ricerca dei germi anaerobi, ad esempio un recipiente con terreno *Anaerocult*). Se il campione non verrà prontamente seminato, occorre aggiungere un anticoagulante, quale il sodio citrato in soluzione sterile al 2%, nella proporzione di 3 ml ogni 10 ml di sangue.

URINA - Il prelievo di urina mediante cistocentesi permette di evitare eventuali contaminazioni batteriche derivanti dai tratti genito-urinari distali. In caso di cistocentesi, si applicano le corrette procedure chirurgiche e si preleva per aspirazione un quantitativo di urina pari a 10-20 ml. Questi infine verranno trasferiti in un contenitore sterile e inviati al laboratorio (vedi Prelievi aperti).



LIQUIDO DI ESSUDATI - Il prelievo di liquido pleurico va fatto per puntura a livello del 4°-5° spazio intercostale, al di sopra delle articolazioni condrocostali.
Il prelievo di liquido peritoneale si fa sull'animale disteso, con puntura sulla linea bianca, sotto l'ombelico, prima in direzione perpendicolare e poi obliqua dal davanti verso dietro.
Il prelievo di liquido sinoviale si fa per puntura dell'articolazione sul retro (dove la membrana sinoviale è più tesa).
LIQUIDO CEFALO-RACHIDIANO - Dopo contenzione e anestesia dell'animale, personale esperto può praticare il prelievo:

- per puntura lombare, presso l'articolazione lombo-sacrale per i grossi animali, mentre, per i carnivori, la zona di elezione risulta essere il 6° spazio intervertebrale lombare.
- per puntura sotto-occipitale, sulla linea mediana dorsale, 3-4 cm dietro la protuberanza occipitale nei grossi animali e circa 1-2 cm nei carnivori.

Prelievi sull'animale morto

I prelievi vanno eseguiti nel più breve tempo possibile dopo la morte dell'animale, al fine di minimizzare le contaminazioni dovute alla migrazione dei batteri dall'intestino. Cronologicamente, i tessuti che vengono invasi per ultimi sono le ossa lunghe, che dovranno essere asportate per disarticolazione. Gli organi cavi (come l'intestino) dovranno essere legati alle due estremità prima di procedere alla loro asportazione. Al fine di dimostrare la presenza di germi anaerobi, sarebbe opportuno utilizzare tessuti patologici freschi, evitando di eseguire passaggi in più recipienti, per non esporre troppo a lungo il materiale all'aria.
Il prelievo sugli organi parenchimatosi verrà effettuato previa cauterizzazione dell'area. In seguito, si potrà incidere l'area con un bisturi sterile e, mediante forbici e pinze sterili, prelevare una porzione profonda di organo. In alternativa, può essere utilizzata una pipetta in vetro sterile, mediante la quale potranno essere prelevate piccole porzioni di organo, utilizzando anche una pipettarice automatica.

Il prelievo del contenuto degli organi cavi potrà essere effettuato, previa cauterizzazione della parete, mediante siringa sterile o pipetta. In caso di presenza di materiale corpuscolare o denso (ad esempio, contenuto intestinale), utilizzare un ago o una pipetta di diametro adeguato. In caso di prelievo dalle vie respiratorie profonde, sarebbe opportuno, una volta evidenziato il tratto bronchiale, cauterizzare la sua parete, incidere con un bisturi sterile e, sull'apertura creatasi, introdurre un tampone sterile.

Conservazione dei campioni

Dopo il prelievo, i campioni devono essere conservati mediante refrigerazione (2/4°C) o congelamento (< -18°C). Da ricordare che non possono essere sottoposti a congelamento campioni di sangue, di materiale destinato alla ricerca del fattore K99 di *E. coli,* di materiale per ricerca *Trichomonas*.
In caso di dubbi sulle modalità di conservazione più corrette, si consiglia di chiedere istruzioni al laboratorio di destinazione e, nell'impossibilità di avere informazioni, di optare per la refrigerazione.

La ricerca di certi microrganismi è comunque difficile dopo conservazione prolungata al freddo ed è necessario, in questi casi, recapitare nel più breve tempo possibile il materiale al laboratorio per allestire subito le semine (nei casi sospetti di *Haemophilus, Campylobacter, Mycoplasma, Rickettsia*).
Per refrigerare i campioni, si può usare ghiaccio secco, ghiaccio preparato in sacchetti con acqua fatta ghiacciare, confezioni di ghiaccio sintetico. La quantità di refrigerante deve essere di gran lunga superiore al volume del campione e il refrigerante va messo in un sacchetto, distanziato dal campione stesso, per non congelare quest'ultimo per contatto.
Sono da evitare le aggiunte di sostanze chimiche (solo per i micoplasmi si può considerare la possibilità di aggiungere al materiale campionato un antibiotico beta-lattamico, al fine di contrastare la flora batterica saprofitaria).

Tipologia di tamponi e terreni di trasporto

La raccolta mediante tampone rappresenta una delle modalità più comuni per effettuare il prelievo del materiale biologico da sottoporre alle indagini microbiologiche. Si utilizzano, solitamente, tamponi sterili a base di cotone o fibre sintetiche, per esempio il *Dacron*. Le fibre sintetiche sono dotate di una bassissima attività inibente per la maggior parte dei microrganismi rispetto ad altri materiali (ad esempio, cotone o alginato di calcio).
I tamponi possono o meno essere provvisti di terreno di trasporto. Quando ne sono privi, devono essere avviati all'analisi nel più breve tempo possibile (entro pochi minuti nel caso si debbano ricercare microrganismi particolarmente delicati, quali, per esempio, *Taylorella equigenitalis*). La funzione principale del terreno di trasporto è di mantenere vitali i microrganismi presenti nel materiale raccolto con il tampone. Al contempo, però, esso deve evitarne la moltiplicazione, al fine di mantenere inalterate le proporzioni quantitative tra le differenti tipologie di batteri. I terreni di trasporto più diffusi sono il terreno di *Stuart* e il terreno di *Amies*, classico o addizionato con carbone attivo. Quest'ultimo è indispensabile solo per la ricerca di microrganismi particolarmente delicati, quali, per esempio, *Taylorella equigenitalis*.
In generale, i terreni di trasporto sono semisolidi e non nutritivi. Per esempio, il terreno di *Stuart*, essendo carente di fonti di azoto, impedisce considerevolmente la crescita batterica, cercando, nel contempo, di garantire una lunga sopravvivenza dei microrganismi eventualmente presenti nel campione, anche di quelli anaerobi. La presenza di sodio tioglicolato abbassa il potenziale *redox* del mezzo, permettendo una migliore conservazione dei batteri anaerobi. Il glicerofosfato contenuto nel terreno di *Stuart* e utilizzato dai coliformi come fonte di energia per la crescita è sostituito, nel terreno di *Amies*, da una soluzione salina tamponata. In questo modo, si evita la sovracrescita dei contaminanti banali, soprattutto nei campioni dove si ricercano batteri piuttosto delicati.
In caso di ricerche specifiche e riguardanti germi di notevole difficoltà (micoplasmi, leptospire, clamidie), è opportuno contattare sempre il laboratorio, al fine richiedere terreni di trasporto specifici per tale tipologia di germi.

Confezionamento di campioni per la spedizione

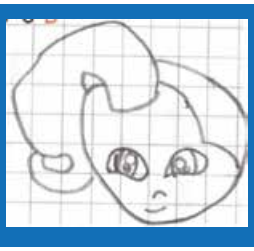
Il confezionamento dei campioni da inviare al laboratorio prevede l'utilizzo di un sistema a tre involucri: involucro primario, secondario ed esterno. Il contenitore esterno può essere di cartone rigido, plastica, legno o altri materiali resistenti a urti e intemperie. Nel caso in cui i campioni biologici siano costituiti da liquidi oppure possano permettere l'emissione di liquidi, gli involucri primari contenenti i campioni dovranno essere introdotti in un ulteriore involucro primario, riponendo tra i due involucri del materiale assorbente (carta assorbente).

Si consiglia di interpellare il laboratorio d'analisi tutte le volte che si tratta di avviare ricerche non di *routine*, per concordare modalità di prelevamento dei campioni, quantità di materiale da inviare, imballaggio e temperatura per il trasporto.

Analisi microbiologiche negli animali

Nella tabella seguente sono sintetizzati i distretti e i germi patogeni isolabili con maggior probabilità in medicina veterinaria. Per comprendere il significato della tabella, è opportuno rifarsi alla seguente *legenda* dei simboli e dei numeri usati:

+/++/+++ = difficoltà di isolamento normale/alta/molto alta
1 = necessità di uno specifico terreno di trasporto
2 = evitare l'esposizione all'ossigeno durante il prelievo
3 = non congelare causa sensibilità alle basse temperature
4 = necessario disporre di un laboratorio specializzato per questo tipo d'analisi
5 = raccomandabile anche l'esame sierologico dell'animale sospetto



La maggior parte dei microrganismi comunemente ricercati nella normale attività diagnostica può crescere in terreni di coltura piuttosto semplici. Solitamente, per ragioni logistiche e di tempo, si procede alla semina del campione su pochi terreni di uso generale, eventualmente favorendo la crescita di determinati germi con l'applicazione di particolari condizioni di crescita, come l'incubazione a temperature specifiche o l'utilizzo dell'atmosfera modificata. La corretta esecuzione del prelievo riveste un'importanza decisiva al fine di garantire l'accuratezza del processo diagnostico, poiché la contaminazione accidentale del materiale prelevato condiziona pesantemente l'esito dell'analisi microbiologica.

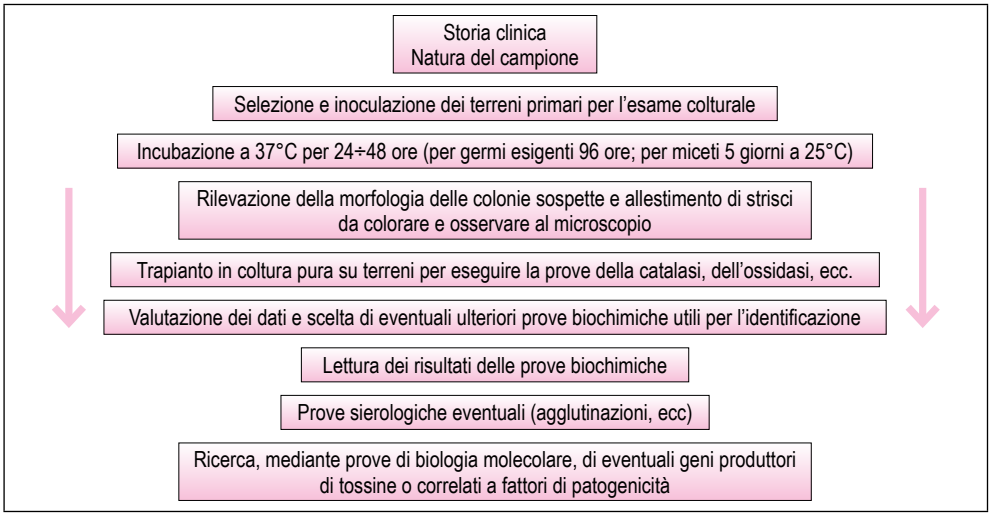
Attualmente, è disponibile anche una vasta gamma di terreni selettivi, utili per tentare l'isolamento di germi patogeni specifici. Il loro impiego, congiuntamente a procedure di arricchimento selettivo, permette di ottenere un notevole aumento della sensibilità della prova, anche nei confronti di microrganismi particolarmente esigenti (micoplasmi, *Campylobacter*, *Haemophilus*, ecc.).

I passaggi usualmente seguiti nell'isolamento e nell'identificazione dei batteri, partendo da materiale clinico, sono riassunti nello schema successivo.

Batteri che si isolano più frequentemente da campioni patologici di animali in medicina veterinaria

Localizzazione prelievo	Germi	Difficoltà analisi	Precauzioni particolari
Feci	*enterobacteriaceae (Salmonella*, ecc)	++	4,5
	Mycobacterium paratuberculosis	+++	3
	Campylobacter	+++	2,4
	Clostridium	++	
Apparato respiratorio	*Pasteurella*	+	5
	Bordetella	+	
	Corynebacterium	+	
	Actinobacillus	+	
	Pseudomonas	+	
	Haemophilus	++	
	Micoplasmi	+++	1,4
	Chlamydia	+++	1,4
Urine	*Enterobacteriaceae*	+	
	Staphylococcus	+	
	Streptococcus	+	
	Corynebacterium	+	
	Pseudomonas	+	
	Leptospira	+++	1,3,4,5

Localizzazione prelievo	Germi	Difficoltà analisi	Precauzioni particolari
Ascessi	*Staphylococcus*	+	
	Streptococcus	+	
	Actinobacillus	+	
	Actinomyces	+	
	Enterobacteriaceae	+	
	Pseudomonas	+	
	Pasteurella	+	
	Corynebacterium	+	
	Anaerobi	++	2,4
	Micobatteri	+++	4
Apparato genitale	*Chlamydia*	+++	1,4
	Haemophilus	++	
	Actinobacillus	+	
	Corynebacterium	+	
	Campylobacter	+++	3
	Micoplasmi	+++	1,4
	Pseudomonas	+	
	Clostridium	++	2
	Listeria	+	
	Brucella	++	4,5
	Klebsiella	+	
Apparato locomotorio	*Staphylococcus*	+	
	Streptococcus	+	
	Corynebacterium	+	
	Actinobacillus	+	
	Pasteurella	+	3
	Enterobacteriaceae	+	
	Haemophilus	++	
	Micoplasmi	+++	1,4
	Erysipelothrix	+	
Sistema nervoso	*Listeria*	+	
	Haemophilus	++	
	Staphylococcus	+	
	Streptococcus	+	
Latte	*Enterobacteriaceae*	+	
	Staphylococcus	+	
	Streptococcus	+	
	Corynebacterium	+	
	Micoplasmi	+++	1,4
	Pasteurella	+	3
Sangue	*Streptococcus*	+	
	Salmonella	+	4
	Brucella	++	3
	Pasteurella	+	
	Erysipelothrix	+	1,4,5
	Leptospira	+++	4
	Francisella	+++	4
	Bacillus anthracis	+	



Passaggi usualmente seguiti nell'isolamento e identificazione dei batteri da campioni clinici in veterinaria

Esame microscopico diretto

È applicabile al materiale in esame, previa colorazione di strisci allestiti su vetrino. Le colorazioni più impiegate sono:

- GRAM: per distinguere batteri Gram-positivi (tra cui stafilococchi, streptococchi, clostridi, ecc) e batteri Gram-negativi
- ZIEHL-NEELSEN: per batteri alcool-acido resistenti (micobatteri, corinebatteri, *Nocardia*)
- LATTOFENOLO-COTTON BLUE: per i miceti

Il seguente elenco riassume i casi in cui l'esame microscopico diretto fornisce indicazioni efficaci:

Malattia o infezione sospettata	Procedimento
Vibriosi	Colorazione dal contenuto dello stomaco fetale
Brucellosi	Dimostrazione dei batteri entro le cellule del corion
Carbonchio	Striscio da sangue, organi, tessuti
Gangrena gassosa (da anaerobi solfito-riduttori)	Gram su muscolo sospetto
Enterotossiemia (da *Clostridium perfringens*)	Gram su striscio della mucosa del piccolo intestino
Micobatteriosi	Ziehl-Neelsen su striscio da lesioni
Actinomicosi / Nocardiosi	Gram o Ziehl-Neelsen su strisci da lesioni
Stafilococcosi (infezioni cutanee con lesioni aperte)	Gram da *pus*
Streptococcosi (apparato genito-urinario, mastiti)	Gram da urine o latte

Esame colturale

Semina del campione

Il materiale costituito da **spurghi, essudati, *pus*** viene raccolto con tamponi sterili. Una porzione di una piastra di Agar sangue viene seminata con il tampone e successivamente si procede, con l'ansa, a stendere l'inoculo sulla restante porzione della piastra.

Il materiale costituito da **organi e tessuti** viene cauterizzato esternamente con una spatola arroventata e, quindi, sezionato con un bisturi o con pinze e forbici sterili. Un frammento del campione viene strisciato sulla superficie di una o più piastre di *Agar sangue*, con l'aiuto di una pinza sterile, in modo da ottenere lo sviluppo si colonie staccate.

Il **latte** esaminato per le mastiti viene seminato direttamente su una piastra di *Agar sangue* oppure di un terreno selettivo per gli streptococchi (come il *TKT*) o selettivo per gli stafilococchi (come il terreno di *Baird-Parker* o il *Mannitol Salt Agar*).

Le **urine** vengono centrifugate e un'ansata del sedimento viene seminata per striscio su una piastra di *Agar sangue*.

Le **feci** vengono risospese, se necessario, in soluzione fisiologica sterile (circa 1 g in 5-10 ml). Dalla sospensione si semina un'ansata su almeno due piastre di *Agar sangue*, in modo da ottenere lo sviluppo di colonie staccate, e su una piastra di un terreno selettivo per batteri Gram-negativi (*MacConkey Agar* oppure *Gassner* o *Verde Brillante Agar*). Circa 1 ml di sospensione, inoltre, può essere seminato in una provetta contenente 10 ml di terreno di arricchimento per salmonelle (come il *Brodo tetrationato* o il *Brodo selenito*). Le provette di arricchimento vengono incubate a +37°C per 18-24 ore e successivamente trapiantate in terreno selettivo solido (*Gassner*, *Verde brillante Agar*, ecc.) da incubare a +37°C per 24 ore.

Cosi come per l'esame batteriologico delle feci, è possibile, in caso di campioni definiti "sporchi", quali prelievi da contenuto intestinale, liquido biliare, peritoniti settiche, ascessi aperti, polmoniti *ab ingestis*, ecc., allestire una sospensione del campione in 2 ml circa di terreno liquido. Si procederà quindi alla semina di almeno 10-20 µl della sospensione. Tale procedura permette di evitare la probabile formazione di patine batteriche che non permettono la corretta lettura delle piastre.

Sia nel caso del tampone che nel caso del frammento di tessuto, dopo lo striscio su *Agar sangue* il campione viene trasferito in una provetta di terreno liquido non selettivo (ad esempio, *Brodo BHI*), da incubare a +37°C per 24 h. Da questa coltura liquida è possibile procedere alla semina di una seconda piastra di *Agar sangue* (cosiddetta semina indiretta o dopo arricchimento del campione), qualora la semina primaria (semina diretta) risulti negativa,

Le piastre di *Agar sangue* vengono incubate a +37°C per 24-48 ore in aerobiosi o in micro-aerofilia (termostato con 5-10% di CO_2). Se il sospetto comprende germi quali *Brucella, Campylobacter, Actinobacillus pleuropneumoniae,* il tempo d'incubazione non dovrà essere inferiore a 96 ore prima dell'eliminazione delle piastre.

Nel caso di ricerca di germi anaerobi (bacilli e clostridi), le piastre di *Agar sangue* dovranno essere poste, per 48 ore, in una giara per anaerobiosi, da incubare in termostato a +37°C. Come terreno liquido, potrà essere utilizzato, al posto del *Brodo BHI,* il terreno liquido *CMM* o il *Brodo tioglicolato*, con incubazione per 48 ore a +37°C in termostato normale.

Le provette di brodo BHI vengono incubate a +37°C per 24-48 ore prima di essere inoculate su piastre di *Agar sangue*, da incubare come nel caso delle piastre seminate direttamente col campione.

Lo **schema di Carter** può risultare utile per riassumere le procedure ordinarie di semina e incubazione.

Semina dei campioni clinici in veterinaria secondo il protocollo di Carter

Campione	Materiale da seminare	Terreni	Incubazione
Spurghi, essudati, pus	Tampone*	Agar sangue	Aerobi: +37°C per 48 h (in aria)
			Anaerobi: +37°C per 48 ore (in anaerobiosi)
			Microaerofili: +37°C per 96 ore +5-10% CO_2
		Brodo BHI	+37°C per 24-48 ore Segue semina in Agar sangue
Organi, tessuti	Cubetto (circa 1 cm di lato) prelevato in profondità, previa cauterizzazione della superficie, con pinze e forbici sterili	Agar sangue	vedi sopra
		Altro terreno specifico	Secondo il terreno specifico
	Cubetto dimezzato	Brodo BHI	+37°C per 48 ore Segue semina in Agar sangue o altro terreno specifico
		Altro arricchimento specifico	Secondo arricchimento specifico
Urine	Sedimento ottenuto per centrifugazione a 3.000 rpm per 20 min. Eseguire anche striscio e Gram	Agar sangue	vedi sopra
Feci	1 g in 5-10 ml soluzione fisiologica	Agar sangue (2 piastre)	vedi sopra
		MacConkey Agar	+37°C per 18-24 ore
		Altro terreno specifico	Secondo il terreno specifico
		Arricchimento specifico per *Salmonella*	Secondo arricchimento specifico
Latte	Campione tal quale	Agar sangue	+37°C per 24-48 ore
		TKT Agar	
		Mannitol Salt Agar	

* ***NOTA*** - Tamponi semplici da seminare, dopo il prelievo, nel più breve tempo possibile (o da trasportare refrigerati a +2/4°C per non più di 18 ore) oppure tamponi con terreno di trasporto (con o senza carbone) conservabili per lo stesso periodo anche a temperatura ambiente.

Le piastre delle colture primarie vanno incubate generalmente a +37°C per 24÷48 ore o più (per i germi esigenti) ed eliminate, in quest'ultimo caso, dopo un'incubazione di 4 giorni.

Lettura delle piastre

Dopo l'incubazione, le piastre vanno esaminate per rilevare la presenza di colonie. Devono essere considerate le caratteristiche e la quantità delle colonie cresciute. Se il campione seminato proviene da un animale morto già da qualche tempo, è facile osservare la crescita di tipi differenti di colonie, ciascuno dei quali con una numerosità ampiamente variabile. Questa situazione è indicativa dell'avvenuta migrazione dei microrganismi dal tratto gastroenterico. In generale, non è fattibile né opportuno pretendere di identificare tutte le tipologie di colonie osservate. È consigliabile, invece, concentrarsi sulle colonie che mostrano le caratteristiche proprie delle specie microbiche che si suppone possano essere responsabili della condizione clinica che ha richiesto l'accertamento microbiologico. Nella scelta di quali colonie siano da ritenere significative in questo senso devono essere tenuti in considerazione una serie di elementi, fra i quali si ricordano la specie del paziente, l'età, il distretto anatomico, la sintomatologia clinica, ecc. Va da sé che l'esperienza del microbiologo veterinario gioca un ruolo non secondario nell'operare correttamente questa scelta.

Identificazione delle colonie

In generale, solo poche specie microbiche clinicamente importanti in medicina veterinaria possono essere direttamente riconosciute da un microbiologo sufficientemente esperto sulla base delle sole caratteristiche di crescita delle loro colonie su Agar sangue. Tra queste, si possono citare: *Staphylococcus aureus/intermedius*, alcuni streptococchi (in particolare, i beta-emolitici, *Streptococcus suis*), *Pseudomonas spp*., *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Trueperella pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*. Anche in questi casi, tuttavia, è spesso necessario ricorrere a una o più prove di identificazione, che, solitamente, presuppongono l'isolamento in purezza della colonia da identificare in uno o più ulteriori terreni di coltura e l'esecuzione, a partire dalla coltura pura, di prove biochimiche, sierologiche, molecolari, ecc.

MALATTIE DA MICETI

(SONIA FLAMINIA LAVAGNOLI)

Largamente diffusi in natura, i miceti vivono generalmente come saprofiti del terreno o come commensali in vari organismi vegetali e animali. Solo alcune specie sono in grado di provocare malattie, chiamate micosi, nell'uomo e negli animali.

Le micosi vengono distinte, in base alla localizzazione e alla profondità delle lesioni, in:

- **Micosi superficiali**: causate da funghi che crescono solo sulla superficie più esterna della cute e degli annessi cutanei (unghie, peli, zoccoli) con scarsa o nulla risposta infiammatoria da parte dell'ospite normale. Nell'uomo hanno quasi esclusivamente importanza dal punto di vista estetico, ma nei soggetti immuno-compromessi la diffusione del fungo sulla cute può essere molto vasta e distruttiva (*Malassezia*, *Trichosporon*);
- **Micosi cutanee**: dovute allo sviluppo di miceti negli strati cheratinizzati e più profondi della cute, degli annessi cutanei e delle mucose con danni tissutali e reazione infiammatoria scarsa da parte dell'ospite (*Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*);
- **Micosi sottocutanee**: sostenute da miceti presenti nel terreno che penetrano nel sottocute principalmente attraverso ferite traumatiche e determinano infezioni croniche granulomatose. L'infezione può rimanere localizzata o diffondere per contiguità, o per via linfatica, con rilevante reazione immunitaria da parte dell'ospite (*Sporothrix*, *Phialophora*, *Exophiala*, *Conidiobolus*).

- **Micosi profonde e/o sistemiche**: determinate da miceti che da una sede iniziale, solitamente polmonare, si diffondono per via ematica a tutto l'organismo dell'ospite. A loro volta distinte in:
  - *Micosi primarie*: sostenute da miceti dimorfi "patogeni veri", in grado di determinare malattia anche nei soggetti immuno-competenti. Si verifica una forte reazione immunitaria da parte dell'ospite e sono associate con elevata mortalità specialmente negli ospiti immuno-compromessi (*Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*);
  - *Micosi opportuniste*: causate da funghi normalmente innocui, saprofiti dell'ambiente o commensali nell'uomo, ma in grado di diventare patogeni negli individui debilitati e immuno-compromessi (*Candida, Criptococcus, Aspegillus, Pneumocystis*) (Tampieri, 2004).

Micosi degli animali domestici

• *Micosi superficiali*

Infezioni da *Malassezia* spp. (Pitiriasi)

Lievito cosmopolita presente sulla cute dell'uomo e di molti animali domestici (gatti, cani, cavalli, capre, bovini, maiali e conigli) e selvatici come parte della normale flora. Può dare origine a infezioni cutanee, auricolari e, raramente nell'uomo, sistemiche (figura 1). Sono conosciute diverse specie lipofile e lipido-dipendenti (*Malassenzia furfur*, *M. restricta, M. globosa*, *M. sympodialis*) associate alla *pitiriasi versicolor* e ad altre affezioni dermatologiche dell'uomo.

La specie che più frequentemente colpisce gli animali, soprattutto i carnivori domestici, è *M. pachydermatis*, specie lipofila, ma non lipido-dipendente, che viene rilevata principalmente nelle zone ricche di ghiandole sebacee (condotto uditivo esterno, perineo, ghiandole anali). Altre specie isolate negli animali sono *M. caprae*, *M. equina*, *M. slooffiae*, *M. cuniculi*, *M. nana*.

Cambiamenti dell'ambiente cutaneo, accumulo di sebo e cerume, presenza di batteri, traumi e calo delle difese immunitarie, sono i fattori predisponenti che, associati a una maggiore recettività di specie (cane e gatto) e di razza, permettono lo sviluppo della patogenicità del fungo.

Fra i cani le razze più sensibili sono i bassotti, *basset hounds*, *cocker spaniels*, *shar pei*, barboncini, *bulldogs* e *west highland white terriers*; nei gatti si segnalano *devon rex*, *peterbald* e *sphynx*.
L'infezione nel cane può dare origine a dermatite seborroica pruriginosa e otite esterna. Gli animali presentano inizialmente eritema, seborrea, alopecia, seguito da lichenificazione e iperpigmentazione ed emanano un forte odore di grasso rancido. Le lesioni sono generalmente localizzate sulla testa e negli spazi interdigitali, più raramente su tutto il corpo, e spesso in associazione con altre patologie (dermatite atopica nel cane, infezioni da retrovirus, timoma e diabete mellito nel gatto).
L'otite esterna è unilaterale o, più spesso, bilaterale, di grado variabile ed è caratterizzata da eritema, prurito e iperproduzione di cerume ceroso, brunastro. Talvolta associata a infezioni batteriche (otite suppurativa) o da acari (*Otodectes*), può aggravarsi in otite interna o media (figura 1) (Cabañes, 2014; Velegraki *et al*., 2015; Theelen *et al*., 2018; ESCCAP, 2015-2018).

Figura 1 - Infezione da *Malassezia* spp.: dermatite seborroica nel cane *jack russell terrier* (a), iperpigmentazione cutanea *west highland white terrier* (b), diffusa in *basset hounds* (c), a livello nasale nel gatto *devon rex* (d), otite esterna (e), dermatite interdigitale (f), cutanea in bovino *limousine* (g) e capra *Saanen* (h).

Micosi cutanee

• *Dermatofitosi*

Infezione della pelle e degli annessi cutanei (peli, unghie, penne, lana) che colpisce mammiferi domestici e selvatici, sostenuta da funghi in grado di metabolizzare la cheratina, costituente essenziale dell'epidermide. La malattia è contagiosa e può essere trasmessa anche all'uomo. Tuttavia, nella maggior parte degli ospiti immuno-competenti, la malattia è autolimitante entro poche settimane o mesi. Il trattamento è quindi raccomandato con l'obiettivo di diminuire il decorso della malattia e per prevenire la diffusione ad altri animali e alle persone.

I funghi dermatofiti appartengono ai generi *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, i primi due parassitano sia gli animali che l'uomo, il terzo causa problemi solamente nell'uomo.

Vengono suddivisi, in base all' *habitat* in cui si riproducono (tabella 1), in:

- Geofili: miceti che vivono e si moltiplicano nel suolo e occasionalmente infettano l'uomo e gli animali (*Microsporum cookei*, *M. gypseum*, *Trichophyton terrestre*, *T. ajelloi*);
- Antropofili: parassiti strettamente umani, molto raramente sono trasmessi agli animali (*Epidemophyton floccosum*, *M. audouinii*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. rubrum*);
- Zoofili: vivono e si moltiplicano sulla cute animale e sono agenti di zoonosi. Alcuni attaccano comunemente l'uomo (*M. canis*, *T. mentagrophytes* var. *mantagrophytes*, *T. verrucosum*), mentre altri raramente parassitano l'uomo (*M. equinum*, *M. nanum*, *T. equinum*, *T. gallinae*).

La trasmissione delle spore fungine può avvenire direttamente per contatto tra animali, ma anche indirettamente, attraverso l'ambiente e i vettori meccanici. Dopo un'incubazione di 8-10 giorni, compaiono le prime lesioni, denominate tigna o *tinea*, solitamente sulla testa, attorno agli occhi, alle orecchie, che si manifestano come zone alopeciche, leggermente eritematose, ricoperte di piccole squame, a margini ben delimitati e leggermente sollevati, con o senza vescicole. Le lesioni, tipicamente asimmetriche, di solito si estendono in modo centrifugo, assumendo una forma circolare con caduta del pelo alla periferia e guarigione al centro (figura 2) (ESCCAP 2015).

Il prurito è variabile, ma di solito è assente, e le lesioni tendono a guarire spontaneamente in 1-2 mesi, tuttavia, in mancanza di trattamento, compaiono nuove lesioni che possono estendersi su tutto il corpo.

Tabella 1: Principali dermatofiti patogeni per gli animali

Dermatofita	Specie più recettiva	Fonte di contaminazione	Trasmissione all'uomo
Microsporum canis	Cane, gatto e molti altri mammiferi (anche uomo)	Gatto soprattutto	Frequente
M. equinum	Cavallo	Cavallo	Rara
M. gypseum	Cane, cavallo	Suolo (geofilo)	Molto rara
M. persicolor	Piccoli roditori, cane, gatto	Piccoli roditori	Rara
M. nanum	Suino	Suolo	Rara
Trichophyton mentagrophytes	Coniglio, piccoli roditori, cane, gatto, cavallo	Piccoli roditori	Frequente
T. verrucosum	Bovino (ovino), mammiferi	Bovino	Frequente
T. equinum	Cavallo	Cavallo	Occasionale
T. gallinae	Avicoli, gatto, cane	Avicoli	Rara
T. rubrum	Uomo, cane (raro)	Uomo (proprietario)	Il cane è infettato dal proprietario (non il contrario)

A volte le lesioni divengono pustolose (*kerion*), per complicazione con germi d'irruzione secondaria; altre volte, soprattutto nei gatti, si evidenzia una reazione granulomatosa (pseudomicetoma) che può ulcerarsi e lasciare fuoriuscire dei grani.

Talvolta si può avere lo stato di portatore asintomatico, particolarmente frequente nei carnivori domestici, soprattutto nei gatti a pelo lungo, ma anche nei conigli. In questo caso, la presenza di spore, senza lesioni apparenti, gioca un ruolo molto importante nell'epidemiologia della malattia e spesso sono i proprietari che diventano i reali testimoni della dermatofitosi dei loro animali.

I fattori che favoriscono l'insorgenza delle dermatofitosi sono la giovane età, la specie animale, (gatto, cane e coniglio sono più sensibili), la razza (gatti angora o persiani, cani dalmata, barboncini, *jack russell terriers, yorkshire terriers*), le carenze alimentari, l'alta densità di animali, come si verifica nei canili e nei gattili o durante mostre ed esposizioni, lo stato sanitario e immunitario degli animali, la stagione (maggiore frequenza durante i periodi caldo/umidi) (Moriello *et al*., 2017; ESCCAP, 2018).

Fra le diverse specie di dermatofiti *Microsporum canis* è l'agente causale della più importante dermatofitosi del cane e del gatto, definita come "micosi a ciclo urbano" in quanto trova nell'ambiente cittadino le condizioni migliori per la sua sopravvivenza e moltiplicazione. Rappresenta inoltre il principale responsabile della dermatofitosi dell'uomo, al quale viene trasmesso più spesso dal gatto (Refai *et al*., 2016e).

Nel cavallo la dermatofitosi è sostenuta da *M. equinum*, più raramente da *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. verrucosum*. La maggior parte delle lesioni si trovano nelle aree di contatto con selle o finimenti, di solito su testa, collo, petto e area dorsolaterale della cinghia (Refai *et al*., 2016c).

Trichophyton mentagrophytes var. *mentagrophytes* è responsabile della dermatofitosi dei lagomorfi e dei roditori domestici e selvatici, mentre *Trichophyton verrucosum* determina malattia primariamente nei ruminati (Refai *et al*., 2016b-2017; ESCCAP, 2017).

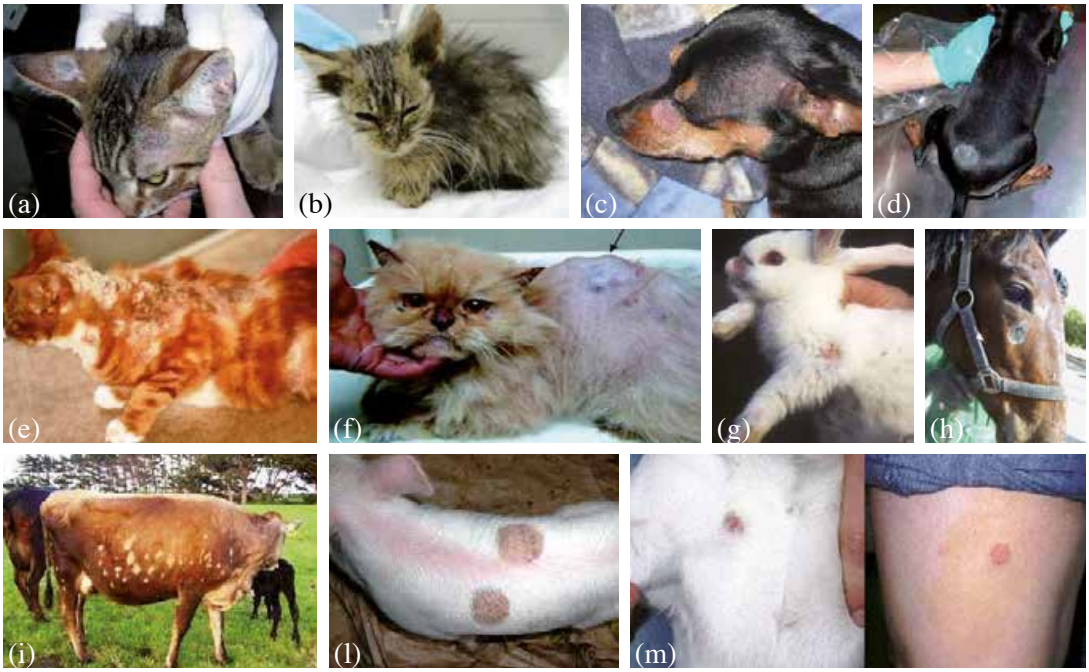


Figura 2 - Lesioni alopeciche da *Microsporum canis* in gatto (a); Dermatofitosi diffusa (b); *M. canis* nel cane (c, d); Lesioni *kerion* (e); Pseudomicetoma (f); *Trichophyton mentagrophytes* nel coniglio (g); *M. equinum* nel cavallo (h); *T. verrucosum* nel bovino (i); *M. nanum* nel suino (l); Lesioni identiche sul petto del cane e sul polpaccio del padrone da *M. canis* (m).

Micosi sottocutanee

• *Sporotricosi*

Malattia cronica granulomatosa, poco comune e a carattere sporadico, sostenuta da *Sporothrix schenkii* complex (*S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu stricto*, *S. globosa* e *S. luriei*), fungo dimorfo saprofita ambientale che vive soprattutto nei terreni ricchi di materiale organico. Segnalata in tutto il mondo, principalmente in aree caratterizzate da elevata umidità e temperatura mite, in Europa è considerata endemica in Spagna e nell'Italia meridionale.

Il gatto rappresenta l'animale più recettivo, ma la malattia può colpire anche cane, cavallo, bovino, suino e l'uomo. L'infezione avviene per inoculazione traumatica del suolo contaminato (nell'uomo ad esempio attraverso spine di rose) o per trasmissione dall'animale infetto (morsi e graffi di gatti).

Le lesioni rilevabili sono rappresentate da noduli cutanei superficiali, spesso ulcerati con fuoriuscita di materiale purulento. Sono interessati testa (naso e orecchio), collo, torace e arti, dove i noduli si sviluppano lungo il tragitto dei vasi linfatici e dai linfonodi. In rari casi l'infezione diviene generalizzata, con interessamento delle articolazioni e delle ossa, ma anche dei visceri toracici e addominali. Il gatto può sviluppare la forma disseminata, nel cavallo la malattia può dare quadri simili alla linfangite epizootica (figura 3) (Gremião *et al*., 2015**;** Refai *et al*., 2016c-2016e; Pal e Dave, 2017).

• *Cromomicosi*

Infezioni cutanee e sottocutanee di tipo cronico, causate da miceti melanino-pigmentati (funghi neri o dematiacei), appartenenti a numerosi generi e specie. Si tratta di funghi saprofiti, largamente diffusi nel suolo e nei vegetali in disfacimento, che inducono infezione attraverso colonizzazione dei tessuti in corrispondenza di traumatismi.

Determinano diversi tipi di lesioni che vengono classificate, dal punto anatomo-clinico, in:

- Cromoblastomicosi: lesioni verrucose dovute alla proliferazione del tessuto dell'ospite per effetto del micete presente nel derma in forma di granuli (microtallo);
- Feoifomicosi: comprende sia tumefazioni sottocutanee superficiali, spesso necrotiche e ulcerate, dovute a un'ampia varietà di miceti in cui le forme fungine sono di tipo ifale, senza tallo e granuli, sia infezioni invasive come ascessi cerebrali e malattie disseminate;
- Cromomicetomi (maduromicosi): costituiti da granulomi ulcerati, suppurati e fibrosi localizzati generalmente alla testa e agli arti inferiori, contenenti granuli formati dal micete che cresce *in vivo* come tallo (figura 3).

Il gatto rappresenta l'animale domestico più sensibile. *Cladophialophora bantiana*, *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Exophiala spinifera*, *E. jeanselmei*, *Alternaria alternata* e *A. infectoria* sono le specie maggiormente isolate nei gatti e sono responsabili d'infezioni feoifomicotiche cutanee (soprattutto al naso) o generalizzate (occhio, rene, cervello).

La feoifomicosi sistemica canina può manifestarsi con encefalite, osteomielite, nefrite e lesioni che variano da ascessi incapsulati multifocali a infiammazioni piogranulomatose. Sono segnalati soprattutto *Verruconis gallopava*, *Bipolaris spicifera*, *Cladosporium cladosporioides* e *A. infectoria*.

Pochi casi di feoifomicosi e cromomicetomi sono stati descritti nei ruminanti e negli equini, prevalentemente a livello delle labbra, degli arti e del collo negli equini e della mucosa nasale dei bovini. Negli equini *Alternaria* spp., *Bipolaris spicifera* e *Curvularia* spp. sono le specie più frequentemente isolate nei casi di feoifomicosi, mentre *Madurella mycetomatis*, *Pseudallescheria boydii*, *Curvularia geniculata* e *Setosphaeria rostrata* sono le principali cause di micetomi (Cafarchia *et al*., 2013; Lloret *et al*., 2013b; Seyedmousavi *et al*., 2013).

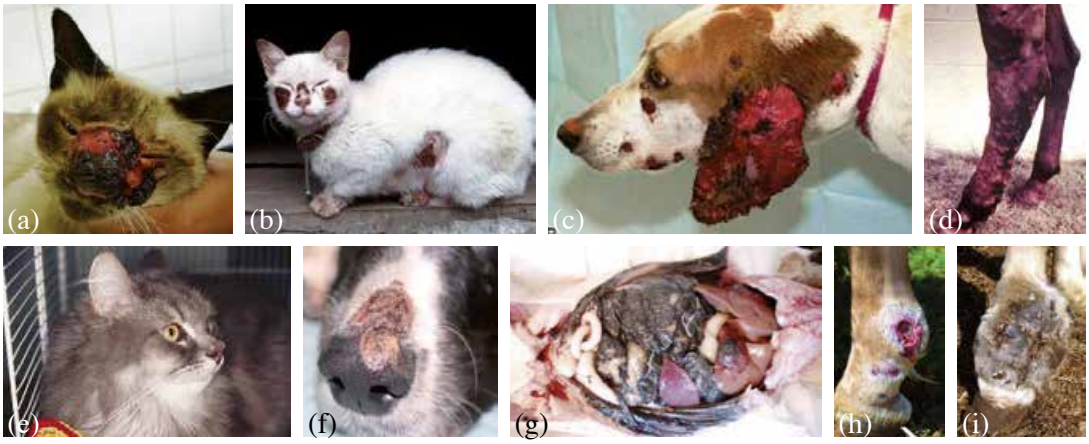


Figura 3 - **Sporotricosi** nel gatto (a, b), nel cane (c) e nel cavallo (d); **Feoifomicosi** nel gatto da *F. pedrosoi* (e); **Cromoblastomicosi** sul naso di un cane da *A. infectoria* (f); Lesioni viscerali diffuse nel gatto da *C. bantiana* (g); Micetoma sul pastorale nell'equino da *M. mycetomatis* (h, i).

• *Entomoftoromicosi (conidiobolomicosi, basidiobolomicosi)*

Infezione cronica sottocutanea causata da zigomiceti dell'ordine *Entomophthorales*: *Conidiobolus coronatus*, *C. incongruus*, *C. lamprauges* e *Basidiobolus ranarum*, micromiceti ubiquitari nel terreno e nei vegetali in disfacimento, ma anche commensali del tratto gastrointestinale di anfibi, pesci, rettili e pipistrelli insettivori. Questi funghi, raramente segnalati in Europa, sono presenti soprattutto delle zone tropicali e subtropicali (Africa, Asia, America).

La malattia è sporadica e si verifica negli animali immunocompetenti a seguito di un impianto traumatico o tramite insetti o per inalazione del fungo che è presente nei detriti vegetali ambientali.

La conidio-bolo-micosi colpisce principalmente ovini, cavalli e cani. Le lesioni, granulomatose e necrotiche, vengono distinte in due forme cliniche: rinofacciale e nasofaringea. Nella forma rinofacciale, piogranulomi ulcerativi sono localizzati sul vestibolo nasale, a livello della giunzione muco-epiteliale e del labbro superiore, con conseguente dispnea e scolo nasale per ostruzione meccanica. La forma nasofaringea interessa etmoide, turbinati, seni paranasali, il palato, la regione oculare e faringea e colpisce soprattutto le pecore (figura 4).

B. ranarum, responsabile della basidiobolomicosi, determina lo sviluppo di grossi noduli granulomatosi, ulcerati e fistolosi, sulla cute della regione pettorare, sul collo e sulla testa degli equini. Una forma disseminata è stata descritta, seppur raramente, nei cani (figura 4) (Ubiali *et al*., 2013; Seyedmousavi *et al*., 2015a; Refai *et al*., 2016c-2017).

• *Rinosporidiosi*

Infezione granulomatosa cronica, sporadica, sostenuta da *Rhinosporidium seeberi* (mesomicetozoi). Le lesioni, rappresentate da polipi rosati, rugosi e facilmente sanguinanti, sono rilevabili soprattutto sulla mucosa nasale e occasionalmente sulla cute di equidi, bovini, cani, gatti e nell'uomo (figura 4). Se voluminosi possono ostruire le cavità nasali. Osservata sovente nelle aree tropicali (India, Africa e Sud-America), l'infezione è favorita da traumi locali e non è ritenuta trasmissibile (Tiwari *et al*., 2015; Pal *et al*., 2016; Murray *et al*., 2017).

• *Pitiosi*

Pythium insidiosum è un oomicete acquatico (protista) che vive nelle acque paludose, responsabile negli equini di lesioni, molto simili a quelle dell'entomoftoromicosi, localizzate agli arti, all'addome, al petto e ai genitali (figura 4). La malattia, denominata "cancro delle paludi", è tipica dell'equino, ma è stata segnalata anche nel bovino, nella pecora, nel cane, nel gatto e nell'uomo.

Si rilevano noduli granulomatosi ulcerati e fistolizzati o masse necrotiche sottocutanee che determinano intenso prurito e spesso sono soggette ad automutilazioni. Sono comuni anche osteite, artrite e tenosinovite e l'interessamento dei linfonodi satelliti. *P. insidiosum* negli ovini e, più raramente negli equini, è inoltre responsabile di una rinofaringite granulomatosa con lesioni analoghe a quelle riscontrabili nella conidio-bolo-micosi; nel cane è stato isolato anche a livello orale e gastrointestinale, associato a vomito, diarrea, anoressia e perdita di peso.

La pitiosi si riscontra nelle regioni tropicali, sub-tropicali e, durante l'estate, nelle zone temperate. Non ci sono segnalazioni di trasmissione diretta tra animali e tra animali e l'uomo e non è riportata una predisposizione legata a età, razza o sesso (Cafarchia *et al*., 2013; Ubiali *et al*., 2013; Pal e Mahendra, 2014; Souto *et al*., 2016; Murray *et al*., 2017).

Figura 4 – **Conidio-bolo-micosi** rinofacciale (a) e nasofaringea (b) nell'equino; **Conidio-bolo-micosi** nel cane (c, d) e nella pecora (e); Sezione medio-sagittale della testa di pecora con **conidio-bolo-micosi** rinofacciale (f) e nasofaringea (g); **Basidio-bolo-micosi** nell'equino (h, i); **Rinosporidiosi** nel cavallo (l) e nel cane (m); **Pitiosi** nell'equino (n, o, p, q) e nel cane (r, s).

Micosi sistemiche primarie

• *Blastomicosi*

Malattia sostenuta dal fungo dimorfo *Blastomyces dermatitidis*, è caratterizzata da lesioni pio-granulomatose in vari tessuti. Più frequente nell'uomo e nel cane, è segnalata anche nei cavalli e nei gatti. Molti cani infetti sono immuno-competenti.

Il fungo predilige i terreni umidi e il materiale vegetale in decomposizione ed è stato isolato un po' in tutto il mondo, specialmente nei territori americani, tanto che alcune zone degli Stati Uniti (*Southeast* e *Midwest*) sono considerate endemiche.

In Italia non è riportata la presenza del fungo nell'ambiente, ma rari casi di blastomicosi sono stati diagnosticati in cittadini italiani che non hanno mai viaggiato all'estero.

Il cane si può infettare per inalazione delle spore o per contatto attraverso lesioni cutanee e l'incubazione delle forme cliniche può variare da 3 settimane a più di 3 mesi. I sintomi possono essere vari e poco specifici, anche perché l'infezione può cominciare con una polmonite (dispnea, tachipnea, tosse), per poi disseminarsi a pelle (noduli non ulcerati o ascessi di grandi dimensioni), ossa, articolazioni, tratto genito-urinario, occhi, linfonodi, cuore e cervello (figura 5).

Non è una zoonosi, ma il riscontro di malattia in cani e nei loro proprietari suggerisce la presenza di un'esposizione ambientale comune (Werner e Norton, 2011; Seyedmousavi *et al*., 2018).

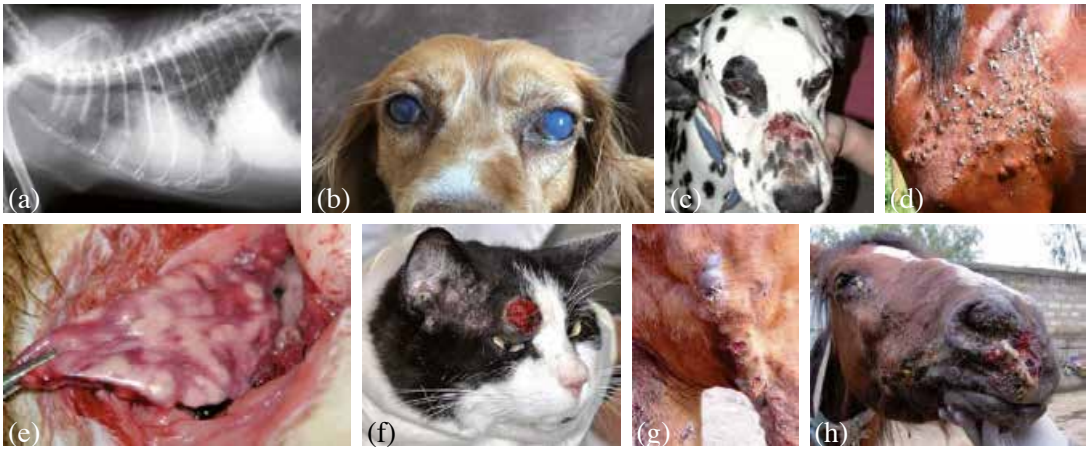


Figura 5 - **Blastomicosi** nel cane: radiografia polmonare (a), panoftalmite (b), lesioni cutanee (c); Noduli piogranulomatosi da *B. dermatitidis* sulla spalla di un cavallo (d); **Istoplasmosi** nel gatto: polmonite diffusa (e) e lesioni cutanee (f); **Linfangite epizootica** nel cavallo (g, h).

• *Istoplasmosi*

Infezione fungina, non contagiosa, che colpisce numerosi mammiferi domestici e l'uomo, causata dall'inalazione di *Histoplasma capsulatum*, fungo dimorfo che vive nei terreni umidi, ricchi di azoto, contaminati da feci di pipistrello, galline, storni e altri uccelli. L'infezione è comune nelle aree tropicali o subtropicali del mondo e negli Stati Uniti centro-orientali.

H. capsulatum comprende tre sottospecie distinte per distribuzione geografica e segni clinici.

H. capsulatum var. *capsulatum* ha una distribuzione globale e causa infezioni polmonari e sistemiche in un'ampia varietà di mammiferi, uomo compreso. Fra gli animali domestici sono colpiti soprattutto i gatti e, più raramente, i cani.

Oltre alla forma polmonare, acuta o cronica (tosse cronica e lesioni nodulari granulomatose nei polmoni e nei linfonodi toracici), è rilevata la forma gastrointestinale (diarrea persistente), come pure quella disseminata, con prognosi molto severa, con interessamento di fegato, linfonodi, occhi, midollo osseo e la cute con lesioni nodulari ulcerate e gementi (figura 5).

Nei cani normalmente le razze da lavoro (*Weimaraners* e *Brittanys* in particolare) e da pastore sono affette da istoplasmosi disseminata, mentre le razze *toy* manifestano la forma gastrointestinale.

Fattori predisponenti alla malattia sono rappresentati anche dalla giovane età e dal sesso, con maggiore incidenza nei maschi. L'esito della malattia è variabile e dipende dallo stato immunitario dell'ospite e dalla virulenza del ceppo isolato (Lloret *et al*., 2013a; Seyedmousavi *et al*., 2018).

H. capsulatum var. *duboisii* è endemico/enzootico nell'Africa centrale, causa linfoadenopatia e diffusione alla pelle e alle ossa, principalmente nell'uomo e negli altri primati.

H. capsulatum var. *farciminosum* è responsabile della linfangite epizootica, malattia che colpisce la pelle e il sistema linfatico sottocutaneo degli equidi (cavalli, asini e muli), ma è stato anche isolato da cani, gatti, bovini e uomo. Clinicamente la malattia è caratterizzata da noduli cutanei facilmente spostabili, localizzati a livello di arti, petto, testa o collo, che si sviluppano dai vasi linfatici superficiali o dai linfonodi, a loro volta prominenti e infiammati. I noduli tendono a formare ascessi e a ulcerarsi con fuoriuscita di sangue e *pus*. Lesioni simili si possono riscontrare anche nei polmoni e a livello delle mucose oculare, nasale e genitale. Presente in Africa, Asia e nel bacino del Mediterraneo, la malattia è contagiosa e viene trasmessa attraverso ferite infette o con la puntura di insetti (figura 5) (Scantlebury & Reed, 2009; Refai *et al*., 2016c).

• *Coccidioidomicosi*

Infezione tellurica, non contagiosa, sostenuta dai micromiceti dimorfici *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*, in grado di infettare molti mammiferi anche acquatici, alcuni rettili e uccelli. I funghi si trovano nel suolo delle zone aride degli Stati Uniti sud-occidentali, del Messico e dell'America centrale e meridionale.

Sebbene numerose specie di animali, uomo incluso, siano recettive, lo sviluppo della malattia in seguito all'infezione è specie-dipendente. Solo il cane (meno frequentemente il gatto) fra gli animali domestici sembra avere una sensibilità simile a quella dell'uomo, potendo manifestare infezione subclinica, patologia polmonare (broncopolmonite cronica), la più frequente (60-80% dei casi), e anche la forma disseminata (bulbo oculare, ossa, SNC). Sono a rischio soprattutto i cani giovani, di taglia grande e di razze da lavoro e sportive.

Nel cane la sintomatologia è variabile, a seconda degli organi coinvolti e della gravità dell'infezione, e si manifesta con tosse cronica secca o umida, anoressia, cachessia, letargia, zoppia, tumefazioni articolari, febbre e diarrea intermittente. A livello del polmone e dei linfonodi toracici si evidenziano noduli simil-tubercolari. L'interessamento cutaneo, raro nel cane, si manifesta con ascessi, noduli sottocutanei e ulcerazioni, mentre nel SNC si rilevano masse parenchimali granulomatose. La forma più comune di malattia disseminata del cane è costituita dall'osteomielite, mentre nel gatto sono più comuni le lesioni cutanee (figura 6).

Ruminanti, suini e gatti possono contrarre infezioni subcliniche, con lesioni circoscritte a focolai polmonari e a carico dei linfonodi toracici. Rari casi sono segnalati nei cavalli, soprattutto di razza araba e nelle femmine gravide, nella maggior parte dei quali si evidenziano forme disseminate accompagnate da placentite e aborto (Nogueira Brilhante *et al*., 2016; Renschler e Wheat, 2018).

Figura 6 - **Coccidioidomicosi**: cachessia (a), gonfiore e osteomielite dei tarsi nel cane (b), lesioni cutanee nel gatto (c).

• *Paracoccidioidomicosi*

Denominata anche blastomicosi sudamericana, è una micosi endemica/enzootica dei paesi dell'America Latina, sostenuta dai funghi dimorfi *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. L'infezione viene acquisita per inalazione di conidi infettivi o attraverso ferite infette di cute e mucose. Malattia sistemica molto grave nell'uomo, può colpire anche il cane dove si manifesta con emaciazione, linfoadenomegalia ed epatosplenomegalia. Le indagini sierologiche o i *test* cutanei con antigeni di *P. brasiliensis* hanno rivelato l'esistenza d'infezione da paracoccidioidomicosi anche in gatti, suini, ruminanti, cavalli e conigli (Rodrigues de Farias *et al*., 2010; Seyedmousavi *et al*., 2015a-2018; Refai *et al*., 2016e).

Micosi sistemiche opportuniste

• *Criptococcosi*

Micosi sistemica sostenuta da lieviti saprofiti ambientali cosmopoliti, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. La specie *C. neoformans* comprende due varietà, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*, che rappresentano i principali agenti di infezione nei mammiferi. Le diverse specie e varietà vengono distinte ulteriormente in genotipi molecolari e sierotipi che variano per virulenza, distribuzione geografica e suscettibilità ai farmaci antimicotici.

Molto frequente in gatti e cani, la malattia interessa anche equini, bovini e ovi-caprini, soprattutto i soggetti immuno-compromessi, ma a volte anche gli animali sani. L'uomo può anch'esso infettarsi, tuttavia non è dimostrata la trasmissione da animale a uomo.

C. neoformans manifesta una particolare predilezione per gli ambienti dove sono presenti escrementi di piccioni e di altri uccelli. Il lievito, infatti, è in grado di utilizzare per il suo sviluppo alcune molecole prontamente utilizzabili, come la creatinina, presenti nelle feci e può sopravvivere nel guano per più di due anni. Tuttavia i piccioni in genere non s'infettano a causa dell'alta temperatura corporea (42°C). *C. gattii* è stato rilevato in più di 50 specie di alberi, tra cui *Eucalyptus* spp.

La principale via d'ingresso delle spore è quella respiratoria, per inalazione di polveri contaminate, a cui consegue la disseminazione per via ematica dal polmone ad altri distretti. La trasmissione può avvenire anche attraverso l'ingestione di cibo contaminato o attraverso ferite.

I gatti rappresentano la specie più sensibile: la manifestazione clinica più frequente è associata alla forma nasale, ma l'infezione assume spesso aspetto generalizzato e la variabilità della sintomatologia clinica dipende dagli organi interessati. *C. neoformans* ha un particolare tropismo per polmoni, SNC e bulbo oculare. Si evidenziano pertanto polmoniti croniche, sub-acute e acute, meningiti ed encefaliti, uveite e corio-retinite. A livello polmonare si rilevano lesioni miliari bilaterali, voluminose cisti replete fino ad una polmonite lobare. Si osservano anche osteomieliti e poliartriti, lesioni cutanee ulcerate, nodulari o granulomatose, localizzate soprattutto a livello nasale (figura 7). L'ingestione di alimento contaminato può determinare la formazione di granulomi nel tratto gastro-intestinale. Negli animali sani ha generalmente un andamento subclinico, ma nei soggetti debilitati può diffondersi rapidamente. L'infezione può variare da acuta a cronica.
I cani presentano localizzazioni simili, ma il coinvolgimento del SNC è più comune e i sintomi includono atassia, movimenti di maneggio, incoordinazione motoria e cecità, quest'ultima riportabile a lesioni del cervello e/o del bulbo oculare. Le meningi si presentano inspessite e viscide, cisti ripiene del micete si ritrovano nel cervello.
Negli equini *C. neoformans* si localizza di preferenza a livello meningoencefalico, broncopolmonare e genitale (placentite ed endometrite), mentre nei ruminanti colpisce principalmente la mammella e si evidenziano mastiti molto gravi, che colpiscono più animali nell'allevamento. Il latte si presenta bianco-grigiastro, denso e vischioso (Pennisi *et al*., 2013; Refai *et al*., 2016c-2016e-2017).

Figura 7 - **Criptococcosi felina**: lesioni ulcerative sulla testa (a, b); gonfiore e deformità facciale (c); cheratouveite e criptococcoma nella camera anteriore dell'occhio (d).

• *Aspergillosi*

Aspergillus spp. sono tipici miceti opportunisti, cosmopoliti e ubiquitari, identificati in pressoché tutti gli animali domestici e negli uccelli. A seconda della specie animale interessata si localizzano in diversi tessuti e determinano differenti patologie. Le forme più comuni negli animali domestici sono l'aspergillosi polmonare e l'aborto bovino, la micosi delle tasche gutturali del cavallo e l'infezione dei seni nasali e paranasali del cane.

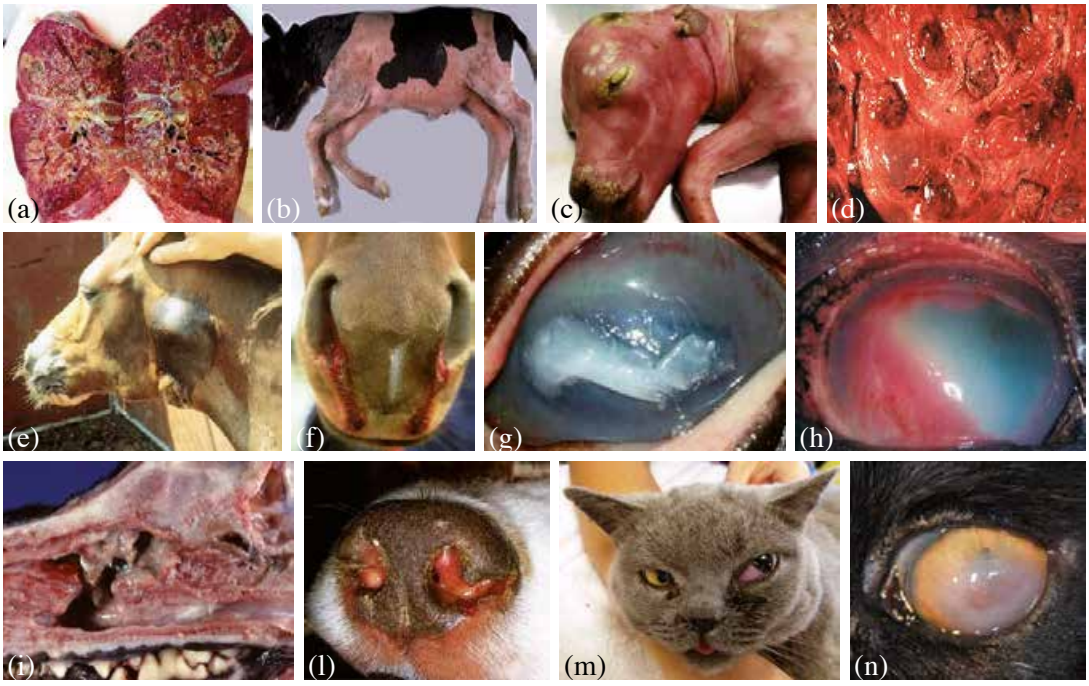


Figura 8: Infezioni da *Aspergillus* spp.: polmonite (a), aborto micotico (b, c) e placentite (d) nel bovino, aspergillosi delle tasche gutturali del cavallo (e, f), cheratite ulcerativa (g) e ascesso corneale (h) nell'equino, aspergillosi dei turbinati nel cane (i, l), granuloma retro-bulbare con esoftalmo e prolasso della 3ª palpebra (m) e cheratite ulcerativa nel gatto (n).

L'insorgere dell'infezione e la gravità della malattia dipendono dallo stato fisiologico dell'ospite, ma anche dalla specie di *Aspergillus* coinvolta: i ceppi riconosciuti patogeni appartengono, per oltre il 90%, ad *A. fumigatus*. *A. niger*, *A. nidulans*, *A. flavus* e *A. terreus* possono occasio-

nalmente provocare malattie negli animali. Generalmente sono necessarie alte concentrazioni di spore per determinare l'infezione, pertanto anche le condizioni ambientali in cui gli animali vivono, la scarsa ventilazione, l'illuminazione insufficiente, il sovraffollamento, la lunga esposizione all'agente fungino, sono fattori predisponenti allo sviluppo della malattia.

Nei bovini la localizzazione polmonare può manifestarsi sia in forma asintomatica, come pure con infezioni broncopolmonari rapidamente fatali; nelle forme a evoluzione subacuta o cronica, il polmone presenta granulomi che richiamano la tubercolosi.

Non rara è la placentite e l'aborto micotico (circa il 60% degli aborti micotici è dovuto ad *A. fumigatus*), con infezione che si verifica sia per via aerogena che per via ascendente. Rara invece risulta la mastite. Spesso le vacche infette non presentano altri sintomi al di fuori dell'aborto, che è sporadico e avviene generalmente al 7°-8° mese di gravidanza, con ritenzione di placenta. La placenta è inspessita con focolai necrotico-emorragici ricoperti da pseudomembrane aderenti. I cotiledoni e le caruncole materne appaiono ipertrofici, con superficie ruvida e irregolare, fortemente adesi fra loro. Le lesioni cutanee del feto abortito consistono in piccoli focolai para-cheratosici diffusi su testa, collo, fianchi, spalle. Occasionalmente si rilevano lesioni negli organi interni fetali (polmone, fegato, abomaso) (figura 8) (Moretti *et al*., 2013; Borel *et al*., 2014; Pal, 2015; Refai *et al*., 2016b).

Nel cavallo la patologia più comune è la micosi dei seni e delle tasche gutturali, più frequentemente causata da *A. nidulans*, mentre rare sono le polmoniti e le forme sistemiche. La malattia è caratterizzata da necrosi della mucosa, con inspessimenti, emorragie e presenza di pseudomembrane friabili. Epistassi e disfagia sono complicanze abituali per interessamento dei vasi e dei nervi cranici, mentre disturbi della deambulazione e alterazioni visive, che possono portare a cecità, si verificano con il diffondersi dell'infezione. Sono anche segnalati casi di cheratocongiuntivite per trauma locale (figura 8) (Moretta *et al*., 2010; Seyedmousavi *et al*., 2015b; Elad & Segal, 2018).

Nel cane è coinvolto soprattutto *A. terreus* che si localizza particolarmente nelle cavità nasali e nei seni paranasali determinando una grave forma di rinosinusite che interessa soprattutto i soggetti dolicocefali (levrieri) e mesocefali (pastori tedeschi e *rottweiler*). La malattia è caratterizzata da starnuti, scolo nasale mono-bilaterale, da sieroso a mucopurulento, e sovente epistassi (figura 8). Sono decritti anche molti casi di otite. La forma disseminata della malattia, con localizzazioni al SNC e muscoloscheletriche, sembra essere più comune nei pastori tedeschi (Sharman e Mansfield, 2012; Refai *et al*., 2016e).

Le forme più frequenti nei gatti, soprattutto nei persiani (brachicefali), sono le infezioni rinosinusali e senorbitali sostenute da *A. felis*. Spesso l'infezione si propaga alla cavità orbitale, determinando lo sviluppo di un granuloma e di esoftalmo (figura 8). Sono state descritte anche infezioni polmonari ed enteriche, la maggior parte associate a casi di enterite infettiva e immunosoppressione (Seyedmousavi *et al*., 2015b; Elad & Segal, 2018).

• *Candidosi*

Varie specie di *Candida* (*C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis, C. guilliermondii*) vivono come saprofita nell'ambiente e frequentemente fanno parte anche del microbiota umano e animale, vengono pertanto considerate commensali e patogene facoltative. *C. albicans* e *C. glabrata* sono invece endosaprofite nel tubo digerente, ma non della cute degli animali. Le infezioni sono solitamente causate da ceppi che pre-colonizzano commensalmente l'ospite piuttosto che trasmesse da altri animali e anche il potenziale zoonosico è considerato basso. Sebbene *C. albicans* sia considerata la specie più virulenta, altre specie possono essere prominenti a seconda della specie animale e del sito di infezione.

Candida albicans provoca più frequentemente infezioni aviarie, mentre è rara nei mammiferi. *Candida* spp. determinano infezioni cutanee, orali, nasali, dell'orecchio esterno, inte-

stinali e genitali in molti animali domestici (cavalli, bovini, pecore, cani, gatti e maiali). La disseminazione del fungo può portare alla candidemia, infezione gravissima degli organi interni (polmoni, cuore, reni, occhi).

La candidosi cutanea è piuttosto frequente nei cani, soprattutto nei giovani animali, e spesso necessita di fattori predisponenti o debilitanti, quali malnutrizione e una prolungata terapia antibiotica. Si manifesta con una dermatite seborroica generalizzata, alopecia, eritema irregolare ed erosioni superficiali (figura 9). Ferite, traumi, interventi chirurgici possono introdurre *Candida* spp. nei tessuti profondi o in cavità peritoneale con formazione di granulomi, peritonite, infezioni delle vie urinarie e dei reni.

Le specie di origine ambientale possono causare mastiti e aborto nella bovina e nella cavalla. La mastite da *Candida* spp. rappresenta la più frequente tra le mastiti micotiche nella bovina da latte ed è una conseguenza del trattamento intramammario indiscriminato con antibiotici. Oltre che reazione infiammatoria della ghiandola mammaria e dei linfonodi associati, si evidenzia febbre, dolorabilità locale, riduzione della produzione e alterazione della qualità del latte (Jadhav e Pal, 2013; Refai *et al*., 2016b-2016c-2016e; Seyedmousavi *et al*., 2018).

Figura 9 - **Candidosi nel cane**: genitale (a), dell'orecchio (b), sul muso (c) e cutanea diffusa (d).

• *Mucormicosi*

Sostenuta da miceti ubiquitari appartenenti all'ordine *Mucorales* (classe *Zygomycetes*) che si ritrovano normalmente nel terreno ricco di materiale organico, nel letame e nei vegetali in decomposizione. Sono patogeni opportunisti e l'infezione si verifica negli animali debilitati, con disordini metabolici, sottoposti a trattamento prolungato con antibiotici e/o cortisonici. I generi più diffusi sono *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Lichtheimia*, *Mortierella*.

Sono interessate numerose specie di animali, tra cui il cane, il bovino, il suino, gli equidi e il coniglio. L'infezione provoca angioinvasione e diffusione a più organi: lesioni focali di tipo granulomatoso si rilevano in polmoni, apparato digerente, linfonodi, fegato, rene, cute (figura 10). La sintomatologia è generalmente aspecifica e varia in relazione agli organi coinvolti.

Nei bovini si osservano gastroenterite, polmonite e linfoadenite dei linfonodi meseraici e mediastinici con lesioni macroscopicamente indistinguibili dalla tubercolosi bovina (noduli giallastri, caseo-calcificati e fibrotici). Alcuni soggetti, con focolai nodulari linfonodali, non presentano alcuna sintomatologia e le lesioni si rilevano solo in sede di macellazione. Ulcerazioni si ritrovano nei pre-stomaci (soprattutto nell'omaso) e nell'abomaso dei bovini. *L. corymbifera* è stata identificata come causa del 60% micosi gastro-intestinali bovine (Refai *et al*., 2016b).

Nelle vacche gravide, i miceti mucorali, in particolare *L. corymbifera* e *M. wolfii*, sono causa di placentiti e aborto. L'aborto da zigomiceti rappresenta circa il 20% di tutti gli aborti da miceti, è sporadico e si verifica, senza sintomi prodromici, al 6°-8° mese di gestazione ed è spesso seguito da ritenzione di placenta; solitamente occorre nel periodo invernale, quando le bovine vengono alimentate con fieno ammuffito (figura 10) (Pal, 2015).

Nei cavalli, *R. stolonifer*, *L. corymbifera* e *Mucor* spp. sono le specie più frequentemente isolate. Sono descritte quattro forme mucormicotiche: polmonare, gastrointestinale, disse-

minata e cutanea localizzata. Nei maiali l'infezione è rara e colpisce in particolare polmoni, stomaco, intestino e linfonodi. Nei cani e nei gatti alcuni casi di mucormicosi sono stati descritti come causa di enterite, diffusione sistemica e periorbitale (Schwartze e Jacobsen, 2014; Seyedmousavi *et al*., 2018).

Figura 10 - **Aborto micotico** da *L. corymbifera* nel bovino: lesioni macroscopiche del feto (a) e della placenta (b); **Lesioni mucormicotiche** nel polmone (c); **Mucormicosi periorbitale** nel cane (d); **Encefalitozoonosi** (e); **Rodotorulosi** (f); **Penicilliosi** (g); **Cheratite da *Fusarium* spp**. (h) nel cavallo.

• *Microsporidiosi (Encefalitozoonosi)*

I microsporidi sono un gruppo di funghi parassiti intracellulari obbligati responsabili d'infezioni negli animali e nell'uomo (individui immuno-depressi). Il più importante per gli animali è *Encephalitozoon cuniculi* che colpisce conigli e animali da laboratorio. L'infezione diffonde soprattutto tramite le spore presenti nel cibo contaminato da urine infette di coniglio, ma anche per via transplacentale e per contatto con gli essudati infetti. Circa il 50% dei conigli risulta essere sieropositivo.

Solitamente colpisce reni, SNC e cristallino, meno comunemente può interessare miocardio, milza e fegato. La malattia si presenta in forma latente, asintomatica, e diventa evidente dopo un periodo di *stress*. Si può evidenziare in forma acuta, con sintomi prevalentemente neurologici, e in forma cronica, caratterizzata da granulomi in diversi organi e con gravi alterazioni funzionali. I sintomi comprendono paresi e paralisi, perdita di coordinazione, convulsioni, torsione del capo, cataratta, cecità, sordità, nefrite ed emaciazione. I soggetti sono poco reattivi e possono presentare un'apparente incontinenza urinaria conseguente al danno renale (figura 10) (ESCCAP, 2017).

Encephalitozoon intestinalis colpisce ruminanti, suini e cani causando un'infezione gastrointestinale, oculare, genitourinaria e respiratoria. Il sintomo sempre presente è una diarrea persistente che facilita anche la trasmissione del fungo per contaminazione fecale dell'alimento o dell'acqua di bevanda. In molti mammiferi, in particolare nel suino, è segnalato anche *Enterocytozoon bieneusi*, agente causale d'infezioni gastrointestinali e respiratorie (Seyedmousavi *et al*., 2018).

Tabella 2: Principali malattie da miceti rilevabili negli animali domestici

Malattia	Agente eziologico	Animali *target*	Sintomatologia/lesioni	Malattia nell'uomo
		Micosi superficiali		
Infezione da *Malassezia* (Pitiriasi)	*Malassezia pachydermatis*, *Malassezia* spp.	Cane, gatto, cavallo, ruminanti, suino e coniglio	Dermatite seborroica, alopecia, prurito, iperpigmentazione, odore rancido, otite	*Pitiriasi versicolor*
Tricosporonosi[1]	*Trichosporon* spp.	Bovino	Mastite	Piedra bianca
		Micosi cutanee		
Dermatofitosi	*Microsporum* spp., *Trichophyton* spp.	Cane, gatto, cavallo, ruminanti, suino e coniglio	Dermatite alopecica eritematosa, lesioni circolari, asimmetriche, senza prurito; kerion; pseudomicetoma	*Tinea corporis*, *T. pedis*, *T. capitis*,*T. unguium*, *T. barbae*
		Micosi sottocutanee		
Sporotricosi	*Sporothrix schenkii complex*	Gatto, cane, cavallo, bovino, suino	Noduli cutanei granulomatosi, ulcerati, noduli linfocutanei e infezioni disseminate	Noduli cutanei, linfocutanei, osteoarticolari, infezioni disseminate
Cromoblastomicosi	*Alternaria*, *Bipolaris*, *Phialophora*	Gatto, cane, cavallo, bovino	Lesioni verrucose contenenti granuli di micete	Cromoblastomicosi
Feoifomicosi	*Cladophialophora, Phialophora, Fonsecaea, Alternaria, Exophiala, Bipolaris, Cladosporium*	Gatto, cane, cavallo, bovino	Tumefazioni, spesso necrotiche e ulcerate, senza granuli, raramente disseminate	Feoifomicosi, spesso forme disseminate
Micetoma	*Madurella*, *Pseudallescheria*, *Curvalaria*, *Setosphaeria*	Gatto, cane, cavallo, bovino	Granulomi ulcerati, suppurati e fibrosi contenenti granuli	Micetoma
Conidiobolomicosi	*Conidiobolus coronatus, C. incongruus, C. lamprauges e*	Pecora, cavallo, cane	Lesioni necrotiche e granulomatose rinofacciali e nasofaringee	Granulomi rinofacciali, rara forma disseminata
Basidiobolomicosi	*Basidiobolus ranarum*	Equino, cane, pecora	Granulomi ulcerati e fistolosi su testa, collo, petto	Granulomi sottocutanei
Rinosporidiosi	*Rhinosporidium seeberi*	Equidi, ruminanti, cane, gatto	Polipi rosati, rugosi e facilmente sanguinanti sul naso	Polipi nasali, oculari, cutanei
Pitiosi	*Pythium insidiosum*	Equidi, cane, gatto, ruminanti	Noduli granulomatosi con prurito su arti, corpo. Anche forma gastrointestinale	Forme cutanee, oculari, vascolari e sistemiche
		Micosi profonde o sistemiche - primarie		
Blastomicosi	*Blastomyces dermatitidis*	Cane, cavallo, gatto	Forma polmonare, cutanea e disseminata multiorgano	Forme polmonari, cutanee, diffuse
Istoplasmosi	*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*	Gatto, cane, ruminanti, equidi	Forma polmonare, gastrointestinale, disseminata	Forma polmonare, sistemica

Malattia	Agente eziologico	Animali *target*	Sintomatologia/lesioni	Malattia nell'uomo
Linfangite epizootica	*Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*	Equidi, cane, gatto, bovino	Noduli cutanei granulomatosi ulcerati lungo i linfatici; anche nei polmoni e mucose visibili	Noduli cutanei granulomatosi, ascessi, ulcere
Coccidioidomicosi	*Coccidioides immitis, C. posadasii*	Cane, gatto, ruminanti, equidi, suini	Forma subclinica, polmonare cronica, disseminata (ossa, cute, bulbo oculare, SNC)	Forma asintomatica, polmonare, disseminata
Paracoccidioidomicosi	*Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii*	Cani, mammiferi domestici e selvatici	Cachessia, linfoadenomegalia diffusa, epatosplenomegalia	Forma polmonare, muco-cutanea, disseminata
Micosi profonde o sistemiche - opportuniste				
Criptococcosi	*Cryptococcus neoformans, C. gattii*	Gatto, cane, ruminanti, equini	Forma polmonare, cutanea, diffusa (SNC, bulbo oculare)	Colpisce polmone, cute, occhio, SNC
Aspergillosi	*Aspergillus fumigatus, A. niger, A. nidulans, A. flavus*, *A. terreus*, *A. felix*	Bovino, equino, cane, gatto	Polmonite e aborto nella bovina; micosi tasche gutturali e cheratite nel cavallo, infezione rinosinusale e sinorbitale nei cani e nei gatti	Infezioni polmonari, localizzate e diffuse, aspergilloma, reazioni allergiche
Candidosi	*Candida albicans, Candida* spp.	Cani, gatti, cavallo, ruminanti, suini	Infezioni cute e mucose, alopecia e prurito; aborto e mastite bovina. Forme diffuse	Infezioni cute e mucose. candidemia forma diffusa
Mucormicosi	*Mucor, Rhizomucor, Rhizopus, Mortierella, Lichtheimia*	Bovino, cane, cavallo, suino, coniglio	Focolai granulomatosi in polmoni, omaso, linfonodi, cute; aborto micotico bovino	Forma rinocerebrale, polmonare, cutanea, diffusa
Microsporidiosi (Encefalitozoonosi)	*Encephalitozoon cuniculi*	Coniglio	Infezioni reni, SNC (torcicollo) e occhio; spesso forma asintomatica	Infezioni localizzate (rene, occhio, polmoni) e diffuse
	Encephalitozoon intestinalis, *Enterocytozoon bieneusi*	Ruminanti, suini, cani	Infezione gastrointestinale (diarrea persistente), oculare, genitourinaria e respiratoria	Infezione gastrointestinale
Rodotorulosi[2]	*Rhodotorula mucilaginosa, R. glutinis e R. minuta*	Cane, gatto, ruminanti, equino	Lesioni cutanee alopeciche, crostose, rosate, non pruriginose; otite; mastite; cheratite	Infezioni localizzate e diffuse, endocardite, meningite
Geotricosi[3]	*Geotrichum candidum*	Cavallo, ruminanti, cane, gatto	Infezioni di cute e mucose; aborto e mastite bovina	Infezioni cute e mucose, diffuse
Penicilliosi[4,5]	*Penicillium* spp., *Talaromyces marneffei*	Cane, gatto	Infezioni della cavità nasale, orecchio, occhio, polmoni, linfonodi e ossa	Forma disseminata a polmoni, fegato, cute, linfonodi

Malattia	Agente eziologico	Animali *target*	Sintomatologia/lesioni	Malattia nell'uomo
Fusariosi[5]	*F. solani, F. oxysporum, F. moniliforme, F. verticilliodes*	Equini, ruminanti, cane	Cheratiti, polmoniti, peritoniti, cellulite, meningoencefaliti, osteomieliti, piaghe cutanee	Onicomicosi, cheratite, occasionali malattie invasive
Paecilomicosi[6]	*Paecilomyces variotii, P. lilacinus*	Cavallo, cane, gatto, ruminanti	Lesioni granulomatose polmonari, corneali, disco-vertebrali, mastite	Infezioni di occhio, cute e unghie; granulomi diffusi
Adiaspiromicosi[4]	*Emmonsia crescens, E. parva, E. pasteuriana*	Ampio spettro d'ospite, equini	Asintomatica, autolimitante, rara polmonite necrotico-granulomatosa	Da asintomatica a grave polmonite granulomatosa
Pneumocistosi[7]	*P. oryctolagi*, *P. canis*, *P. jirovecii*	Cane, coniglio, gatto, ovi-caprini, equini	Polmonite interstiziale anche mortale	Infezioni polmonari letali in soggetti immunodeficienti

(1) Refai *et al*., 2016b; (2) Agnetti *et al*., 2012; Wirth e Goldani, 2012; (3) Antoniassi *et al*., 2013; Pal *et al*., 2013; (4) Seyedmousavi *et al*., 2015a; (5) Refai *et al*., 2016e; (6) Refai *et al*., 2016c-2016e; (7) Refai *et al*., 2016c; ESCCAP, 2017

Patologie micotiche negli avicoli

• *Aspergillosi aviaria*

Malattia sistemica, prevalentemente respiratoria, caratterizzata da lesioni granulomatose a carico di polmoni e sacchi aerei. *Aspergillus fumigatus* rappresenta la specie più frequentemente coinvolta, più raramente sono stati isolati *A. niger*, *A. flavus e A. nidulans*, *A. glaucus* e *A. terreus*.

Sono colpiti soprattutto polli e tacchini, in misura minore galline ovaiole, anatre, oche, piccioni, canarini e molti uccelli selvatici. La modalità di infezione più frequente è l'inalazione di spore presenti su lettiera, granaglie, mangimi contaminati, ma anche l'ingestione di alimenti ammuffiti e l'inoculazione cutanea a seguito di traumatismi rappresentano altre vie, sebbene più rare, di trasmissione. L'aspergillosi può diffondere anche per via verticale, determinando scarsi livelli di schiusa e mortalità embrionale. La rottura inoltre delle uova infette negli incubatoi determina l'infezione nei soggetti giovani.

Fattori predisponenti, come il sovraffollamento, la scarsa igiene dell'allevamento, un ambiente caldo, con elevata umidità e difetti di ventilazione, uno stato di debilitazione e immunosoppressione dell'animale, dovuti a una dieta non appropriata e soprattutto a carenze vitaminiche (in particolare vitamina A), come pure a tossicosi o infezioni concomitanti, possono predisporre alla micosi.

La malattia è primariamente una broncopolmonite, con dispnea e rantoli, a cui si accompagna sonnolenza, anoressia, piume arruffate, dimagrimento, polidipsia e poliuria. Quando l'infezione coinvolge il cervello e l'occhio, come si verifica spesso nei tacchini, si notano torcicollo e disturbi dell'equilibrio, zoppie, tremori, opistotono, decubito laterale, convulsioni, atassia e paralisi, cecità. La mortalità può essere inferiore al 10%, ma nei soggetti giovani può raggiungere rapidamente il 70-90% degli animali presenti.

La malattia può presentarsi in forma acuta, con morte in 24-48 h per setticemia, nei soggetti molto giovani (entro i primi 10 giorni di vita), nei soggetti adulti immunodepressi o che vivono in ambienti fortemente contaminati. Nei soggetti giovani (2-3 settimane di vita) si manifesta la forma subacuta, caratterizzata da sintomatologia respiratoria (infezione di bronchi e sacchi aerei) e talvolta digestiva (diarrea fetida), con morte in 8-15 giorni. La forma cronica

si evidenzia più frequentemente nei soggetti adulti (in particolare nei tacchini di età superiore a 1 mese) che presentano malessere generale, sintomatologia respiratoria e digestiva, entero-epatite e morte per cachessia in 1-2 mesi.

A livello delle vie aeree, del polmone e dei sacchi aerei si osservano noduli diffusi sulla superficie, di diversa taglia e consistenza, non incapsulati, infiltranti. Noduli granulomatosi giallastri interessano talvolta i visceri in profondità e le mucose delle cavità splancniche. Occasionalmente nel pollame e nei piccioni si evidenzia una dermatite granulomatosa necrotica (figura 11) (Leishangthem *et al*., 2015; Girma *et al*., 2016; Elad e Segal, 2018).

• *Moniliasi (candidosi)*

Candida spp. sono gli agenti causali della moniliasi, micosi muco-cutanea degli uccelli, caratterizzata da placche circolari bianco-grigiastre caseose, talvolta ulcerate o ricoperte di pseudomembrane difteriche, localizzate su creste e bargigli e, soprattutto, a livello di ingluvie, cavità orale, esofago, pro-ventricolo (figura 11).

C. albicans è la specie più frequentemente isolata, ma anche *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* sono implicate come agenti causali. La trasmissione avviene principalmente attraverso i mangimi e l'acqua contaminati da feci di animali infetti.

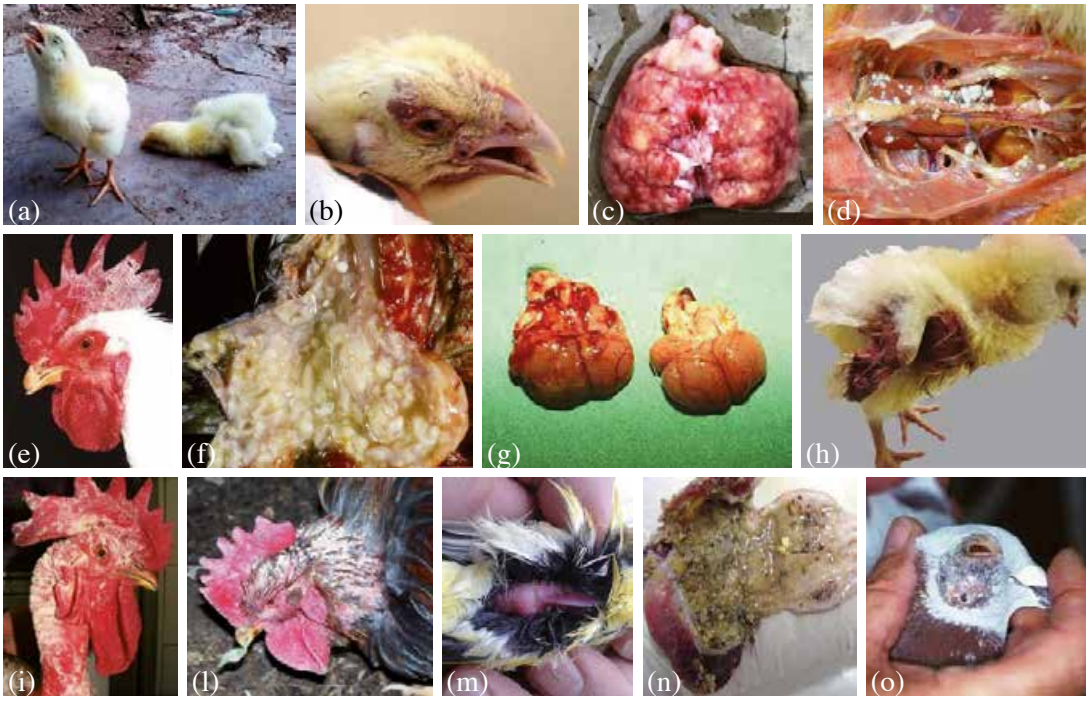


Figura 11 - **Aspergillosi aviaria**: sintomatologia (a, b), granulomi diffusi nei polmoni (c) e nei sacchi aerei (d); **Candidosi**: lesioni su cresta e bargigli (e) e nel gozzo (f); **Dactilariosi** cerebrale (g); **Dermatite cutanea gangrenosa-necrotizzante** da *R. glutinis* (h); **Tigna favosa** nel tacchino (i) e nel pollo (l); **Macrorabdiosi aviaria**: atrofia dei muscoli pettorali nel canarino (m) e ulcerazioni ed emorragie del proventriglio (n); **Criptoccoccosi** nel piccione (o).

La malattia colpisce polli, tacchini, fagiani e faraone, soprattutto i soggetti giovani (1-2 settimane di vita). La sintomatologia non è specifica (anoressia, apatia, deperimento, arruffamento delle penne, diarrea), in rari casi si assiste a un'invasione sistemica e si evidenziano sintomi neurologici, renali o intestinali. Di norma la mortalità non è elevata, ma si registra un ritardo della crescita.

La scarsa igiene degli allevamenti, le carenze nutrizionali, enteriti parassitarie, micotossicosi, la somministrazione di antibiotici e i fattori stressanti, sono ritenuti i principali fattori predisponenti all'instaurarsi della malattia (Dhama *et al*., 2013; Refai *et al*., 2016d).

• Dactilariosi (encefalite micotica)

Micosi che interessa tacchini e polli giovani (1-5 settimane di vita), con localizzazione cerebrale, sostenuta da *Verruconis gallopava* (*Ochroconis* o *Dactylaria gallopava*), fungo dematiaceo che si riscontra abitualmente negli ambienti a temperatura elevata e a pH basso, come la lettiera in fermentazione.

La malattia si trasmette per via inalatoria e successiva invasione ematogena del SNC. Si evidenziano sintomi nervosi, paralisi, torcicollo, incoordinazione, cecità ed estese lesioni pigmentate localizzate a livello cerebrale. La mortalità è variabile dal 3-20% (figura 11) (Seyedmousavi *et al*., 2013; Refai *et al*., 2016d).

• Rodotorulosi (dermatite micotica)

Rhodotorula spp. sono spesso isolate dalla lettiera di pollame e dagli escrementi di piccione, tuttavia solo raramente sono associate a malattie del pollame. *R. glutinis* è responsabile nel pollo da carne di dermatite cutanea gangrenosa-necrotizzante, particolarmente evidente a carico delle regioni del collo, del torace e del dorso, con sensibili tassi di calo ponderale e successiva mortalità dei volatili infetti (50-60%) (figura 11). *R. mucilaginosa* è invece causa della dermatite delle piume. In rari casi *Rhodotorula* spp. possono anche localizzarsi nel gozzo e, in questo caso, si ha mortalità improvvisa degli animali con il gozzo disteso, ripieno di mangime (Agnetti *et al*., 2012; Dhama *et al*., 2013).

• Tigna favosa (tricofitosi)

Dermatofitosi sporadica che colpisce il pollo e il tacchino, occasionalmente segnalata nei pollai famigliari. *Trichophyton gallinae* (*Microsporum gallinae*) rappresenta l'agente più spesso isolato, sebbene siano stati rilevati anche *M. gypseum* e *T. simii*. Le lesioni sono principalmente localizzate nelle zone prive di penne (cresta e bargigli) e sono rappresentate da croste bianche rugose, irregolari, pulverulente, confluenti, che emanano il caratteristico "odore di muffa. Nei casi più gravi l'infezione si diffonde alle penne del collo e del dorso che appaiono sfrangiate, spezzate (figura 11).

La diffusione dell'infezione si verifica per contatto diretto o attraverso le attrezzature contaminate. Pur essendo una malattia contagiosa, solitamente non si manifesta in tutti gli animali presenti, ma interessa solamente pochi soggetti isolati. Può esservi trasmissione anche ai mammiferi e all'uomo (Dhama *et al*., 2013; Refai *et al*., 2016d).

• Macrorabdiosi aviaria

Malattia sostenuta da *Macrorhabdus ornithogaster*, fungo cosmopolita che colpisce polli, tacchini, ma anche selvaggina, struzzi, passeriformi, piccioni e psittacidi. La malattia è sporadica e la gravità dipende dalla specie di uccelli coinvolta, molto grave negli struzzi, lieve negli psittacidi e nel pollame domestico. L'infezione è caratterizzata da sintomatologia gastroenterica, perdita di peso e atrofia dei muscoli pettorali. Lesioni emorragiche e ulcerative sono rilevabili nel proventriglio e ventriglio (figura 11) (Refai *et al*., 2016d).

Tabella 3: Le principali malattie da miceti negli avicoli

Malattia	Eziologia	Specie target	Sintomatologia e lesioni
		Micosi cutanee e sottocutanee	
Tigna favosa (Tricofitosi)	*Trichophyton gallinae*	Polli, tacchini	Croste bianche, irregolari, pulverulente, confluenti, nelle zone su cresta e bargigli; può estendersi alle penne di collo e dorso
Rodotorulosi (Dermatite micotica)	*Rhodotorula glutinis*, *R. mucilaginosa*	Polli	Dermatite gangrenosa-necrotizzante o delle piume, morte 50-60%
		Micosi profonde	
Aspergillosi	*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* spp.	Tacchini, polli. Rara in altre specie domestiche e selvatiche	Sintomi respiratori, nervosi e oculari. Morte 10-90%. Lesioni granulomatose su polmoni e sacchi aerei. Rara in altri organi e cute
Moniliasi (Candidosi)	*Candida albicans*, *Candida* spp.	Polli, tacchini, fagiani e faraone giovani	Deperimento, arruffamento delle penne, diarrea. Placche caseose in cavità orale, ingluvie, esofago, proventricolo
Dactilariosi	*Verruconis gallopava*	Tacchini e polli giovani	Sintomi nervosi. Lesioni pigmentate al SNC
Macrorabdiosi aviaria	*Macrorhabdus ornithogaster*	Polli, tacchini, uccelli domestici e selvatici	Sintomi gastroenterici, atrofia muscoli pettorali. Lesioni emorragiche e ulcerative in proventriglio e ventriglio
Mucormicosi(1)	*Mucor racemosus*, *Lichtheimia corymbifera*	Uccelli domestici e selvatici	Focolai granulomatosi orali e nel SNC, più rari in polmone, occhi, vertebre e tratto gastrointestinale
Microsporidiosi (encefalitozoonosi) (2)	*Encephalitozoon hellem*	Uccelli domestici e selvatici (pappagalli)	Sintomi aspecifici e respiratori; granulomi polmonari e diffusi in diversi organi
Criptococcosi(3)	*Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*	Uccelli da compagnia (canarini, pappagallini)	Lesioni ulcerative su becco e narici o forma disseminata (polmoni, SNC e occhi)
Istoplasmosi(2)	*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*	Uccelli da compagnia, selvatici. Rara pollame	Asintomatica; forma respiratoria con lesioni polmonari se associata ad *Aspergillus*

(1) Dhama *et al*., 2013; (2) Seyedmousavi *et al*., 2018; (3) Refai *et al*., 2016d.

Patologie micotiche negli animali acquatici

• *Saprolegniosi*

Infezione dei pesci di acque dolci (trote, salmoni) sostenuta da miceti appartenenti alla famiglia *Saprolegniaceae* (classe *Oomycota*). Le specie più rappresentate sono *Saprolegnia ferax*, *S. parasitica*, *S. diclina*, *Achlya americana, A. dubia*.

Le lesioni da *Saprolegnia* si evidenziano principalmente su cute, branchie, occhi e si presentano come macchie bianco-giallastre che, se osservate in acqua, hanno un aspetto cotonoso, per effetto del micelio del fungo che cresce sulla superficie. Inizialmente hanno forma

quasi circolare, focale e interessano lo strato superficiale del derma, poi crescono radialmente e possono penetrare fino alla muscolatura. In quest'ultimo stadio, le lesioni assumono spesso un colore grigio o marrone per adesione del fango sul micelio (figura 12). Frequentemente vengono colpite anche le uova.

Nei soggetti colpiti si osservano letargia, difficoltà respiratoria e riduzione della schiusa delle uova. Le lesioni, anche se superficiali, determinano un *deficit* circolatorio periferico e gravi alterazioni dell'osmoregolazione. Nei casi più gravi, quasi la totalità del corpo può essere coperto dalla crescita fungina, nei casi cronici può sopravvenire un'infezione batterica secondaria. Inoltre, seppur raramente, si evidenziano infezioni sistemiche generalizzate, con localizzazione negli organi interni (intestino) e nel midollo spinale (sintomatologia nervosa).

Fattori predisponenti all'instaurarsi della malattia sono la manipolazione dei pesci e qualsiasi danno traumatico della pelle, le condizioni di sovrapopolazione, malnutrizione, la cattiva qualità dell'acqua (alti livelli di materiale organico, ammoniaca e nitriti, diminuzione del flusso), le malattie virali o batteriche intercorrenti e le temperature dell'acqua molto basse o, al contrario, troppo alte.

L'esito della malattia è solitamente fatale, anche se il tempo che intercorre fra infezione e morte è variabile e dipende dal sito iniziale d'ingresso, dal tessuto distrutto, dal tasso di crescita del micete e dalla capacità immunitaria dell'animale. Negli allevamenti le infezioni dai *Saprolegnia* spp. sono causa di perdite economiche limitate, ma costanti. Tuttavia, la mortalità delle uova può aumentare rapidamente e determinare un impatto economico maggiore (Roberts, 2012; Refai *et al*., 2016a).

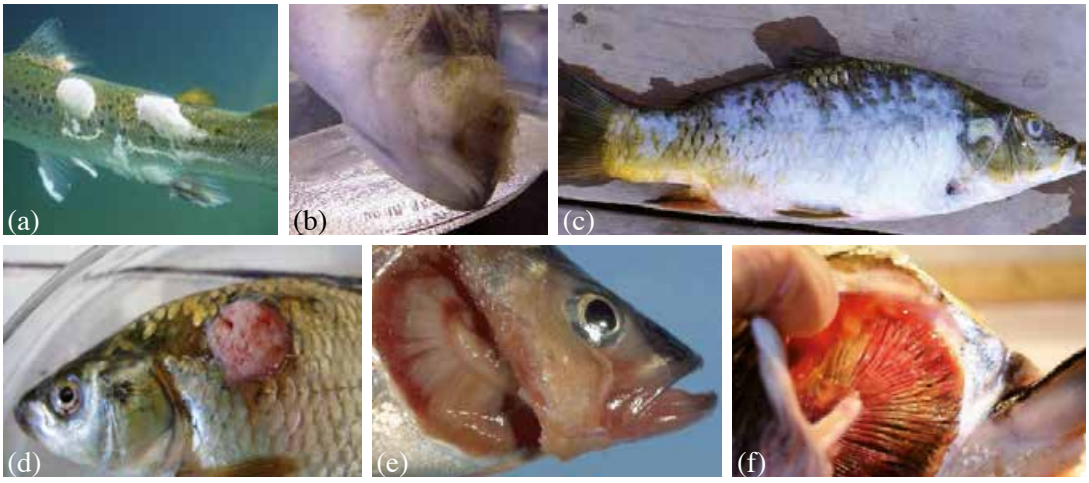


Figura 12 - Lesioni da *Saprolegnia* spp. (a, b, c); Lesioni da *Dermocystidium* spp. nella carpa (d); **Branchiomicosi** (e, f).

• *Infezione da Dermocystidium spp*.

Dermocystidium spp. sono causa di infezioni della cute dei pesci di acqua dolce e si localizzano su branchie, pinne o corpo. Ritenuti funghi da alcuni autori per la presenza di spore e ife, sono attualmente classificati fra i mesomicetozoi.

Le lesioni caratteristiche sono rappresentate da gonfiori in rilievo, di colore bianco o rosato, di dimensioni variabili da 1-2 cm fino a 10 cm e di forma variabile da ovale/circolare a striature allungate (figura 12). In fase avanzata, l'epidermide che copre il ponfo diventa più sottile, e,

al di sotto, è possibile vedere all'interno le ife biancastre che conferiscono un aspetto nuvoloso alla tumefazione. Quando la lesione è matura, si rompe spargendo migliaia di spore nell'acqua.

La malattia si verifica generalmente in primavera e ha una durata di 6-8 settimane. Sembra inoltre che si ripresenti annualmente nei bacini in precedenza infetti.

L'infezione da *Dermocystidium* non è generalmente fatale, tuttavia le lesioni spesso servono all'impianto d'infezioni secondarie (Glockling *et al*., 2014; Gozlan *et al*., 2016).

• *Branchiomicosi*

Malattia acuta rilevabile in moltissime specie di pesci di acqua dolce. Le lesioni caratteristiche sono rappresentate da zone di necrosi infartuale ed emorragie nelle branchie dovute alla crescita intravascolare di *Branchiomyces sanguinis e B. demigrans*. *B. sanguinis* cresce principalmente nei vasi sanguigni branchiali, mentre *B. demigrans* si trova nei tessuti parenchimali delle branchie.

I pesci infetti presentano sintomi respiratori, perdita di equilibrio, movimenti lenti e anoressia. Le branchie appaiono necrotiche, erose, pallide o congeste, marmoree (figura 12). La mortalità può verificarsi in meno di 48 ore e può raggiungere il 50% dei soggetti infetti.

La branchiomicosi è stata segnalata in Europa, Asia, Medio Oriente, Australia e Nord America, nelle regioni in cui la temperatura estiva dell'acqua è superiore a 20°C.

Fattori stressanti, come una temperatura dell'acqua superiore a 20 ºC, il basso livello di ossigeno disciolto, il flusso d'acqua ridotto, il sovraffollamento, gli alti livelli di nutrienti e fitoplancton, favoriscono lo sviluppo della malattia (Ibrahim, 2011; Khalil *et al*., 2015).

• *Ittiofoniasi o ittiofonosi*

Granulomatosi sistemica, sostenuta dal mesomicetozoo *Ichthyophonus hoferi*, che colpisce molte specie di pesci di acqua dolce, salmastra e salata, sia in zone temperate che tropicali.

L'infezione si manifesta con ruvidità della pelle (effetto "carta vetrata"), principalmente nella regione caudale latero-ventrale, ed è caratterizzata da granulomi dermici proliferativi, solitamente nerastri, del diametro di 1 mm e in rilievo rispetto alla superficie cutanea. Un'ulteriore crescita del fungo causa necrosi locale e formazione di ascessi o ulcere pigmentate che assomigliano a scaglie di pepe sulla superficie della pelle (figura 13).

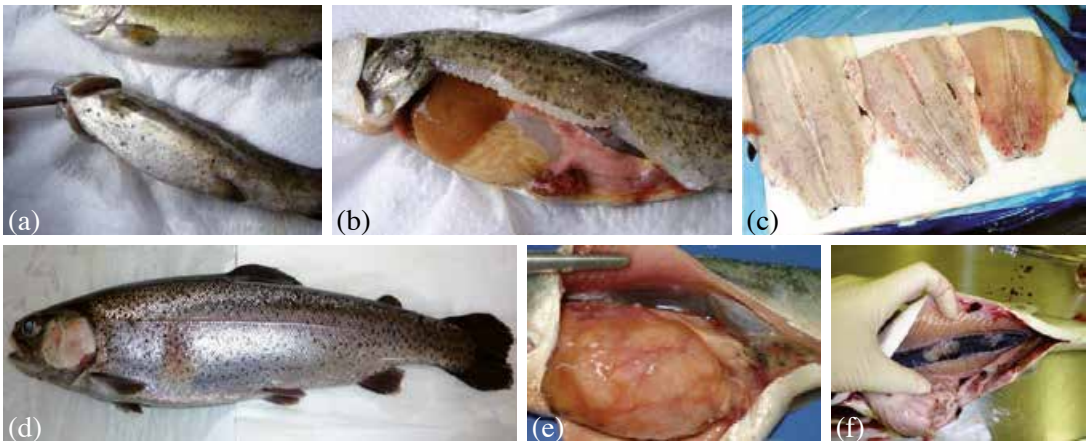


Figura 13 - **Ittiofoniasi**: macchie pigmentate ventrali (a), noduli negli organi interni (b), emorragie nei filetti (c); *Exophiala* spp.: rigonfiamento dell'addome, esoftalmo e ulcere craniche (d), granulomi nei visceri addominali (e) e nei reni (f).

In altri casi sono colpiti maggiormente gli organi interni rispetto alla cute, soprattutto fegato e cuore, ma anche muscoli, milza e cervello: si evidenziano noduli biancastri rilevati, simili ai granulomi tubercolari. Lesioni pigmentate si rilevano nei muscoli scheletrici di pesci pesantemente infetti, causando l'esclusione dalla commercializzazione dei filetti interessati. Altri sintomi clinici non specifici della malattia sono rappresentati da anomalie del nuoto, letargia, anoressia, emaciazione, anomalie cromatiche, distensione addominale, esoftalmo ed elevata mortalità (Hershberger, 2012; Roberts, 2012; Refai *et al*., 2016a).

• *Cromomicosi (Feoifomicosi)*

Exophiala salmonis, *E. psychrophila E. aquamarina*, *E. pisciphila* sono responsabili di infezioni nei pesci d'acqua dolce e, talvolta, anche in anfibi, crostacei e pesci marini. La malattia ha bassa incidenza e morbilità, tuttavia vengono descritti alcuni episodi epizootici con mortalità fino al 50%.

Il pesce infetto solitamente non manifesta segni clinici, ad eccezione di un nuoto irregolare e vorticoso, e, solo nei casi più gravi, si evidenzia addome rigonfio e indurito alla palpazione. L'esoftalmo e le ulcere cutanee craniche sono comuni, sebbene questi segni clinici non siano considerati patognomonici. Internamente sono colpiti soprattutto reni, fegato e milza e si rilevano noduli grandi, multipli, grigio/giallastri, che possono, nel proseguo della malattia, confluire e interessare l'intera cavità addominale e i muscoli adiacenti. Nel salmone è stato evidenziato micetoma cerebrale.

Le infezioni da *Exophiala* spp. sono generalmente considerate secondarie a fattori di *stress* o dismetabolici, condizioni tossiche o problemi di qualità dell'acqua, traumi (maltrattamento o aggressività), malattie batteriche o parassitarie (figura 13) (de Hoog *et al*., 2011; ICES, 2016).

Anche altri funghi neri dematiacei come *Ochroconis humicola*, *O. tshawytshae* e *Verruconis gallopava* sono responsabili di infezioni nei pesci di acque dolci e marine caratterizzate da addome ingrossato, ascite, aderenze, aree grigiastre ed emorragiche negli organi interni (soprattutto nel rene), spesso associate ad ascessi, ulcere e vesciche cutanee (Refai *et al*., 2016a).

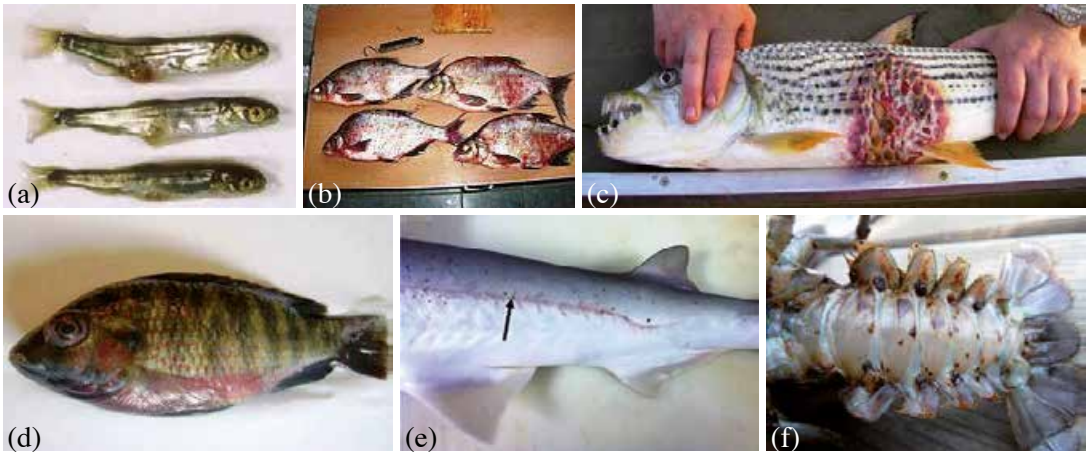


Figura 14 - Infezione da *P. herbarum* in avannotti di salmone (a); Forma setticemica di *S. destruens* (b); Sindrome ulcerativa epizootica (c); Scurimento della cute, esoftalmo e moderata distensione addominale da *Aspergillus* spp (d); Lesioni superficiali in squalo martello da *Fusarium* spp. (e); Erosioni e melanizzazioni da *Aphanomyces astaci* nel gambero (h).

• *Infezione da Phoma herbarum (Sphaeropsidales)*

Infezione dei pesci di acque dolci che solitamente colpisce gli avannotti, sia quelli appena nati che quelli che hanno diverse settimane di vita. Raramente ha una morbilità superiore al 5%, tuttavia, quando l'incidenza della malattia è alta, i pesci manifestano nuoto anomalo e incapacità a mantenere l'equilibrio. Le lesioni, localizzate nella vescica natatoria, inizialmente sono rappresentate da aree biancastre di 1-2 mm, successivamente il micete invade tutto l'organo che diventa iperplastico. In altri casi, il micete si localizza a livello dell'intestino, dove provoca ostruzione del lume, peritoniti, necrosi ed emorragie viscerali. Si evidenziano addome retratto e petecchie emorragiche sulla superficie latero-ventrale e sulla pinna caudale del pesce (figura 14) (Meyers *et al*., 2008).

• *Infezione da Sphaerothecum destruens*

S. destruens, strettamente correlato al genere *Dermocystidium*, è un parassita intracellulare obbligato, agente causale di una malattia che causa alti tassi di morbilità e mortalità in diverse specie di salmonidi e altri pesci d'acqua dolce. Isolato per la prima volta negli anni '80 nel salmone reale (*O. tshawytscha*) degli Stati Uniti, viene ritenuto un grave rischio in Europa in quanto le specie autoctone risultano molto sensibili (Glockling *et al*., 2014; Gozlan *et al*., 2014).

La malattia si presenta sia in forma setticemica che in forma nodulare granulomatosa cronica, con lesioni rilevabili in più organi (rene, fegato, branchie, gonadi e intestino) (figura 14). *Pseudorasbora parva*, piccolo pesce originario dell'estremo Oriente, introdotto nel XIX secolo in Europa e divenuto infestante e dannoso in molti fiumi italiani (soprattutto Po e Arno), è anche portatore sano di *S. destruens* (Sana *et al*., 2017).

• *Sindrome ulcerativa epizootica*

Aphanomyces invadans e altre *Alphanomyces* spp. sono responsabili della Sindrome ulcerativa epizootica (SUE), malattia della cute e dei visceri dei pesci d'acqua dolce e salmastra. Sono colpite più di 100 specie di pesci presenti nelle regioni Pacifico-Asiatiche, in Australia e negli Stati Uniti orientali.

Le lesioni sono rappresentate da dermatite granulomatosa necrotizzante, miosite e granulomi viscerali. Nelle fasi iniziali della malattia si evidenziano sulla cute piccole macchie rosse e lesioni emorragiche, a cui seguono ulcere profonde e grandi erosioni necrotiche e morte rapida (figura 14) (Boys *et al*., 2012; Kamilya and Baruah, 2014).

A. invadans richiede una combinazione specifica di fattori per germinare all'interno del derma del pesce. La SUE, infatti, si verifica comunemente nelle acque tropicali e subtropicali nei periodi caratterizzati da basse temperature (< 25°C) e forti piogge. Queste condizioni favoriscono la sporulazione e ritardano la risposta infiammatoria del pesce alle infezioni.

Tabella 4: Principali patologie micotiche negli animali acquatici

Malattia	Agente eziologico	Organismi *target*	Sintomatologia e lesioni
		Micosi superficiali	
Saprolegniosi	*Saprolegnia ferax, parasitica, diclina, Aclya americana, dubia*	Pesci d'acque dolci	Alta mortalità. Lesioni cotonose su cute, branchie, occhi, uova. Alterazione circolatoria, raramente invasione organi interni
Peste dei gamberi[1]	*Aphanomyces astaci*	Crostacei americani ed europei (più sensibili)	Crescita nerastra sul guscio (zona ventrale e intorno alle articolazioni), necrosi muscolatura coda, alta mortalità

Malattia	Agente eziologico	Organismi *target*	Sintomatologia e lesioni
Infezione da *Dermocystidium*	*Dermocystidium* spp.	Pesci d'acque dolci	Grandi ponfi su cute, branchie, pinne. Rara mortalità, spesso infezioni secondarie
Micosi vascolare branchiale			
Branchiomicosi	*Branchiomyces sanguinis, B. demigrans*	Pesci d'acque dolci	Malattia acuta, alta mortalità. Emorragie e necrosi delle branchie (marmorizzate). Sintomi respiratori, perdita equilibrio, movimenti lenti, anoressia
Micosi profonde			
Ittiofoniasi	*Ichthyophonus hoferi*	Pesci d'acque dolci e marine	Alti tassi di mortalità. Granulomi su cute (carta vetrata), organi interni, muscoli
Cromomicosi	*Exophiala salmonis, E. psychrophila, E. aquamarina, E. pisciphila*	Pesci d'acque dolci e marine, crostacei, anfibi. Zoonosi	Bassa incidenza e mortalità. Addome rigonfio, ulcere craniche, esoftalmo, noduli organi interni. Micetoma cerebrale
	Ochroconis humicola, O. tshawytshae, Verruconis gallopava	Pesci d'acque dolci e marine	Addome ingrossato, ascite, aderenze, aree emorragiche e grigiastre organi interni; ascessi, vesciche, ulcere cutanee
Infezione da *Phoma herbarum*	*Phoma herbarum* (*Sphaeropsidales*)	Pesci d'acque dolci (avannotti). Zoonosi	Lesioni in vescica natatoria e intestino; petecchie superficiali, emorragie e necrosi
Infezione da *Sphaerothecum destruens*	*Sphaerothecum destruens*	Pesci d'acque dolci. *Pseudorasbora parva*, infestante, è portatore sano	Alti tassi di morbilità e mortalità. Forma setticemica acuta e nodulare granulomatosa sistemica multi-organo
Sindrome ulcerativa epizootica	*Aphanomyces invadans*	Pesci d'acque dolci e salmastre in zone Pacifico-Asiatiche, USA, Australia	Dermatite granulomatosa necrotizzante, miosite, granulomi viscerali. Alta mortalità
Aspergillosi[2]	*Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*	Pesci d'acque dolci delle zone tropicali di Africa e Asia	Mortalità elevata. Nuoto anomalo, scurimento cute, addome rigonfio, esoftalmo. Emorragie cutanee e viscerali (fegato). Granulomi sistemici nelle forme croniche
Fusariosi[3]	*Fusarium* spp., *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moliniforme*	Pesci marini in Oceano Atlantico e Indo-Pacifico; pesci d'acque dolci dell'Asia sud-orientale	Mortalità elevata. Inizialmente erosioni, vesciche superficiali laterali, poi dermatite necrotizzante, miosite, infezione organi interni. Nei gamberi: malattia branchia nera
Paecilomicosi[3]	*Purpureocillium* (*Paecilomyces*) *lilacinus*	Pesci d'acque dolci. Zoonosi	Emaciazione, iperpigmentazione ed emorragie cutanee, occhi infossati, pinne erose. Granulomi visceri (rene) e vescica natatoria

Malattia	Agente eziologico	Organismi *target*	Sintomatologia e lesioni
Infezione da *Haliphthoros* spp.[3]	*Haliphthoros milfordensis* Vishniac, *phillippinensis* Hatai	Crostacei marini	Alta mortalità. Lesioni necrotiche rossastre su branchie, arti. Localizzazione su uova (mancata schiusa) e larve (morte)
Infezioni di uova e larve	*Lagenidium, Atkinsiella, Halocrusticida, Halioticida, Pythium*	Crostacei marini e d'acque dolci	Alta mortalità. *Pythium* spp. provoca mortalità anche nelle uova e nelle larve di pesci di acque marine e dolci

(1) Jussila *et al*., 2014; Mrugała, 2016; (2) Iqbal and Saleemi, 2013; (3) Refai *et al*.,2016a

Miceti di interesse patologico per le api

Figura 15 - Covata calcificata (a, b); Covata pietrificata c); Dissenteria da *Nosema apis* (d); Spopolamento dell'alveare da *N. ceranae* (e).

• *Covata calcificata o "di gesso" (Ascosferosi o Chalkbrood)*

Causata dal fungo ascomicete *Ascosphaera apis*, rappresenta la più comune delle micosi di *Apis mellifera*. L'infezione viene trasmessa attraverso l'assunzione di cibo contenente spore e colpisce le larve di 3-4 giorni di età, dopo l'opercolatura della cella. Inizialmente il fungo compete con la larva per il cibo causandone la morte "per fame", in seguito ne invade il corpo che diventa mummificato, gessoso. Le larve morte si presentano, infatti, come pezzi di

gesso, bianchi o neri a seconda della presenza o meno di ascospore colorate, e tipicamente si ritrovano sul fondo o all'ingresso dell'alveare (figura 15). La malattia è più frequente in primavera, dal momento che la crescita del fungo è migliore in ambiente fresco e umido. Anche eventuali carenze alimentari (in particolare di alcuni amminoacidi) possono contribuite allo sviluppo della patologia. Le spore sono molto resistenti e possono rimanere vitali per almeno 15 anni nell'alveare (Aronstein and Murray, 2010).

• *Covata pietrificata (Aspergillosi o Stonebrood)*

Patologia non frequente, a potenziale rischio zoonosico, che interessa soprattutto l'Europa e il Nord America, con massima incidenza da aprile ad agosto, sostenuta da *Aspergillus flavus* e, occasionalmente, da *A. fumigatus* e *A. niger*. L'infezione viene trasmessa sia per ingestione di spore sia attraverso la cuticola e colpisce sia la covata (larve e pupe) che le api adulte.

Nelle api adulte la sintomatologia è caratterizzata inizialmente da grande agitazione, a cui segue, prima della morte, debolezza, paralisi, addome dilatato e mummificato. Nella covata il fungo cresce rapidamente e forma un caratteristico anello collareo giallo-biancastro vicino all'estremità della larva infetta. Dopo la morte, larve e pupe vengono ricoperte dal fungo, diventano dure, difficili da schiacciare e assumono una colorazione giallo-verde (*A. flavus*), verde-grigiastra (*A. fumigatus*) o nera (*A. niger*) (figura 15).

La malattia di solito non è grave, in quanto colpisce solo una piccola parte di individui della colonia. Conseguenze serie si possono registrare solo nelle colonie già indebolite o sottoposte a fattori stressanti (Lopes *et al*., 2015).

• *Nosemiasi*

Malattia sostenuta dai microsporidi *Nosema apis* e *N. ceranae*, funghi che colpiscono le api adulte con massima incidenza in primavera e autunno. L'infezione negli insetti è assunta per via orale e per trofallassi. La diffusione all'interno di un apiario o tra apiari diversi avviene tramite favi contaminati da feci, miele/polline infetto, attraverso i meccanismi di saccheggio e deriva delle api, con il materiale apistico contaminato. Clinicamente le api manifestano riduzione delle produzioni, alterazioni morfologiche con ventricolo gonfio e intestino biancastro, dissenteria (*N. apis*) e lento spopolamento fino al collasso della colonia (*N. ceranae*) (figura 15). La malattia è soggetta a denuncia (D.P.R. 320/1954) (Carpana e Lodesani, 2014).

Tabella 5: Principali patologie micotiche delle api (*Apis mellifera*)

Micete	Ospite	Comportamento	Malattia
Ascosphaera apis	Covata	Parassita	Covata calcificata
Ascosphaera major	Covata	Parassita facoltativo	
Bettsia alvei	Alveare	Saprofita	Muffa del polline
Aspergillus flavus, *A. fumigatus*, *A. niger*	Adulti e covata	Saprofita/parassita	Covata pietrificata
Nosema apis, *N. ceranae*	Adulti (intestino)	Parassita obbligato	Nosemiasi
Torulopsis spp.	Adulti (intestino)	Patogeni occasionali	
Fungo non identificato	Ape regina (organi riproduttori)	Patogeni occasionali	Melanosi api regine
Miceti vari	Alveare	Saprofiti, patogeni occasionali	

MALATTIE DA VIRUS

(MATTIA CECCHINATO - GIOVANNI FRANZO)

Prelievo e trasporto di campioni diagnostici

La scelta del materiale adatto dipende dalla malattia e dalle specie virali sospette. Il campionamento dovrebbe generalmente essere fatto il prima possibile nel ciclo dell'infezione poiché la replicazione virale precede i sintomi clinici, mentre molte volte quando l'animale è oggetto di campionamento è già in fase sintomatica. In genere infatti l'eliminazione virale è molto elevata tra la fine del periodo di incubazione e i primi giorni del decorso clinico.

I campioni destinati all'isolamento virale devono essere prelevati in condizioni il più possibile sterili per evitare contaminazioni e la possibile crescita di microrganismi, come per esempio batteri, che potrebbero inficiare l'isolamento stesso. Deve inoltre essere prelevata una quantità idonea di materiale da esaminare poiché il titolo virale nel materiale diagnostico è quasi sempre piuttosto basso. Il trasporto del campione al laboratorio deve essere il più rapido possibile in quanto l'emivita dei virus al di fuori del corpo animale è spesso molto breve e condizioni di refrigerazione permettono di mantenere i virus vitali per tempi più lunghi. Se si prevede un invio del campione in tempi brevi (qualche ora), lo si può mantenere a temperatura di +4°C sino all'arrivo in laboratorio; altrimenti, se il tempo previsto è maggiore, allora si consiglia di congelare rapidamente il materiale e mantenerlo a temperature comprese tra -20 e -70°C (e.g. utilizzando per il trasporto ghiaccio secco) sino al momento dell'esecuzione delle prove. Inoltre, per una migliore conservazione dei campioni vengono spesso usati terreni di trasporto che contengono normalmente sostante antibiotiche e antimicotici e sono maggiormente utilizzati per evitare che il materiale diagnostico si disidrati e per evitare una proliferazione batterica. Un particolare mezzo di trasporto dovrebbe essere selezionato dopo aver consultato il laboratorio per assicurarsi che il supporto sia compatibile con le metodiche diagnostiche impiegate. Se invece i campioni sono destinati ad indagini molecolari non serve utilizzare terreni di trasporto e nemmeno temperature di congelamento. Lo stesso vale per campioni destinati ad indagini istopatologiche che prevedono l'invio di campioni in formalina (10%) tamponata e a temperatura di refrigerazione per non alterare l'architettura dei tessuti.

Per la raccolta, il trasporto, l'archiviazione e l'isolamento di acidi nucleici a temperatura ambiente esistono in commercio le FTA® Card. Queste contengono prodotti chimici che causano la lisi delle cellule, la denaturazione delle proteine e proteggono gli acidi nucleici da nucleasi, ossidazione e danni da UV. Le cartine inattivano rapidamente gli organismi, compresi gli agenti patogeni del sangue, e prevengono la crescita di batteri e altri microrganismi rendendole particolarmente utili per diagnosi molecolare di infezioni virali, soprattutto se si vuole inviare i campioni a lunga distanza senza la necessità di mantenimento di una catena fredda o norme di sicurezza rispetto alla spedizione di reagenti pericolosi.
Al fine di massimizzare l' efficienza diagnostica e permettere una corretta interpretazione dei risultati, è necessario fornire al laboratorio sufficienti informazioni anamnestiche, sul decorso e sullo stadio della malattia, sulle eventuali vaccinazioni effettuate, etc., sul sospetto diagnostico in modo da indirizzare la procedura diagnostica verso la ricerca specifica di alcuni virus.

Prima di inoculare il substrato, il campione può essere addizionato ad antibiotici, centrifugato e/o filtrato (utilizzando appositi filtri di porosità di 0.22 o 0.45 μm) per eliminare\ridurre gli eventuali batteri presenti. Tutte queste manipolazioni comportano ovviamente il rischio di perdita di virus e quindi riduzione della sensibilità del *test*.

Diagnosi di una malattia virale

Diversi metodi vengono utilizzati per studiare i virus e diagnosticare una malattia virale e questi sono in costante cambiamento dovuto alla scoperta e introduzione di nuove metodiche e tecnologie che rendono più veloce il responso diagnostico.

Questa sezione fornirà una panoramica sommaria delle tecniche più comunemente usate nella virologia diagnostica e concluderà con una breve panoramica sulle nuove tecnologie applicate principalmente all'ambito della ricerca.

La virologia diagnostica riguarda l'identificazione del virus associato a segni e sintomi clinici. Le procedure più comunemente utilizzate includono:

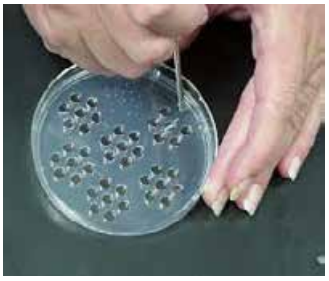
1. Rilevazione di una risposta immunitaria significativa al virus (anticorpo o cellulo-mediata) mediante analisi immunologica;
2. Identificazione del virus mediante utilizzo di anticorpi, colorazione di campioni o sezioni di tessuto (microscopia ottica ed elettronica);
3. Isolamento e identificazione virale (colture cellulari o uova embrionate);
4. Rilevamento dell'acido nucleico virale (metodiche biomolecolari).

1. Rilevazione della risposta immunitaria

Tali metodiche diagnostiche vengono utilizzate qualora sia difficile identificare un virus in relazione alla malattia osservata, quando si esegue uno studio retrospettivo su una popolazione per determinarne l'esposizione a un patogeno, o per misurare la risposta di un individuo o una popolazione animale ad un vaccino. In questi casi sono necessari metodi indiretti, come la misurazione della risposta anticorpale al virus di interesse. Nel corso del tempo sono state validate diverse metodiche, ma quelle maggiormente utilizzate sono:

- **Agar-*gel* imunodiffusione (AGID);**
- **Virus neutralizzazione (VN);**
- **Inibizione dell'emo-agglutinazione (HI);**
- ***Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA);**
- **Immunofluorescenza indiretta (IFI);**
- **Fissazione del complemento (FC).**

• *Agar-gel immunodiffusione (AGID)*



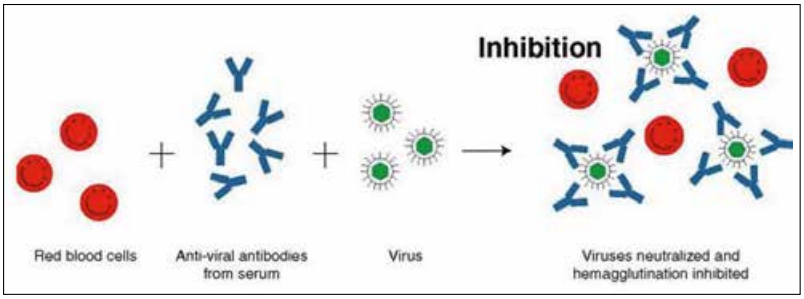
I principi alla base di questi *test* sono fondamentalmente gli stessi, in quanto si basano sulla rilevazione dell' interazione anticorpo-antigene. Per la loro esecuzione si rendono quindi necessari un virus noto o una proteina virale, un campione dell'animale (di solito il siero) e un indicatore. Se gli anticorpi sono presenti nel siero del paziente, si legheranno al virus. Se non sono presenti anticorpi, non si verificherà alcun legame. Tale legame viene rilevato ed evidenziato con mezzi- indicatore differenti a seconda dello specifico *test*, che permettono di determinare se il campione è positivo o negativo per la presenza di anticorpi e, in di questi sistemi, è possibile anche una quantificazione della risposta immunitaria. Quest'ultima risulta molto utile per valutare l'efficacia della vaccinazione effettuata o per discriminare, sulla base del titolo, tra una risposta anticorpale vaccinale e una indotta da virus di campo, solitamente caratterizzata da titoli maggiori rispetto a quelli sviluppati a seguito di vaccinazione.

Per il medesimo scopo sarebbe opportuno prelevare due campioni di siero: il primo il più rapidamente possibile dopo la comparsa dei sintomi e il secondo dopo 2-4 settimane. La comparsa di anticorpi specifici o un rialzo del titolo anticorpale di almeno 4 volte fra i due campioni vengono sempre considerati indicatori di infezione recente. Allo stesso modo la presenza di IgM specifiche è sintomo di infezione recente, in quanto tali anticorpi compaiono precocemente e altrettanto precocemente scendono a livelli non rilevabili.

• *Virus neutralizzazione (VN)*

Nel *test* il campione di interesse viene incubato con il virus-bersaglio e si valutano eventuali cambiamenti morfologici nella coltura cellulare (detto *effetto citopatico*, CPE). Se il campione in esame contiene anticorpi neutralizzanti, impedirà al virus di crescere nella coltura cellulare e non verrà osservato alcun CPE. Se nel campione non sono presenti anticorpi, il virus crescerà e verrà osservato il CPE. Tale *test* risulta essere assai laborioso, ma ha come vantaggio una elevata sensibilità e spesso anche una elevata specificità.

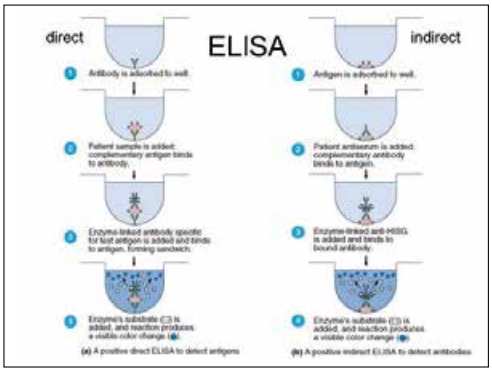
• *Inibizione dell'emo-agglutinazione (HI)*



Alcuni virus hanno una proteina sulla loro superficie che interagisce con i globuli rossi ed è in grado di legarsi a questi. Questa proprietà è chiamata emo-agglutinazione in quanto il legame di singoli virus a diversi globuli rossi ne determina l'aggregazione. L'inibizione o il blocco di questa attività è alla base del *test* di inibizione dell'emo-agglutinazione (HI). Il virus più noto con questa proprietà è il *virus dell'influenza*. Il campione di siero in esame viene incubato con il virus di interesse a cui viene successivamente aggiunta una sospensione di globuli rossi. Se sono presenti anticorpi specifici per quel virus, l'attività di emo-agglutinazione sarà inibita; se non sono presenti anticorpi nel siero in esame, il virus si legherà ai globuli rossi e sarà visibile l'agglutinazione sul fondo di pozzetti in apposite piastre o provette sotto forma di un sottile strato granulare, a margini irregolari, che ricopre tutto il fondo.

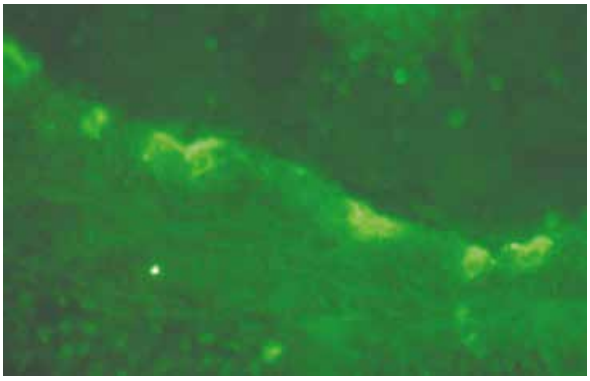
• *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

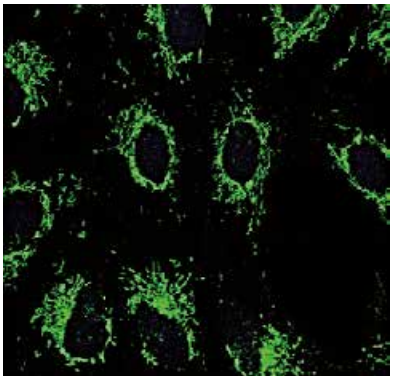
Il *test* ELISA è una tecnica molto utilizzata grazie alla facilità d'uso (esistono diversi *kit* commerciali per diverse malattie virali), al basso costo e alla possibilità di automatizzare tale *test* diagnostico, permettendo l'analisi di un gran numero di campioni in poco tempo. Se nel campione in esame sono presenti anticorpi specifici, questi si legano all'antigene presente nella provetta o nel pozzetto della piastra. Successivamente viene applicato un anticorpo anti-anticorpo (marcato con un enzima) e viene aggiunto un indicatore di colore. Se si è formato il complesso antigene/anticorpo/anti-anticorpo marcato si osserverà un cambiamento di colore che verrà misurata allo spettrofotometro. La presenza di colore indica la presenza di anticorpi. Inoltre, la diversa intensità misurata spettrofotometricamente permette di ottenere anche una titolazione degli anticorpi specifici.



• *Immunofluorescenza indiretta (IFI)*

Questa tecnica permette di mettere in evidenza una reazione fra un antigene noto, fissato su vetrino, e gli anticorpi dopo aggiunta di un antisiero anti-immunoglobuline della specie da cui proviene il siero in esame, marcato con un fluorocromo (fluoresceina o rodamina), ovvero un colorante che, assorbendo onde ad alta frequenza (ultravioletti), emette fluorescenza. L'avvenuto legame antigene-anticorpo è possibile tramite osservazione con un microscopio a luce ultravioletta.

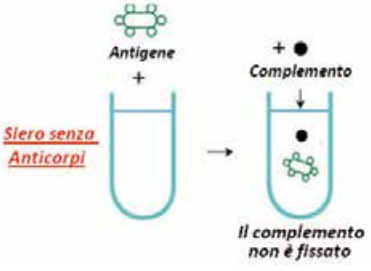




Nella foto sopra: Immunofluorescenza indiretta positiva per *Metapneumovirus* aviare su sezioni criostatiche di trachea; nella foto a lato: Immunofluorescenza citoplasmatica in colture di leucociti di suino (a 24 ore dall'infezione sperimentale con virus PSA)

• *Fissazione del complemento (FDC)*

Questa reazione immunologica sfrutta la capacità del complemento (una serie di proteine presenti nel sangue dei mammiferi) di attivarsi qualora vi sia una reazione antigene-anticorpo. In presenza di anticorpi, questi andranno a legarsi all'antigene, "consumando" il complemento che non sarà in grado di lisare i globuli rossi successivamente aggiunti. Nel caso in cui non vi siano anticorpi specifici per l'antigene noto, il complemento rimarrà libero di legarsi ai globuli rossi provocandone



la lisi e la liberazione di emoglobina. Per eseguire il *test* è indispensabile rimuovere il complemento dal siero in esame attraverso una inattivazione termica detta "scomplementazione" (il complemento è un fattore labile che viene distrutto tramite trattamento termico alla temperatura di +56°C per 30 minuti).

2. Identificazione del virus mediante utilizzo di anticorpi, colorazione di campioni o sezioni di tessuto (microscopia ottica ed elettronica)

La stragrande maggioranza dei virus, a differenza dei batteri, sono troppo piccoli per essere visti con un microscopio ottico *standard*. Pertanto, vengono utilizzati anticorpi marcati con un indicatore, più frequentemente perossidasi o fluoresceina\rodamina, per identificare il virus d'interesse. Questi indicatori permettono la visualizzazione di *cluster* di virus (poiché un singolo virus produce un segnale troppo debole per essere rilevato) mediante un microscopio ottico nel caso di perossidasi, o un microscopio a luce ultravioletta (UV) nel caso di utilizzo di un marcatore fluorescente. Le tecniche maggiormente utilizzate su cellule e sezioni di tessuto sono *l' immuno-perossidasi e l'immunofluorescenza*. Inoltre, un ulteriore vantaggio di queste tecniche è che, utilizzando preparati istologici, è possibile evidenziare le lesioni causate dall'infezione che, in alcuni casi, risultano particolarmente caratteristiche quali la presenza di corpi del Negri nelle cellule dell' ippocampo tipiche della *rabbia* o la presenza di corpi inclusi caratteristici in animali dopo infezione da *virus erpetici* (inclusioni intranucleari eosinofiliche) o da *Poxvirus* (inclusioni presenti a livello del citoplasma).

Inoltre, possono essere ricercati oltre che in tessuti anche in altri matrici biologiche (es. siero, feci, etc.) antigeni virali mediante l'utilizzo di **sieri policlonali o anticorpi monoclonali specifici** per proteine strutturali o non strutturali del virus. Il vantaggio di tali metodiche è che possono essere messi in evidenza antigeni virali indipendentemente dal fatto che i virus siano ancora vivi e in fase di replicazione ma ovviamente bisogna avere un sospetto eziologico in quanto si possono accertare solo un numero limitato di ipotesi diagnostiche. Tra questi *test* il più utilizzato è l'ELISA per la facilità di esecuzione e i tempi ristretti di diagnosi.

Un altro modo per identificare un virus è mediante l'uso di un microscopio elettronico. Poiché, come già detto, i virus sono molto più piccoli dei batteri, un normale microscopio ottico non fornisce un ingrandimento sufficiente per vederli.
L' ingrandimento che si riesce ad ottenere con un microscopio elettronico (1.000.000 X, risoluzione 0,5 nm) fornisce la capacità di vedere le particelle virali. Il maggior limite di questo metodo è la mancanza di sensibilità: è necessaria una concentrazione di circa 10^6 particelle virali per millilitro di campione in esame al fine di identificare il virus di interesse. Tuttavia, la sensibilità di questa tecnica può essere aumentata mediante l'utilizzo di anticorpi specifici antivirali, che una volta legati ai virus formano aggregati facilmente identificabili (immuno-elettro-microscopia). Tali metodiche risultano però sempre meno utilizzate in quanto la diagnostica virologica si avvale dei progressi delle metodologie molecolari, tecniche che, come vedremo più avanti, sono molto rapide, sensibili e specifiche e richiedono apparecchiature relativamente economiche.

3. Isolamento e identificazione virale

A differenza dei batteri, molti dei quali possono essere coltivati su substrati nutritivi artificiali, i virus, essendo parassiti intracellulari obbligati, richiedono una cellula ospite vitale per la replicazione e quindi possono moltiplicarsi solo in colture cellulari *in vitro*, in uova embrionate di pollo o di altri volatili e animali. L'isolamento e la moltiplicazione di virus animali è importante per: 1) identificare e quindi fare diagnosi di virus patogeni nei campioni clinici; 2) produrre vaccini e 3) effettuare studi di ricerca di base.

Tabella riassuntiva di alcuni fra i principali virus degli animali

Genere	Virus	Ospite	Lesioni/malattie
Aviadenovirus	Fowl aviadenovirus A-E	Volatili	Epatite, infezioni respiratorie
Varicellovirus	Bovine herpesvirus 1 (BoHV1)	Bovino	Rinotracheite infettiva, aborto; vulvovaginite e balonopostite pustolosa
	Canid herpesvirus 1 (CaHV1)	Cane	Malattia emorragica fatale del cucciolo; malattia respiratoria (tosse dei canili)
	Equid herpesvirus 1 (EHV1)	Cavallo	Aborto, malattia respiratoria, encefalomielite
	Equid herpesvirus 3 (EHV3)	Cavallo	Esantema coitale maligno
	Felid herpesvirus 1 (FeHV1)	Gatto	Rinotracheite infettiva
	Suid herpesvirus 1 (SuHV1)	Suino, ospiti secondari	Malattia di Aujeszky, Pseudorabbia
Iltovirus	Gallid herpesvirus 1 (GaHV1)	Pollo	Laringotracheite infettiva
Mardivirus	Gallid herpesvirus 1 (GaHV1)	Pollo	Malattia di Marek
Macavirus	Ovine herpesvirus 2 (OvHV2)	Ovino	Febbre catarrale maligna
Salmonivirus	Salmonid herpesvirus 1,2 e 3 (SalHV1-2-3)	Salmonidi	Tumori cutanei, necrosi focale parenchimatosa, mortalità
Deltapapillomavirus	Deltapapillomavirus 4	Bovino, cavallo	Fibropapilloma cutaneo, sarcoide equino, tumore della vescica del bovino
Circovirus	Porcine circovirus 2 (PCV 2)	Suino	PCV2 complex
Aquabirnavirus	Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)	Salmoni	Petecchie emorragiche nei visceri addominali e necrosi del pancreas
Avibirnavirus	Infectious bursal disease virus (IBDV)	Pollo	Bursite infettiva (malattia di Gumboro)
Orbivirus	Blue tongue virus (BTV)	Ruminanti domestici e selvatici	Febbre catarrale dei piccoli ruminanti
Rotavirus	Rotavirus A-I	Vertebrati (felini, bovini, primati, suini, conigli, roditori, tacchini)	Gastroenterite, diarrea
Arterivirus	Equine arteritis virus (EAV)	Equidi	Arterite virale
	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)	Suidi	Sindrome riproduttivo-respiratoria del suino
Lagovirus	Rabbit hemorragic disease virus (RHDV)	Lagomorfi	Epatite
Vesivirus	Feline calicivirus (FCV)	Gatto	Ulcere orali/malattia respiratoria
	Vesicular exanthema of swine virus (VESV)	Suino, mammiferi marini	Lesioni vescicolari
Alphacoronavirus	Alphacoronavirus 1 (FCoV, CCoV, TGEV, PRCoV)	Gatto, cane, suino	Enteriti e peritoniti nel gatto; enterite nel cane; gastroenterite trasmissibile del suino
	Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)	Suino	Enterite

Genere	Virus	Ospite	Lesioni/malattie
Betacoronavirus	Betacoronavirus 1 (BCoV, ECoV, PCoV, CRCoV)	Bovino, equino, suino, cane	Enteriti, sintomi respiratori
Gammacorona-virus	Avian coronavirus	Uccelli	Bronchite infettiva aviare
Flavivirus	Tick borne encephalitis virus (TBEV)	Ruminanti, roditori (uomo)	Encefalite
	West Nile virus (WNV)	Equini, volatili (uomo)	Meningoencefalite nel cavallo; mortalità nei volatili
Pestivirus	Bovine viral diarrhea 1 e 2 (BVDV1-2)	Bovino, capra, pecora	Diarrea virale bovina/malattia delle mucose
	Border disease virus (BDV)	Pecora, capra, bovino	Malattia simile alla diarrea virale bovina
	Classical swine fever virus (CSFV)	Suino	Peste suina classica
Aphthovirus	Foot-and-mouth disease virus (FMDV-O)	Bovino, pecora, capra, suino domestico e selvatico; svariati ruminanti selvatici, ratto, nutria, orso, capibara, armadillo	Afta epizootica (lesioni vescicolari)
Mamastrovirus	Schmallemberg virus	Bovino, pecora	Malattia congenita, malformazioni, artrogrifosi
Influenza A	Influenza A virus	Uomo, suino, volatile, cavallo	Influenza
Respirivirus	Bovine parainfluenza virus 3 (BPIV-3)	Bovino, pecora, uomo, primati, cane, gatto, roditori	Malattia respiratoria in bovini e pecore
Avulavirus	Avian paramixovirus 1 (APMV-1)	Volatili domestici e selvatici	Malattia di Newcastle
Morbillivirus	Canine distemper virus (CDV)	Canidi, procionidi, mustelidi	Cimurro
Orthopneumo-rirus	Bovine respiratory syncytial virus (BRSV)	Bovino, pecora	Malattia respiratoria
Lyssavirus	Rabies lyssavirus (RABV)	Tutte le specie di mammiferi terrestri sono suscettibili, alcune fungono da serbatoio (volpe, cane, procione, pipistrelli)	Rabbia
Gammaretrovirus	Feline leukemia virus (FeLV)	Gatto	Leucemia felina
Deltaretrovirus	Bovine leukosis virus (BLV)	Bovino	Leucosi bovina enzootica
Lentivirus	Small ruminant lentivirus	Pecora e capra	Maedi-Visna, artrite, encefalite caprina
	Equine infectious anemia virus (EIAV)	Cavallo	Anemia infettiva equina
	Feline immunodeficiency virus (FIV)	Gatto	Immunodeficienza felina

• *Colture cellulari*

Le colture cellulari rappresentano attualmente il più importante substrato a disposizione per l' isolamento, la propagazione e l' identificazione dei virus animali e umani. Gli studi moderni hanno portato a multiple possibilità di scelta per le colture cellulari, garantendo in linea teorica la possibilità di coltivare molti virus esistenti inclusi quelli con tropismo molto stretto e particolarmente esigenti. Le tipologie di coltura sono molto varie: esistono colture di tessuto o d'organo, espianti di tessuto o di frammenti di organo, le cui cellule mantengono l'architettura e la funzionalità originarie per periodi limitati di tempo. Tra queste ricordiamo le *organo-colture di anelli tracheali di embrioni di pollo* che risultano essere il substrato di elezione per alcuni virus quali il *Metapneumovirus* aviare, responsabile di una infezione respiratoria principalmente nei tacchini e in altre specie di volatili.

Preparazione delle organo-culture di anelli tracheali di embrioni di pollo. Le trachee vengono tagliate utilizzando un sezionatore di tessuti per colture d'organo, ottenendo sezioni trasversali di circa 500 μm

Organo-coltura di anelli tracheali di embrioni di pollo in provetta pronta per essere letta al microscopio ottico rovesciato

Le colture cellulari sono invece ottenute da sospensioni cellulari allestite disgregando meccanicamente o chimicamente i tessuti e che quindi non mantengono l'originaria architettura tissutale.

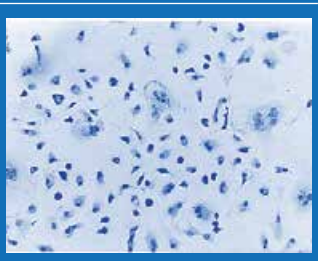
Tra queste se ne possono distinguere tre tipi: le **colture cellulari primarie** sono quelle ottenute direttamente per dissociazione delle cellule di un organo (solitamente rene o fegato) o tessuto, preferibilmente prelevati da un animale molto giovane o un embrione\feto. Queste cellule possono essere mantenute in coltura solo per un breve periodo di tempo e il numero di passaggi che si può effettuare è in genere limitato (tipicamente inferiore a 20) dopo di che le cellule degenerano e muoiono. Esistono poi **linee cellulari diploidi o semi-continue** che possono essere mantenute in vita, conservando caratteristiche simili a quelle naturali, per almeno 70 passaggi senza perdere il loro patrimonio genetico diploide come i fibroblasti di embrioni umani.
Infine, le **linee cellulari continue**, sia derivate da cellule normali, come ad esempio la linea cellulare VERO derivata da cellule renali di scimmia verde Africana sia (la maggior parte) da tessuti cancerosi di molte specie animali e dell'uomo (es. le cellule HeLa derivanti dall'adenocarcinoma cervicale) sono spesso in grado di essere sub-coltivate molte volte o addirittura cresciute indefinitamente (nel qual caso vengono chiamate "immortali").

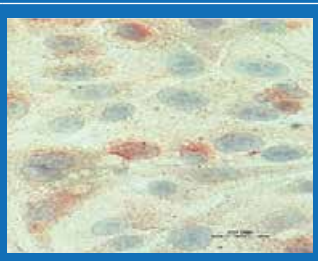
Queste linee cellulari sono coltivate in tubi di vetro o di plastica o in *flask,* usando mezzi di coltura cellulare appositamente formulati che contengono normalmente piccole quantità di siero e antibiotici per ridurre eventuali contaminazioni batteriche. Inoltre, molto spesso viene

incluso nel terreno di coltura un indicatore per monitorare gli eventuali cambiamenti di pH durante l'incubazione. Le cellule aderiscono alla superficie delle provette o delle *flask* e producono un singolo strato di crescita confluente, noto come *monostrato cellulare*. Alcune linee continue possono crescere anche in sospensione in quanto sono meno dipendenti dall'ancoraggio, consentendo di ottenere una maggiore densità cellulare.

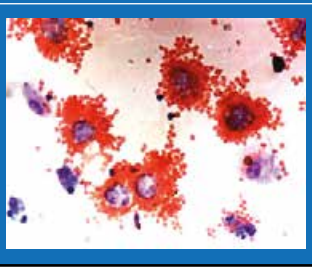
Importanza delle colture cellulari in virologia

Come ricordato, l'isolamento dei virus su cellule si basa essenzialmente su due tipi di colture: **primarie** e **stabilizzate**. In veterinaria nel primo caso sono benemerite, tra le altre, quelle di fibroblasti di pollo e di leucociti di suino; nel secondo caso si tratta spesso di colture cellulari selezionate a partire da rene di suino (*porcine kidney*) contrassegnate con le iniziali PK ed un numero dato in laboratorio (PK-2a, PK-13, PK-15, ecc), oppure con altre sigle (CP, F, ecc). Hanno lunga durata se trapiantate con una certa frequenza e se il terreno viene periodicamente rinnovato. Esigono terreni complessi arricchiti con siero





Nelle foto sopra sono raffigurate: una coltura primaria di leucociti di suino e una coltura stabilizzata di rene di suino PK-15.



Il *test* di Malmquist
La specificità della prova di **emoadsorbimento** è stata provata da Drager (1965) infettando colture di leucociti di suino con ceppi di virus della Peste Suina Classica senza ottenere il fenomeno che avviene nella **Peste Suina Africana** (PSA, nella foto al microscopio).

La capacità di un virus di infettare una particolare linea cellulare dipende dalla presenza di specifici siti recettori sulla membrana cellulare a cui il virus si può attaccare. La presenza o l'assenza di determinati siti recettori sulla superficie della membrana cellulare determina la suscettibilità o la sensibilità di quella particolare linea cellulare all'infezione virale.

Una volta che un virus infetta un monostrato cellulare può indurre alcuni cambiamenti morfologici nell'aspetto tipico delle cellule, un fenomeno noto come ***effetto citopatico*** (CPE). Alcuni tipi di CPE causati da diversi virus includono arrotondamento e rigonfiamento cellulare generalizzato, formazione di sincizi (fusione di cellule con formazione di cellule giganti multinucleate che possono contenere sino a un centinaio di nuclei) e formazione di placche (lisi di cellule). È importante sottolineare che il tipo di linea cellulare infettata e il CPE sono estremamente utili nel fornire indizi riguardanti l'identità del particolare virus isolato. Il CPE può richiedere da 1 a 25 giorni per svilupparsi, a seconda della specie virale e a volte del singolo ceppo.

Alcuni gruppi di virus, come i virus dell'influenza e della parainfluenza, non sono in grado di produrre CPE quando infettano le colture cellulari, e quindi i monostrati cellulari infettati appaiono morfologicamente normali.
Sia in presenza di CPE che in sua assenza è necessario confermare l'isolamento mediante diverse tecniche come l'immunofluorescenza, l'emo-agglutinazione, la microscopia elettronica o l'evidenziazione dell'antigene virale (es. ELISA) o del genoma virale (PCR o *real-time PCR*).

Uova embrionate

Uova embrionate di pollo SPF che verranno inoculate per isolamento virale

Uova fertili di pollo o di altri volatili vengono utilizzate per l'isolamento di diversi virus incluso il virus influenzale di tipo A. Infatti, diversi importanti agenti patogeni si riproducono con maggior successo in uova rispetto alle colture cellulari.

L'utilizzo di tale substrato porta molti vantaggi, quali la rapida replicazione virale, un ambiente intrinsecamente asettico e la non necessità di preparare il substrato come invece avviene per le colture cellulari. Le uova che vengono utilizzate devono provenire da riproduttori *Specific Pathogen Free* (SPF) provenienti da allevamenti indenni da malattie virali e anche da altre malattie specifiche (es. micoplasmosi). Prima dell'inoculazione del campione in esame in uova embrionate bisogna assicurarsi (mediante speratura) che le uova siano vitali e abbiano vasi sanguigni ben visibili e la camera d'aria e l'embrione siano opportunamente sviluppati. A seconda del virus sospettato, possono essere utilizzati diversi siti di inoculazione. Questi includono la cavità allantoidea, la cavità amniotica, la membrana corion-allantoidea (CAM) e il sacco vitellino. Evidenze di crescita virale possono essere osservate sulla membrana corion-allantoidea come lesioni macroscopiche circoscritte (pustole chiamate *pocks*) e possono essere causate da *Poxvirus*, *virus erpetici* e dal virus del *cimurro del cane*. Altri possibili effetti della crescita virale sono alterazioni e mortalità embrionale, con lesioni agli organi interni o presenza di emorragie diffuse. Alcuni virus meno patogeni o presenti a titoli non elevati possono crescere in uova SPF senza dare effetti evidenti. In ogni caso, la conferma di isolamento virale e la caratterizzazione del ceppo eventualmente isolato devono essere effettuate come già descritto in precedenza con altri metodi quali l'immunofluorescenza, l'emo-agglutinazione, la microscopia elettronica o l'evidenziazione dell'antigene virale (es. ELISA) o del genoma virale (*PCR o real-time PCR*)

Inoculazione delle uova embrionate di pollo (da https://slideplayer.it)

Alcuni tipi di lesioni da infezione virale in uova embrionate

Mortalità embrionale e presenza di emorragie a seguito della moltiplicazione del virus della **Malattia di Newcastle** in uova embrionate di pollo.

Lesioni embrionali causate dal Virus della **Bronchite Infettiva Aviare**.

A sinistra: accartocciamento dell'embrione (due embrioni a colpiti; il controllo è a destra)

A destra: nanismo (embrioni piccoli sulla destra; evidente la differenza con i controlli sulla destra)

(Si ringrazia il Prof. Catelli dell'Università di Bologna per le foto gentilmente fornite)

A sinistra: lesioni renali con presenza di depositi di urati in un embrione causate dal virus della **Bronchite Infettiva Aviare**.

A destra: placche opache con aree di necrosi centrale sulla membrana corionallantoidea a seguito di inoculazione in uova SPF di un **Herpesvirus** responsabile della **laringotracheite infettiva**.

4. Rilevamento dell'acido nucleico virale (metodiche biomolecolari)

L'invenzione della PCR nella metà degli anni '80 ha gettato le basi per una svolta nel mondo della diagnostica virologica. L'idea alla base di questa tecnologia è estremamente semplice e consiste sostanzialmente nell'emulare *in vitro* i fenomeni di replicazione del materiale genetico che avvengono *in vivo*.

Per questo fine viene sfruttata una coppia di *primer* (brevi sequenze di DNA a singolo filamento di circa 20 nucleotidi), definiti senso e anti-senso, disegnati per legarsi a delle specifiche sequenze del DNA *target* su entrambi i filamenti che lo compongono. Questi oligonucleotidi verranno successivamente sfruttati come "innesco" per la produzione di un nuovo filamento di DNA complementare da parte di particolari DNA-polimerasi. L'amplificato ottenuto servirà a sua volta da stampo per l'ibridazione da parte del *primer* di senso opposto e la successiva replicazione.

Nota tecnica

In estrema sintesi, la PCR si fonda sulla ripetizione ciclica di variazioni termiche implicate nel determinare la diversa interazione fra i diversi costituenti della reazione. Ciascun ciclo si compone essenzialmente di tre fasi: (I) fase di *MELTING* o *DENATURATION*, in cui l'aumento della temperatura determina la dissociazione dei filamenti di DNA; (II) fase di *ANNEALING*, in cui la temperatura viene diminuita permettendo ai *primer* di legarsi al *single-strand* DNA; (III) la fase di *EXTENSION* o *ELONGATION*, in cui la DNA-polimerasi sintetizza il filamento di DNA complementare.

Apparecchio per elettroforesi

Questo processo, ripetuto un dato numero di volte, solitamente 35-40, determina un incremento, teoricamente esponenziale, del numero di copie (*ampliconi*) della regione di DNA-*target* compresa fra i due *primer*. Al fine di visualizzare l' avvenuta reazione, e quindi la positività del campione, si ricorre generalmente ad una corsa elettroforetica, in cui il prodotto di PCR viene inserito in un *gel* (solitamente di agarosio o acrilamide) e sottoposto ad una differenza di potenziale elettrico. In funzione della carica negativa del DNA, questo tenderà a migrare verso il polo positivo, ad una velocità inversamente proporzionale alle dimensioni dell'amplificato, formando cosi delle bande che potranno essere rese visibili con opportune colorazioni (e.g. agenti intercalanti, colorazione argentica, ecc). Il confronto con *marker* di peso molecolare, ossia tratti di DNA a lunghezza nota, permette di stimare le dimensioni dell'amplificato e quindi di verificare che questo corrisponda alle aspettative, valutando in questo modo la specificità della reazione.

Thermo-cycler

Le metodiche di amplificazione degli acidi nucleici hanno largamente soppiantato i *test* diagnostici tradizionali basati sul fenotipo. Microscopia, cultura dei patogeni, metodiche di rilevamento dell'antigene e sierologia sono spesso limitate da scarsa sensibilità o specificità, necessità di avere a disposizione microrganismi vivi e vitali in elevate quantità, difficoltà nel loro isolamento e coltura, lunghi tempi di esecuzione, costi elevati ed altro ancora.

Al contrario, la PCR risulta essere un metodo generalmente altamente sensibile e specifico, oltre che rapido e relativamente poco costoso. Inoltre risulta facilmente scalabile e automatizzabile, permettendo l'analisi di grandi numeri di campioni.

I prodotti di PCR rappresentano inoltre il punto di partenza per una serie di altre tecniche, quali clonaggio, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RLFP) e soprattutto sequenziamento, che permettono una più fine caratterizzazione dei microrganismi.

L'analisi del patrimonio genetico può infatti fornire utili informazioni inerenti al fenotipo, quali fattori di virulenza e di resistenza, oltre a permettere una più fine tipizzazione dei diversi patogeni e lo studio della loro epidemiologia ed evoluzione.

Un'ulteriore variazione delle metodiche di PCR è rappresentata dalla ***real-time* PCR**. La fondamentale differenza rispetto alle metodiche di PCR classica consiste nella possibilità di rilevare e quantificare i prodotti generati durante lo svolgersi della reazione tramite l'utilizzo di reagenti fluorescenti. Tanto maggiore è la concentrazione iniziale del virus, tanto più precoce sarà la comparsa della fluorescenza. Tramite il confronto con delle curve *standard* generate utilizzando campioni a titolo noto è così possibile stimare i titoli del campione ignoto. Questa informazione può risultare di grande utilità nel valutare il decorso dell' infezione, l'efficacia della terapia, la replicazione dei vaccini vivi attenuati, e, in taluni casi, permette di definire la gravità della malattia.

Paradossalmente, tanto quanto le metodiche di biologia molecolare hanno contribuito allo studio e alla conoscenza dei virus, così i virus hanno involontariamente contribuito allo sviluppo di queste metodiche. Infatti, uno dei principali limiti era rappresentato dalla capacità delle polimerasi utilizzate in PCR di duplicare solamente il DNA. Per superare tale limite sono state "addomesticate" le *reverse-transcriptase* dei retrovirus, al fine di trascrivere le molecole di RNA in DNA, che può quindi essere amplificato in modo tradizionale. Tale innovazione ha permesso l'acquisizione di nuove conoscenze che vanno ben al di là della diagnostica dei virus a RNA, estendendosi, solo per dare un esempio, allo studio dell'espressione genica.
Infine, un metodica che merita una seppur breve menzione è lo sviluppo del *Next Generation Sequencing* (NGS). Questa tecnologia permette il sequenziamento, in parallelo, di una quantità di regioni genomiche e/o di RNA di svariati ordini di magnitudine superiori al tradizionale sequenziamento Sanger. Le applicazioni sono sconfinate ma, focalizzandosi nell'ambito virologico, il NGS ha consentimento un enorme incremento nel sequenziamento di genomi virali completi e soprattutto lo studio delle sotto-popolazioni virali all'interno di un campione. Ciò ha permesso di studiare la straordinaria variabilità intra-ospite di alcuni virus, in particolare di quelli con genoma a RNA, con immediate ripercussioni in ambito epidemiologico e terapeutico. La stessa metodica sta permettendo l'esecuzione di studi metagenomici su vastissima scala, portando all'identificazione di nuove specie virali, sia patogene che non, e ad una migliore comprensione della loro biologia e impatto sull'ecologia globale.

"*L'antropizzazione dell'ambiente tipica di molte specie, attraverso l'intensa urbanizzazione di aree rurali e boschive, vede spesso gli animali intrappolati tra i confini di piccoli e grandi centri. Alcune specie riescono ad adattarsi a questa nuova situazione: la volpe è in grado di costruire tane anche nei parchi urbani; il cinghiale trova facilmente in città importanti quantità di cibo. I gabbiani poi, riescono a sopravvivere in qualunque ambiente*".

La frequenza di malattie infettive trasmesse da animali selvatici è bassa, anche se i focolai di **Peste Suina Africana** hanno in passato – complici i cinghiali – arrecato gravissimi danni agli allevamenti. Senz'altro è più frequente la diffusione di virus tra gli animali d'affezione e l'uomo (o viceversa!). Una conseguenza poco evidente del fenomeno di urbanizzazione dei selvatici sta nella possibile trasmissione di alcune malattie alle specie di allevamento. I volatili selvatici, soprattutto gli **uccelli acquatici** migratori, svolgono un ruolo molto importante quale serbatoio del **botulismo** e dell'**virus influenzale A**. Con ogni probabilità l'introduzione primaria dei virus dell'IA nelle aziende avicole deriva dal contatto diretto o indiretto con volatili selvatici (www.izsvenezie.it).

Si presentano alla porta e non sono animali domestici: esiste anche l'urbanizzazione dei selvatici

Non sempre la comparsa di selvatici sul prato di casa deve metterci in allarme. Anzi, la meraviglia di poter vedere da vicino un'upupa, volatile dallo splendido piumaggio variopinto e dotato di un'inconfondibile cresta a ventaglio, non può che rallegrare.

ZOONOSI VIRALI NEGLI ANIMALI DA COMPAGNIA

(SONIA FLAMINIA LAVAGNOLI)

Il concetto di zoonosi

Malattie ed infezioni che si trasmettono naturalmente dagli animali vertebrati all'uomo e viceversa (O.M.S.)

"Tra la medicina umana e quella animale non vi è alcuna barriera scientifica – né potrebbe esservi. L'esperienza dell'una deve servire allo sviluppo dell'altra".

RUDOLF VIRCHOW, patologo e scienziato tedesco (1821-1902).

Secondo l'ultima rilevazione dell'EURISPES (2019), un terzo degli italiani (33,6%) possiede almeno un animale domestico. Il 17% degli italiani ha un solo animale da compagnia, l'8,1% ne ha due, il 4,7% ne ha tre e il 3,8% dichiara di averne più di tre. Il miglior amico degli italiani resta il cane (40,6%) seguito dal gatto (30,3%) e poi da uccelli (6,7%), pesci (4,9%), tartarughe (4,3%), conigli (2,5%), criceti (2%), animali esotici (2%), equidi (1,7%) e rettili (1,1%).

Sebbene cani e gatti siano ancora gli animali maggiormente presenti nelle nostre case, altri animali d'affezione "non convenzionali", stanno assumendo un ruolo numericamente significativo. Tra questi vi sono conigli, furetti, roditori (cavia, cincillà, scoiattolo, criceto, ratto, topo, gerbillo, cane della prateria), marsupiali (petauro dello zucchero), rettili (serpenti, iguane, tartarughe) e uccelli da voliera (canarini, fringuelli, diamantini, gracule, parrocchetti, pappagalli, cacatuidi).

Possedere un animale domestico può essere di grande beneficio per la salute delle persone. I cani, in particolare, aumentano le opportunità di uscire e socializzare, obbligano i proprietari a effettuare attività fisica, influenzano lo sviluppo sociale, emotivo e cognitivo nei bambini, ma anche il più semplice animale domestico, aiuta a ridurre lo *stress*, a gestire la solitudine e la depressione.

Gli animali da compagnia condividono strettamente l'ambiente domestico con gli esseri umani (oltre il 50% viene accolto nel "lettone") e possono agire da fonti e sentinelle di un ampio spettro di infezioni zoonosiche anche quando l'animale sembra sano.

Tra le zoonosi, quelle di origine virale destano le maggiori preoccupazioni, soprattutto per il rischio di malattie endemiche. In realtà, gli animali di allevamento e la fauna selvatica rappresentano le fonti primarie delle zoonosi virali e se, come nel caso dell'influenza, spesso sono i proprietari che contagiano i propri animali (zoonosi inversa), per altre malattie la probabilità d'infezione per l'uomo è davvero rara (rabbia) o inesistente (*West Nile Disease*).

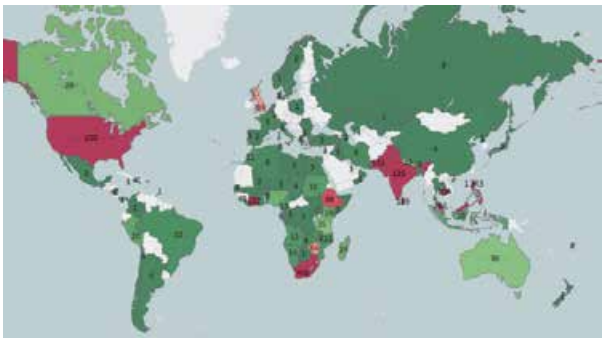
Zoonosi virali trasmesse da cani, gatti e furetti

Rabbia

Rappresenta la più conosciuta e temuta tra le zoonosi virali. Trasmessa dalla saliva degli animali infetti attraverso il morso o la lambitura su cute non integra, la malattia è un'encefalomielite associata a manifestazioni di tipo eccitativo (rabbia furiosa) e/o depressivo (rabbia muta), con un tasso di mortalità del 100%, sia per gli animali che per l'uomo.

Ogni anno causa la morte di circa 60.000 persone (perlopiù in Asia e Africa), il 30-50% rappresentato da bambini e ragazzi di età inferiore ai 15 anni. In Italia, al contrario, l'ultimo

caso di rabbia umana è stato descritto nel 1996 e anche in Europa i casi di rabbia umana sono rarissimi: un caso è stato segnalato nel 2017 e un altro nel 2016, entrambi in Francia, altri tre casi sono stati descritti nel 2014 e un altro nel 2013. In tutti questi casi i soggetti si sono infettati al di fuori dell'UE (Sri Lanka, Pakistan, Haiti, India, Mali e Marocco). La rabbia tuttavia persiste a livello silvestre ed è stata rilevata nelle volpi (Polonia, Romania, Ungheria e Serbia) e nei pipistrelli (Belgio, Germania, Paesi Bassi, Polonia, Regno Unito, Svizzera) (EFSA & ECDC, 2018).



Influenza

I virus influenzali tipici dei cani (H3N8 e H3N2) sono in grado di provocare malattia solo nei cani e nessuna infezione umana con l'influenza canina è mai stata segnalata.

Cani, gatti e furetti sono sensibili al virus dell'influenza aviaria e umana e la acquisiscono per contatto diretto con gli animali infetti, per ingestione di carne cruda infetta (volatili selvatici morti) e attraverso superfici contaminate. Gli animali, una volta infetti, possono diffondere l'influenza nell'ambito della propria specie (Chomel, 2014).

Tuttavia, il ruolo di cani, gatti e furetti nella trasmissione dell'infezione umana sembra essere assai limitato e, al contrario, alcuni studi scientifici suggeriscono che non sia raro che proprio le persone siano le reali fonti dell'influenza che colpisce i propri animali (Messenger *et al*., 2014).

Infezione da Cowpox virus

Zoonosi emergente sostenuta da un *Poxvirus* che colpisce diverse specie di animali tra cui bovini, gatti (raramente i cani), animali dei giardini zoologici e roditori, che rappresentano i *réservoir* del virus.

Il gatto s'infetta normalmente per contatto con i roditori selvatici (morsi, graffi o ingestione) e mostra multiple lesioni cutanee, ulcerose e pruriginose, principalmente sulla testa, sulle orecchie e sulle zampe. Sono riportati anche casi di polmonite necrotizzante.

L'uomo si contagia prevalentemente tramite il contatto con gatti, ratti domestici (*fancy rats*) e animali esotici e manifesta la comparsa di lesioni dolorose (vescicole, pustole, ulcere), soprattutto a livello delle mani e del volto, talvolta associate a linfoadenite e a sintomi influenzali. Sebbene la malattia nell'uomo sia considerata auto-limitante (guarisce in 6-8 settimane), i pazienti immunodepressi possono sviluppare una malattia sistemica letale simile al vaiolo (Tack & Reynolds, 2011).

Norovirus

I *Norovirus* (*Caliciviridae*), tra gli agenti più diffusi di gastroenteriti virali acute dell'uomo, sono stati recentemente rilevati in campioni fecali provenienti da cani che erano stati a contatto diretto con pazienti infetti. Ciò suggerisce la possibilità che questi virus possano sopravvivere nel tratto gastrointestinale dei cani, i quali assumono quindi un ruolo nella dispersione virale (Chomel, 2014).

Zoonosi virali trasmesse da conigli e piccoli roditori

Coriomeningite linfocitaria

Malattia rara, sostenuta da un *Arenavirus*, trasmessa per aerosol o per contatto diretto di ferite o abrasioni cutanee con urina, escrementi, saliva di roditori, topi e criceti in particolare. I piccoli roditori infetti spesso appaiono normali o mostrano una lieve diminuzione dell'attività e dell'appetito e solo raramente segni più significativi (perdita di peso, cifosi, morte).

Le persone infette generalmente sono asintomatiche o presentano lievi sintomi simil-influenzali che perdurano per 1-3 settimane. I pazienti possono migliorare per qualche giorno e, in seguito, presentare recidiva con febbre ricorrente, cefalea, *rash*, edema delle articolazioni delle mani, meningite, encefalite asettica, idrocefalo, orchite, parotite. Nella maggior parte dei casi la guarigione è completa e senza complicanze e i casi mortali sono meno dell'1%. Tuttavia l'infezione durante la gravidanza, spesso asintomatica per la donna, è associata ad aborto nel primo trimestre, oppure alla nascita di bambini con idrocefalo congenito, corioretinite e ritardo mentale (Bonthius, 2012).

Epatite E

Il maiale rappresenta il principale serbatoio per l'infezione umana (consumo di carne poco cotta, contaminazione con i liquami delle acque di bevanda e d'irrigazione), tuttavia diversi ceppi virali sono stati rilevati nei conigli domestici e d'allevamento, nei roditori e anche nei polli. Negli animali il virus è responsabile di lesioni al fegato che si presenta pallido, aumentato di volume e consistenza, in assenza di sintomatologia clinica manifesta.

Nell'uomo l'infezione può causare un'epatite acuta, spesso anitterica e autolimitante, tuttavia insufficienza epatica fulminante, con morte del 20% dei soggetti, può verificarsi in pazienti con malattie croniche del fegato, negli anziani e nelle donne in gravidanza (Doceul *et al*., 2016).

Infezioni da Hantavirus

Gli *Hantavirus* sono un gruppo di virus diffusi nei roditori di tutto il mondo che li eliminano per tutta la vita nelle urine, nelle feci e nella saliva. La trasmissione all'uomo avviene per inalazione di *aerosol* provenienti dagli escrementi dei roditori, meno frequentemente per contatto diretto del materiale infetto su ferite cutanee, sulle mucose di occhi, naso e bocca, o con il morso di un ospite infetto. Dati recenti suggeriscono che, raramente, si possa verificare anche la trasmissione interumana.

Gli *Hantavirus* nelle Americhe, noti come virus del "Nuovo Mondo", possono causare una sindrome polmonare, caratterizzata inizialmente da sintomi simil-influenzali aspecifici, a cui segue lo sviluppo di edema polmonare acuto non cardiogeno e la morte nel 40-75% dei casi.

Gli *Hantavirus* presenti in Europa e in Asia, virus del "Vecchio Mondo", sono responsabili della febbre emorragica con sindrome renale. In alcuni casi asintomatica, esordisce con sintomi simil-influenzali, spesso lievi, frequentemente accompagnati da emorragie congiuntivali, esantema del tronco e arrossamento, simile a una scottatura, del volto, e può progredire verso lo *shock* acuto, l'emorragia e l'insufficienza renale acuta. La gravità della malattia varia a seconda del virus che causa l'infezione. La mortalità è del 5-15% (Jonsson *et al*., 2010).

Monkeypox virus

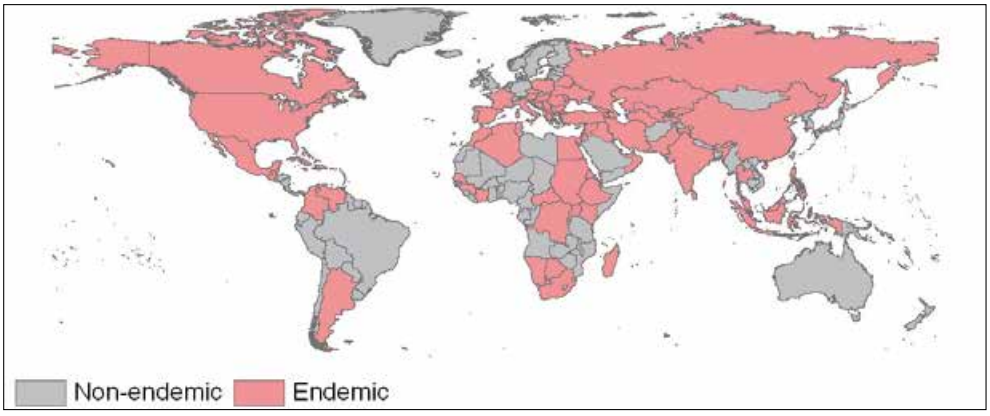
Malattia rara, non presente in Europa, ma che di solito si trova in Africa centrale e occidentale (Congo, Sudan). Nel 2003 è stata identificata negli Stati Uniti in persone entrate in contatto con cani delle praterie malati importati dall'Africa.

L'infezione viene trasmessa all'uomo da ratti, topi, conigli e cani della prateria. Gli animali infetti possono apparire sani, asintomatici o presentare febbre, tosse, congiuntivite e linfoadenopatia, seguiti da un'eruzione nodulare.

L'uomo può contrarre il virus attraverso il morso, il contatto diretto con sangue, liquidi organici o lesioni di un animale infetto o per via respiratoria. La malattia può diffondere anche da uomo a uomo, per contatto diretto con liquidi organici o con oggetti contaminati.
Si manifesta con le medesime caratteristiche cliniche del vaiolo umano: febbre, mal di testa, mal di schiena, aumento dei linfonodi, malessere generale e spossatezza, associati ad eruzione cutanea di pustole ombelicate, presenti solitamente prima sul volto. La malattia generalmente perdura 2-4 settimane e risulta fatale in circa il 10% delle persone infette (Tack & Reynolds, 2011).

Zoonosi virali trasmesse dagli equini

West Nile Disease



Il virus West Nile (WNV) è un *Flavivirus* trasmesso dalle zanzare femmine (in genere *Culex* spp.) che acquisiscono l'infezione nutrendosi su uccelli viremici che fungono da ospiti amplificatori. Tra gli uccelli, risultano particolarmente sensibili i Charadriiformi (gabbiani, starne, beccacce, chiurli) e i Passeriformi (passeri, storni, gazze, cornacchie).

I focolai più comuni della malattia si rilevano nelle zone "umide", come acquitrini e risaie, ma anche cisterne, vasche e fontane ornamentali, tombini, grondaie e piccole raccolte di acqua temporanee (barattoli vuoti, sottovasi) possono favorire lo sviluppo delle zanzare.

Il virus è anche in grado di infettare diverse specie di mammiferi, anfibi e rettili. Gli uomini e i cavalli, che talvolta mostrano sintomatologia clinica, sono considerati ospiti accidentali a fondo cieco e

non possono trasmettere il virus ai vettori. Sono stati registrati anche casi di trasmissione interumana attraverso emotrasfusioni, trapianti di organo, allattamento al seno e per via verticale.
Nell'uomo la maggior parte delle infezioni ha decorso asintomatico e solo nel 15-20% dei casi si manifesta come una sindrome influenzale. Raramente si rilevano sintomi neurologici (meningite, meningoencefalite, mielite) associati a febbre alta. I decessi si rilevano soprattutto nei pazienti di età più elevata (Kumar *et al*., 2018).

Nel 2018, in Italia e in altri Paesi dell'Europa centro-meridionale, è stato registrato un aumento della circolazione del WNV. Solo nel nostro Paese l'infezione ha provocato 595 casi umani, di cui 238 nella forma neuro-invasiva (mortalità del 9%) distribuiti in sei regioni (Veneto, Emilia-Romagna, Lombardia, Piemonte, Sardegna, Friuli-Venezia Giulia) (EFSA and ECDC, 2018).

Influenza

Anche gli equini sono sensibili al virus dell'influenza A. I sierotipi tipici (H7N7, H3N8), sono responsabili di una malattia respiratoria particolarmente grave e contagiosa per i cavalli che, tuttavia, non è considerata trasmissibile all'uomo (Parrish *et al*., 2014).

Hendra

Il virus *Hendra* (*Paramyxoviridae*) è un patogeno raro ed emergente, rilevato al momento solo in Australia. I pipistrelli sono gli ospiti naturali del virus che, attraverso la contaminazione del pascolo con gli escrementi, trasmettono la malattia ai cavalli, a loro volta responsabili dell'infezione all'uomo. Non è mai stata osservata una trasmissione da uomo a uomo.

I sintomi dell'infezione negli esseri umani e nei cavalli vanno dalla lieve malattia simil-influenzale alla sindrome da *distress* respiratorio acuto. In alcuni casi, la malattia può progredire verso l'encefalite. La mortalità è elevata (60-75%) (Kumar *et al*., 2018).

Bornavirus

La malattia di *Borna* (BDN) è un'encefalomielite che colpisce principalmente cavalli e pecore, ma che interessa molti altri mammiferi selvatici (topi, ratti), da allevamento (conigli, ruminanti), da zoo, da compagnia (cani e gatti) e anche i volatili ornamentali (psittacidi e canarini). La zona endemica comprende soprattutto alcune aree della Germania, della Svizzera e l'Austria.

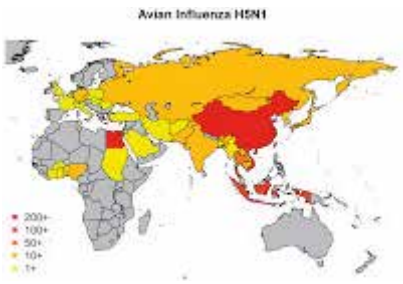
Negli animali l'infezione, spesso asintomatica, si manifesta con sintomi neurologici, da lievi a gravi. Comune è la paralisi e la morte (80-100%) che in genere sopraggiunge in 1-5 settimane.

Secondo alcuni studi le infezioni da BDV nell'uomo sarebbero all'origine di alcune malattie mentali umane (disturbo bipolare, schizofrenia, sindrome da affaticamento cronico, disturbo depressivo maggiore). La questione se la BDN sia da considerarsi una zoonosi e la possibilità di una sua distribuzione mondiale è molto controversa e il dibattito è tuttora in corso (Stefani, 2011).

Zoonosi virali trasmesse dagli uccelli da compagnia

Influenza aviaria

Nel XX secolo si sono verificate tre grandi pandemie d'influenza aviaria: la Spagnola (H1N1) nel 1918 provocò la morte di 40-100 milioni di persone, l'Asiatica (H2N2) nel 1957 e la Hong Kong (H3N2) nel 1968 hanno determinato la morte rispettivamente di 1 milione e 750 mila persone. Più recenti epizoozie di origine aviare si sono verificate con il ceppo asiatico Hong Kong HPAI/H5N1, che ha causato a livello mondiale, tra il 2003 e il 2017, l'infezione in circa 900 soggetti (mortalità del 60%), e con il ceppo asiatico Cina LPAI H7N9 che, tra il 2013 e il 2017, ha infettato oltre 1500 persone (mortalità del 40%). Altri virus dell'influenza aviaria hanno provocato infezioni umane sporadiche, inclusi i virus H7N7 e H9N2.



L'influenza aviaria (*Influenza-virus* di tipo A) è una malattia virale altamente contagiosa che colpisce prevalentemente i volatili acquatici selvatici e migratori (anatre, oche, cigni, germani reali, gabbiani, cormorani, aironi, cicogne) e il pollame domestico (polli, tacchini, galline ovaiole).
Gli uccelli acquatici selvatici generalmente non manifestano sintomatologia clinica e fungono da serbatoi naturali del virus nell'intestino e nel tratto respiratorio.
Gli avicoli di allevamento, se infettati da ceppi a bassa patogenicità (LPAI), possono non presentare alcuna sintomatologia o sintomi lievi (piume arruffate, calo della produzione di uova) ma, al contrario, se infettati con ceppi altamente patogeni (HPAI) manifestano gravi sintomi, soprattutto di tipo neurologico (torcicollo, paralisi delle ali), interruzione dell'ovo-deposizione, depressione del sensorio e morte del 90-100% dei soggetti entro 48 ore.

Sporadicamente il virus dell'influenza aviare, sia HPAI che LPAI, può essere trasmesso ad alcuni mammiferi (suini, felini, equini e uomo).

Le infezioni umane vengono acquisite principalmente per contatto diretto (via orale e inalatoria), prolungato e stretto, con uccelli infetti o con ambienti altamente contaminati, ma non si traducono in una trasmissione efficiente di questi virus tra le persone. Non vi sono altresì prove che l'influenza aviaria possa trasmettersi all'uomo tramite il consumo di carni e uova derivati dal pollame infetto.

Nell'uomo la sintomatologia è variabile da lieve a grave e include malattia simil-influenzale, a volte accompagnata da sintomi gastrointestinali, grave malattia respiratoria (insufficienza respiratoria, polmonite, sindrome da *distress* respiratorio acuto), sintomi nervosi da encefalite, sindrome da disfunzione multiorgano.
Piccioni, passeri, storni, merli e rondini, come pure gli uccelli da voliera (canarini, pappagallini), pur rappresentando una potenziale fonte di trasmissione, sono considerati poco recettivi e pertanto non rappresentano un pericolo reale di trasmissione per l'uomo (Keels *et al*., 2009).

Malattia di Newcastle

Uccelli da voliera e pappagalli sono molto sensibili alla malattia e possono fungere da serbatoi del virus fino a 12 mesi dopo l'infezione acuta. Il virus, diffuso attraverso le feci e le secrezioni degli uccelli infetti, è causa nell'uomo di congiuntivite o, più raramente, sintomatologia simil-influenzale (Boseret *et al*., 2013).

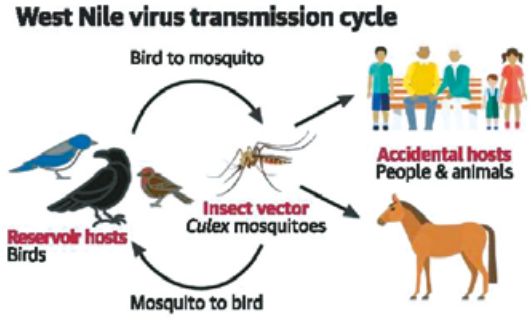
West Nile Disease

Numerosi passeriformi, compresi i canarini, così come gli psittacidi, sono implicati nel ciclo di trasmissione come ospiti amplificatori. Nella maggior parte dei casi gli uccelli sono asintomatici o presentano lievi sintomi oculari e neurologici (Boseret *et al*., 2013).

Virus Usutu

Strettamente correlato al virus *West Nile* (WNV), il virus *Usutu* (USUV) può essere trasferito dalle popolazioni aviarie ai mammiferi, esseri umani inclusi, attraverso i cosiddetti vettori-ponte, ovvero zanzare che compiono il pasto sia sugli uccelli che sui mammiferi.

WNV e USUV differiscono per la frequenza con cui si registrano casi di mortalità negli uccelli (elevata nel caso dell'USUV, bassa per il WNV) e per l'impatto sulla sanità pubblica (il WNV è responsabile di numerosi casi umani con sintomi neurologici gravi, l'USUV finora è stato rinvenuto in pochi casi non gravi).



Le specie da allevamento avicolo sembrano essere resistenti all'infezione, come pure le specie selvatiche africane. Tra gli uccelli europei si sono invece riscontrate forti morie in molte specie, in particolare nei passeriformi (merli, passeri, cinciallegra, picchio muratore, pettirosso). Gli uccelli migratori hanno svolto un ruolo chiave nella diffusione del virus al di fuori dell'Africa.

I mammiferi, uomo compreso, sono ospiti casuali e a fondo cieco. La trasfusione di sangue e il trapianto di organi infetti possono rappresentare altre vie d'infezione (Ashraf *et al*., 2015).

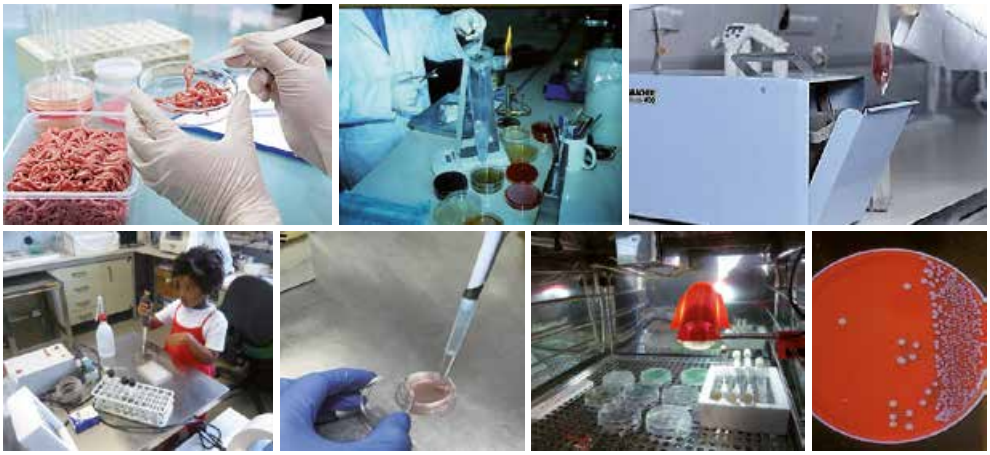
La malattia da virus Usutu in Italia sembra essere ad oggi limitata a poche e sporadiche segnalazioni in Emilia-Romagna ed in Veneto, pur in presenza di livelli di siero-prevalenza umana non inferiori a quelli per WNV nella valle del Po.

Al pari delle infezioni da WNV, dal 2017 è stata istituita una sorveglianza dei casi d'infezione da USUV. Nel 2018, nonostante il riscontro di un'elevata circolazione di USUV nelle zanzare e negli uccelli, sono stati notificati solo 9 casi di infezione umana da USUV (2 nella forma neuro-invasiva, 4 febbri e 3 in donatori asintomatici) in 4 regioni italiane (Veneto, Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Lazio). In 4 di questi casi, di cui nessuno neuro-invasivo, è stata confermata una co-infezione USUV-WNV

Capitolo 4

ALIMENTI

ANALISI BATTERIOLOGICA DI UN ALIMENTO



Da sinistra a destra: prelievo del campione – pesata e sospensione in soluzione – omogeneizzazione in Stomacher® – allestimento delle diluizioni seriali – semina su terreno solido – incubazione in termostato – lettura dei risultati

Ricerche qualitative e quantitative: le differenze

Certi microrganismi si ricercano in forma **qualitativa** (determinazione di presenza/assenza) quando si presume che il loro rinvenimento sia indice sufficiente di **potenziale pericolosità dell'alimento**. Questo approccio vale, ad esempio, per *Salmonella, Shigella, Vibrio, Campylobacter, Yersinia, Brucella, E. coli verotossico, Mycobacterium. Trattandosi di germi che spesso sono in bassa concentrazione o stressati da condizioni ambientali sfavorevoli (flora concorrenziale, trattamenti industriali, additivi chimici, ecc) la loro ricerca esige colture rivitalizzanti, chiamate di "pre-arricchimento" o di "arricchimento". Non sempre queste procedure hanno successo. Non va intesa come una quantificazione la semina iniziale di 25 grammi in 225 ml di brodo che comunemente vige per queste analisi*. Viceversa, per i batteri che si trovano abitualmente sparsi in natura e che solo sopra un certo numero possono assumere un significato di **deterioramento** o di **pericolosità dell'alimento**, la loro presenza viene valutata per conteggio, cioè in forma **quantitativa**. È il caso della ricerca di enterobatteri, stafilococchi, streptococchi, lattobacilli, germi sporigeni e della carica batterica totale. Le tecniche sono abbastanza simili: 10 grammi del prodotto vengono sospesi e omogeneizzati in 90 ml di un diluente a pH fisiologico a cui seguono alcune diluizioni decimali destinate alla semina di una quantità misurata su piastre di specifici terreni selettivi. Con opportuni calcoli si risale alla concentrazione di germi nel campione.

Due sono le limitazioni alla tecnica dei conteggi che possono condurre ad una sottostima della realtà: 1 – Si ammette che da una sola cellula batterica si formi una sola colonia sui terreni artificiali (per cui al numero segue la specifica di unità formanti colonia = u.f.c./g o ml di alimento), ma questo non è mai stato provato; 2- Nelle popolazioni batteriche non tutti i germi si lasciano coltivare in laboratorio.

Nota tecnica - Qualche suggerimento per iniziare le analisi

I campioni vanno tenuti alla temperatura originaria dell'alimento, con eccezione dei molluschi refrigerati, che si possono congelare.

Lo scongelamento (se indispensabile al prelievo) si ottiene in frigorifero (0-2°C, max 18 ore) o a T° ambiente (max 2 ore).

Si pesano nel recipiente sulla bilancia 10-50 g per le cariche batteriche, 25 g per le ricerche di patogeni.

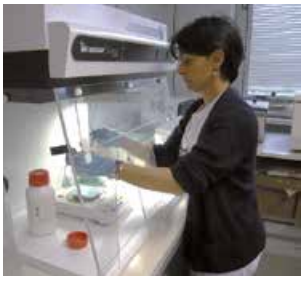
Il metodo più veloce di semina delle cariche è quello in superficie (*Surface Spread*) a ml 0,1 per piastra (in doppio) con spatole a L diverse per ogni diluizione. Infine, le piastre vanno incubate capovolte.

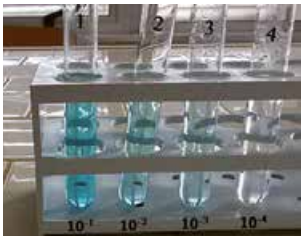
Si esamina la parte edibile dell'alimento (cioè superficie + profondità contemporaneamente oppure sola profondità (avicoli sotto pelle, formaggi con crosta non edibile, pesce, ecc) previa cauterizzazione sopra l'area da asportare.

Il diluente da aggiungere alla pesata (in rapporto 1:10) è una soluzione a pH fisiologico (Ringer ¼ conc., PBS, ecc) oppure brodo d' arricchimento per i patogeni. La soluzione fisiologica serve anche per le successive diluizioni decimali (ml 1 + 9).

Raccomandato il trattamento dei campioni sotto cappa a flusso laminare, d' obbligo per pasteurizzati e sterilizzati. I piani di lavoro devono essere prima sanitizzati.

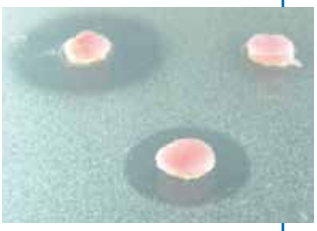
Si usano sempre strumenti e recipienti sterili, guanti compresi cambiati ad ogni prelievo.





Presenze indesiderate che invalidano le analisi: le sostanze inibenti

La presenza di residui di antibiotici e sulfamidici negli alimenti di origine animale è motivo di preoccupazioni per la qualità dell'alimento. Se da un lato sono innegabili i vantaggi economici provenienti dall'uso degli antibiotici in zootecnia, dall'altro lato i rischi tossicologici e tecnologici derivanti non sono trascurabili. Pertanto la ricerca dei residui di sostanze inibenti in Europa è prescritta dal Regolamento CEE 2377/90.
Si definiscono **inibenti** in biologia le sostanze che reagiscono con organismi viventi impedendone la crescita. Questa proprietà, applicata *in vitro* nei confronti di certi microrganismi sensibili, sta alla base del cosiddetto *test* di ricerca delle sostanze inibenti. Si tratta di una prova di valenza generica largamente impiegata in diagnostica per la dimostrazione presuntiva di residui di antibiotici e chemioterapici negli alimenti. È un metodo di *screening qualitativo* che non consente di identificare il tipo di residuo farmacologico né il dosaggio. Risponde positivamente sia agli inibenti artificiali che a quelli naturali. Necessita sempre di conferma con metodi chimici (ad esempio cromatografia su strato sottile, HPLC) o immunologici (ELISA).



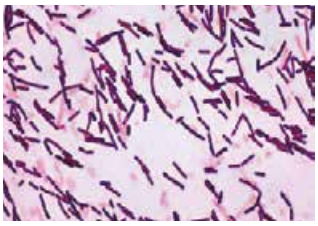
Sono stati elaborati numerosi metodi di ricerca delle sostanze inibenti per via microbiologica, che si basano su un unico principio: il campione in esame (o un suo estratto) viene posto su un terreno agarizzato seminato con un microrganismo sensibile; l'eventuale residuo diffonde dal campione, producendo un alone trasparente d'inibizione privo di crescita batterica. I metodi si differenziano tra loro per il tipo (o i tipi) di terreno adottato e per la scelta del microrganismo sensibile, che può essere anche più di uno.

Tra i metodi più affermati usati per le **carni ed altri alimenti** si ricordano:
- il metodo tedesco AH-*test* (*Allgemeine Hemmsoffentest*), che impiega il *Bacillus subtilis* BGA e due piastre del medesimo terreno, ma con pH diversi (6,0 e 8,0).
- il metodo olandese (*Dutch KidneyTest*), che impiega il *Bacillus subtilis* BGA e una piastra di terreno a pH 7.0 addizionato di trimethoprim.
- il metodo EEC (*Four Plate Method*), che impiega il *B. subtilis* BGA e il *Micrococcus luteus* su terreni a pH 6,0 - 7,2 -8,0. Sono stati impiegati anche altri microrganismi sensibili (tra cui *Bacillus cereus, Bacillus licheniformis, E. coli,* ecc).

Tra i metodi più usati per il **latte** si ricordano:
- il metodo *Disc Assay*, che impiega il *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* su terreno a pH 8.0 con trimethoprim.
- il DELVO TEST.
- il CHARM TEST.

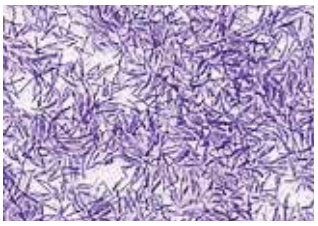
Sono stati impiegati anche altri microrganismi sensibili (tra cui *Streptococcus thermophilus, Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, ecc).

La sensibilità ottenibile con i metodi microbiologici accennati è molto varia e non sempre eccellente. La penicillina, ad esempio, può essere rivelata nelle carni col metodo olandese fino a 0,01 mcg per grammo, col metodo EEC fino a 0,1, mentre nel latte col metodo *Disk Assay* fino a 0,008 mcg per ml e col metodo CHARM fino a 0,005.



Bacillus subtilis BGA

Micrococcus luteus



Bacillus stearothermophilus

Microrganismi normalmente presenti negli alimenti

Quasi tutti i generi sono potenzialmente presenti negli alimenti, sia di origine animale che vegetale. Un tentativo di semplificazione delle tipologie batteriche in ambito alimentare è il seguente:

	aerobi	*Acetobacter, Acinetobacter, Brucella, Flavobacterium, Moraxella, Pseudomonas, Xantomonas*
batteri Gram-negativi	microaerofili	*Campylobacter*
	anaerobi facoltativi	*E. coli, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Shigella, Serratia, Yersinia, Vibrio, Plesiomonas, Aeromonas*
batteri Gram-positivi	aerobi facoltativi	*Brochothrix, Listeria*
	anaerobi aerotolleranti	*Lactobacillus*
	aerobi	*Micrococcus*
	microaerofili aerobi	*Aerococcus*
cocchi Gram-positivi	anaerobi facoltativi	*Staphylococcus*
	anaerobi aerotolleranti	*Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Lactococcus*
	anaerobi	*Sarcina*
	aerobi	*Corynebacterium, Brevibacterium, Mycobacterium*
batteri corineformi	anaerobi facoltativi	*Propionibacterium*
	anaerobi	*Bifidobacterium*
batteri Gram-positivi sporigeni	aerobi/anaerobi facoltativi	*Bacillus cereus*
	anaerobi	*Clostridium (perfringens, botulinum)*
altri gruppi particolari	aerobi	*Halococcus, Halobacterium*

Quali sono i cibi più contaminati? È difficile stabilirlo. Normalmente si può assistere ad una distribuzione dei germi nei cibi che più comunemente consumiamo simile a quella di seguito descritta.

Carni

In vivo il pH del muscolo è pressoché neutro (7,2) e, dopo la macellazione (per azione enzimatica sul glicogeno trasformato in acido lattico), scende a 5,3-5,8. La frollatura delle carni si completa in 2-4 giorni per la carne suina e in 10-14 giorni per la carne bovina in frigorifero a -1/+2 °C. In questo periodo diminuiscono i germi Gram-negativi, sostituiti da micrococchi, lattobacilli e *Brochotrix thermosphacta* (germi microaerofili). La stessa evoluzione della flora batterica si manifesta, seppure ritardata, nella carne posta sotto vuoto o in atmosfera modificata.

La carne trita, presentando una superficie esposta maggiore, va incontro ad aumento rapidissimo della carica mi-

crobica, per cui la sua durata è limitata a 1 giorno in frigorifero a temperatura tra 0 e +2 °C. La carica microbica totale della carne può arrivare fino a 10^6 germi/g senza apprezzabili variazioni organolettiche. Si manifesta la comparsa dell'odore sgradevole in presenza di CBT superiore a 10^7 germi/g, mentre con10^8 germi/g si nota la formazione di mucillagine superficiale.

Carni lavorate e/o conservate (salumi)

La conservazione prolungata dei prodotti genericamente chiamati salumi o insaccati viene ottenuta con la salatura (sodio cloruro al 3%, sodio o potassio nitrato), l'aggiunta di droghe, la riduzione dell'A_w nella stagionatura, le modificazioni della flora microbica nel corso della maturazione della carne con abbassamento del *p*H (eventualmente favorito da aggiunta di zucchero), la cottura o l'affumicamento.

I salumi vengono classificati in freschi (salsicce, cotechini), stagionati (prosciutto crudo, salame, *speck*) e cotti (*wurstel*, mortadella).

Nella preparazione dei salami stagionati vengono impiegati *starter* microbici (*Micrococcus, Staphylococcus, Pediococcus, Lactobacillus)* oltre a lieviti per accelerare la formazione di aromi particolari e muffe *(Penicillium nalgiovense*) per la formazione dello strato superficiale bianco. I germi aggiunti hanno la capacità di favorire la conservazione (per antagonismo con la flora originale della carne), creare l'aroma e migliorare il colore. In particolare, i lattobacilli e i micrococchi si moltiplicano rapidamente nell'impasto di carne per la produzione dei salami e sostituiscono le *Enterobacteriaceae* durante le 4-8 settimane di stagionatura a condizioni di temperatura decrescente (20-18-13 °C) e umidità appropriata (90-85-80%). L'aggiunta di nitrati impedisce la moltiplicazione del *Clostridium botulinum*. Al termine della stagionatura, questi prodotti possono presentare una A_w di 0,90-0,80 e un pH di 5,7-5,9.

Nei prosciutti crudi (ad eccezione del prosciutto di Parma e di San Daniele) vengono impiegate salamoie contenenti sodio cloruro al 20%, nitrati, nitriti, acido ascorbico, polifosfati, zucchero. La flora microbica, durante tali trattamenti (che possono durare da pochi giorni fino a 2 mesi a temperatura <5 °C), è composta da lattobacilli, micrococchi, vibrioni alofili, lieviti, *Enterococcus fecium,* alcuni Gram-negativi.

Dopo una fase di asciugatura (che può durare un mese), subentra la fase di stagionatura (della durata da 9 mesi a 2 anni), con il raggiungimento di un'A_w ridotta a 0,96.

Nel prosciutto cotto il trattamento termico raggiunge circa +68 °C (seguito da rapido raffreddamento a -1 °C). Possono sopravvivere batteri Gram-negativi e streptococchi. Nella mortadella (preparata con carne suina, bovina, polvere di latte, sale, nitrato, nitrito, spezie, fosfati), il trattamento termico raggiunge +78°C per 16-18 ore e l'A_w finale è di 0,95-0,94. Possono sopravvivere al centro della massa lattobacilli, streptococchi fecali, bacilli Gram-positivi e alcuni germi Gram-negativi.

Prodotti ittici

Il pesce è soggetto a una rapida moltiplicazione batterica costituita, principalmente, da Gram-negativi e *Pseudomonas* che, oltre alla degradazione, può comportare la produzione di sostanze tossiche (istamina), soprattutto nei pesci ricchi di istidina (sgombri, tonno). In alcuni paesi (come il Giappone), il consumo di pesce crudo (*sushi* e *sashimi*) porta il rischio di tossinfezioni da *Vibrio parahaemolyticus*.

Nei crostacei (gamberi, granchi, aragoste) e nei molluschi (cozze, ostriche, seppie, calamari) possono essere presenti *Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*.

Coregone e sarde sul lago di Garda

LA SCATOLA DEI NUMERI

Carica batterica totale per g o ml in alcuni alimenti:

- Latte pastorizzato $<20x10^3$
- Ittici $<10^6$
- Salumi $>10^6$
- Formaggi $<10^{10}$
- Gelati $<10^6$
- Burro $<10^7$

Spiaggia a Sirmione

Latte

Nel latte crudo alla raccolta si trovano, normalmente, micrococchi, stafilococchi, corinebatteri, bacilli Gram-negativi (*Pseudomonas, Enterobacteriaceae*), lattobacilli, bacilli, clostridi, lieviti e muffe.

Il latte può essere contaminato da germi patogeni, tra cui *Mycobacterium tuberculosis* e *bovis, Brucella abortus* e *melitensis, Streptococcus agalactiae* (agente della mastite bovina), *Staphylococcus aureus, Salmonella, Campylobacter jejuni*.

Derivati del latte

Nella fabbricazione dei prodotti caseari vengono aggiunti al latte batteri e muffe che hanno la funzione di acidificare il latte (precipitando la caseina), produrre gas (batteri lattici etero-fermentanti), formare aroma (batteri lattici nello *yogurt*, muffe nei formaggi definiti "erborinati").

• *Burro*

La panna riscaldata viene inoculata con una miscela acidificante di *Streptococcus cremoris, Streptococcus lactis, Leuconostoc cremoris*.

• *Yogurt*

Il latte, esente da residui di antibiotici, viene inoculato con *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, eventualmente anche con *Bifidobacterium bifidum* e incubato a +45 °C per 3 ore.

Lo *yogurt* non deve contenere meno di 5 milioni di batteri lattici per ml e non più di 10 coliformi/ml. Il conteggio dei lattobacilli e dei lattococchi viene ef-

fettuato con la semina di due terreni in piastra: MRS agar a +37 °C + 10% di CO_2 per 72 ore per i bacilli e M-17 agar a +44 °C per i cocchi, sommando i risultati parziali ottenuti.

• *Kefir*

Vengono aggiunti al latte dei "grani" contenenti lieviti, lattobacilli e streptococchi, incubando per 10-24 ore a +20/22 °C.

• *Formaggi*

Nella produzione di caseificio, il latte crudo viene purificato, portato al tenore di grasso desiderato, riscaldato e addizionato di colture *starter* (chiamate "innesto"), formate da batteri lattici (lattobacilli, streptococchi, *Leuconostoc*) che, acidificando, provocano la coagulazione e da altri batteri (*Propionibacterium, Brevibacterium*) o muffe (*Penicillium, Mucor*) che, metabolizzando lattosio, grassi e proteine sviluppano l'aroma tipico. La massa coagulata (detta "cagliata") viene separata dal siero di latte e lavorata (con una serie di procedimenti denominati formatura, pressatura, salatura, maturazione).

• *Gelati*

Possono essere inquinati con *Salmonella* e *S. aureus* per contaminazione secondaria (mani, saliva, ecc) da parte del personale che li manipola.

Uova e ovoprodotti

Le uova possono essere contaminate, sul guscio, da salmonelle, mentre, internamente, solo in caso di trasmissione verticale dall'ovaio possono contenere *S. Gallinarum-pullorum*, *S. Enteritidis* e poche altre salmonelle (tuttavia in numero esiguo e in proporzione di 1:15.000 uova durante la deposizione in allevamenti infetti).

Il problema delle tossinfezioni da *Salmonella* con le uova è legato, soprattutto, al fatto che le uova non vengono conservate refrigerate e che prodotti derivati possono contenere un elevato numero di salmonelle (creme crude, salse, maionese, tiramisù) in seguito a mancato rispetto di buone pratiche di preparazione e di conservazione.

Gli ovoprodotti (misto d'uovo, tuorlo, albume) possono aumentare il rischio di contaminazione da salmonelle provenienti dalla sgusciatura, se non sono stati sottoposti a pastorizzazione (+65 °C per 2,5-3 minuti) e successiva conservazione in frigorifero.

Il controllo preventivo delle tossinfezioni da uova inquinate è basato sul controllo veterinario degli allevamenti di ovaiole, integrato da esami di laboratorio sugli animali morti, sulle feci e sulle uova.

Vegetali

Sono esposti alle fonti di contaminazione più ricche di germi: il terriccio, l'aria, gli insetti, i concimi.

Le **verdure** hanno un alto contenuto d'acqua (A_w 0.98-0.99) e un pH spostato verso l'acidità, per cui la moltiplicazione batterica risulta favorita (raggiungendo 10^6/g nell'insalata, 10^7 nei cavoli, 10^{10} nel sedano). Prevalgono batteri lattici (*Leuconostoc*, streptococchi), stafilococchi coagulasi-positivi, enterobatteri di origine fecale, clostridi del terreno (*Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*) e bacillacee (*B. cereus*).

I cosiddetti **vegetali della IV gamma** sono per lo più insalate confezionate sotto *film* plastico in atmosfera modificata. La flora microbica è composta da batteri Gram-negativi (*Pseudo-*

monas, Xanthomonas, Enterobacter, Erwinia), da lattococchi (*Leuconostoc*), da lieviti (*Candida, Cryptococcus, Rhodotorula, Trichosporon, Pichia*). La quantità è spesso elevata (10^5/g).

La **frutta** ha generalmente un pH inferiore a 4.6 (tranne cocomero, banana, fico) per cui prevalgono specie batteriche acidofile, muffe, lieviti.

Bacche e germogli

Nonostante le misure di controllo, la vicinanza col terriccio e le manipolazioni nella raccolta giustificano la quantità di germi che possono contaminare le **bacche** commercializzate sia fresche che surgelate (lamponi, mirtilli, more, mirto, *acai*, *goji*). Durante la coltivazione dei **germogli** esistono condizioni ideali (umidità, temperatura, contenuto proteico dei semi) per la moltiplicazione dei batteri *Bacillus cereus, Salmonella, E. coli*. I germogli si possono produrre anche in casa da tante piante: soja verde, ceci, fagioli, lenticchie, grano, girasole, avena, miglio e riso.

Spezie ed erbe aromatiche

Spezie - Sesamo, lino, girasole, cumino, zucca, lino, amaranto, *chia* sono alcuni ingredienti che oggi entrano molto spesso nella preparazione dei piatti più sofisticati. In conseguenza della provenienza da paesi poveri con scarse attrezzature, la lavorazione comporta una contaminazione da germi tellurici considerevole, compreso *Escherichia coli*.

Erbe aromatiche - Nel 25% dei casi contengono germi aerobi mesofili fino a 1.000.000 per grammo, con i massimi livelli nel basilico, maggiorana e timo.

Salse

Le cariche batteriche mesofile in salse a base di uova si sono dimostrate in qualche caso attorno a 10^6 microrganismi per grammo. I prodotti considerati in questa categoria di alimenti sono la maionese, il *ketchup* e il *surimi*.

Paste fresche, farcite, pizza

La pasta prodotta industrialmente (è un cibo tipicamente italiano) è stata controllata per la carica batterica mesofila con risultati variabili fra 10^6 e 10^7 microrganismi per grammo. I valori più alti si troverebbero in corrispondenza dei prodotti all'uovo. La pizza industriale surgelata può contenere da 10^6 a 10^8 germi per grammo, con variazioni dipendenti dalla farcitura. In massima parte la carica batterica totale era sostenuta da lattobacilli.

Piatti pronti di gastronomia

Vitello tonnato, gelatine, paté, insalate (russa, viennese, capricciosa, di mare) possono raggiungere una carica batterica totale (CBT) mediamente sul milione di germi per grammo, coperti però al 90% da lattobacilli (la flora normale del latte, della maionese e delle verdure).

Anche il *kebab* può essere fortemente inquinato nelle salse o nei cetrioli aggiunti alla carne.

Acqua

Nell'acqua potabile si trovano normalmente pochi batteri, costituiti principalmente da bacilli Gram-negativi aerobi, spesso mobili, pleomorfi, che crescono in laboratorio con colonie pigmentate. Appartengono tipicamente ai generi *Pseudomonas, Flavobacterium, Vibrio, Spirillum*. In minor quantità si trovano batteri Gram-positivi dei generi *Corynebacterium, Micrococcus, Sarcina*, che formano colonie pigmentate.

Solo in caso d'inquinamento di origine fecale compaiono nell'acqua altri microrganismi, tra cui *Escherichia coli, Proteus vulgaris* (Gram-negativi), *Enterococcus faecalis* e *Clostridium perfringens* (Gram-positivi).

Sono stati registrati casi di inquinamento degli acquedotti da *Aeromonas hydrophila* e da *Burkholderia cepacia*.

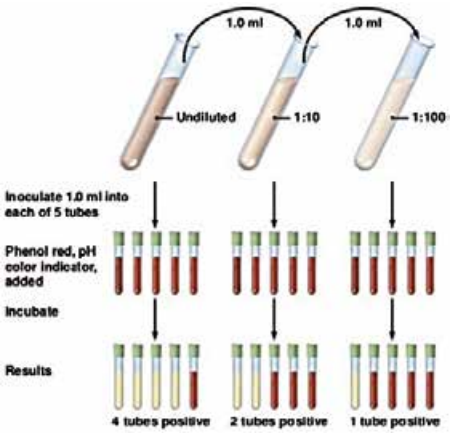
Altre bevande

Non si trovano in letteratura grossi episodi d'inquinamento delle acque minerali, mentre è nota la possibilità dello sviluppo di lieviti (*Saccharomyces*) in succhi di frutta e altri prodotti similari a bassa acidità.

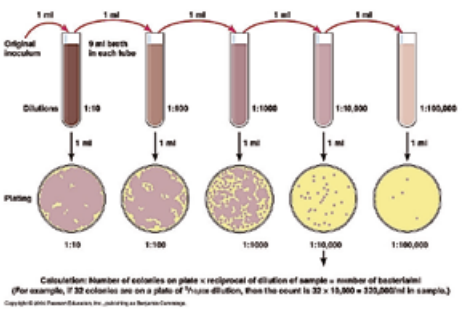
Nota tecnica - *Si possono contare i batteri?*

Certamente sì! Esiste una tecnica chiamata "***Most Probable Number***" **(MPN)**. Essendo indaginosa, viene poco apprezzata dai laboratori, per cui si preferisce il metodo delle diluizioni del campione e della **semina su piastre (in superficie o in profondità)**. Ovviamente, cambiando i terreni è possibile numerare vari generi. Unico svantaggio di questa tecnica è la possibile *sottostima della concentrazione reale dei germi*. Le due alternative sono qui schematizzate.

TECNICA MPN



TECNICA DELLE DILUIZIONI E SEMINA IN PIASTRA



Differente è la tecnica delle **diluizioni in micrometodo** (foto), dove si usa una piastra *microtiter* sterile con fondo a V e due micropipette (da 20 e 180 mcl) con puntali sterili da cambiare ad ogni passaggio.
Il diluente (ad esempio, soluzione di Ringer ¼ concentrata) viene preventivamente distribuito in una fila di pozzetti a 180 mcl per pozzetto.
Il campione, sospeso nello stesso diluente e opportunamente omogeneizzato, viene aggiunto al primo pozzetto in ragione di 20 mcl. Con la micropipetta da 180 mcl si miscela con ripetute aspirazioni (in media, 5) il contenuto del pozzetto. Quindi, con un puntale nuovo, si trasferiscono 20 mcl nel successivo pozzetto e si ripetono le operazioni di cui sopra (vedi anche APPENDICE).

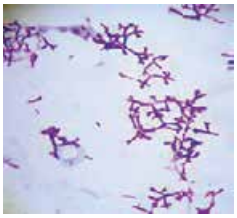
NOTA TECNICA – Contare i batteri lattici nello *yogurt*

I batteri lattici sono microrganismi Gram-positivi di forma eterogenea, distinguibili in "***lattobacilli***" se allungati e "***lattococchi***" se rotondeggianti. Essendo capaci di avviare le reazioni di fermentazione, sono utili come *starter* nell'industria casearia, nella conservazione delle carni, nella produzione di mangimi. Nello *yogurt* sono spesso associati a ***Bifidobatteri.***

Lattobacilli Sono ubiquitari e costituiscono la flora normale nel latte, nella carne, nella frutta e negli insilati. Preferiscono *p*H acidi (3,5-6,4) e temperature fra +15 e +45 °C. Sono asporigeni, immobili e microaerofili. Si chiamano *omo-fermentativi* se formano acido lattico ed *etero-fermentativi* se producono anche altri metaboliti (alcool etilico, acido acetico, ecc).
Sviluppano in laboratorio su terreno MRS a +37 °C in 72 ore con il 5% di anidride carbonica, mostrando colonie rotondeggianti, a margine netto o debolmente frastagliato, del diametro di 2-3 mm, biancastre o translucide. Nello *yogurt* si trova prevalentemente ***L. delbrueckii subsp. bulgaricus***.
Vengono conteggiati mediante allestimento di diluizioni decimali del campione (iniziando da 10 g + 90 ml di soluzione di Ringer 1/4 conc.) e semina in profondità. Talvolta, si possono presentare sulle piastre delle colonie con diametro più piccolo, ascrivibili a lattococchi. Le prove di conferma consistono nell'allestimento di strisci da colorare con Gram (+) e la prova della catalasi su vetrino (-).

Lattococchi Hanno affinità con gli streptococchi (***S. thermophilus*** è quasi sempre associato a *L. bulgaricus*), ma si differenziano in quanto non sviluppano in presenza del 6,5% di NaCl. In laboratorio, vengono ricercati con gli stessi metodi quantitativi usati per i lattobacilli, ma ricorrendo al terreno più specifico M17, da incubare a +37 °C per 24 ore. Le colonie dei lattococchi si presentano rotonde, convesse, a margine netto, del diametro di 1-3 mm, bianche. Qualche colonia di lattobacilli può sviluppare con dimensioni più grandi. Anche in questo caso è raccomandabile procedere alla verifica microscopica (cocchi Gram+) per poi allestire la catalasi (-). Le ricerche di lattobacilli e lattococchi sono previste nei metodi ISO 7889 (2003).

Bifidobacterium bifidum (subsp. lactis) Un Gram-positivo immobile dagli effetti benefici sulla flora intestinale. Secondo la norma ISO 29981 (2010) si usa la conta su terreno TOS-MUP propionato agar + agenti selettivi (litio-mupirocina) e galatto-oligosaccaridi (TOS), seminato per inclusione e incubato a +37°C per 72 ore in anaerobiosi. Cresce con colonie puntiformi, bianche.



Lo *yogurt* al microscopio. Da sinistra: un preparato colorato con blu di metilene di **lattobacilli + streptococchi** e un preparato colorato con Gram di **bifidobatteri** (ingrandimento = 1000x). A destra: *test* della catalasi su vetrino, rispettivamente con reazione positiva (bolle di gas) e negativa. La prova consiste nello stemperare una piccola quantità di patina batterica in una goccia di acqua ossigenata al 3%.

EVOLUZIONE DELLA FLORA MICROBICA NEGLI ALIMENTI

Per deterioramento dei prodotti alimentari (*food spoilage*) si intende qualsiasi alterazione delle caratteristiche tipiche di un alimento rilevabile attraverso i sensi e tale da rendere quell'alimento, seppur non pericoloso, inaccettabile al consumo umano. Il deterioramento microbiologico rappresenta la causa più comune e importante di alterazione alimentare e può manifestarsi, sul piano sensoriale, come crescita visibile della popolazione microbica alterante (comparsa sull'alimento di *slime* o di colonie microbiche), come cambiamento della consistenza e della struttura dell'alimento (per degradazione di polimeri) o come comparsa di odori e sapori indesiderati. Solo una frazione della popolazione microbica totale è responsabile dei processi che portano alla perdita della qualità e tale frazione dipende dalle caratteristiche dell'alimento stesso, dalle condizioni ambientali e dalle interazioni tra le diverse specie di microrganismi. I microrganismi che con maggior frequenza sono responsabili del deterioramento sono noti come organismi specifici di deterioramento (*Specific Spoilage Organisms* – SSO).

Diverse specie batteriche (*Bacillus, Pseudomonas, Enterococcus, Clostridium, Proteus*) demoliscono le proteine, a volte mediante decarbossilazione con formazione di ammine biogene alteranti l'odore o per deaminazione ossidativa con produzione di ammoniaca e di acidi organici. I miceti idrolizzano i grassi trigliceridi mediante lipasi, con formazione di acido butirrico e fenomeni d'irrancidimento.

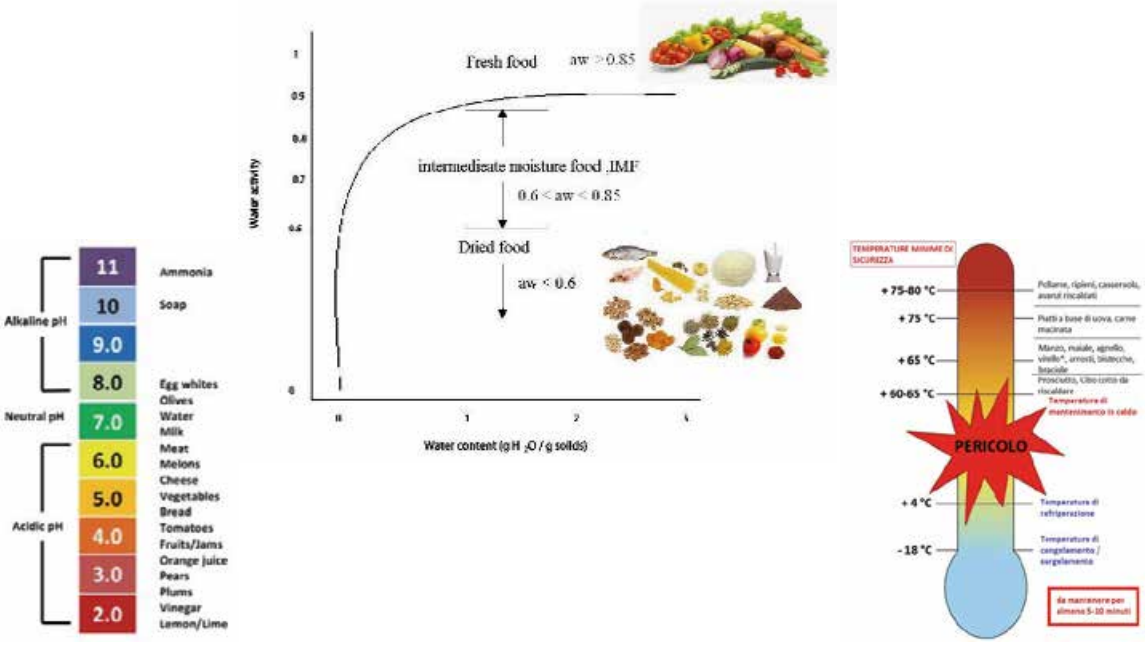
In sintesi, le principali modificazioni avvertibili negli alimenti mal conservati si possono ricondurre a:

- inverdimento (ad esempio nella carne, nel pesce e nei salumi)
- inacidimento (nelle carni lavorate in genere)
- formazione di patina viscosa o di mucillagine superficiale
- odore e sapore acido o burroso (nei prodotti sottovuoto e in atmosfera modificata)
- formazione di gas (*early blowing*) e sapore amaro (*bitter flavour*), come avviene nei formaggi
- rigonfiamento dei prodotti in scatola (*bloater damage*)

Alcuni lattobacilli, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Clostridium butirricum* demoliscono gli zuccheri con formazione di CO_2, etanolo e acido lattico, producendo variazioni di colore e di consistenza nell'alimento. Nei vegetali questo fenomeno - che parte dalla demolizione della pectina - causa il cosiddetto "marciume molle".

Il deterioramento di origine microbiologica degli alimenti può essere messo in relazione a quattro condizioni:

1. **pH** – Esistono alimenti alcalini con pH>7.0 (esempio: albume d'uovo con pH 9.6), alimenti neutri con pH 6.5-7.0 (come il latte), alimnti debolmente acidi con pH 5.3-6.5 (carni, pesce, pane, verdura), alimenti acidi a pH 3.7-4.5 (pomodori, *yogurt*, maionese, frutta) e alimenti fortemente acidi a pH<3.7 (come i limoni a pH 2.2-2.4). Sappiamo che i batteri sopportano generalmente pH fra 4.0 e 9.0, con eccezione di lattici (*Lactobacillus*), acetici (*Acetobacter*), lieviti (*Saccharomyces*) e funghi (*Penicillium, Aspergillus*) che tollerano pH fino a 1.6.



2. $\mathbf{A_w}$ - Gli alimenti con valori superiori a 0.95 vengono considerati facilmente alterabili (carni, uova, pesce). Quelli con valori tra 0.91 e 0.95 sono detti moderatamente alterabili (*würstel*, carni salmistrate) e quelli con A_w <0.90 sono ritenuti praticamente inalterabili (salami stagionati, pesce secco salato, succhi di frutta concentrati, farina, riso, frutta secca, latte e uova in polvere, patatine fitte).

3. **Potenziale ossido-riduttivo (*Eh*)** – Carne, formaggio, conserve in scatola hanno valori di -150 / -200 mV (graditi da germi anaerobi), mentre friutta e verdura hanno *Eh* di +300 / +400 mV (accettati da batteri aerobi e funghi).

4. T**emperatura** – In relazione all'intervallo ottimale di crescita dei batteri e dei funghi, gli alimenti hanno durate più o meno lunghe.

Quando i microrganismi danneggiano la dispensa…

I batteri sono responsabili di alcuni degli eventi di deterioramento più rapidi ed evidenti in alimenti proteici come carne, pollame, pesce, molluschi, latte e alcuni prodotti caseari. La crescita di lieviti e muffe è generalmente più lenta di quella batterica, tuttavia la capacità di utilizzare un'ampia varietà di substrati e la tolleranza di condizioni ambientali più estreme, li rendono dei pericolosi agenti di deterioramento. I microrganismi alterativi appartengono a diversi gruppi microbici:

ALCUNI ESEMPI

Batteri Gram-negativi:
Pseudomonas (*fluorescens, putida*, ecc), nella **carne**, nel **pomodoro**, nel pesce, nelle **uova**. Degradano i cibi anche *Xanthomonas* e gli Enterobatteri (tra cui *Proteus*, *Serratia marcescens* (nei **formaggi**)

Batteri Gram-positivi non sporigeni:
Lattici (*Lactobacillus, Cronobacterium*), *Brochotrix thermosphacta* (nei ***würstel***)

Batteri Gram-positivi sporigeni:
Bacillus (cereus, coagulans, stearothermophilus), Clostridium (nello **scatolame**)

Lieviti:
Pichia, Rhodotorula, Debaryomyces (nella **carne macinata**)

Muffe:
Aspergillus (nel **pane**), *Colletotrichum* (nelle **banane**), *Penicillium* (nelle **arance**), *Mucor, Fusarium*

Nota tecnica – Il controllo microbiologico dell'acqua potabile

La ricerca di alcuni parametri microbiologici serve per escludere la presenza di patogeni abitualmente non ricercati (che possono trovarsi nelle acque superficiali) e per scoprire microrganismi resistenti alla clorazione, in sostituzione di ricerche mirate lunghe e laboriose. Le analisi riguardano:

- *Escherichia coli* – Si trova nelle feci ad una concentrazione di circa 10^8 UFC/ grammo. L'O.M.S. lo considera il miglior indicatore di contaminazione fecale, essendo più stabile degli altri coliformi alle variazioni climatiche.
- Coliformi totali – Sono presenti nelle feci, ma anche nell'ambiente.
- *Enterococcus faecalis* – Proviene certamente dall'intestino, sopporta alte concentrazioni saline, pH alcalino e temperature fra +18 e +40°C. Può indicare, indirettamente, la presenza di *Enterovirus*.
- *Clostridium perfringens* – Formando spore, resiste più di altri germi ai trattamenti igienizzanti.
- *Pseudomonas aeruginosa* – Si trova nelle feci, negli scarichi di liquami ed è molto resistente ai trattamenti.
- Carica batterica totale – Numeri elevati di germi sono indice di una contaminazione. Testimonia l'efficacia dei trattamenti di potabilizzazione e l'integrità della rete di distribuzione. I batteri che crescono a +37°C derivano presumibilmente da animali a sangue caldo, mentre quelli che sviluppano a +22°C provengono dall'ambiente.

Tipologia di acque	Germi da ricercare	Limiti di accettabilità	Metodo di riferimento
Acque potabili non confezionate	*Escherichia coli*	0/100 ml	ISO 9308-1 oppure Colilert-18 (DST) oppure m-Endo LES Agar
	Enterococchi	0/100 ml	ISO 7899-2
	Coliformi a 37 °C	0/100 ml	ISO 9308-1 oppure Colilert-18 (DST) oppure mEndo LES Agar
	Clostridium perfringens (spore comprese) se influenzate o provenienti da acque superficiali	0/100 ml	m-CP Agar a 44 °C ISO 6461-2 TSC – Rapp. ISTISAN 07/5
Acque potabili confezionate	*Escherichia coli*	0/250 ml	ISO 9308-1
	Enterococchi	0/250 ml	ISO 7899-2
	Pseudomonas aeruginosa	0/250 ml	EN ISO 16266
	Carica batterica totale a 22 °C	100/ml	UNI EN ISO 6222
	Carica batterica totale a 37 °C	20/ml	UNI EN ISO 6222

Il D.L.vo 31/2001 ha cambiato i parametri di base per il giudizio microbiologico già contenuti nel DPR 236 del 24/05/88 ed ha diviso le acque in "potabili non confezionate" e "confezionate", adottando ricerche in parte diversificate e stabilendo metodi d'analisi di riferimento (norme ISO). Gli aspetti innovativi riguardano sostanzialmente la distinzione dei parametri in due categorie:

- *limiti microbiologici* (coli, coliformi, enterococchi), il cui superamento comporta un giudizio di non conformità e l'adozione di provvedimenti;
- parametri *indicatori* (*Cl. perfringens*, carica batterica totale), per i quali il superamento dei limiti di accettabilità non comporta necessariamente l'adozione di provvedimenti, se non in caso di pericolo per la salute. Accanto alle ricerche sopra riportate, possono essere richieste indagini supplementari, ad esempio per *Salmonella, Legionella, Campylobacter*, coli EPEC, *Giardia, Cryptosporidium*, virus enteropatogeni, ecc.

I controlli, differenziati su due livelli (di *routine* e di verifica), prevedono, oltre alle analisi microbiologiche, la ricerca di parametri organolettici (colore, odore, sapore, torbidità), fisici (conduttività, pH), chimici (ammoniaca, ferro, nitrati, ecc).

In tabella compare per la prima volta la sigla ISO, che sta per *International Standard Organisation*, seguita da un numero. Si tratta di protocolli d'analisi di riferimento sovranazionale, che fanno testo quanto a ufficialità. Tuttavia le norme sulle procedure analitiche di alimenti vigenti nella Comunità Europea ammettono che i laboratori possano adottare anche altre metodiche, purché queste forniscano risultati equivalenti.

BATTERI PATOGENI NEGLI ALIMENTI

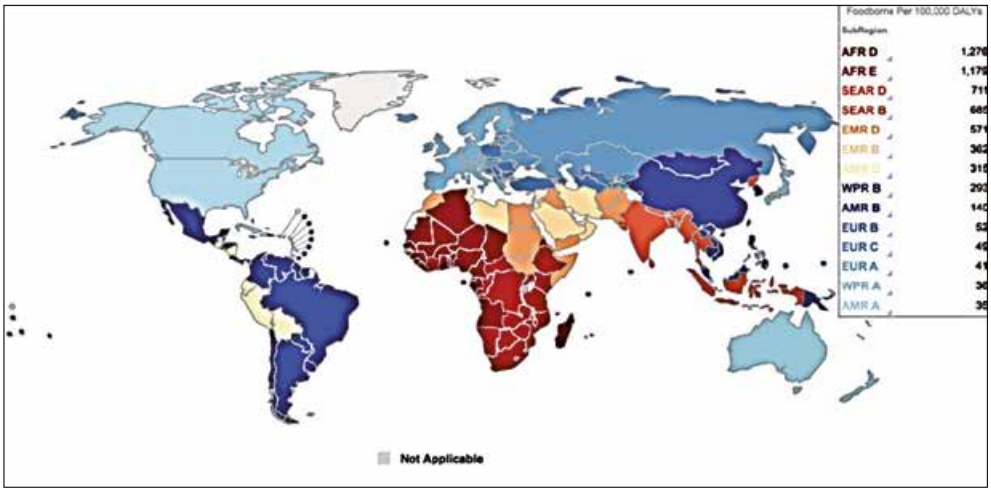
I microrganismi possono mantenere la loro concentrazione nell'alimento contaminato, oppure moltiplicarsi, produrre tossine (cioè veleni), attaccarsi alle cellule dell'ospite (*proprietà adesiva*), diffondere nei tessuti (*proprietà invasiva*).

Perché tutto questo avvenga sono necessarie alcune condizioni: potere patogeno del microrganismo (detta *virulenza*), sua concentrazione (necessita una *dose infettante minima*), reazione difensiva dell'ospite (espletata dalle mucose, dal succo gastrico, dagli *anticorpi* messi in circolo dal sistema immunitario). Le conseguenze sono di tre tipi:

- **Infezioni alimentari**. Sono provocate da microrganismi invasivi che raggiungono le cellule sensibili attraverso acqua, latte crudo, ecc provocando infiammazioni localizzate che comportano diffusione per via ematica con febbre e formazione di anticorpi. Tra questi, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella*, *Listeria monocytogenes*.
  Molto complesso è il gruppo di infezioni che possono derivare da ceppi particolari di *Escherichia coli (entero-tossici, entero-emorragici, entero-aggregativi)*, pur essendo un germe Gram-negativo commensale dell'intestino.
- **Intossicazioni alimentari**. Sono provocate da tossine esterne al microrganismo (esotossine) che agiscono anche dopo la scomparsa del germe (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*).
- **Tossinfezioni alimentari**. Prevedono la presenza del germe e della sua tossina (endotossine generalmente di natura polisaccaridica o lipidica, a volte resistente al calore). Dopo la morte della cellula batterica, le endotossine liberate danno diarrea, febbre, ipotensione, disturbi nervosi. Tra i germi, si trovano *Salmonella, Bacillus cereus, Yersinia enterocolitica, Vibrio parahaemolyticus* (e altri vibrioni alofili), *Vibrio cholerae, Shigella, Campylobacter jejuni e coli*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*.

Contano anche le **condizioni esterne**. Il grado di contaminazione degli alimenti (e quindi la maggior possibilità che insorgano malattie infettive da cibo) sono in rapporto con la maggior concentrazione delle produzioni alimentari, con l'incremento della ristorazione collettiva, con l'importazione di prodotti esotici e col turismo internazionale. Per questi ed altri motivi la scelta delle materie prime e l'igiene nelle preparazioni assumono grande rilievo, come lo sono la refrigerazione sotto i 4°C, la cottura completa e il riscaldamento sopra i 65°C dei cibi già cotti.

Da uno studio pubblicato in Inghilterra (Ryan *e Coll*., 1996) risulterebbe che la massima incidenza di casi di tossinfezione è in relazione a esercizi pubblici (37%) contro un 17% nelle case private. Come prevedibile, nella statistica degli agenti eziologici primeggiano le salmonelle (77% dei focolai), seguite da *Clostridium perfringens* (4%), *Bacillus cereus* (2%), *Campylobacter* ed *Escherichia coli* (1%).



Incidenza delle malattie trasmesse da alimenti (dati WHO 1991-2011)
Casi su 100.000 abitanti indicati in senso decrescente dai colori nero-rosso-giallo-blu-celeste

Suggerite dall'esperienza e dai dati statistici raccolti in ciascuna area geografica, alcune ricerche batteriologiche sono diventate di *routine* nei laboratori specializzati. Ad esempio, le analisi riportate nella seguente tabella sono largamente condivise.

Alcune ricerche di primaria importanza in microbiologia alimentare

Scopo	Ricerche
Qualità igienica delle materie prime e dei prodotti finiti	Carica batterica totale, numerazione di coliformi, stafilococchi, miceti (muffe e lieviti)
Qualità igienica dell'acqua per giudizio di potabilità	Carica batterica totale, coliformi, streptococchi fecali, anaerobi sporulati
Qualità igienica delle superfici di lavoro (banchi, nastri trasportatori, bilance, affettatrici, pareti e pavimenti, mezzi di trasporto, coltelli, guanti, mani degli addetti, ecc)	Carica batterica totale con tamponi o piastre a contatto, conteggio dei miceti (muffe e lieviti), presenza di *Salmonella* o di *Listeria monocytogenes*
Residui di farmaci	Sostanze inibenti (per via microbiologica)
Germi patogeni	*Salmonella, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens, Listeria monocytogenes*

INFEZIONI ALIMENTARI

La **tubercolosi** è causata dal *Mycobacterium tuberculosis* o **bacillo di Koch (BK)**, dal nome del medico e batteriologo tedesco che lo scoprì nel 1882 e da altre specie affini di micobatteri alcool-acido resistenti. Nella maggior parte dei casi interessa i polmoni, in quanto si trasmette attraverso goccioline di saliva emesse dal malato, i colpi di tosse, gli sputi e gli starnuti. Se non viene trattata tempestivamente, la tubercolosi può diffondere in altre parti del corpo (ossa, SNC) attraverso il sangue. L'ambiente domestico è la sede più comune di contagio, soprattutto in condizioni di sovraffollamento, inadeguato ricambio d'aria e condizioni

La dimostrazione di questi microrganismi ha tratto notevole vantaggio dalle tecniche di biologia molecolare (PCR), sostituendo in parte i metodi tradizionali di coltura.

igieniche precarie, per cui rimane una piaga nei paesi più poveri. Esiste tuttavia un'altra fonte d' infezione: il **latte bovino** infetto consumato non pasteurizzato ed i relativi sottoprodotti (**formaggi** da latte crudo). L'agente eziologico è in questo caso il *Mycobacterium bovis*, eliminato con il latte dall'animale affetto da mastite. Oggi fortunatamente in Europa questa evenienza è del tutto eccezionale, sia per effetto della profilassi anti-tubercolare sui bovini (mediante il *test* della tubercolina) che per i controlli veterinari sugli allevamenti. Inoltre, efficaci processi di pastorizzazione sono entrati nelle pratiche produttive a garanzia di quasi tutti i derivati del latte.

Il *test* della tubercolina si basa su un fenomeno di ipersensibilità ritardata scoperto da Koch nel 1890 in seguito all'inoculazione intradermica nella cavia di bacilli uccisi col calore. Attualmente questo allergene è un estratto purificato di micobatteri chiamato PPD, *Purified Protein Derivative* messo a punto nel 1930 dalla biochimica americana Florence Seibert che sta alla base del *test* omonimo ideato da Charles Mantoux nel 1907 (nella foto la misurazione dell'ispessimento della cute 48-72 ore dopo l'inoculazione della tubercolina PPD nel bovino).

La **brucellosi** è una zoonosi nota anche come **febbre maltese**, **febbre mediterranea** o **febbre ondulante** provocata da batteri Gram-negativi aerobi del genere *Brucella* - in particolare delle specie *melitensis*, *abortus* e *suis* - che si trasmettono dagli animali (soprattutto ovicaprini, bovini e suini) per via diretta o indiretta.

L'uomo può contrarre la brucellosi nelle stalle per contatto diretto con l'animale infetto, con le sue deiezioni o con i prodotti dell'aborto. Interessa categorie professionali come allevatori, veterinari e macellai.

La trasmissione avviene per via cutanea attraverso piccole abrasioni (ad esempio durante la mungitura o l'assistenza al parto), la mucosa congiuntivale o per via respiratoria. Più comunemente, la brucellosi si può trasmettere per ingestione di alimenti infetti, come **latte** fresco non **pastorizzato** e derivati (**formaggi freschi**, **gelati**, **panna e burro**).

Questa malattia è quasi scomparsa nei paesi più progrediti, sia per i trattamenti termici del latte (le brucelle vengono rapidamente uccise dal calore a 60-70°C per 10 minuti) che per la profilassi negli allevamenti attraverso la ricerca degli anticorpi e la vaccinazione con il ceppo *B. abortus* Buck 19, prodotto in biomassa coi fermentatori (*foto IZS-Brescia*).

Dal 2005 la presenza di ***Listeria monocytogenes*** negli alimenti è normata dal Regolamento CE 2073/2005 (modificato nel 2007 dal Regolamento n° 1441) che contempla criteri di tolleranza (<100 u.f.c./g) in determinate derrate. Per queste ragioni il conteggio in piastra su terreno selettivo rimane fondamentale (nelle foto, da sinistra a destra, le colonie di *L.m.* su ALOA, PALCAM e Oxford Agar.

La **listeriosi** è sostenuta da batteri Gram-positivi del genere *Listeria* (specie *monocytogenes* e *ivanovii*) ubiquitari e ampiamente diffusi nel terreno, nei foraggi, nelle acque di superficie e nelle feci. La caratteristica più importante di questo microrganismo è la **capacità di adattarsi e moltiplicarsi in condizioni sfavorevoli di temperatura** (0-45°C), di pH (4,4-

9) e di concentrazione salina (15-20%). Resiste inoltre all'essicamento e al congelamento. Si annida nei frigoriferi domestici poco puliti. Non sopravvive all'ebollizione e alla pasteurizzazione a +63°C per 30 minuti o a +72°C per 15 secondi. L'uomo contrae la listeriosi principalmente attraverso il **consumo di cibi contaminati (carica minima infettante 10^4) anche se** non vanno sottovalutate altre modalità di trasmissione, tra cui quella **verticale (madre-figlio) o** attraverso **contatto diretto con animali infetti** (bovini, suini, ovi-caprini). Fra gli alimenti, carni, formaggi, prodotti ittici e vegetali pronti al consumo sono contaminabili da *Listeria* sia a livello di materie prime che ambientale (frigoriferi, piani di lavoro). Le **persone più sensibili** alle infezioni da *Listeria* sono gli anziani, le donne in gravidanza, i neonati e le persone con *deficit* del sistema immunitario (trapiantati, pazienti oncologici, malati di AIDS).

La procedura per la ricerca di presenza/assenza della *Listeria monocytogenes* negli alimenti può seguire il protocollo dell'*International Standard Organisation* (ISO) o altri metodi equivalenti.

RICERCA *LISTERIA MONOCYTOGENES* (ISO 11290)	
PRE-ARRICCHIMENTO = Campione 1:10 in HALF FRASER BROTH*	
Piastre ALOA e PALCAM	ARRICCHIMENTO = 1+9 ml FRASER BROTH
ISOLAMENTO COLONIE SU TSYEA	Piastre ALOA e PALCAM
	ISOLAMENTO COLONIE SU TSYEA**
CONFERMA BIOCHIMICA E SIEROLOGICA	

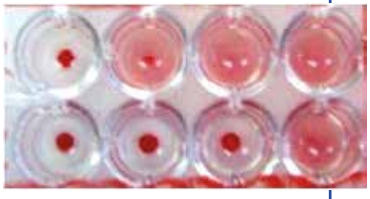
* Incubazione 24 ore a +30°C, tutti gli altri a +37°C.
** Tryptic Soy Yeast Extract Agar.

NOTA TECNICA SULLE PROVE DI IDENTIFICAZIONE DI *L.M.*

Fra i *test* di conferma delle colonie sospettate *Listeria monocytogenes* ne esistono due particolarmente efficaci, che mettono in evidenza la proprietà dell'emolisi propria di questo germe:

• Prova rapida dell'emolisi che può essere allestita come segue:

In due pozzetti con fondo a U di una piastra *microtiter* sterile (capacità 250 mcl) introdurre 50 mcl di una brodocoltura del ceppo in esame coltivato per 18 ore a +37°C e 100 mcl di una sospensione di globuli rossi di pecora allo 0,25 % (in soluzione di Alsever). Affiancare all'esame altri due pozzetti – come controllo negativo – contenenti brodo sterile e sospensione di globuli, usando le stesse quantità di cui sopra. Coprire con coperchio e incubare in termostato per 2 ore a +37°C.



Nell'immagine:
Emolisi negativa (precipitato a forma di bottone rosso) nei pozzetti A1 – B1 – B2 - B3.
Emolisi positiva (intorbidamento uniforme) nei rimanenti pozzetti A2 – A3 – A4 - B4.

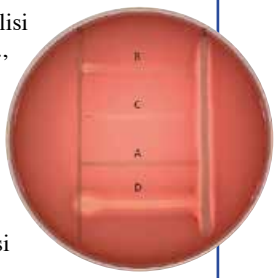
• *Test* di CAMP (vedi anche APPENDICE)

CAMP è *un acronimo derivato dalle iniziali di Christie, Atkins, Munch-Petersen e introdotto per la prima volta nel 1944 da questi tre Ricercatori che applicarono la prova all'identificazione degli streptococchi di gruppo B.*

In sostanza, in questa prova *in vitro* solo *Listeria monocytogenes* è capace di "esaltare" la rottura dei globuli rossi del sangue che *Staphylococcus aureus* (suo "*partner*") non riesce a completare. Un terzo microrganismo (*Rhodococcus equi*), posto nelle vicinanze, sinergizza anch'esso l'emolisi, ma di altre specie di listerie.

Nel punto di maggior vicinanza fra *L.m.* e *S. aureus* si produce una zona d'emolisi completa, trasparente, a forma di "punta di freccia rovesciata" (*Althage e Coll.*, 1992; *Fernandez-Garayazabal e Coll.*, 1996).

Il fenomeno di CAMP (mai completamente spiegato) **non è da ritenere un indice certo di virulenza** per *L.m.*, ma comunque collegabile con il possesso di geni considerati corresponsabili della patogenicità dei ceppi.



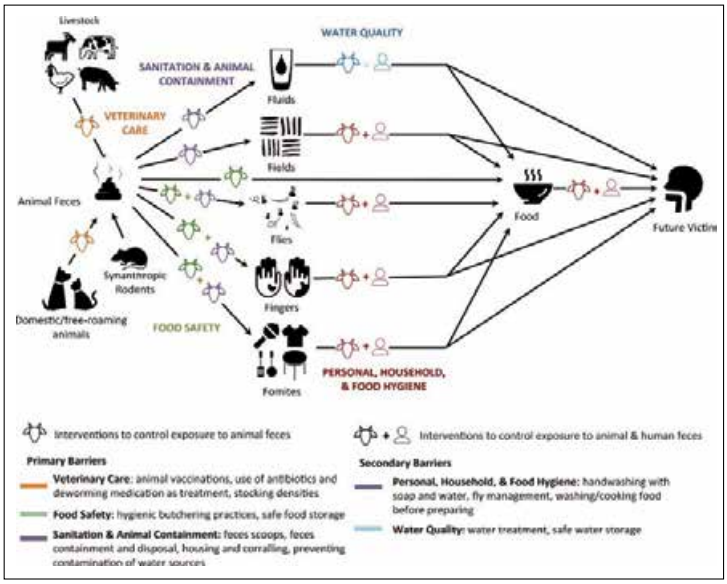
A *Listeria innocua* = Nessuna attività emolitica
B *Listeria monocytogenes* = S^+/R^-
C *Listeria seeligeri* = S^-/R^- (ß-emolisi lungo lo striscio ma assenza di emolisi sinergica all'intersezione con i ceppi ATCC)
D *Listeria ivanovii* = S^-/R^+

Su una piastra di Agar sangue (contenente globuli rossi di pecora) vengono strisciati in senso verticale i due ceppi protagonisti del *test*:

R = *Rhodococcus equi* (ATCC 6939) **nello striscio verticale a sinistra**
S = *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) **nello striscio verticale a destra**

In mezzo vengono seminati (perpendicolarmente ai precedenti) i ceppi sospettati *L.m.*, tenendoli distanziati di alcuni mm dagli strisci di *Rhodococcus equi* e *Staphylococcus aureus*.

INTOSSICAZIONI E TOSSINFEZIONI DA BATTERI NEGLI ALIMENTI



In questo schema i vettori dei possibili agenti eziologici iniziano in inglese tutti per "F", equivalenti, in italiano a: ***feci, dita delle mani, insetti, terreno, liquidi, ricettacoli di sporco***, fino a giungere agli ***alimenti***.

The "F-diagram" (**feces**, **fingers**, **flies**, **fields**, **fluids**, **fomites**, **food**), showing pathways of fecal–oral disease transmission. The vertical blue lines show barriers: **toilets**, **safe water**, **hygiene** and **handwashing**.

Gastro-enteriti batteriche	
Quadro clinico-patologico	*Microrganismo responsabile*
DIARREA	*Escherichia coli* enteropatogeni (EPEC) *Escherichia coli* enterotossici (ETEC) *Salmonella* *Shigella* *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* *Vibrio*
DISSENTERIA	*Escherichia coli* enteroinvasivi (EIEC) *Escherichia coli* enteroemorragici (EHEC) *Yersinia enterocolitica* *Campylobacter jejuni* *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides*

Un quadro riassuntivo che mette in relazione i tempi d' insorgenza e l'agente eziologico può essere il seguente:

Incubazione	**Agente Eziologico**	**Sintomi**	**Alimenti**
1-6 ore	*S. aureus*	nausea, vomito, crampi addominali, ipotermia	gastronomia, dolci, piatti cotti pronti manipolati e conservati non refrigerati
	B. cereus (tossina emetica)	attacco acuto di vomito	riso o vegetali cotti conservati non refrigerati e successivamente riscaldati
12-24 ore	*Salmonella, E. coli EPEC, ETEC, EIEC, Vibrio parahaemolyticus*	diarrea, febbre, dolori addominali, talvolta vomito	cibi crudi o manipolati dopo cottura
	Clostridium perfringens, Bacillus cereus (tossina diarroica)	diarrea, dolori addominali	cibi precotti, non refrigerati e riscaldati inadeguatamente
18-36 ore	*Clostridium botulinum (tossina preformata)*	vertigini, mal di testa, diplopia, secchezza delle fauci	conserve a basso grado di acidità, sott'olio o sottovuoto o inadeguatamente sterilizzate
12-72 ore	*Aeromonas hydrophila*	diarrea, gastroenterite	pesci, crostacei, molluschi
24-36 ore	*Yersinia enterocolitica*	dolori addominali, febbre, cefalea, diarrea, vomito	carni crude o poco cotte, latte
1-3 giorni	*Shigella*	diarrea, feci con sangue, febbre, vomito, dolori addominali	crudi o manipolati dopo cottura
	Vibrio cholerae	diarrea acquosa, vomito, disidratazione	contaminati da acqua infetta, prodotti ittici crudi

Incubazione	Agente Eziologico	Sintomi	Alimenti
3-21 giorni	*Listeria monocytogenes*	simil-influenzali	latte e formaggi non pasteurizzati, carni crude, vegetali crudi
fino a 30 giorni	*Brucella*	febbre, sudorazione, mialgia, splenomegalia	latte e formaggi freschi non pasteurizzati
oltre 30 giorni	*Mycobacterium tuberculosis*	tubercolosi ghiandolare	latte non pasteurizzato

Scambi commerciali, alimenti e microbi

UN ESEMPIO

La Serenissima Repubblica di Venezia – da Marco Polo in poi – è stata la dominatrice degli scambi con l'Oriente, governando per 130 anni il traffico delle spezie dalla Cina e dall'India fino al Mediterraneo. Su veloci velieri da 45 metri iniziarono ad arrivare in Europa cibi poco o per nulla conosciuti, ciascuno **portatore di microrganismi spesso diversi** da quelli del posto, **patogeni compresi.**

Nel 2020 nascerà una nuova rotta commerciale fra la Cina e Trieste per iniziativa del presidente Xi Jinping, rinnovando l'importanza degli scambi via mare, come ai tempi della famosa "*Via della seta e delle spezie*".

Il porto di Trieste, futuro *hub* commerciale della rinnovata "via della seta e delle spezie" / un tre-alberi d'eccezione, ricostruzione dei velieri d'epoca (la "Vespucci", ancorata in Riva degli Schiavoni a Venezia) / un cargo in navigazione.

Escherichia coli

Sono germi a trasmissione oro-fecale, localizzati in prevalenza nell'intestino dell'uomo e degli animali. Veicoli d'infezione sono: latte e formaggi non pasteurizzati, carni bovine non cotte, cibi esotici, spezie, insalate non lavate, acque non potabili.

UN TERRENO NELLA STORIA DEL COLI

Alfred Théodore **MacConkey** era un batteriologo britannico (1861-1931) laureato a Cambridge che studiò per tutta la vita le malattie intestinali e il problema dello smaltimento dei liquami di Liverpool, inventando nel 1905 il terreno che porta il suo nome. Le colonie rosse circondate da un alone rosso sulla piastra appartengono ad *Escherichia coli*.

La scoperta di questo germe risale al 1886 ad opera di **Théodore Escherich** (1857-1911), un pediatra tedesco.

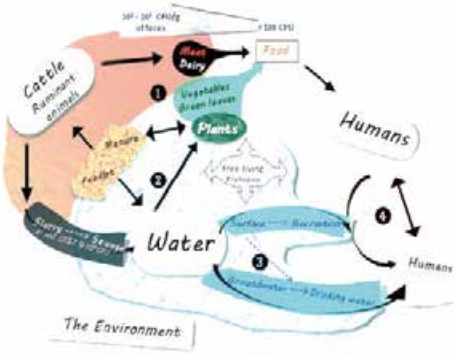
ENTERO-PATOGENI (EPEC)
Sono importanti nelle diarree infantili.

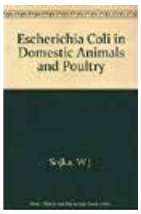
ENTERO-TOSSICI (ETEC)
Li chiamano anche "*coli della diarrea dei viaggiatori*". Producono una **tossina termolabile** (LT), simile a quella del colera, che causa diarrea per attivazione di una adenilato-ciclasi, e una **tossina termostabile** (ST) che attiva la guanilato-ciclasi, stimolando la secrezione intestinale. Queste tossine possono essere ricercate con *test* ELISA.

ENTERO-INVASIVI (EIEC)
Invadono la mucosa intestinale e si moltiplicano all'interno delle cellule.

ENTERO-EMOLITICI (EHEC)
Questi ceppi sono provvisti di organi di adesione particolari (fimbrie: CFA nell'uomo, F41 e K99 negli animali). Danno una colite emorragica diarroica oppure una sindrome emolitico-uremica (HUS) con tombocitopenia, anemia emolitica, insufficienza renale acuta. A questo gruppo appartiene il sierotipo **O157:H7**, un patogeno che, a differenza degli altri coli, non fermenta il lattosio e viene pertanto ricercato su MacConkey Sorbitol Agar (SMAC). I coli EHEC formano due **tossine** (verotossine o shigatossine, VT1 e VT2) simili a quelle delle Shigelle, che possono essere ricercate con *test* ELISA.

Un *test* biochimico tradizionale per differenziare *E. coli*, la formazione di indolo. dalla degradazione del triptofano. La positività del *test* è indicata dalla colorazione rossastra, in seguito alla reazione con p-dimetil-amino-benzaldeide aggiunta dopo l'incubazione. Fu messo a punto da un veterinario ungherese, **Erwin Kovacs** (1927-2010) che ha dato il nome al reattivo.





Due Veterinari, centinaia di pubblicazioni su *E. coli:*
W. J. Sojka, *Research Officer*, *Central Veterinary Laboratory*, *Weybrid*ge, Inghilterra
J. Nicolet, *Veterinary Institute of Bern University*, Svizzera

Nota tecnica - Conteggio di *Escherichia coli* negli alimenti

Un esempio fra i terreni maggiormente in uso oggi

I substrati cromogeni rivelano colonie blu di *E. coli* e rosa-rosse di enterobatteri in genere dopo incubazione di 24 ore a +37°C (Rebecca®EB BioMérieux)

Per l'analisi, 10 g o ml del prodotto, prelevati sterilmente, vengono introdotti in un sacchetto da Stomacher® con filtro ed omogeneizzati per 1-2' assieme a 90 ml di diluente (soluzione di Ringer ¼ concentrata).
Le opportune diluizioni decimali nello stesso diluente vengono poi seminate ciascuna con spatole a L (in superficie a 0,1 ml) in doppio su piastre del terreno selettivo scelto.

Hamburger sì o no?

Da più parti il *fast-food* è stato visto come l'antitesi (negativa) alla dieta mediterranea, tanto da essere etichettato "*junk-food*", cioè cibo-spazzatura. Addirittura era stato coniato lo *slogan*: "Meglio non mangiare cibo da *fast-food*" e al menù-base (*hamburger*+patatine) venivano imputate conseguenze gravi sulla salute.

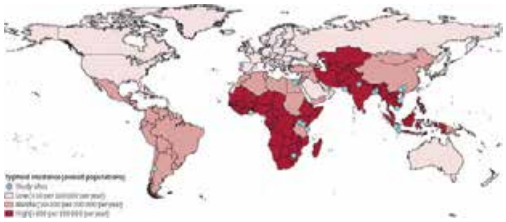
Il *fast-food* è un'alternativa veloce alla cucina casalinga, è poco costoso, ma l'eccesso di calorie e grassi saturi contenuti negli *hamburger* potrebbe portare all'obesità. Un ulteriore appunto sulle tanto amate patatine "*chips*" deriva dal fatto che vengono spesso fritte con olio di *mais*, contenente alte quantità di acidi grassi saturi. Questo farebbe crescere la concentrazione di colesterolo nel sangue.
Ad aggravare il giudizio negativo già pesante, alcuni episodi di avvelenamento alimentare da ***Salmonella*** e da ***Escherichia coli* O157:H7** attribuiti a carni macinate **non cotte sufficientemente** nei *fast-food*.
Come comportarsi? Non occorre demonizzare troppo questo tipo di alimentazione. È la sua frequenza, infatti, il vero problema. Se rimane un'eccezione, non c'è da preoccuparsi. Sembrerebbe anzi che l'umore ne possa beneficiare in positivo…
Oltretutto, sotto il **profilo igienico-sanitario**, la filiera delle carni che ci riguarda (carni di esclusiva provenienza italiana) è la più controllata d' Europa per merito dei Veterinari che operano nei macelli e nelle aziende di trasformazione. Non a caso, in Italia esiste dal 1928 un Regolamento di Polizia Veterinaria per la Vigilanza sanitaria sulle carni preso a modello da tutto il mondo, aggiornato nel DPR dell'8/2/1954 n. 320.

Salmonella

Dal 1885, quando un assitente del veterinario D.E. Salmon nel New Jersey (USA) scorpì questo germe, il capitolo delle salmonelle è diventato il più ricco di indagini e di statistiche di tutta la batteriologia. Difatti esso investe lo studio di una grossa famiglia, le Enterobatteriacee. Sarebbe sufficiente vedere le segnalazioni di nuovi sierotipi isolati in poco più di un secolo da disparate fonti animali e vegetali, riassunti nello schema di Kauffmann-White, il "catalogo" delle salmonelle, per rendersene conto.

Il tifo, una malattia a sé

Nella febbre enterica causata da ***S. Typhi*** bastano 100-1.000 cellule portate da cibi, acqua, feci umane; l'incubazione dura da 5 a 20 giorni. Si tratta di una malattia acuta sistemica con batteriemia, febbre a +40°C, brividi e cefalea. Le complicanze possibili sono polmoniti, endocarditi, emorragie intestinali con interessamento di fegato e milza. Si formano anticorpi e lo stato di portatore può durare tutta la vita. Una sindrome simile, ma meno severa, è sostenuta da *S. Paratyphi A,B,C*.



Può causare enteriti e setticemie, anche se le forme diarroico-dissenteriche, interessando ileo e colon, sono le più frequenti. Ha un'incubazione di 24-48 ore, presentandosi con dolori, febbre, talvolta vomito. La malattia è generalmente localizzata all'intestino. Forma una tossina termolabile. Non provoca immunizzazione. Infezioni generalizzate si verificano in bambini e anziani. L'eliminazione avviene con le feci per alcune settimane (stato di portatore). Si conoscono più di 2.500 sierotipi, diversi per antigeni somatici (O) e ciliari (H). Non tutti i sierotipi sono patogeni. Quelli adattati ad ospiti specifici (come S. *Cholerae-suis* nei suini e S. *Gallinarum-pullorum* nei volatili) se infettano l'uomo danno gravi malattie ad evoluzione setticemica. Alcuni ceppi si sono dimostrati antibiotico-resistenti (*Salmonella Enteritidis* PT4 e *Salmonella Typhimurium* DT104).

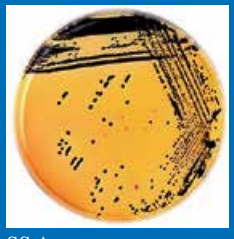
Si trova dappertutto, ma in particolare in **pollame, suini e vitelli.** Diffonde in particolare dall'intestino animale al momento dell'eviscerazione e per il pollame alla spennatura. **I cibi più contaminati sono: verdure irrigate con liquami, derivati delle uova, insaccati non stagionati.**

Nelle cucine si trasmette per insufficiente cottura, contaminazione crociata crudo-cotto, conservazione in frigo a temperatura non corretta. Si moltiplica fra +7°C e +45°C, ha un *optimum* a +37°C. Non sopravvive alla pasteurizzazione.

Nota tecnica

Nello stesso tempo sono stati inventati terreni e procedure per favorire la coltura di questo germe, ad esempio innalzando la temperatura d'incubazione. Dalla mole di lavoro di illustri ricercatori (Mossel, Kampelmacher, Preuss e tanti altri) sono nati i "*pre-arricchimenti*", cioè brodi destinati a rivitalizzare le salmonelle stressate e gli "*arricchimenti*", altri terreni liquidi contenenti sostanze chimiche contro la flora concorrenziale. Fra i primi si contano il Brodo Lattosato e l'Acqua Peptonata Tamponata, nei secondi il Müller-Kauffmann, il Brodo Selenito e il Rappaport-Vassiliadis.

Selenite Broth



SS Agar

Kligler Iron Agar

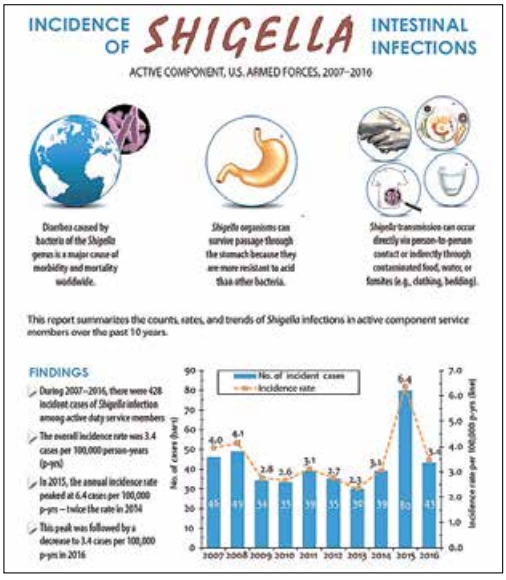
Agglutinazione rapida

L'esame colturale continua naturalmente su terreni "selettivi solidi", sempre in coppia per aumentare le probabilità di isolamento delle salmonelle. Tutti i laboratori hanno visto sfilare sui banchi le piastre di Gassner, di Agar Verde Brillante, di SS Agar (*Salmonella-Shigella, nella foto*) oppure di Hektoen Enteric Agar. Fino ai più moderni terreni *cromogeni* (Chromocult ®) o *fluorogeni* (Fluorocult®) caratterizzati da suggestivi colori delle colonie batteriche. Qui solo i germi che possiedono un enzima caratteristico (ad esempio, una certa glucuronidasi) si colorano in maniera differenziale.

Test biochimici

Un esempio di percorso analitico (ISO 6579) per la ricerca delle salmonelle in campioni di alimenti prevede la semina di 25 grammi del prodotto omogeneizzato entro 225 ml di brodo di pre-arricchimento (acqua peptonata tamponata). Dopo 18 ore a +37°C si ha il passaggio in due brodi di arricchimento da incubare per altre 24 ore (Rappaport-Vassiliadis a +42°C e Müller-Kauffmann a +37°C). Le successive piastrature offrono, come si è detto, ampia scelta di terreni (XLD e un secondo terreno selettivo) che consentono di apprezzare le eventuali colonie sospette dopo ulteriori 24 ore a +37°C. Da qui è possibile l'isolamento in coltura pura su Kligler Iron Agar che fornirà materiale sufficiente, dopo 18-24 ore a +37°C, per le conferme biochimiche e sierologiche (sieri polivalente anti-salmonella e anti-O e anti-H per agglutinazione rapida).

La shigellosi è malattia tipicamente pediatrica, perché il 70% dei casi riguarda comunità con soggetti fra 1 e 15 anni. L'incubazione è di 1-2 giorni. Si accompagna a dolori addominali, febbre, crampi, tenesmo. Si manifesta con disenteria e frequenti evacuazioni di volume ridotto rispetto alla diarrea liquida, ma con pus e sangue, conseguenti ad infiammazione della mucosa, essendoci produzione di citotossine seguita da invasione dell'epitelio. Prototipo è la *S. dysenteriae*, scoperta nel 1897 da **Kiyoshi Shiga**, batteriologo giapponese (1871-1957). Altre specie sono *flexneri, boydii, sonnei*.

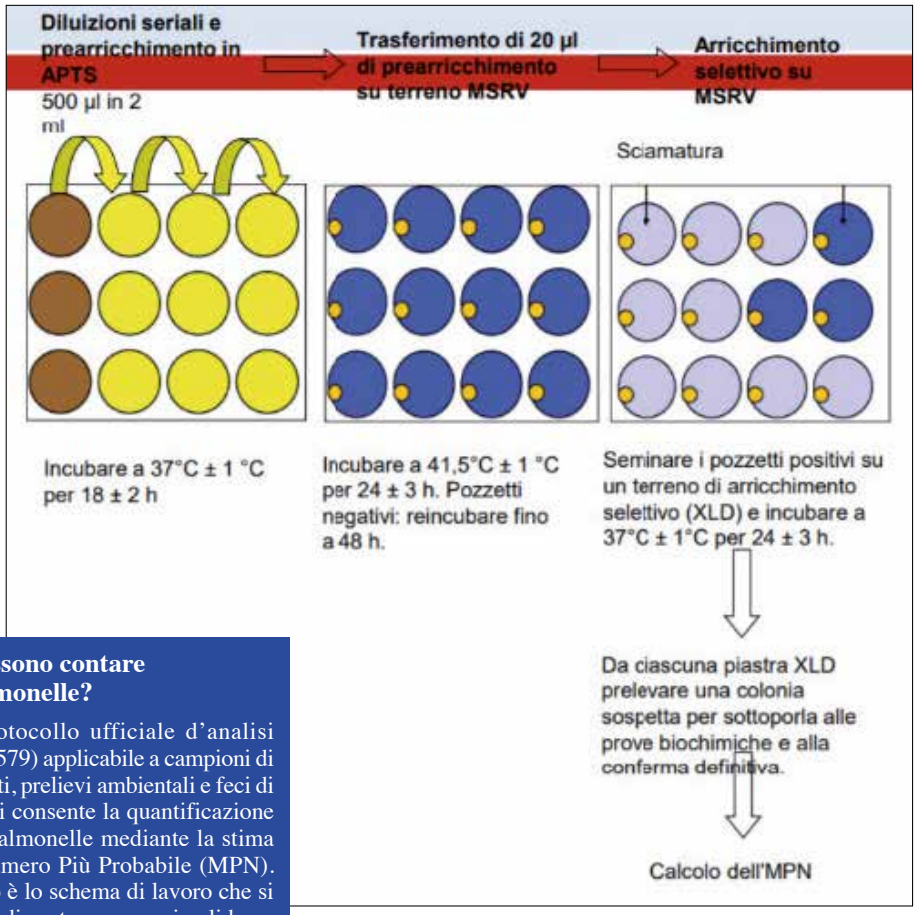


Serbatoio unico è l'uomo. Veicoli d'infezione sono le feci dei portatori, le acque reflue, le verdure concimate, il latte contaminato non pasteurizzato.

Shigella è un Gam-negativo immobile (provetta a destra) a differenza delle salmonelle e dell'*Escherichia coli*.

A somiglianza di altri enterobatteri, *Shigella* possiede geni che la rendono resistente ai succhi gastrici e geni che promuovono l'invasione delle placche di Peyer nell'intestino tenue (come i coli entero-invasivi, EIEC). Queste proprietà la rendono molto aggressiva.

La ricerca qualitativa delle shigelle (in 25 g di materiale) segue le modalità previste per *Salmonella*.

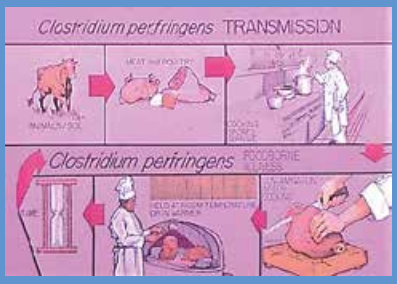


Si possono contare le salmonelle?

Un protocollo ufficiale d'analisi (ISO 6579) applicabile a campioni di alimenti, prelievi ambientali e feci di animali consente la quantificazione delle salmonelle mediante la stima del Numero Più Probabile (MPN). Questo è lo schema di lavoro che si avvale di un terreno semi-solido su cui si può apprezzare la sciamatura delle salmonelle, che sono microrganismi mobili (da IZS Venezie, 2014).

In Italia il controllo degli alimenti è affidato principalmente alle seguenti istituzioni: Servizi d' Igiene degli Alimenti e Nutrizione delle A.S.L., Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale (ARPA), Uffici territoriali del Ministero (P.I.F., U.V.A.C. e U.S.M.A.F.), Comando Carabinieri per la Tutela della Salute (NAS), Ispettorato centrale per il controllo della qualità dei prodotti agroalimentari. Nei disegni: la sede centrale di Brescia dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna.

Clostridium perfringens



Il suo nome deriva dal verbo *frangere* che in latino significa *rompere in pezzi*; è presente nella flora intestinale dell'uomo e di animali domestici (cani, maiali a concentrazioni molto elevate).

Le enterotossine prodotte da *Clostridium perfringens* possono scatenare un'intossicazione - normalmente non pericolosa - dopo l'ingestione di cibo contaminato. Il patogeno, dopo un tempo d'incubazione variabile da 8 a 16 ore dall'assunzione dell'alimento infetto (che deve contenere almeno 10^6 spore/g) mostra sintomi tipicamente gastrointestinali (diarrea e crampi addominali): per questo motivo, si parla di enterite da *Clostridium perfringens,* un'infiammazione intestinale che tende ad autorisolversi in poche (24) ore.

Altrimenti conosciuto come *Clostridium welchii*, il *Clostridium perfringens* è un bacillo Gram-positivo la cui scoperta risale al 1880.

Presenta una forma a bastoncino con estremità squadrate, è un microorganismo flagellato, dunque mobile, e solo raramente capsulato; è sporigeno ed anaerobio (vive in assenza di ossigeno).

I batteri della specie *Clostridium perfringens* sono in grado di ridurre i solfiti in solfuri, e produrre spore stabili nell'ambiente e termoresistenti . L'infezione da *Clostridium perfringens* è trasmessa all'uomo tramite ingestione di alimenti contaminati, soprattutto **carni, pollame e pesci**.

A seguito della preparazione, se l'alimento rimane a lungo a temperatura ambiente, le spore, producendo tossine, possono originare nuove forme vegetative: precisamente, subito dopo l'ingestione, le spore germinano nel tratto digerente dell'ospite, sintetizzando appunto una nuova tossina. Gli effetti della tossina originata all'interno dell'organismo, sommati a quelli della tossina preformata (all'interno dell'alimento) scatenano la tossinfezione da *Clostridium perfringens*.

La ricerca delle tossine (*alfa, beta, epsilon* le principali) nell'alimento è fattibile con ***Reverse Passive Latex Agglutination Test*** oppure nelle feci con un *test* in **ELISA** (molto utile nei casi di enterotossiemia degli animali domestici e nelle enteriti necrotizzanti dell'uomo).

La determinazione nelle acque è un parametro importante per la valutazione di inquinamento fecale remoto o intermettente, essendo le spore di *Cl. perfringens* più resistenti nell'ambiente rispetto ai classici indicatori fecali (coliformi, *E. coli*, enterococchi). Un terreno contenente cicloserina e 4-MUP permette al *Cl. perfringens* di idrolizzare questa sostanza attraverso l'enzima fosfatasi, con produzione di 4 metilumbelliferone, che rende fluorescenti le colonie sotto lampada di Wood (luce ultravioletta a 366 nm). L'incubazione delle piastre seminate con le membrane di filtrazione avviene in anaerobiosi (sacca AnaeroGen™ OXOID) a +44°C per 24 ore (TSC Agar MUP®, BIOLIFE ITALIA).

Clostridium botulinum

Anaerobio, Gram-positivo, presente nel suolo e nell'intestino di vari animali (anche dei pesci) in forma di spore. La temperatura ideale di moltiplicazione è di 18-25°C con pH da 4.6 a 9.0. Contamina di preferenza conserve preparate in casa (spesso sott'olio) contenenti verdure, carne, tonno, salse (pesto) e anche il miele. **Le spore, che resistono fino a 121°C per 3 minuti**, non vengono distrutte dalla semplice ebollizione dell'alimento, ma germinano nell'intestino dando forme vegetative accompagnate da liberazione di tossine (di 7 tipi, la più pericolosa è la A), **tra le più potenti sostanze velenose conosciute**. A differenza delle spore, **le tossine sono termolabili** e vengono inattivate dopo 5 minuti a 100°C. Non sono a rischio le conserve acide (salsa di pomodoro, sottaceti), ricche di zucchero (marmellate), sotto sale (capperi, olive, acciughe).

Poche ore dopo l'ingestione compaiono i primi sintomi gastro-intestinali (nausea, vomito, diarrea, dolori addominali). Entro 24-72 ore si hanno cefalea, disturbi della vista, secchezza delle mucose, difficoltà a deglutire. Nelle forme più gravi si può arrivare in 2-3 giorni a paralisi dei muscoli respiratori.

La diagnosi di laboratorio non è facile. Consiste nell'isolamento del clostridio contemporaneamente dall'alimento sospettato e dai campioni biologici (feci, vomito) prelevati dal paziente con sintomatologia indicativa, seguito da identificazione con PCR.

Secondo gli esperti, la diagnosi più sicura rimane la dimostrazione della tossina ottenuta dal *test in vivo* su topo (*mouse test*), che però richiede antitossine botuliniche e necessita di 3 giorni di analisi, anche se in alcuni casi positivi è possibile ottenere un risultato definitivo in 3-4 ore.

Sono stati proposti anche metodi alternativi in ELISA, che però sembrano non avere la sensibilità e la specificità richieste, soprattutto se applicati a matrici complesse (campioni fecali e alimentari).

La mappa indica le aree con i maggiori focolai di botulismo dal 1994 al 2010.

A fronte di un diminuito numero di casi di botulismo nell'uomo (da attribuire a maggiori conoscenze sui pericoli della malattia) sono invece in aumento i focolai negli uccelli acquatici. Colpiti sono soprattutto **germani reali**, **gabbiani** e **folaghe** che vivono lungo le coste marine e nei laghi. Uno dei vettori dell'infezione botulinica è una specie invasiva di chiocciola d'acqua (*Physa acuta*) che frequentemente trasporta il *Clostridium botulinum* al suo interno e di cui si nutre l'avifauna. La tossina responsabile è spesso di tipo C.

Bacillus cereus

Bacillus cereus è un batterio Gram-positivo ubiquitario. Tra gli alimenti più frequentemente coinvolti nelle intossicaioni vi sono cereali, carne trita e polpette, verdure e zuppe, derivati del latte, budini.

Soprattutto nelle cucine dei ristoranti, la pre-cottura ed il successivo mantenimento dell'alimento a temperature superiori a quelle di refrigerazione, per molte ore prima di una successiva e breve cottura, aumenta il rischio di gastroenteriti da *Bacillus cereus* in quanto la tossina emetica termostabile formatasi non viene distrutta dal successivo riscaldamento.

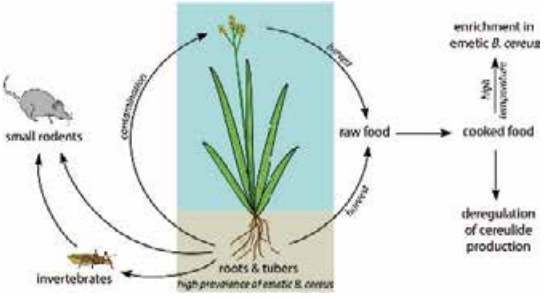
La sua moltiplicazione non avviene in alimenti acidi a pH <4.5 La cottura a +60°C uccide i batteri, ma non le tossine emetiche, che possono rimanere attive fino a 100°C.
Le colonie rosa-rosse circondate da alone più chiaro sono visibili su terreno cromogeno (tipo BACARA® BioMérieux)
Dopo 24 ore d' incubazione a +37°C.
La tecnica di conteggio è la stessa descritta per *E. coli*.

La gastro-enterite da *Bacillus cereus* si può manifestare con:

1. Una *forma emetica* (nausea e vomito, raramente diarrea, da una a sei ore dopo l'ingestione di alimenti contaminati con durata fino a 24 ore). Dipende da tossine preformate, già presenti nell'alimento, particolarmente resistenti al calore. Assomiglia all'intossicazione da *Staphylococcus aureus*
2. Una *forma diarroica* (coliche addominali, diarrea, nausea, raro il vomito) dopo 8 - 24 ore dall'assunzione dell'alimento fino a 24 ore. Dipende da enterotossine sintetizzate dal batterio nell'intestino.
   L'intossicazione da *Bacillus cereus* è conosciuta anche come "sindrome del riso cotto", vista in soggetti che avevano consumato piatti di riso lasciato riposare per ore a temperatura ambiente, raggiungendo cariche di 10^6-10^9 germi/g.

Alcuni ceppi possono svilupparsi a temperature di refrigerazione (4-6°C), ma la maggior parte cresce tra +15 e +55°C, con *optimum* a 30-37°C. Il pH adatto alla crescita di *Bacillus cereus* è compreso tra 5.5 ed 8.0.
Deve il suo nome all'aspetto ceroso che assume in coltura (ad esempio, su terreno selettivo MYP (nella foto) contenente polimixina.

La **tossina diarroica** del *Bacillus cereus* può essere ricercata con un ***Reverse Passive Agglutination Test (RPLA)*** sia su feci che su alimento.
La preparazione del campione per l'esame avviene attraverso omogeneizzazione, centrifugazione a 3.000 g per 20', filtrazione su membrana da 0.2 o 0.45 µm e allestimento di diluizioni al raddoppio (25 mcl+25 mcl) in apposito diluente entro i pozzetti a V di una piastra *microtiter*.
Dopo incubazione per 24 ore a +37°C, si osservano i risultati sia del campione che dei controlli positivi e negativi.

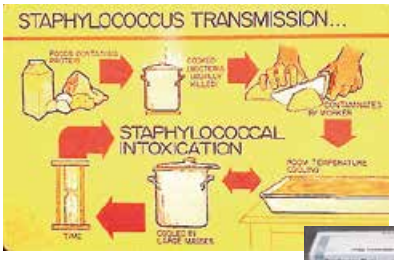


Staphylococcus aureus

Le **intossicazioni alimentari da *Staphylococcus areus*** sono caratterizzate, entro alcune ore dal consumo di cibo contaminato da ceppi produttori di enterotossina, da vomito, brividi, lieve rialzo termico e diarrea. Dipendono spesso da alimenti manipolati da persone con infezioni sulla pelle delle mani. L'alimento più a rischio rimane il **latte crudo** proveniente da vacche con mastite.
La bollitura e la pastorizzazione distruggono il microrganismo, ma non le sue tossine. Lo *Staphylococcus aureus* non cresce a temperature inferiori a 5-6°C e produce tossine soltanto a temperature superiori ai 12-13°C.
Riesce a svilupparsi anche in presenza di elevate concentrazioni saline (NaCl 7,5%) e di bassa umidità (carni lavorate, come prosciutto, salame, ecc). Oltre al latte e ai suoi derivati, sono i cibi ad alto contenuto proteico, come la carne, il pesce e le uova, a rappresentare i generi alimentari più a rischio di contaminazione da *Staphylococcus aureus*.

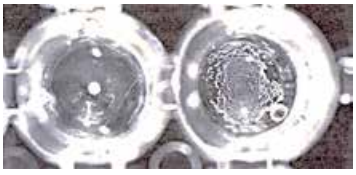
S. aureus al microscopio; le colonie su terreno selettivo (Baird-Parker Agar), molto usato per effettuare conteggi e su Agar sangue (sotto) dove è evidente l'emolisi. La tecnica di conteggio è la stessa descritta per *E. coli*.

Lo *Staphylococcus aureus* è un batterio Gram-positivo di forma sferica, asporigeno, che si dispone in ammassi, talvolta simili ad un grappolo d'uva. È un saprofita comune: colonizza soprattutto le mucose nasofaringee e può essere isolato anche a livello della pelle e delle sue ghiandole, più raramente nella vagina, nell'intestino e nel perineo. Lo *Staphylococcus aureus*, così chiamato per la colorazione dorata delle sue colonie in coltura, è il più virulento dei batteri appartenenti al genere degli stafilococchi ed è il più comune agente eziologico di infezioni piogeniche cutanee, quindi formanti pus, come foruncoli e ascessi. ma anche di patologie più gravi, come osteomielite, artrite settica, borsite, sindrome da *shock* tossico, polmonite, meningite ed endocardite. Provoca inoltre infezioni nosocomiali su pazienti sottoposti ad interventi chirurgici.
Alcuni ceppi producono tossine responsabili di due malattie: la *sindrome da shock tossico* e la *sindrome della cute pseudo-ustionata*, che colpisce soprattutto i bambini durante la primissima infanzia. La trasmissione avviene per via aerogena (tosse o starnuti), o per contatto diretto (mani).



Uno dei fattori di virulenza è dimostrabile con il "*clumping factor*", un *test* di agglutinazione rapida di particelle di lattice sensibilizzate verso la proteina A dello *S. aureus*.

La prova indiscutibile di patogenicità dello *S. aureus* rimane la dimostrazione della tossina nell'alimento.

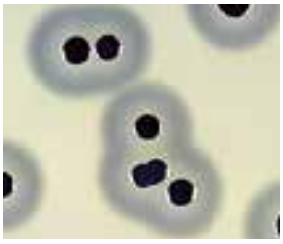


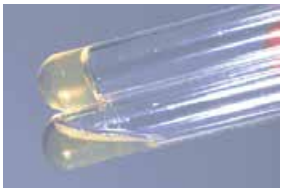
Nel *test* **Reverse Passive Latex Agglutination** particelle di polistirene sensibilizzate con antisieri prodotti su conigli iperimmunizzati con enterotossine A,B,C,D. vengono agglutinate se c'è la corrispondente tossina nel campione. La prova può avvenire nei pozzetti di una piastra *microtiter* (nella foto, a destra reazione positiva).
La sensibilità è pari a 1-2 ng/ml di estratto del campione.

NOTA TECNICA – Rilevazione delle enterotossine stafilococciche A-B-C-D-E (metodo immuno-enzimatico con sensibilità max 0.05 ng/ml)
Omogeneizzare 25 g o ml del campione + 40 ml H_2O distillata a +37°C e attendere 30 minuti
Aggiustare il pH a 3.5 con HCl 1 N (non scendere <3.0)
Centrifugare a 3130 g x 15 min.
Trasferire il soprastante in un *becker*. Controllare (e aggiustare) il pH fra 3.5 e 4.0
Portare il pH fra 7.5 e 8.0 con NaOH 1 N (non superare 9.0)
Centrifugare a 3130 g x 15 min.
Recuperare la fase acquosa
Concentrare mediante dialisi a 2-8°C per una notte
Recuperare l'estratto concentrato
Ricercare la tossina con un *kit* immuno-enzimatico
Lettura con spettrofotometro a 450 nm

Stafilococco aureo negli alimenti e patogenicità

Per lo stafilococco aureo sono considerati indici di probabile patogenicità l'**emolisi** e il possesso degli enzimi **lecitinasi**, **coagulasi**, **termonucleeasi**. La norma ISO 6888 è basata sulla **conta degli stafilococchi coagulasi-positivi**. L'analisi inizia con l'allestimento di una sospensione del campione 1:10 in diluente fisiologico, seguito dalla preparazione di opportune diluizioni decimali. Si seminano in superficie con ml 0.1 due piastre di ciascuna diluizione su Baird-Parker Agar, da incubare a +37°C per 48 ore.
Le colonie da conteggiare appaiono nere, del diametro di 1.5-2.5 mm, lucenti e convesse, circondate da un alone chiaro, che può essere parzialmente opaco, con o senza un anello opalescente a contatto delle colonie. La prova di conferma più comune è la **coagulasi (libera e legata***), in cui 0,1 ml di coltura in BHI (realizzata da trapianto di almeno 5 colonie tipiche su Baird-Parker) vengono miscelati con 0,3 ml di plasma di coniglio. Dopo incubazione a +37°C per 4-6 ore si forma – per effetto dell'enzima dello *S. aureus* - un coagulo aderente alla provetta (che può essere capovolta) in seguito alla trasformazione del fibrinogeno del plasma in fibrina. *Le foto mostrano gli effetti degli enzimi lecitinasi e coagulasi (sotto).*

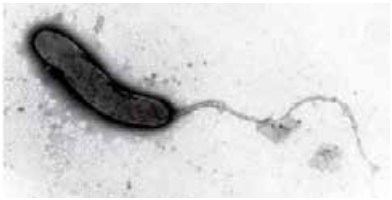




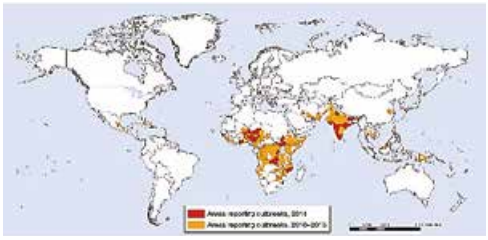
* La **coagulasi legata** o *clumping factor* si trova adesa alla parete cellulare. Si può rilevare con una prova di coagulazione mescolando una colonia batterica con una goccia di plasma su un vetrino portaoggetti.

Vibrio

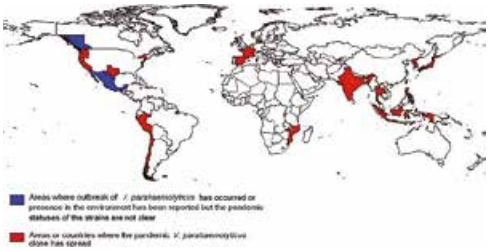
Nel genere *Vibrio* due sono i protagonisti: ***V. cholerae*** e ***V. parahaemolyticus***. Molte altre specie ad *habitat* marino possono causare tossinfezioni e sono dette **alofile** per la proprietà di sopportare alte concentrazioni saline (V. *alginolyticus, V. metschnikovii, V. fluvialis*, ecc). Si presentano come bastoncini Gram-negativi, mobili, di forma incurvata a virgola, anaerobi facoltativi.



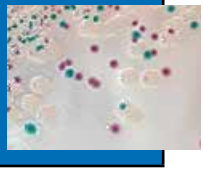
V. cholerae è stato scoperto da Filippo Pacini (1812-1883), anatomo-patologo toscano nel 1854.
I sierogruppi più pericolosi sono O1 o O139, biotipo El Tor, sierotipo Ogawa. Si moltiplica fra 10 e 43°C, *optimum* a +37°C e pH fra 5.0 e 9.6, *optimum* a 7.6. La dose infettante minima è 10^6. Dall'agglutinazione rapida su vetrino si può desumere l'appartenenza ai gruppi sierologici O1 /O139. I ceppi che non agglutinano vengono definiti NAG, di incerto potere patogeno.
La **dimostrazione della tossina** su coltura del ceppo isolato (un'endotossina termolabile identica alla tossina LT di *E. coli* enterotossici) è fattibile con un *test* di *Reverse Passive Latex Agglutination* (ad esempio, VET-RPLA Oxoid).



Il **colera** è una malattia infettiva acuta causata dal *Vibrio cholerae*, veicolata dall'**acqua** e da **alimenti contaminati (pesce, verdure)**. Colonizza l'intestino, dove aderisce all'epitelio con dei pili e produce una **tossina** che modifica l'assorbimento dell'acqua. L'incubazione va da poche ore ad alcuni giorni.
I sintomi sono **scariche massive di diarrea acquosa (detta "acqua di riso" per colore e odore)**, associata a vomito, rapida disidratazione e riduzione del peso corporeo con eventuali complicazioni (anuria, crampi muscolari, ipovolemia e **collasso cardiocircolatorio)**. In Europa il colera è una malattia di importazione. In Italia l'ultima importante epidemia risale al 1973 in Campania e Puglia. Nel 1994 si è verificata a Bari un'epidemia di limitate proporzioni.
V. parahaemolyticus è diffuso in tutti i mari, ma particolarmente pericoloso in Asia e nei paesi in cui esiste la tradizione del pesce mangiato crudo (assieme a verdure inquinate).



NOTA TECNICA – La coltura dei vibrioni inizia con la semina del materiale diluito 1:5 (feci) o 1:10 (alimento) in acqua peptonata alcalina (pH 8.6, NaCl 3%). Dopo 18-24 ore avviene la piastratura su terreno selettivo, che richiede altre 18-24 ore per mostrare lo sviluppo delle colonie. Per *V. cholerae* sono richieste due piastrature, la prima dopo 6 ore e la seconda dopo un secondo passaggio (ml 1+9) in acqua peptonata alcalina in termostato per altre18-24 ore. La temperatura d'incubazione è sempre +37°C.
Il terreno selettivo universalmente adottato per i vibrioni è il TCBS (tiosolfato-citrato-bile-saccarosio). *V. cholerae* mostra colonie giallastre, *V. parahaemolyticus* colonie verdi.
Su CHROMagar™ i vibrioni sviluppano colonie color malva (*V. parahaemolyticus*), verde/turchese (*V. cholerae* o *V. vulnificus*), incolori (*V. alginolyticus*).



Yersinia enterocolitica

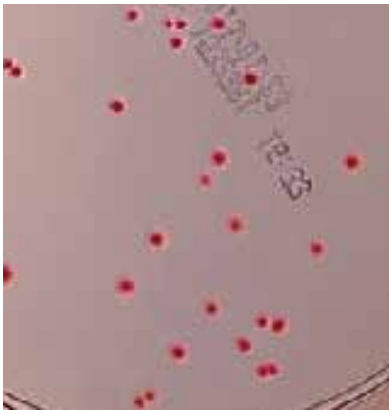
È un batterio bastoncellare Gram-negativo, simile agli enterobatteri, mobile a 30°C ed ubiquitario, che provoca enterocolite nell'uomo. Appartiene al genere *Yersinia*, in cui si trovano *Yersinia pestis, agente eziologico della peste bubbonica e Yersinia pseudotuberculosis*, un patogeno per gli animali selvatici e i roditori.

Cresce preferibilmente a 28-29°C con pH da 4.2 a 10, ma **anche a basse temperature (in frigorifero) e sopravvive per alcuni mesi in congelatore**.
Nella specie *Y. enterocolitica* si trovano solo alcuni sierotipi patogeni (specie O:8) per l'uomo e per gli animali (conigli, maiali, pecore, bovini, cani e gatti) per cui è considerata una zoonosi. Tra tutti, il suino rappresenta il "serbatoio" dal quale più frequentemente vengono isolati stipiti patogeni per l'uomo.
Nell'uomo *Y. enterocolitica* è responsabile di tossinfezioni alimentari, trasmesse da **carni suine crude o mal cotte**, **ostriche, latte non pasteurizzato** ed acqua.

Questo batterio invade i linfonodi mesenterici, causando adenite mesenterica ed ileite terminale, che può essere facilmente confusa con l'appendicite acuta. Raramente diffonde per via linfatica con casi di setticemia ed infezioni purulente a carico di vari organi (sistema nervoso centrale, fegato e polmoni). Le complicanze sono extra-intestinali infiammatorie (soprattutto artrite reattiva ed eritema nodoso). Il quadro clinico più frequente rimane la diarrea acuta (da enterite o da enterocolite) accompagnata da febbre, dolore addominale crampiforme e talvolta da nausea e vomito. In genere la malattia è autolimitante.

La diagnosi di yersiniosi avviene generalmente mediante l'esame diretto delle feci, poiché l'isolamento mediante coprocoltura è reso difficile dalla lenta crescita di *Yersinia enterocolitica* (le prove si rendono positive solo dopo più giorni). In alternativa, si possono fare indagini sierologiche per la ricerca di anticorpi specifici contro *Yersinia enterocolitica*, che compaiono precocemente e scompaiono entro 2-6 mesi.

Deve il suo nome a **Alexander Yersin** (1863-1943), un medico svizzero che scoprì l'egente causale della peste.
CIN Agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocina) è il terreno più usato per le ricerca qualitativa di *Y. enterocolitica*.



La tecnica di isolamento ha tempi lunghi: un arricchimento del campione omogeneizzato in Brodo di Rappaport incubato a temperatura ambiente per 48 ore, seguito da piastratura su CIN agar con lettura dopo altre 48 ore a +30°C

Un *test* per le tossine LT dei Gram-negativi

Cape Cod è un promontorio affacciato sull'Oceano Atlantico nello stato del Massachusett (USA) a 4 ore di macchina da New York. Vanta spiagge selvagge, abitate dalle foche. In primavera arrivano a deporre le uova nella sabbia le femmine di curiosi "granchi giganti" del diametro di 20-25 cm. Si chiamano *Limulus polyphemus* e sono artropodi, più vicini agli scorpioni che ai crostacei marini. Nel 1885 uno scienziato americano, Howell, ha scoperto che nel sangue di questi animali (usati anche per studi sulla fisiologia della visione) si trovano cellule speciali (gli *amebociti*) che contengono una particolare sostanza, capace di coagulare in presenza di tossine batteriche (lpopolisaccaridi) da germi Gram-negativi. Il *Limulus Amebocyte Lysate* è diventato il substrato di **un *test* col nome di LAL e può fornire anche risultati quantitativi. Viene usato per le acque e per il latte.**

Il reagente LAL viene mescolato in provetta al campione in esame e lasciato fermo ad una temperatura di 37°C ±1 per 60 ±2 min. Al termine, la provetta viene tolta dall'incubatore e capovolta di 180°. Se sul fondo della provetta si è formato un *gel* che rimane stabile dopo l'inversione, il *test* è positivo.

Il *Limulus polyphemus* oltre a fornire il suo "sangue blu" ai laboratori batteriologici, sarebbe in grado di inibire coi suoi amebociti il virus HIV. Ha ispirato nei cartoni animati uno dei Pokèmon e viene pure citato ad esempio del fallimento della teoria evoluzionistica, essendo un "fossile vivente" datato 4000 anni a.C. che non ha subito mutazioni. Però non si mangia, a differenza del moscardino (*Eledone moschata*), un mollusco cefalopode (anch'esso amante della sabbia) che si può gustare a Venezia (grigliato) da Vittoria, in riva al Canal Grande!

Campylobacter

Bacilli mobili a forma di bastoncino ricurvo o spiraliforme, non sporigeni, microaerofili, Gram-negativi, termofili (si moltiplicano fra 30 e 45°C, con optimum intorno a +42°C) e molto fragili nell'ambiente esterno (amano un pH fra 5 e 8), per cui non si trovano facilmente sulle superfici di lavoro delle cucine.

Causano infezioni da ingestione di alimenti , ma non è da escludere anche la trasmissione diretta da persona a persona per via oro-fecale ed hanno una dose minima infettante molto bassa, circa 500 cellule. La malattie è autolimitante, ma nei soggetti in età pediatrica oppure immunocompromessi possono verificarsi infezioni che coinvolgono altri tratti dell'apparato digerente (pancreatite, colecistite), le articolazioni (artrite reattiva) o il sistema nervoso (sindrome di Guillan-Barrè).

Tra le 15 specie conosciute, quattro si associano a malattie nell'uomo, più frequenti nei mesi estivi ed autunnali, specie nei bambini: *Campylobacter jeujini, Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* sono, in ordine decrescente, le specie che provocano infezioni intestinali con sintomatologia gastroenterica. *Campylobacter fetus* è invece responsabile di infezioni extra-intestinali nel neonato e nei soggetti immunocompromessi.

Si tratta di comuni commensali del tratto gastro-intestinale di molti animali a sangue caldo, sia selvatici che domestici (bovini, ovini, suini, cani, gatti, roditori, uccelli), per cui la campylobatteriosi è da considerare una zoonosi. La maggior parte delle infezioni deriva da bevande o cibi contaminati di recente da feci di animali portatori, tra cui gli animali d' affezione. Tra i cibi, nelle statistiche si trovano coinvolti**: latte non pastorizzato, carne di pollo** non cotta a sufficienza e carne macinata (***hamburger*).**

Le infezioni da *Campylobacter* sono molto più comuni di quanto si creda (negli USA ogni anno colpiscono più di 2 milioni di persone). Attualmente si ritiene che superino per incidenza le infezioni da *Salmonella* e *Shigella* messe insieme.

L'isolamento in coltura dei *Campylobacter* non è semplice. Uno dei tanti metodi proposti contempla l'arricchimento del campione in brodo supplementato con vancomicina, polmixina B e trimethoprim per 48 ore a +43°C con il 10% di CO_2, seguito da piastratura su terreno di Skirrow da incubare come sopra.

Le difficoltà nel coltivare i *Campylobacter* su terreni artificiali è stata superata con la possibilità di seminare il campione di alimento o di feci direttamente in una piastra *microtiter* dove eseguire un *test* immunoenzimatico (tipo ProSpect® Alexon-Trend o RIM test® Remel) oppure di ricorrere a un metodo di biologia molecolare (tipo AccuProbe® Gen-Probe) che mette in pratica la tecnica dei *probes* specifici per riconoscere il DNA delle varie specie di *Campylobacter*.

Batteri Gram-negativi delle acque inquinate

Aeromonas hydrophila e *Plesiomonas shigelloides*

Aeromonas hydrophila è noto soprattutto come agente eziologico di una grave malattia, la *fascite necrotizzante,* che comporta arrossamento cutaneo, brividi, debolezza, diarrea, dolore circoscritto, edema, febbre, lividi, necrosi tissutale, *shock*, sudorazione, vomito.

Questo germe viene veicolato da pesci e crostacei, carne di maiale sottovuoto, filetti di aringa, pollame. La fonte d'inquinamento primaria è sempre l'acqua non potabile. **Sopporta la temperatura di frigorifero**, ha un tempo d'incubazione di 1-7-giorni e nelle tossinfezioni alimentari dà i seguenti sintomi: diarrea, dolore addominale, nausea, mal di testa, disidratazione, feci acquose senza muco o sangue. Si presenta soprattutto nei mesi caldi ed elabora una tossina simile a quella del colera.

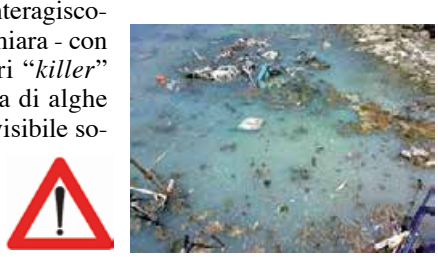
Plesiomonas shigelloides ha un periodo d'incubazione di 24-50 ore. I sintomi sono tipici di una gastroenterite (diarrea, dolori addominali, nausea, febbre, mal di testa, vomito) con possibili complicazioni (meningite, setticemia, endoftalmite, artrite settica).

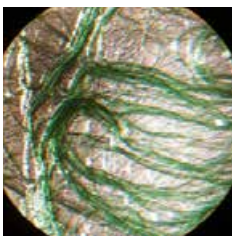
L'inquinamento generato nei bacini interni (stagni, lagune) dalla proliferazione di questi germi, oltre a conseguenze sulla salubrità delle acque, può condurre all'allontanamento della fauna stanziale e alla morìa di pesci (foto Enzo Zavanella).

POSSIBILI PROVENIENZE DI TOSSINE DA PRODOTTI ITTICI

Alleanza batteri + alghe = intossicazioni da biotossine marine

Il pesce e i molluschi sono considerati cibi sani, presenti nei ristoranti di tutto il mondo diventati raggiungibili con l'espansione del turismo nei paesi esotici. Possono però diventare veicolo di tossine invisibili ai sensi che resistono alla cottura. Sono in parte prodotte da batteri e in parte da alghe, che interagiscono - in maniera non ancora chiara - con certi batteri, che sono i veri "*killer*" della situazione. La fioritura di alghe marine tossiche (fenomeno visibile soprattutto nei mesi estivi chiamato "*marea rossa*") è aumentata (si ipotizza per effetto dell'eutrofizzazione





da inquinamento e innalzamento della temperatura dell'acqua). Esistono più di 5.000 specie di alghe (di cui 40 circa producono tossine) sparse nel mare mediante cisti (dormienti per anni) che liberano ciascuna 6.000-8.000 nuove cellule algali. I molluschi bivalvi incontaminati possono incamerare, ad esempio, 3 grammi di alghe al giorno, diventando tossici. Lo stesso fenomeno può avvenire nei crostacei (gamberi e aragoste) e nei pesci e quindi raggiungere l'uomo seguendo la catena alimentare.

L'*avvelenamento sgombrotossico* (da tonno, merluzzo, acciughe, sardine, aringhe) è il caso più frequente e dipende da formazione di istamina per azione di **batteri deterioranti** che agiscono al di sopra di 4°C sull'istidina, una proteina del pesce. Si manifesta dopo pochissimo tempo dall'ingestione con diarrea, svenimento, vomito. L'alleanza fra batteri dei generi ***Vibrio***, ***Moraxella***, ***Bacillus*** e la alghe dinoflagellate *Alexandrium* e *Gymnodinium* fa nascere veleni idrosolubili ad effetto neurotossico (il più potente è la saxitossina) causa di una sindrome nota sotto la sigla PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*). Si accumulano nei molluschi bivalvi e possono fare stragi di aringhe, acciughe, merluzzi, salmoni.

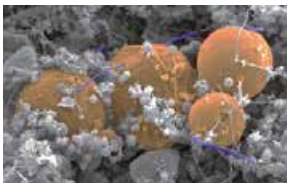
Norme sui controlli microbiologici

Nell'ultimo decennio del '900 le disposizioni sul controllo della salubrità degli alimenti sono cambiate in seguito all'avvento di nuove acquisizioni: HACCP - autocontrollo - norme comunitarie europee.

• **HACCP** è l'acronimo di *Hazard Analysis (of) Critical Control Points*. In sostanza, le aziende devono individuare i possibili rischi sanitari lungo la filiera produttiva dell'alimento per rimuoverne le eventuali cause.

• Il monitoraggio delle produzioni è affidato in **autocontrollo** alle ditte stesse, che devono avvalersi per le analisi di strutture autorizzate dagli enti istituzionali, depositari dei controlli ufficiali.

• La Comunità Europea ha emesso **norme specifiche** sui controlli delle principali tipologie di alimenti. Circa i criteri microbiologici da applicare agli stessi, il **Regolamento 2073 del 2005** ha stabilito norme valide in fase di produzione (chiamate **criteri di igiene del processo,** con analisi da eseguire in autocontrollo) e norme valide nel periodo di commercializzazione (chiamate



criteri di sicurezza alimentare, con analisi da eseguire nei controlli ufficiali). Si tratta di un regolamento **aperto**, cioè destinato a essere aggiornato e ampliato, come dimostrano le variazioni apportate nel 2007 (Reg. 1441) e negli anni seguenti.

Analisi previste dal regolamento CE n° 2073/2005 aggiornato dal regolamento CE n° 1441/2007

Alimento	Ricerche in fase di produzione	Ricerche su prodotto finito
Carcasse di bovini, equini, suini, ovi-caprini	Carica batterica, enterobatteri, *Salmonella*	
Carcasse di polli e tacchini	*Salmonella*	
Carni macinate e separate meccanicamente	Carica batterica, *E. coli*	*Salmonella*
Prodotti a base di carne	*E. coli*	*Salmonella*
Gelatina e collagene		*Salmonella*
Pesci con elevato contenuto d'istamina (tonni, sgombri, ecc)		Istamina
Molluschi bivalvi, tunicati, echinodermi, gasteropodi vivi	*E. coli*, stafilococchi coagulasi+	*Salmonella, E. coli*
Crostacei e molluschi cotti		*Salmonella*
Latte e derivati liquidi del latte pastorizzati	Enterobatteri	
Latte in polvere e siero di latte in polvere	Enterobatteri, stafilococchi coagulasi+	*Salmonella*, tossina stafilococcica
Formaggi da latte crudo	Stafilococchi coagulasi+	*Salmonella*, tossina stafilococcica
Formaggi da latte pastorizzato o riscaldato, freschi o stagionati	Stafilococchi coagulasi+	Tossina stafilococcica
Burro e panna da latte non pastorizzato	*E. coli*	*Salmonella*
Gelati	Enterobatteri	*Salmonella*
Alimenti per l'infanzia	Enterobatteri	*Salmonella*, *Listeria monocytogenes, Enterobacter sakazakii*
Prodotti contenenti uova crude o non pastorizzate		*Salmonella*
Prodotti a base d'uovo	Enterobatteri	
Frutta e verdura pre-tagliata	*E. coli*	*Salmonella*
Semi germogliati		*Salmonella*
Succhi di frutta non pastorizzati	*E. coli*	*Salmonella*
Alimenti in generale		*Listeria monocytogenes*

Questi sono i limiti microbiologici previsti dai Regolamenti CE 2073/2005 e 1441/2007:

Alimento	Controlli in fase di produzione	Valori accettabili
Carcasse di bovini, equini, ovi-caprini	Carica batterica Enterobatteri *Salmonella*	*5.000-100.000/cm² (media giornaliera)* *50-500/cm² (media giornaliera)* *massimo 2 positivi su 50 campioni*
Carcasse di suini	Carica batterica Enterobatteri *Salmonella*	*10.000-100.000 /cm² (media giornaliera)* *100-1.000/cm² (media giornaliera)* *massimo 5 positivi su 50 campioni*
Carcasse di polli e tacchini	*Salmonella*	*massimo 7 positivi su 50 campioni da 25 g di pelle del collo*
Carni macinate e carni separate meccanicamente	Carica batterica *E. coli*	*500.000/g e fino a 5.000.000/g in 2 campioni su 5 esaminati* *50/g e fino a 500/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Prodotti a base di carne	*E. coli*	*500/g e fino a 5.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Crostacei e molluschi cotti	*E. coli* Stafilococchi coagulasi+	*1/g e fino a 10/g in 2 campioni su 5 esaminati* *100/g e fino a 1.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Latte e derivati liquidi pastorizzati	Enterobatteri	*<1/ml e fino a 5/ml in 2 campioni su 5 esaminati*
Latte in polvere e siero di latte in polvere	Enterobatteri Stafilococchi coagulasi+	*10/g su 5 campioni* *10/g e fino a 100/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Formaggi da latte crudo	Stafilococchi coagulasi+	*10.000/g e fino a 100.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Formaggi da latte pastorizzato o riscaldato, formaggi stagionati	Stafilococchi coagulasi+	*100/g e fino a 1.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Formaggi molli (= formaggi freschi)	Stafilococchi coagulasi+	*10/g e fino a 100/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Burro e panna da latte non pastorizzato	*E. coli*	*10/g e fino a 100/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Gelati	Enterobatteri	*10/g e fino a 100/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Alimenti per l'infanzia	Enterobatteri	*Assenti in 10 campioni da 10 g*
Prodotti a base di uova	Enterobatteri	*10/g e fino a 100/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Frutta e verdura pre-tagliata Semi germogliati	*E. coli*	*100/g e fino a 1.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Succhi di frutta non pastorizzati	*E. coli*	*100/g e fino a 1.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*

Alimento	Ricerche sul prodotto finito	Valori accettabili
Carne macinata e preparazioni a base di carne da consumare crude Gelatina e collagene	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 25 g
Carne macinata, preparazioni a base di carne, prodotti a base di carne di pollame da consumare cotti Carni separate meccanicamente	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 10 g (dal 2010 in 5 campioni da 25 g)
Pesci con elevato contenuto d'istamina (tonni, sgombri, ecc)	Istamina (metodo HPLC)	100 mg/kg e fino a 200 mg/kg in 2 campioni su 9 esaminati
Se trattati in salamoia	Istamina (metodo HPLC)	200 mg/kg e fino a 400 mg/kg in 2 campioni su 9 esaminati
Molluschi bivalvi, tunicati, echinodermi, gasteropodi vivi	*Salmonella* *E. coli* (metodo *MPN)*	Assente in 5 campioni da 25 g 230/100 g di carne e liquido intravalvare
Crostacei e molluschi cotti	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 25 g
Burro e panna da latte non pastorizzato	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 25 g
Latte in polvere e siero di latte in polvere	*Salmonella* Enterotossine stafilococciche	Assente in 5 campioni da 25 g Non rilevabili in 5 campioni da 25 g
Gelati	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 25 g
Formaggi	Enterotossine stafilococciche	Non rilevabili in 5 campioni da 25 g
Formaggi da latte crudo	*Salmonella* Enterotossine stafilococciche	Assente in 5 campioni da 25 g Non rilevabili in 5 campioni da 25 g
Alimenti per l'infanzia	*Listeria monocytogenes* *Salmonella* *Enterobacter sakazakii*	Assente in 10 campioni da 25 g Assente in 30 campioni da 25 g Assente in 30 campioni da 10 g
Prodotti contenenti uova **crude o non pastorizzate**	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 25 g
Frutta e verdura pre-tagliata Semi germogliati Succhi di frutta **non pastorizzati**	*Salmonella*	*Assente in 5 campioni da 25 g*
Alimenti in generale **favorevoli alla crescita** di *Listeria monocytogenes*		
– ancora in stabilimento	*Listeria monocytogenes*	*Assente in 5 campioni da 25 g*
– già in commercio	*Listeria monocytogenes*	*100/g in 5 campioni*
Alimenti in generale **sfavorevoli alla crescita** di *Listeria monocytogenes*	*Listeria monocytogenes*	*100/g in 5 campioni*

NOTA - Con il termine "campioni" si intendono le unità campionarie prelevate all'interno di un'unica campionatura, composta, ad esempio, da almeno 5 unità, che vengono esaminate separatamente.

CONTROLLI SULL'IGIENE DELLE SUPERFICI DI LAVORO

Di significato pratico sono le verifiche microbiologiche inerenti la contaminazione residua dopo lavaggio e sanitizzazione degli impianti.

Sono disponibili in commercio piastre Petrifilm® (3M) per "fotografare" la distribuzione dei germi sui piani di lavoro umidi. Il metodo più datato prevede, invece, lo sfregamento superficiale su 10 x 10 cm con un tampone di alginato, bagnato e poi reintrodotto in una provetta con 5 ml di soluzione fisiologica. Alcune diluizioni decimali in fisiologica e la semina di 0,1 ml su piastre di *Plate Count Agar* riveleranno – dopo 24 ore a +37°C – con un semplice calcolo la carica batterica per cm^2.

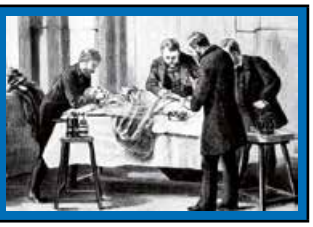
Nelle foto:

- Uso della piastra Petrifilm® per la rilevazione della carica batterica totale su una superficie di lavoro sanitizzata.
- Tecnica di prelievo con tampone di alginato su un'area delimitata di 10 x 10 cm.
- Controllo visivo su una fase di produzione alimentare in osservanza alle disposizioni HACCP.

CONTROLLI SULL'EFFICACIA DEI DISINFETTANTI

Joseph Lister (1827-1912)

Medico scozzese professore di chirurgia a Glasgow, intuì l'importanza dell'antisepsi osservando l'effetto dei trattamenti col fenolo sulle concimazioni animali nei campi e introdusse la pratica della disinfezione preventiva in sala operatoria, salvando la vita ai pazienti che fino ad allora conseguivano infezioni spesso mortali.
La *Listeria* porta il suo nome.



È possibile dimostrare in maniera semplice se un prodotto (da usare, ad esempio, nella composizione di un farmaco per renderlo *asettico) agisce rapidamente sui batteri. Il metodo è sostanzialmente quello standard europeo EN 1040 per gli antisettici e per i disinfettanti.*

1. Allestire in soluzione fisiologica sterile una sospensione del germe-*test* con densità pari a 1 Mac Farland, corrispondente a 1,5 – 5 x 10^8 germi / ml.
2. Verificare la concentrazione della sospensione seminando 100 mcl di una diluizione 1 : 200.000, in soluzione fisiologica sterile, su due piastre di Mueller-Hinton Agar.
3. Diluire 1 ml della sospensione batterica con 9 ml del prodotto antibatterico da saggiare, portato alla concentrazione desiderata per l'uso.
4. Incubare la miscela a temperatura ambiente (+20°C) per 5 minuti.
5. Diluire dopo l'incubazione 200 mcl della miscela in 100 ml di Brucella Broth, preparati entro un apparecchio per filtrazione da 100 ml con montata una membrana filtrante tipo *Millipore*® da 0,22 µm.

6. Filtrare, risciacquare il filtro con 100 ml di Brucella Broth.
7. Ritagliare con un bisturi sterile la membrana e depositarla con una pinza sterile sulla superficie di una piastra di Mueller-Hinton Agar.
8. Incubare in termostato le piastre a +37 °C per 48 ore. Contare le colonie batteriche e calcolare la riduzione di germi vivi operata dal prodotto antibatterico saggiato applicando la formula:

   $R = N \times 10^{-1} / Na$

Dove:

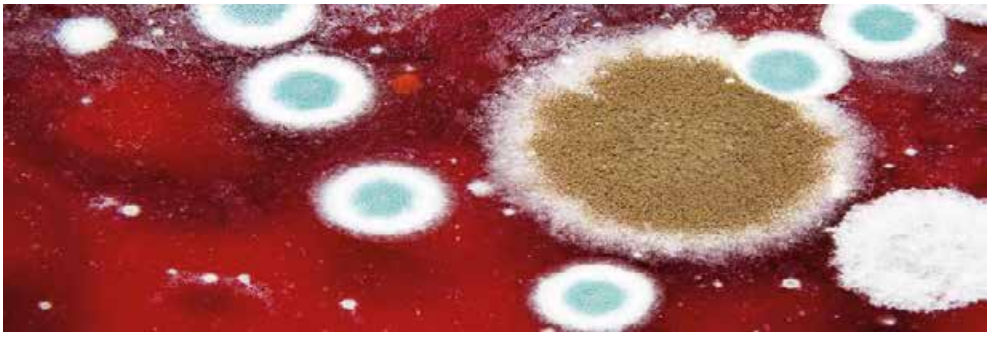
N = numero di colonie contate sulle due piastre di controllo della sospensione batterica usata come *test*

Na = numero di colonie contate sulla membrana filtrante dopo il contatto fra batteri e prodotto disinfettante.

MICETI E MALATTIE DI ORIGINE ALIMENTARE

Le micotossicosi

Sono causate da sostanze tossiche e mutagene prodotte da funghi. Le patologie (in parte sovrapponibili negli animali e nell'uomo, trasmesse attraverso la catena alimentare) sono sostenute dalle **Aflatossine**, dal gruppo **Tricoteceni/Zearalenone/Fumonisine** (da *Fusarium*) e da **Ocratossine e Patuline (**da *Aspergilus* e *Penicillium*)**.** Le Aflatossine B1, G1, B2 e G2 si possono trovano in cereali e nella soia, semi oleaginosi, frutta secca (mandorle, arachidi) e fresca, spezie; le Aflatossine M1 e M2 nel latte e nei derivati; l'Ocratossina A in cereali, spezie, cacao, caffè, carni suine e avicole, vino, birra; il Deossinivalenolo, T-2 e HT-2 nel grano, le Fumosinine e lo Zearalenone nel mais, la Patulina nei succhi di mele, pere, carote.



Riguardo all'alimentazione umana, le più temibili sono le *aflatossine*, che derivano da *Aspergillus flavus* (B1 e B2) e da *Aspergillus parasiticus* (G1 e G2), oltre a M1 e M2 (metaboliti della B1 e della B2).

Si formano se le piante si trovano sotto *stress* (ad esempio, in seguito a umidità o temperatura elevate, scarsa concimazione). Possono essere già presentii nella pianta viva o formarsi dopo la raccolta. Le derrate ammuffite possono essere maggiormente sospettate di contenere aflatossine. Una malattia storica è l'ergotismo da *Calviceps purpurea,* un fungo che contami-

na la segale cornuta. Chimicamente le aflatossine sono derivati di-furano-cumarinici, a basso peso molecolare (< 500 u.m.a.), alto punto di fusione (269°C per aflatossina B1) ed elevata termostabilità (fino a 250°C).

La **tossicità** deriva dalla capacità di legarsi agli acidi nucleici e di interferire con la sintesi proteica (con effetti sugli indici di crescita negli animali) o agendo sul sistema immunitario (immunodeficienza). Le aflatossine provocano un **epatocarcinoma** se ingerite per lungo tempo o in presenza di lesioni da malattie virali.

Favoriscono la comparsa di tumori anche in altri organi (cistifellea ecc.) ed hanno tossicità sul feto, con azione teratogena e mutagena.

Possono arrivare all'uomo attraverso le **carni o il latte** (la M1) di animali allevati con mangimi contaminati; inoltre resistono molto bene ai trattamenti termici (pasteurizzazione). La prevenzione è basata sulla scelta delle specie coltivate (ibridi transgenici, resistenti all'infezione micotica), su corrette pratiche di magazzinaggio dei foraggi, sui controlli di laboratorio degli alimenti più a rischio (latte per neonati ecc).

L'identificazione delle muffe viene fatta con tecnica **PCR**, mentre il dosaggio delle tossine è possibile con metodi chimici (**HPLC**). Esistono dei limiti massimi tollerabili di aflatossine (Direttiva 2006/1881/CE) riguardanti alimenti per l'uomo e per gli animali.

VIRUS E MALATTIE DI ORIGINE ALIMENTARE

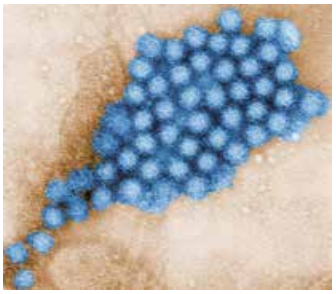
Il serbatoio di tutti i virus a trasmissione alimentare è rappresentato dall'intestino dell'uomo o degli animali, per cui sono soprattutto le **feci** il materiale che può propagare l'infezione attraverso:

- la contaminazione del cibo durante la lavorazione o somministrazione per scarsità d'igiene
- il contatto degli alimenti con **acque contaminate**, come nel caso di **molluschi e crostacei** allevati e/o raccolti in acque contaminate da **liquami umani** oppure **vegetali** prodotti su terreni fertilizzati con **concimi animali** o irrigati con acque provenienti da insediamenti umani (da www.eufic.org).

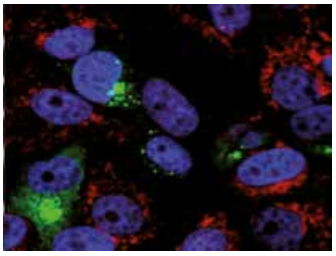
Secondo le statistiche dell'*European Food Safety Authority* in 10 anni (dal 2002 al 2012) l'incidenza di malattie virali trasmesse con gli alimenti è aumentata del 14%. La maggioranza delle malattie virali di origine alimentare è causata da pochi tipi di virus e cioè:

Come è noto, I virus sono microrganismi molto piccoli (cioè in media circa un centesimo della dimensione dei batteri più comuni) composti da DNA o RNA racchiuso in un rivestimento proteico. A differenza dei batteri, i virus possono moltiplicarsi solo all'interno di cellule viventi di altri organismi. Tuttavia, molti virus mostrano un'elevata resistenza a *stress* (calore, disidratazione, congelamento, radiazioni, additivi chimici) e possono sopravvivere – almeno per un certo tempo - fuori da organismi viventi. La maggioranza delle infezioni virali sono dovute al contatto interumano (feci e saliva), mentre la trasmissione per via alimentare costituisce un rischio minore.

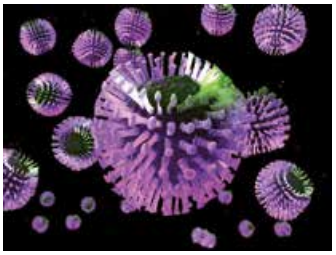
• ***Norovirus*** - (scoperti nel 1972 in seguito ad una grossa epidemia nel 1968 all'interno di un ospedale americano a Norwalk, Ohio). È sensibile al calore (ma solo a temperature > 60°C) e può essere facilmente inattivato dalla cottura. Può essere identificato attraverso specifici marcatori molecolari su campioni fecali (ricerca dell'RNA virale mediante RT-PCR o Real-time PCR) tecnica che ha contribuito distinguere almeno 5 genogruppi di Norovirus. È cosmopolita, molto virulento (sono sufficienti 10 particelle virali), colpisce specialmente le comunità che importano pasti preconfezionati (mense, hotel, navi da crociera ecc.). L'incubazione varia dalle 12 alle 72 ore circa, mentre i sintomi durano da 24 a 60 ore con nausea e vomito, diarrea acquosa, crampi addominali, febbricola, cefalea, dolori muscolari associati a spossatezza ed astenia.



• ***Epatite A*** - È una malattia altamente contagiosa che interessa il fegato. Si trasmette attraverso il consumo di alimenti e bevande contaminate o tramite il contatto diretto con persone infette. Viene eliminato tramite le feci, il sangue e la saliva ed ha un periodo di incubazione da 6 a 50 giorni (in genere 30), al termine dei quali il paziente può accusare febbre e malessere. È abbastanza resistente alle alte temperature, ma si inattiva dopo bollitura di 5-10 minuti. Per la diagnosi è importante la ricerca nel sangue degli anticorpi IgM anti-HAV. che rappresentano un *marker* di infezione acuta, mentre gli IgG testimoniano una pregressa esposizione al virus dell'epatite A e l'immunità nei suoi confronti. L'Epidemia di Epatite A nel 2013-14 in Italia, Irlanda, Olanda, Polonia, Norvegia, Francia, Svezia (collegata al consumo di frutti di bosco prodotti in Bulgaria) ha dato luogo nel nostro paese, dal 1 gennaio 2013 al 31 maggio 2014, a 1300 casi notificati.



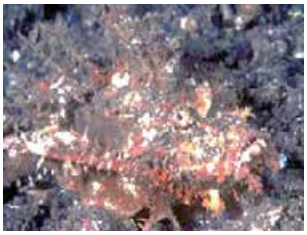
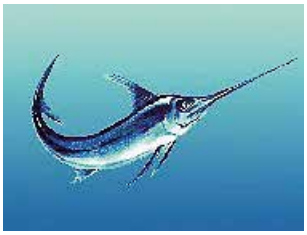
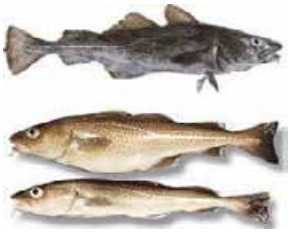
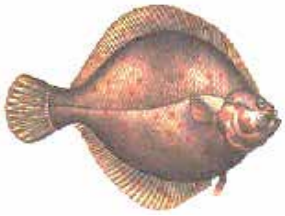
• ***Rotavirus*** - Scoperto dal virologo australiano Ruth Bishop nel 1973, è responsabile della maggior parte dei casi di gastroenterite nei bambini. Presenta nel genoma diverse molecole di RNA a doppia elica; è trasmissibile per via orofecale (modalità di trasmissione principale), per contatto fisico (con oggetti, mani o cibi contaminati) e attraverso le vie respiratorie. L'incubazione dura 14-15 giorni. In genere, i sintomi della gastroenterite consistono in nausea, vomito, stato febbrile e diarrea acquosa. La complicanza più temuta è la disidratazione, successiva ai ripetuti episodi di vomito e dissenteria. La diagnosi avviene con la ricerca del virus nelle feci (PCR).

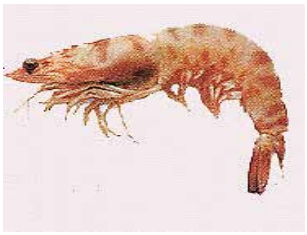


L'abbondana di cibi (un dato di fatto, almeno per molti nelle nazioni più fortunate) può far dimenticare microbi e veleni che stanno al centro di svariate malattie. Il mare – da solo – procura una varietà di alimenti che possono soddisfare qualsiasi persona.

Purtoppo i prodotti della pesca per l'elevato contenuto in acqua sono fra i più aggredibili dai germi e quindi soggetti a rapido degrado. Occorre prestare attenzione ad alcune avvertenze pratiche.

Queste sono le specie ittiche dei nostri mari più richieste sul mercato:

 **Coda di Rospo**	 **Pesce Spada**	**Pagello**
Sogliola	**Branzino**	**Tonno**
Sgombro	 **Merluzzo**	**Orata**
 **Rombo**	**Sarago**	**Sardina**

		
Gambero	**Seppia**	**Vongole**
Mazzancolla	**Granceola**	**Cozze**

Il pesce fresco deve essere necessariamente refrigerato nel ghiaccio a 0°C dove dura per circa 4-7 giorni. Se la temperatura subisce importanti variazioni (come avviene sui banchi di vendita dei mercati all'aperto) cominciano ad apparire le prime alterazioni. Sono conseguenza della formazione di trimetil-amina da parte soprattutto di batteri. Si generano poi altri composti: formaldeide (responsabilie del tipico odore di pesce avariato), acido sulfidrico (che dà un aroma nauseabondo) e amine biogene (istamina, triptamina, cadaverina, putrescina, tiramina). L'istamina può dare origine negli individui sensibili alla rapida comparsa di macchie rosse sulla cute, nausea, dolori addominali, ecc.

I germi che degradano il pesce appartengono *in primis* ai generi *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Flavobacterium*.

È possibile verificare **in laboratorio** la freschezza del pescato con metodi fisici (la conducibilità elettrica aumenta proporzionalmente al deperimento), chimici (cresce il contenuto di istamina), enzimatici (si liberano enzimi se il pesce è stato congelato e scongelato) e microbiologici (c'è un forte incremento della carica batterica).

Ovviamente questi accertamenti non sono praticabili dal consumatore, che può solo ricorrere all'**osservazione attenta** del prodotto sul banco di vendita (sono da controllare alcuni segni di invecchiamento: occhio spento, pelle opaca, branchie grigie).

È buona norma acquistare il pesce surgelato **a fine spesa**, facendo attenzione alla temperatura indicata del termometro che deve essere presente e scegliendo di preferenza le **confezioni sul fondo del banco**, meno soggetto a sbalzi termici causati dall'apertura delle porte. Il trasporto a casa dei prodotti della pesca deve essere veloce, meglio se in **contenitore termico isolato e con refrigerante incluso.**

Se si tiene in frigorifero a 0°C (magari sotto vuoto), il pesce fresco può durare fino a 10 giorni, ma il metodo migliore è di congelarlo a -18°C o addirittura surgelarlo a -30°C, operazione che già viene fatta in 2 ore circa direttamente sui pescherecci. Esistono altri metodi di conservazione (salagione, affumicatura, essicazione, marinatura, confezionamento in scatola).

Nel caso di prodotti ittici già cotti, l'intervallo di temperatura più pericoloso per lo sviluppo di germi è quello compreso fra +35°C e +65 °C. L'**abbattitor**e è un apparecchio utilissimo in

cucina perché consente il raffreddamento da 90°C a 3°C al cuore del prodotto in meno di 90 minuti (**congelamento**); in meno di 270 minuti si ha invece il **surgelamento**.

Quando si raffredda rapidamente un alimento, l'acqua contenuta nel prodotto si trasforma in cristalli di ghiaccio di grosse dimensioni (processo del **congelamento**), provocando la rottura delle pareti delle membrane cellulari, perdita di turgidità dei tessuti e di nutrienti contenuti. Al contrario, un'elevata velocità di raffreddamento (come avviene nel processo di **surgelamento**) promuove una formazione di piccoli e omogenei cristalli, con il risultato che allo scongelamento il prodotto sarà molto simile al prodotto fresco quanto a valori nutrizionali e organolettici.

Anche se si ottengono riduzioni della carica batterica, nessun metodo di conservazione garantisce la sterilità del prodotto e tanto meno l'allontanamento di sostanze tossiche resistenti generate da microrganismi.

Ettore Tito, *Pescheria vecchia*, Venezia, 1893

Clark Zavanella, *Canal Grande*, Venezia, 1929

A tavola non sempre si parla di microbi. Qualche volta di moéche. Cosa sono?

Nella laguna di Venezia per "moéca" si intende il maschio di un granchio verde (*Carcinus moenas*) che perde la corazza quando va in muta, due volte all'anno (marzo-aprile e ottobre-novembre).

Per essere commestibile deve essere molle ("moéca" sta per molle) e quindi pescato solo in questi periodi, prima che raggiunga il mare, dove a contatto dell'acqua salmastra riforma la corazza.
La femmina (detta "masenéta") muta, invece, tra maggio e luglio (periodo dell'accoppiamento) e viene catturata in settembre, quando è piena di gustosissime uova.
I pescatori di Burano, Pellestrina, Treporti e Chioggia raccolgono i granchi in gabbie di legno immerse nell'acqua della laguna e provvedono a separare ancora sulla barca i maschi destinati alla preparazione di un fritto da consumare con polenta (foto Elena Turla). Sembra che l'origine di questo piatto prelibato (piuttosto costoso per il lavoro durissimo della raccolta) risalga all'isola di Burano, anche se i "moecanti" di Chioggia ne rivendicano la priorità da due secoli.

IL RISCHIO MICROBIOLOGICO NEL LATTE CRUDO E NEI PRODOTTI DERIVATI

Nel latte crudo sono presenti diverse popolazioni microbiche che entrano in competizione con la flora patogena (normalmente presente a basse cariche) sottraendo nutrienti dal substrato e alterandone le condizioni di sviluppo (es. riduzione del pH). Nelle normali condizioni igieniche, le flore microbiche prevalenti nel latte crudo sono rappresentate da *Pseudomonas* spp, *Clostridium*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* ed *Enterococcus*. Il mantenimento della catena del freddo e l'applicazione di corrette pras-

Pericolo microbiologico	Bovina	Capra e pecora	Cavalla e asina	Cammella
Bacillus cereus	si	no	si	no
Brucella abortus	si	no	si	no
Brucella melitensis	no	si	no	si
Campylobacter spp. (termofili)	si	si	si	no
Corynebacterium spp.	si	no	no	no
Listeria monocytogenes	si	si	si	no
Mycobacterium bovis	si	no	si	no
Salmonella spp.	si	si	si	no
Staphylococcus aureus	si	si	si	no
Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus*	si	no	si	no
E. coli produttore di Shigatossine (STEC)	si	si	si	no
Yersinia enterocolitica	si	no	si	no
Yersinia pseudotuberculosis	si	si	si	no
Cryptosporidium parvum	si	no	no	no
Toxoplasma gondii	si	si	si	si
Virus dell'Encefalite da Zecche (TBEV)	si	si	no	no

si igienico-sanitarie contribuiscono a contenere lo sviluppo di altre flore alteranti o, peggio, patogene (da www.ersa.fvg.it).

Nel 1983 uno dei formaggi tipici del Cantone di Vaud (Svizzera), il **Vacherin Mont d'Or**, prodotto con latte crudo di montagna non pasteurizzato, provocò 122 casi di listeriosi con 34 morti. Il focolaio gettò nel panico i consumatori, scatenando ripercussioni su tutto il comparto lattiero-caseario europeo. Si capì in seguito che il perpetuarsi della trasmissione di ***Listeria monocytogenes*** (sierotipo 4b) avveniva per contaminazione delle assi di legno sulle quali venivano depositate le forme ad asciugare.

Oggi questo formaggio continua ad essere prodotto con latte pasteurizzato e commercializzato nelle tipiche confezioni in legno d'abete, dove si presenta ricoperto da una crsta biancastra di *Oospora lactis* che gli conferisce un sapore misto di funghi e patate molto apprezzato.

Una vita per la qualità del latte

Gerhard Terplan (1924-2004), è stato uno dei massimi studiosi della *Listeria monocytogenes* con centinaia di pubblicazioni. Laureato in Veterinaria a Monaco, ha lavorato in Istituti che si occupavano del latte (Kempten, Kiel) per dedicarsi infine all'insegnamento nella Ludwig-Maximilians Universität di Monaco di Baviera. Nominato Professore all' Università di Hannover, istituì la prima cattedra per l'igiene del latte. A Monaco è riuscito a fondare nel 1971 un Istituto di livello internazionale. Le sue ricerche hanno fornito un contributo eccellente al miglioramento dei **controlli sulla qualità del latte** (**carica batterica, punto di congelamento, cellule somatiche, residui di antibiotici**). Un settore che fino ad allora era stato trascurato in Germania (*nella foto*, il Centro di Controllo del Latte LZW di **Aulendorf**, Baden-Württemberg).

IL RISCHIO MICROBIOLOGICO NELLE CARNI CRUDE, NELLE UOVA E NEI VEGETALI

Tartare, carpaccio e, in generale, tutta la carne cruda o non cotta a sufficienza possono nascondere microrganismi insidiosi. **La stagione calda è la più a rischio**: le alte temperature favoriscono la moltiplicazione di questi batteri ed è il periodo in cui è più comune consumare pietanze crude o mal cotte (per esempio, durante le grigliate). Le malattie più comuni sono la toxoplasmosi, la trichinellosi e le infezioni da ***Salmonella***, ***Listeria*** ed ***Escherichia coli***. Infatti, an-

che se la carne che consumiamo è sottoposta a molti controlli dall'allevamento alla lavorazione, a causa del suo contenuto di proteine, zuccheri e grassi è un terreno di coltura ideale per la crescita di batteri.

Nell'Unione Europea nel 2016 la ***Salmonella*** è stata la principale causa di tossinfezioni alimentari. Con oltre 94.000 casi notificati, pari a 20,4 casi ogni 100.000 abitanti, ha rappresentato il 22% di tutti gli episodi di malattia dell'uomo correlati all'assunzione di alimenti o acqua. Nello stesso periodo in Italia si sono registrati 4.100 casi di salmonellosi umana, pari a 7 casi ogni 100.000 abitanti.

I sierotipi di *Salmonella* prevalenti nelle uova in Europa sono *Enteritidis* e *Typhimurium*.

I principali alimenti di origine animale coinvolti nelle infezioni da salmonella sono stati, sempre a livello europeo, **uova** e **prodotti a base di uova**.

Le uova consumate crude o poco cotte (occhio di bue, alla *coque*) oppure le preparazioni a base di uovo crudo o poco cotto (maionese fatta in casa, salse e creme, tiramisù) sono state più volte un veicolo per *Salmonella*.

Tra gli alimenti di origine non animale crudi e minimamente trasformati, quelli che pongono i rischi maggiori nell'UE sono verdure a foglia verde, ortaggi a bulbo e a stelo, pomodori, meloni, baccelli, legumi o cereali freschi, semi germogliati e frutti di bosco.

I binomi di alimenti e agenti patogeni di maggiore impatto sono ***Salmonella*** e verdure a foglia verde consumate crude, seguiti da *Salmonella* e ortaggi a bulbo e a stelo, *Salmonella* e pomodori, *Salmonella* e meloni ed ***E. coli*** e baccelli, legumi o cereali (www.efsa.europa.eu).

I principali responsabili delle contaminazioni su **prodotti vegetali** sarebbero acque d'irrigazione, suolo e concimi. Ma nell'insorgenza di tossinfezioni alimentari non sono da sottovalutare le **contaminazioni crociate**, che comportano rischi sanitari quando i prodotti (soprattutto da consumare crudi, come frutta e verdura) vengono a contatto con materiali o altri alimenti infetti (attrezzature di cucina, carni di pollame, ecc).

Philip Bruce White Fritz Kauffmann

Il "catalogo" delle salmonelle è opera di due scienziati, il medico tedesco Fritz Kauffmann (1899-1978) e il microbiologo britannico Philip Bruce White (1891-1949). Kauffmann estese dal 1933 al 1978 lo schema sviluppato inizialmente da White, creando quello che tutti conoscono oggi come lo "*Schema di Kauffmann-White*", ricco di circa 2.500 sierotipi divisi in 67 gruppi.

Parlando di igiene degli alimenti, si trova spesso il batterio ***Salmonella***, forse il più investigato nella storia della microbiologia in quanto largamente diffuso in natura e preso come modello delle **infezioni a trasmissione oro-fecale** (*vedi schema*). Qui il nome del *genus* è seguito da un appellativo riferito al luogo di primo isolamento oppure all'ospite preferito o, ancora, alla malattia sviluppata.

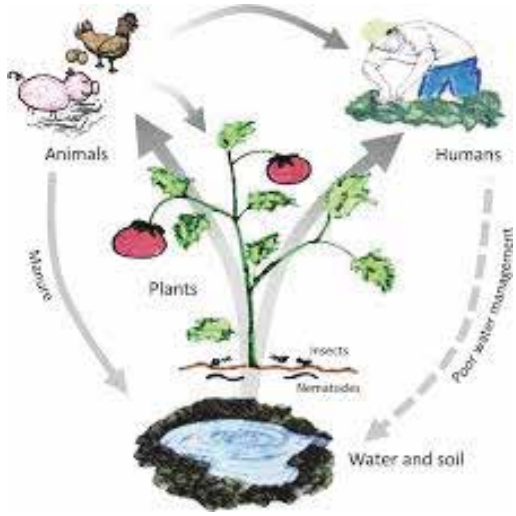
Le classificazioni delle salmonelle sono tante, ma le più conosciute sono quella di **Kauffmann-White** per quanto riguarda la tipizzazione in base al sierotipo, e quella del 1987 del microbiologo francese **Le Minor** per quanto riguarda la suddivisione in 5 sottospecie su base biochimica (*enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae, indica, bongori*).

Nella tabella un esempio della classificazione delle salmonelle, nello schema di Kauffmann-White. Gli antigeni H possono essere presenti in due fasi, di cui una dominante e una recessiva.

"O"-group	Serovar	"O" antigens	Phase 1 "H" antigens	Phase 2 "H" antigens
A	S. Paratyphi A	1,2,12	a	no phase 2 antigen
	S. Paratyphi A var. Durazzo	2,12	a	no phase 2 antigen
B	S. Paratyphi B	1,4,5,12	b	1,2
	S. Paratyphi B var. Odense	1,4,12	b	1,2
	S. Java	1,4,5,12	b	(1,2)
	S. Limete	1,4,12,27	b	1,5
	S. Typhimurium	1,4,5,12	i	1,2
	S. Typhimurium var. Copenhagen	1,4,12	i	1,2
	S. Agama	4,12	i	1,6
	S. Abortus-equi	4,12	no phase 1 antigen	e,n

La struttura antigene di ***Salmonella*** e di ***Escherichia coli*** (entrambi nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*) presenta ovviamente delle somiglianze. Si conoscono, infatti, **antigeni somatici O**, termostabili, di natura lipo-polisaccaridica e **antigeni flagellari H**, termolabili, di natura proteica. Esistono anche antigeni capsulari, proteico-polisaccaridici, corrispondenti all'antigene Vi di *S. Typhi* e agli antigeni K nel coli.

La tecnica di ricerca degli antigeni in laboratorio prevede l'agglutinazione rapida su vetrino in tutti i casi, con possibilità dell'agglutinazione lenta in piastra *microtiter* per la dimostrazione degli antigeni O e delle **adesine** (CFA, K88, K99, P987, F41, ecc) nel coli.



- 65 antigeni O nelle salmonelle, 170 nel coli
- 35 antigeni H nelle salmonelle, 55 nel coli
- Le adesine sono antigeni proteici dei *pili o fimbrie* nel coli, organi di attacco al substrato-ospite diversi dalle *cilia* (o *flagelli*).

Un altro protagonista della microbiologia degli alimenti è l'***Escherichia coli***, oggetto di studi accurati di **W.J. Sojka** e **Ida Ørskov** (1922-2007), medico e batteriologa danese, che tra il 1950 e il 1980 fecero chiarezza sulle relazioni tra il coli e specifiche malattie enteriche degli animali e dell'uomo, gettando così le basi per una classificazione del *genus* basata sulla costituzione antigenica.

Nota tecnica

La **dimostrazione degli antigeni batterici** in laboratorio esige la disponibilità di anticorpi specifici contenuti nei **sieri diagnostici**, classificati in *policlonali* e *monoclonali*.

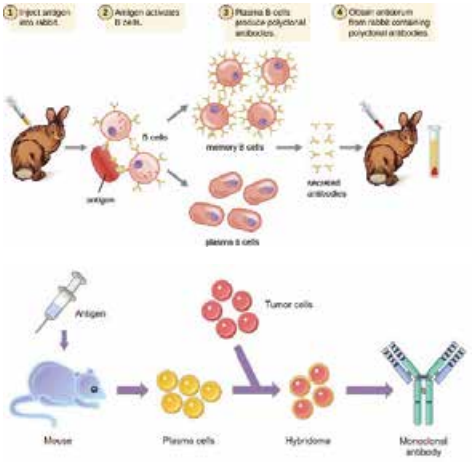
I **sieri policlonali** vengono normalmente prodotti iperimmunizzando dei conigli mediante una serie di inoculazioni i.v. (opportunamente intervallate) di dosi crescenti dell'antigene da diagnosticare.

È importante che il siero ottenuto abbia un **elevato titolo** per non creare confusione reagendo a basse diluizioni con sostanze diverse dall'antigene da ricercare.

Si chiama **titolo** di un siero la più alta diluizione alla quale esso funziona nei *test* di laboratorio (agglutinazione, agar-gel precipitazione, immuno-fluorescenza, ecc). Per diluizioni in sierologia si intendono quelle "al raddoppio" (si dice anche *in base 2*) cioè 1:2 – 1:4 – 1:8 ecc.

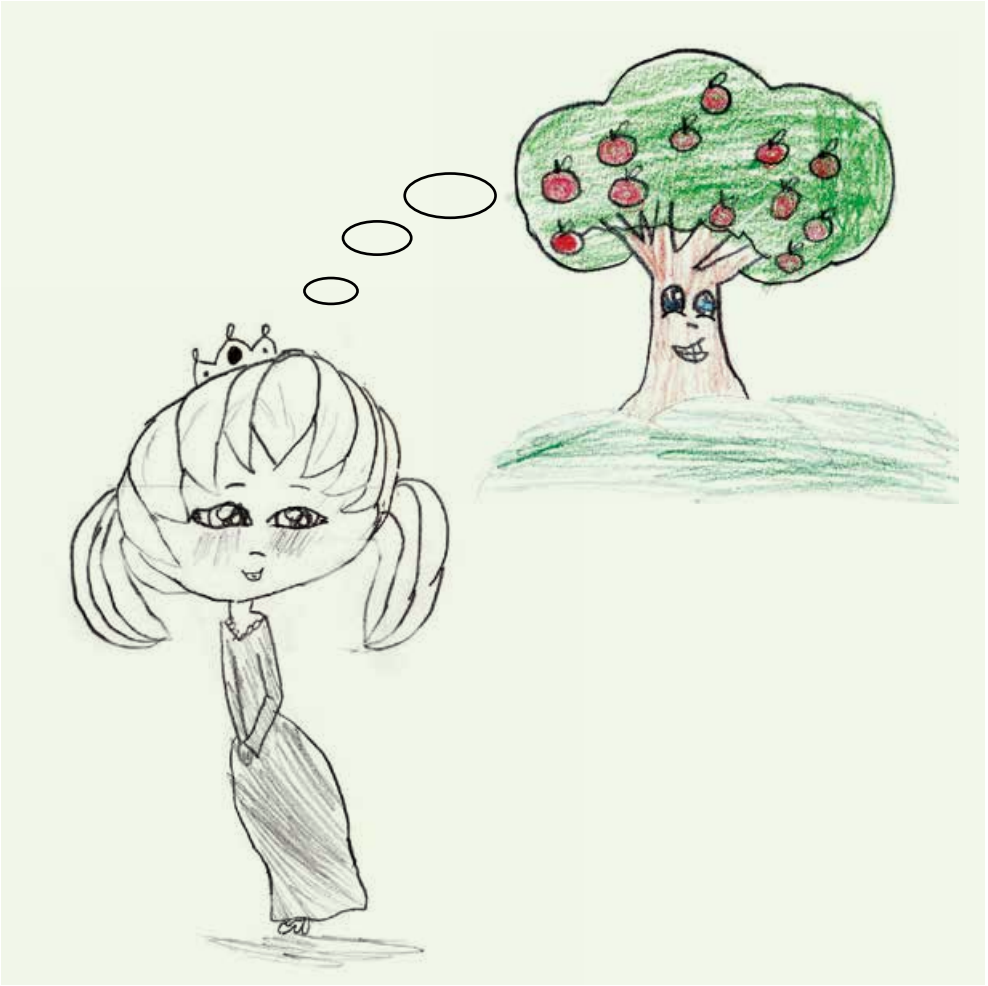
Per allontanare eventuali anticorpi non desiderati (aspecifici) generati dall'animale è spesso necessario **adsorbire il siero**, vale a dire metterlo fisicamente a contatto con gli antigeni che non interessano (in generale biomasse batteriche), allontanando poi antigeni+anticorpi aspecifici mediante centrifugazione.

Un passo avanti in fatto di specificità dei sieri diagnostici è stato compiuto con la scoperta degli ***anticorpi monoclonali*****,** ottenuti inoculando l' antigene nei topi e ibridando le sue cellule produttrici di anticorpi (plasmacellule) con linee cellulari tumorali, in grado di assicurare la moltiplicazione *in vitro* degli anticorpi stessi fabbricati nell'animale.



Capitolo 5

PIANTE



Alcune definizioni (valide anche in diagnostica umana e veterinaria)	
Perché si sviluppi una malattia, l'ospite deve essere suscettibile, il patogeno deve essere virulento e l'ambiente deve essere favorevole allo sviluppo della malattia stessa	
Infezione	**Stabilirsi di relazioni organiche tra un ospite e un patogeno**
Malattia	**Processo in cui un patogeno interferisce con una o più funzioni essenziali delle cellule dell'ospite**
Patogenesi	**Catena di eventi che si verificano durante lo sviluppo della malattia (dall'ingresso alla sopravvivenza del patogeno)**
Patogenicità	**Abilità di un agente eziologico di causare una malattia, interferendo con una o più funzioni essenziali dell'ospite**
Sintomi	**Espressioni di una malattia causate dal manifestarsi di reazioni fisiologiche nell'ospite dovute all'attività dannosa del patogeno**
Segni	**Evidenze fisiche della presenza di un agente eziologico di malattia (esempio: muffe, batteri)**
Sindrome	**Apparizione sequenziale di sintomi di malattia su un ospite durante lo svilupparsi dela malattia oppure somma dei sintomi mostrati da una malattia**
Suscettibilità	**Incapacità dell'ospite di resistere agli attacchi del patogeno**
Tolleranza	**Tipo di difesa che minimizza i danni all'ospite, senza eliminare lo sviluppo della malattia**
Persistenza	**Abilità dell'ospite a resistere agli attacchi del patogeno. Può essere orizzontale o verticale**
Ipersensibilità	**Propensione delle cellule a soccombere in prossimità dell'insediamento dell'ospite nei tessuti**
Virulenza	**Grado di patogenicità di un particolare ceppo di patogeno**
Aggressività	**Capacità del patogeno di invadere e colonizzare l'ospite e di riprodursi in esso**
Predisposizione	**Condizione che rende l'ospite vulnerabile agli attacchi del patogeno**

MALATTIE DA BATTERI

Normalmente presenti	*Habitat*	*Specie prevalenti*
Batteri	Radici Fusto Foglie Frutti	*Rhizobium, Azotobacter* *Pseudomonas* *Erwinia*

Sono chiamati "*fitopatogeni*" i batteri capaci di causare malattie nei vegetali. Non sono del tutto diversi dai germi che si riscontrano negli animali e nell'uomo. Per esempio, si trovano tra gli agenti eziologici di malattie delle piante molte specie di *Pseudomonas*, un pericoloso opportunista ben conosciuto in medicina umana e veterinaria. Fino al 1978 si consideravano solo 9 generi di batteri patogeni di interesse agrario: *Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Nocardia, Pseudomonas, Serratia, Spiroplasma, Streptomyces, Xanthomonas* (Bull C.T. *e Coll*., Journal of Plant Pathology 2014, *96*, 223-226). Successivamente, grazie alle tecniche del DNA sono diventati circa 30. Si sono aggiunti degli enterobatteri (*Gibbsiella*, dà deperimento acuto nella quercia; *Lonsdalea*, dà un cancro del legno nel pioppo in Europa).

Certamente la tassonomia trova parecchi ostacoli, in quanto non tutti i batteri sospettati causa di malattia si lasciano coltivare sui comuni terreni di laboratorio. Alcune specie sono state scoperte con metodi istologici (*Xylella*). Altre non hanno trovato finora una collocazione definitiva ed hanno guadagnato l'appellativo di "*candidatus*" (tra cui i ***Liberibacter***, responsabili di parecchie patologie: **inverdimento degli agrumi, *zebra chip* delle patate, clorosi delle fragole** e i ***Fitoplasmi***, responsabili di gravi malattie come la flavescenza dorata della **vite** e gli scopazzi del **melo**).

Malattia significa deviazione dalla normalità della pianta, che si traduce in un danno estetico o economico.

I batteri in genere penetrano nella pianta attraverso le radici (dalla cosiddetta *rizosfera*) o porosità su foglie, fiori e frutti (*fillosfera*) oppure attraverso microferite apportate dall'apparato masticatore di insetti e acari fitofagi. I *Liberibacter* e i *Fitoplasmi* vengono trasmessi da insetti che si alimentano sulle foglie. Dovunque l'entrata è favorita dall'umidità della pioggia o dalla rugiada notturna che fa aprire gli stomi sulle foglie, mentre la successiva evaporazione da irraggiamento solare fa risucchiare i germi nei vasi, presso i quali essi si collocano tra una cellula e l'altra oppure all'interno del citoplasma.

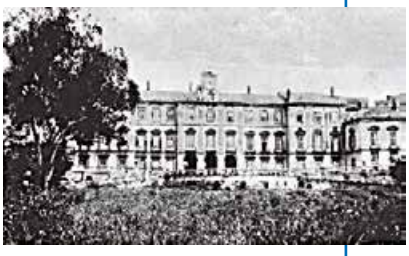
Il più delle volte la pianta segnala l'avvenuta infezione con ingiallimento e avvizzimento delle foglie o anche con la formazione di galle o tumori da germi oncogeni (ad esempio, nell'olivo e negli agrumi). Molte malattie batteriche possono uccidere la pianta se i germi, per nutrirsi di cellule morte, come nel caso del marciume molle, liberano enzimi particolarmente aggressivi o tossine. Il più delle volte i batteri si limitano a inattivare le barriere immunitarie dell'ospite, stabilendo una sorta di convivenza da cui traggono beneficio.

Alcune lesioni tipiche da microrganismi. Da sinistra: fungo *Taphrina deformans*; virus dell'accartocciamento fogliare; virus TSVW o CMV; *fitoplasma* degli scopazzi del melo.

La fitopatologia è nata *negli Orti Botanici delle Università?*

L'**Orto Botanico di Padova,** chiamato in passato il "*Giardino dei Semplici*", fu fondato nel 1545 ed è il più antico al mondo. Dal 1997 è Patrimonio dell'Umanità dell'Unesco. Qui nel 1879 a **Pier Andrea Saccardo** (1845-1920), botanico e micologo di fama internazionale, fu conferita la cattedra di Botanica all'Università di Padova per i suoi studi sulle malattie da funghi di tutta l'Italia.
Il primo studioso italiano che ritenne i batteri responsabili di malattie in piante coltivate fu **Orazio Comes**, biologo che nel 1880 attribuì al *Bacterium gummis* la *gommosi delle piante da frutto*. Ordinò una grande collezione di vegetali presso il Regio Istituto Superiore Agrario di **Portici** che porta il suo nome. Qui fu anche descritta da **Luigi Savastano** nel 1889 la "*Rogna dell'olivo*" (causata da *Pseudomonas savastanoi*).
Santo Garovaglio (1805 -1882) fondò presso l'Orto Botanico di **Pavia** il primo Laboratorio Crittogamico Italiano, dove furono studiate malattie fungine degli agrumi, delle conifere, del gelso e del granoturco, scoprendo anche la "*Rogna delle viti*".

Il "Giardino della Biodiversità" all'Orto Botanico di Padova, inaugurato nel 2014



Gli Orti Botanici di Padova, Pavia e Portici (Napoli) in stampe d'epoca.

Da sinistra: gommosi delle piante da frutto, rogna dell'olivo, rogna della vite.

Il caso Xylella

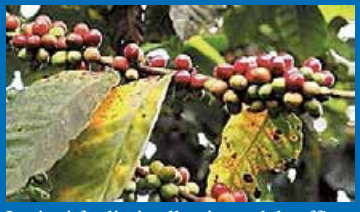
Xylella fastidiosa è un batterio aerobio, a forma di bastoncino (nella foto, al microscopio elettronico), Gram-negativo, classificato nella famiglia delle *Xanthomonadaceae*. Finora nella specie *X. fastidiosa* sono state individuate 4 sottospecie: *X. fastidiosa fastidiosa, X. fastidiosa multiplex, X. fastidiosa sandyi* e *X. fastidiosa pauca;* a quest'ultima appartiene il ceppo CODIRO, l'agente della sindrome che ha colpito l'olivo nel Salento.
Xylella fastidiosa colpisce moltissime specie, tra cui la vite, l'olivo, l'olmo, il platano, l'oleandro, gli agrumi, il caffè e le piante da frutto più familiari (ciliegio, susino, pesco, albicocco, mandorlo).

Il batterio si diffonde attraverso l'azione di insetti vettori (i più noti sono cicaline, famiglia *Cicadellidae*), in grado di trasmettere il batterio nutrendosi prima dai vasi xilematici delle piante infette (acquisizione) e poi su quelli di piante sane (inoculazione). In Italia il vettore del batterio è *Phylenus spumarius* (detta "Sputacchina") che è in grado di alimentarsi su piante di specie diverse che fungono così da serbatoio del patogeno. In olivo il batterio invade i vasi xilematici della pianta e, aggregandosi in colonie, ostruisce il passaggio di acqua e nutrienti. Il deperimento della pianta o di parti di essa è il sintomo del fenomeno di disidratazione.
5.000 Km^2 colpiti dal contagio, più di tremila piante abbattute in Puglia, danni incalcolabil per la produzione d'olio. Le preoccupazioni più gravi sono legate alla necessità di reimpiantare nuovi oliveti nelle aree di insediamento della malattia e al lento ma progressivo avanzamento della malattia in Puglia. Se per la prima questione la ricerca ha messo a disposizione varietà resistenti e/o tolleranti, per la seconda, cioè il contenimento della malattia, si ritiene che essa sarà pressoché impossibile da realizzare.

Il vettore

Il fungo

I danni da *Xylella* erano già noti sulla vite nella malattia di Pierce



Lesioni fogliari sulla pianta del caffè da *Xylella*

QUESTI SONO DAVVERO CATTIVI

Nelle aree tipiche di coltivazione del **pomodoro,** le batteriosi che si riscontrano con maggior frequenza sono causate da *Pseudomonas syringae pv. tomato* e *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. I primi attacchi sulla coltura di norma sono causati da *Pseudomonas syringae*, la ben nota **picchiettatura batterica**, perché questa specie trova il suo sviluppo ottimale in condizioni di clima fresco, cioè con temperatura di 15-20°C, umidità relativa superiore all'80% e presenza di un velo d'acqua sulla superficie della foglia. La **maculatura batterica**, causata da *Xanthomonas campestris*, compare più tardi perché si sviluppa con temperature più elevate (22-26°C) e, come la batteriosi precedente, è favorita da umidità ambientale elevata.

• ***Pseudomonas syringae*** è un Gram-negativo che danneggia gravemente differenti colture. Nella varietà *actidiniae* colpisce le piante di **kiwi**. Le foglie presentano maculature con alone clorotico. Non ci sono mezzi di lotta, se non l'abbattimento delle essenze colpite. Il batterio penetra attraverso stomi o ferite e dal floema passa nel cambio fino ad arrivare nei vasi xilematici, da dove poi può raggiungere le radici. **É attivo a temperature fra i 10 e i 20°C**; le infezioni possono avvenire in **primavera, inizio estate e in autunno – inverno** e in situazioni di **forte umidità, trasmesse da api e altri insetti.**

• ***Xanthomonas campestris*** attacca anche il **peperone,** sul quale si formano tacche necrotiche circondate da un alone clorotico, seguite da disseccamento e clorosi fogliare diffusa accompagnate da **distacco delle foglie dalla pianta**. Un'altra specie, ***Xanthomonas arboricola varietà pruni*** infetta le piante di **pesche i**n primavera ed autunno, quando le temperature sono di 20-25°C. Le vie d'ingresso del batterio sono gli stomi e le ferite causate da potatura, grandine e caduta delle foglie. Sui frutti si vedono piccole maculature che diventano scure e talvolta circondate da un alone verde-giallo.

Un'altra malattia batterica molto diffusa in Europa è il cosiddetto "colpo di fuoco" da ***Erwinia amylovora***, un Gram-negativo appartenente alle *Enterobacteriaceae* che colpisce il **melo**, il **pero e le rosacee in genere (cotogno, nespolo, ecc)**. Dai cancri presenti sulle piante infette i batteri evadono sotto forma di essudato e vanno ad infettare fiori, foglie e germogli. Il periodo più critico per le infezioni è la fioritura, mentre la pioggia, il vento e le operazioni colturali contribuiscono alla sua diffusione. Il germe viene trasportato anche da insetti vettori. Le cellule batteriche, sia *in vitro* che nelle piante, sono circondate da uno strato di polisaccaridi addensati a formare una capsula protettiva. Si tratta di un'indice di virulenza.

Gli **STREPTOMICETI** sono batteri aerobi Gram-positivi di aspetto filamentoso. Formano degli intrecci simili al micelio dei funghi e si moltiplicano per frammentazione delle propaggini. Sono agenti della "scabbia" delle patate.

Nota tecnica

L'attrezzatura necessaria assomiglia molto a quella di un normale laboratorio di analisi cliniche in umana o in veterinaria. In pratica occorre una cappa a flusso laminare verticale per lavorare in ambiente protetto, un termostato a 15-25°C, un frigorifero a +4°C, un bagnomaria termostatato, autoclave, microscopi stereo e ottico tradizionale. Oltre alla dotazione classica di pinze, forbici, provette, piastre di Petri, pipette, vetrini portaoggetti, è di notevole aiuto la cosiddetta "camera umida" (*foto*) per mantenere foglie e quant'altro prelevato dalla pianta in condizioni di sopravvivenza per iniziare le analisi.

I terreni di coltura sono destinati all'isolamento di batteri comuni e di funghi. Alcuni nomi: *Water Agar, Potato Dextrose Agar, V8 Agar, Leaf Extract Madium, Chinese Bean Broth*, ecc).

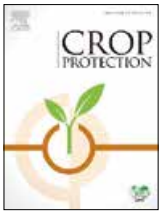
Lo studio delle lesioni inizia con un esame microscopico dei pezzi prelevati, seguito dalla preparazione di un macerato in sospensione acquosa (foglie, sezioni di frutti o radici) destinato alle semine sui terreni batteriologici.

Dopo incubazione in termostato (in genere a +25°C per almeno 72 ore), avviene il riconoscimento delle colonie sviluppate. Solitamente vengono allestiti trapianti in coltura pura delle colonie sospette su terreni analoghi a quelli di primo isolamento per procedere poi all'identificazione con l'ausilio di strisci e colorazione dei preparati (basilare il metodo di Gram), prove biochimiche classiche o agglutinazioni con sieri diagnostici specifici.

Anche qui due metodiche non convenzionali hanno apportato benefici in fatto di rapidità e di precisione. Si parla della tecnica ELISA che sfrutta anticorpi diagnostici moniclonali e delle metodiche di biologia molecolare (*Polymerase Chain Reaction* o PCR, specie nella versione *Real-Time*).

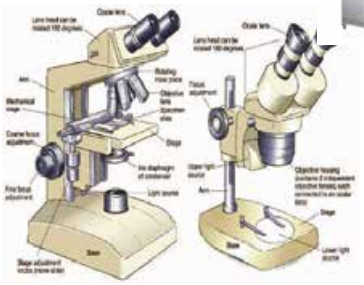
(da Sileshi F. *e Coll.*, Plant Disease Diagnosis, Ethiopian Institute of Biodiversity, 2016; Putnam M., Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis, Crop Protection 1995, *14*, 517-525

La ricerca in laboratorio



Camera umida per conservare i preparati destinati all'esame immediato in laboratorio

A destra:
Schema di funzionamento di una cappa a flusso laminare verticale



Due tipi di microscopio a confronto (a destra uno stereo-microscopio a basso ingrandimento e.g. 100x)

Le classiche colture su piastra con le colonie di batteri isolati dalle lesioni delle piante. I terreni scelti sono in funzione delle specie microbiche sospettate (batteri, funghi).

La preparazione del macerato dai tessuti lesionati dei vegetali in esame, ad esempio foglie.

LE PIANTE NON LI SEGNALANO, MA ESISTONO ANCHE QUESTI CASI…

Si sa che circa il 15 % delle tossinfezioni da *Salmonella* sarebbe legato al **consumo di vegetali crudi** (germogli alfalfa, melone, pomodori, lattuga, ecc). In effetti nei vegetali possono trovare alloggio germi potenzialmente patogeni per l'uomo e gli animali, la cui presenza trae origine dal contatto con materiali molto spesso inquinati, cioè terreno, concimi ed acque d'irrigazione. Sicuramente i germi entrano nelle piante attraverso le radici o i fiori, mentre il viaggio all'interno dei frutti non è stato ancora completamente spiegato (Guo *e Coll*., 2001, 2002).

Microrganismi pericolosi per la salute umana sono stati occasionalmente isolati **dall'interno di prodotti vegetali commestibili**. Dal 2004 al 2010 sono stati segnalati (Waller, 2015) numerosi casi di pomodori contaminati da salmonelle (dei sierotipi *Typhimurium*, *Saint-paul*, *Newport*, *Blockley*, *Hwittingfoss*, *Berta*, *Javiana*, *Montevideo*, ecc.) in diversi stati USA (New Mexico, Texas, Illinois, Pennsylvania, Maryland, Virginia, Minnesota, Iowa). Sembra verosimile che questi patogeni umani usino le piante (e in particolare **il pericarpo del pomodoro nella varietà Roma**) come ospite alternativo del loro ciclo vitale, sfruttando meccanismi diversi per l'adattamento alle piante non ancora completamente spiegati. Sarebbero coinvolti – nel caso delle salmonelle – trasposoni e 50 geni codificanti il metabolismo della cisteina, oltre agli antigeni somatici O e alle fimbrie, che svolgono ciascuno dei ruoli differenti nella colonizzazione dell'ospite (De Moraes *e Coll*., 2017). **La pianta non dimostra sintomi di malattia in seguito all'ingresso dei patogeni elencati in tabella, ma risponde con il proprio sistema immunitario** innato, che mostra forti convergenze evolutive con quello animale. Nei due regni si usano gli stessi meccanismi molecolari per individuare batteri e virus e trasmettere l'allarme**.** Piante, insetti e mammiferi, infatti, pur avendo proteine altamente specifiche dedicate ad avvertire la presenza di molecole batteriche, condividono regioni proteiche comuni. La chiave della somiglianza starebbe nella presenza ripetuta dell'aminoacido leucina, importante nella fase di riconoscimento del nemico. Poi, dopo aver riconosciuto il segnale di pericolo, tutte le cellule, non importa a quale specie appartengano, trasmettono l'allarme usando un altro motivo proteico comune (chiamato motivo chinasico non-RD, ovvero privo degli aminoacidi arginina e aspartato) (www.galileonet.it).

I generi di batteri prevalenti nell'insorgenza di malattie da alimenti vegetali nell'uomo sono riassunti nella seguente tabella (da J.W. Buck, 2003)

Aeromonas hydrophila	alfalfa germogli, asparagi, broccoli, cavolfiore, sedano, lattuga, peperoni, spinaci
Bacillus cereus	alfalfa germogli, crescione germogli, cetrioli, senape germogli, semi di soja germogli
Campylobacter jejuni	Cipolle verdi, lattuga, funghi, patate, prezzemolo, peperoni, spinaci
Clostridium botulinum	cavoli, funghi, peperoni
***E. coli* O157:H7**	alfalfa germogli, succo d'albicocca, cavoli, sedano, coriandolo, crescione germogli, lattuga
Listeria monocytogenes	Piselli germogli, cavolo, cicoria, cetrioli, melanzana, lattuga, funghi, patate, radici, insalate, pomodori
***Salmonella* spp.**	alfalfa germogli, carciofi, foglie di barbabietola, sedano, cavolo, melone, cavolfiore, *chili*, coriandolo, melanzana, indivia, finocchio, cipolle verdi, lattuga, fagioli indiani germogli, senape, succo d'arancia, prezzemolo, peperoni, insalate verdi, spinaci, fragole, pomodoro, anguria

Shigella dysenteriae	sedano, melone, lattuga, prezzemolo, scalogno
Staphylococcus aureus	alfalfa germogli, carote, lattuga, cipolle germogli, prezzemolo, radici
Vibrio cholerae	cavolo, latte di cocco, lattuga

I GERMOGLI : UNA MODA RECENTE (CON QUALCHE PERICOLO)

Sono apprezzati come "*cibo salutistico*" per il basso apporto di calorie, grassi e sodio, mentre sono ricchi di vitamine, oligominerali e altri fitochimici utili alla salute.
Vengono generalmente prodotti industrialmente da sementi di molte specie vegetali: alfalfa, broccoli, piselli, soja che vengono irrigate in serra su appositi supporti. I germogli vengono raccolti dopo 3-10 giorni, lavati e confezionati in sacchetti o vaschette di plastica. Si possono far crescere anche in casa, in vasi di vetro chiusi con una garza (www.leitv.it).
Il caldo e l'umidità del luogo di coltivazione favoriscono la proliferazione di batteri, tra cui primeggiano ***Listeria monocytogenes***, ***Salmonella*** ed ***Escherichia coli O157:H7***.
Dal 1996 ci sono stati almeno 30 episodi di tossinfezione da questi germi, veicolati da germogli mangiati crudi o poco cotti. I sintomi di chi si ammala sono diarrea, nausea, dolori addominali e febbre per alcuni giorni. Nei giovani, negli anziani e negli immuno-depressi *E. coli O157:H7* può condurre ad una sindrome emolitico-uremica (HUS) che danneggia i reni (extension.psu.edu).

Studi accurati sui germogli (e sui relativi pericoli per la salute) sono stati condotti da **Luke Labord**, Ph.D. della *PennState University* (USA).

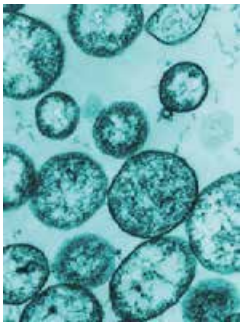
PennState
College of Agricultural Sciences

alfalfa sprouts

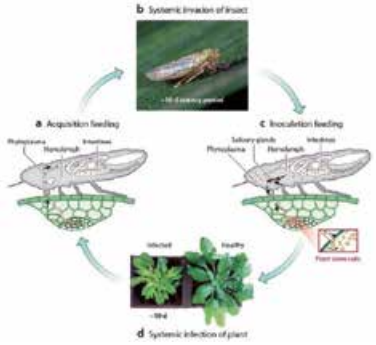
La "*crisi dei germogli*" – cioè la tossinfezione da *Escherichia coli* veicolata da germogli di erba medica, lenticchie, fagioli e fieno greco (importati dall'Egitto) coltivati in un'azienda biologica della Bassa Sassonia che riforniva diversi ristoranti, dai quali il contagio è poi partito attraverso il consumo nelle insalate – ha causato 48 decessi in Germania e uno in Svezia e 4.100 contagi tra Europa e Nord America. In seguito ai focolai infettivi sviluppatisi tra la primavera e l'estate 2011 in Francia e Germania, la Commissione europea ha richiesto all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (Efsa) un parere sui pericoli microbiologici associati al consumo dei semi destinati alla germinazione e dei semi germogliati (germogli, germogli embrionali e crescione). Nella valutazione del rischio, l'Efsa ha raccomandato l'adozione di misure di sicurezza supplementari per l'intera catena di produzione dei semi germogliati.
La contaminazione dei semi può infatti avvenire attraverso l'uso di acqua di irrigazione contaminata o particelle del terreno. Inoltre, anche la temperatura elevata e l'umidità necessarie per la germinazione sono condizioni favorevoli a una proliferazione di batteri patogeni, che possono pertanto causare focolai infettivi, anche in presenza di livelli di contaminazione dei semi molto bassi (4 batteri/kg).
"L'ipotesi dei germogli nella trasmissione di ceppi patogeni di *E. coli* - spiega Alfredo Caprioli dell'Istituto Superiore di Sanità - è sempre stata quella più plausibile anche perché, vista la loro delicatezza, non sono coltivati in terra, ma in vaschette con acqua e sali nutrienti, a temperature abbastanza elevate. In pratica, è lo stesso metodo che utilizziamo noi in laboratorio per coltivare un batterio: è l'*habitat* ideale" (www.epicentro.iss.it).

1967 – Ricercatori giapponesi (Doi *e Coll*., 1967) scoprono che il giallume dell'**astro**, gli scopazzi della **patata** e il nanismo del **gelso** sono causati da microrganismi piccolissimi che vivono esclusivamente all'interno delle cellule. Li chiamano MLO (*Mycoplasma-Like-Organisms*).

Nel 1972 Davis *e Coll*. studiano la malattia denominata *Corn Stunt Disease*, il rachitismo del ***mais*** (le foglie mostrano striature rossastre) e scoprono l'esistenza di micoplasmi particolari, a forma di spirale e mobili che si lasciano coltivare *in vitro*. Da qui la denominazione di "***spiroplasmi***". L'anno seguente Lee *e Coll*. scoprono che un altro microrganismo spiralato causa la *Citrus Stubborn Disease*. Le foglie e i frutti degli agrumi sono più piccoli (nanismo) e all'interno dei **limoni** si formano depositi biancastri che li rendono non commerciabili. È una cicala, *Circulifer tenellus*, a diffondere i germi.



Dopo la scoperta degli spiroplasmi, nel 1994 venne pubblicato il primo articolo nel quale il Comitato internazionale per la tassonomia dei batteri ha riconosciuto l'esistenza del genere *Candidatus Phytoplasma*. Da allora numerose specie di "***fitoplasmi***", sono stati identificati in questo genere, appartenente alla classe *Mollicutes*. Ne sono vittime la vite (Flavescenza dorata e Legno nero), alberi d'alto fusto (**castagno, olmo, frassino**) ma anche nelle zone temperate le **fragole** (*P. fragariae*) e i **pomodori** (*P. licopersici*). L'infezione non risparmia neppure piante esotiche come **canna da zucchero, noce di cocco, *papaya*, *lime***).



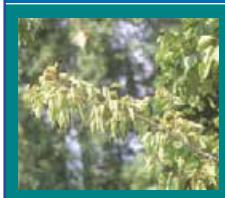
Purtroppo gran parte delle essenze di grande valore economico, le piante da frutto, sono esposte al rischio di malattie da fitoplasmi, dei quali vengono continuamente scoperte nuove specie. E sono trasmessi quasi sempre da cicale. Il ruolo degli insetti è ben raffigurato nel disegno.

Regina delle feste sotto l'albero, *Euphorbia pulcherrima* è la pianta ornamentale conosciuta come "Stella di Natale". Era di dimensioni ben più grandi, ma un'infezione da fitoplasmi ha permesso la selezione di una varietà nana, rendendola adatta alla vendita in vaso.

"Scopazzo del melo"

P. mali appartiene allo stesso gruppo del "*Pear decline*" e del "*Giallume delle drupacee*". Mostra i seguenti sintomi: affastellamento dei germogli, disposizione dei rami "a scopa", frutti piccoli, poco colorati, insapori (nelle varietà Golden, Delicious, Gala). Facilita l'impianto dell'oidio (fungo) sulla pianta.

• VETTORE: *Cacopsilla costalis*



"Giallume delle drupacee"

Le drupacee sono alberi da frutto che appartengono alla famiglia delle Rosacee. Ne fanno parte il **pesco, il susino, l'albicocco, il mandorlo** e il **ciliegio**. La malattia dà arrossamento e arricciamento fogliare, clorosi, formazione di corpi inclusi, mortalità delle piante in 12-24 mesi. Incidenza: 60/70% in Francia. Presente in Sud Africa, Germania, Svizzera, Europa mediterranea (Italia: in Emilia-Romagna) Periodo: estate (Ragozzino *e Coll*., 1983)

• VETTORE: *Cacopsilla pruni*

"Legno nero" (*Bois noir*) della vite

Caratterizzato da ingiallimento e ispessimento delle foglie, che assumono una forma triangolare e accartocciata mentre i tralci che restano verdi anche in inverno sono cadenti e necrotizzano con il freddo invernale. I tralci disseccano e la produzione viene a mancare sui tralci colpiti,

• VETTORE: *Hyalestes obsoletus*

"Pear decline"

Pere, mele. Scarsi frutti, arrossamento e perdita delle foglie, lento declino della pianta. Incidenza: epidemie estese in Italia negli anni '50, Moldavia, Europa mediterranea, Inghilterra, Africa (Libia), Nord America. Periodo: autunno (Refatti, 1967)

• VETTORE: *Cacopsiylla pyri*

"Potato Stolbur"

Produzione di stoloni. **Pomodori**: ingiallimento delle foglie, arresto della crescita dei frutti. Colpisce anche **convolvulacee** e **trifoglio** (Borges *e Coll*., 1972).

• VETTORE: *Hyalestes obsoletus*

"Aster yellows"

P. asteris colpisce >200 specie, trasmessa con la saliva da un insetto omottero di 4 mm bruno-verde con ali semitrasparenti in Europa, Asia, Australia. Periodo: estate. Incubazione malattia: 1-2 mesi.

• VETTORE: *Macrosteles fascifrons*

MALATTIE DA MICETI

Normalmente presenti	*Habitat*	*Specie prevalenti*
Lieviti	Fusto	*Candida, Cryptococcus, Pichia, Rhodotorula*
Funghi	Radici, fusto	*Mucor, Fusarium*

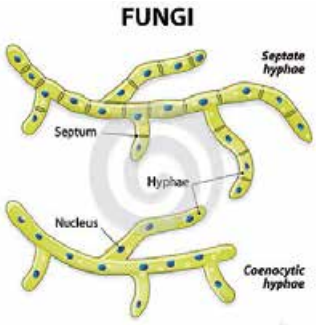
Sono tre le famiglie di prioritario interesse agrario:

1. MIXOMICETI – Sono microrganismi senza membrana con molti nuclei. Vengono classificati fra i Protisti per la somiglianza con le amebe. Se le riserve alimentari si riducono sono in grado di aggregarsi in un'unica massa citoplasmatica, detta *plasmodio***,** eliminando le membrane cellulari divisorie. Normalmente vivono nel terriccio e si nutrono di sostanze organiche o di altri microrganismi ospitati da graminacee, fragole, trifoglio, ecc. che parassitano senza dare apparenti malattie. Il loro ciclo riproduttivo è complesso e passa attraverso la formazione di spore. Rovinano specialmente i **tappeti erbosi di parchi, giardini e campi da golf**, deturpando la lucentezza delle foglie.

2. PLASMODIOFOROMICETI – Tra questi, *Polymixa* dà l'ernia del cavolo e *Spongopora* un tipo di scabbia della **patata**. Il corpo è un plasmodio (da cui il nome) cioè una massa senza parete con dentro tanti nuclei. Si moltiplicano mediante spore.

3. OOMICETI – Sono diversi dai veri funghi per quanto riguarda caratteristiche molecolari, strutturali e fisiologiche. Apportano gravissimi danni alle colture, ad esempio con la ***peronospora della patata*** (causa di carestie micidiali in Europa del Nord nei secoli scorsi) e con la ***peronospora della vite*** (*Plasmopora viticola)*.

   La **peronospora della vite** è originaria del Nord America e si è diffusa in Europa a partire dalla fine del XIX secolo. I primi sintomi si riscontrano sulla pagina superiore delle foglie sotto forma di aree giallastre e tipicamente traslucide (dette macchie d'olio) nei vitigni a uve bianche e rosse, rossastre in vitigni ad uve nere. Si formano poi sulla pagina inferiore delle foglie delle efflorescenze biancastre, costituite dagli organi di riproduzione agamica del fungo. I sintomi a carico dei grappoli fino alla chiusura del grappolo si manifestano con una decolorazione e un ripiegamento a forma di uncino o di esse. I grappoli possono venir ricoperti dalle fruttificazioni della *Plasmopara viticola* e quindi seccare. Dall'invaiatura in avanti, gli acini subiscono un viraggio di colore verso il viola, disseccano e cadono senza che si assista all'evasione del fungo con i rami sporangiofori e sporangi.

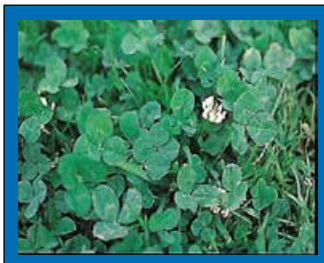


4. ASCOMICETI - Tutti conoscono i danni alle piante ornamentali (**rosacee** *in primis*) da *Sphaerotheca pannosa*, il cosiddetto *oidio* o ***mal bianco***. Tra le piante d'alto fusto sono colpiti (probabilmente da un fungo mitosporico) gli **olmi** e i **platani**.

5. BASIDIOMICETI – Essi comprendono agenti di malattie dei **cereali** (***carbone*, *ruggine del frumento*** da *Claviceps purpurea*). La farina proveniente da cereali contaminati da *Claviceps purpurea* può contenere alcaloidi tossici causa di ergotismo nell'uomo.

   L'**ergotismo** era conosciuto con diversi nomi, quali "fuoco sacro", degli "ardenti" e di "Sant'Antonio", per il fatto che gli individui colpiti da questa intossicazione venivano curati dai monaci dell'ordine di Sant'Antonio. Oltre a manifestazioni fisiche, quali la cancrena, spesso provocava anche allucinazioni. Nel 1853 il ciclo riproduttivo della *Claviceps purpurea* fu identificato e descritto dal botanico francese Louis René Tulasme.

6. ZIGOMICETI – A questo raggruppamento afferiscono sia funghi microrrizici (ordine *Glomales*) sia agenti di marciume (ordine *Mucorales*).


Mixomicosi su trifoglio nano

Ernia del cavolo

Peronospora della patata

Peronospora della vite

Mal bianco delle rosacee

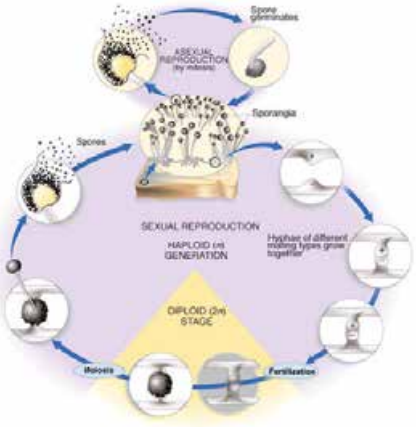
Grafiosi dell'olmo

Moniliosi del melo

Carbone volante (*Ustilago*) nei cereali

Claviceps purpurea nel frumento

Alcune manifestazioni di malattie fungine nelle piante

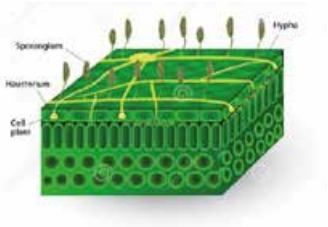


Ciclo riproduttivo degli Oomiceti

Ruggine delle rose

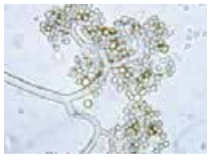
È una malattia fungina caratterizzata dalla formazione di una polvere rossastra simile a ruggine. L'agente patogeno si chiama *Phragmidium subcorticium*. Inizia a primavera il suo ciclo riproduttivo, dopo un periodo di svernamento sotto forma di spore. Le piante infette subiscono un rallentamento del ritmo vegetativo, con perdita di foglie e disseccamenti parziali o totali.

Alcuni funghi crescono su materiale animale o vegetale morto e per questo motivo vengono detti *saprofiti*. Molti funghi vivono in associazione con le radici delle piante costituendo una simbiosi: le micorrize, nelle quali la pianta fornisce al fungo gli zuccheri per il metabolismo, mentre il fungo fornisce alla pianta acqua e importanti sali minerali come il fosforo. I lieviti sono unicellulari e microscopici a differenza dei miceti a tallo filamentoso, che invece sono pluricellulari e possono formare corpi fruttiferi macroscopici.



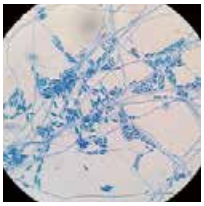
Altre due malattie da funghi assai diffuse…

MUFFA GRIGIA – Si sviluppa prevalentemente in ambienti umidi e poco areati, provocando delle aree marcescenti su fusti e foglie che, successivamente, si ricoprono di una caratteristica muffa grigiastra, causata da un fungo, ***Botrytis cinerea***. È una delle malattie più frequenti delle piante da fiore, ma anche delle pomacee (melo, pero) e drupacee (pesco, albicocco) oltre che della **vite**. La difesa preventiva si basa sull'adozione di corrette pratiche agronomiche, tra le queli assume molta importanza un corretto arieggiamento della chioma, e sull'impiego di sostanze attive ad attività fungicida o di agenti di biocontrollo.



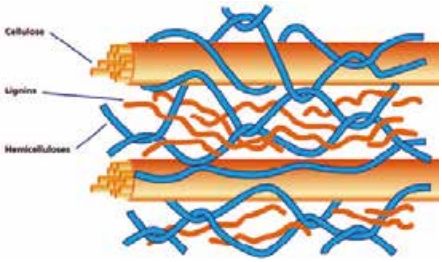
FUSARIOSI – Sono originate da funghi del genere ***Fusarium,*** che causano improvvisi avvizzimenti della pianta, seguiti in tempi brevi dalla morte. La difesa è piuttosto difficile e non sempre si ottengono risultati soddisfacenti. Preventivamente si può intervenire distruggendo con il fuoco le parti o

le piante infette e disinfestando il suolo, prima delle semine o della piantagione dei bulbi, con vapore d'acqua o prodotti chimici idonei.



Fusarium verticillioides è un agente patogeno del mais in grado di produrre nelle cariossidi delle *micotossine,che si trasferiscono nei mangimi e quindi negli alimenti*, fino a giungere negli animali e nell'uomo. ***Fusarium oxysporum*** è implicato nella cosiddetta "malattia di Panama", che colpisce le banane, distruggendo il raccolto. ***Fusarium graminearum*** infetta numerosi cereali tra cui l'orzo, un ingrediente essenziale per la produzione della birra.

QUANDO FUNGHI E BATTERI COOPERANO A DEMOLIRE IL LEGNO



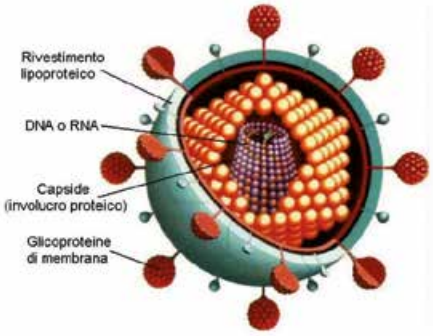
Batteri e funghi sfruttano le sostanza nutritive prodotte dalle piante e demoliscono la cellulosa in zuccheri. Negli attacchi da parte dei funghi, alcuni di essi si limitano ad insediarsi sulla superficie del legno, senza influenzarne le caratteristiche meccaniche. Altri, invece (in genere funghi perfetti) sono in grado di digerire e demolire i componenti della parete cellulare, propagandosi o per accrescimento del micelio, a scapito dei componenti del tessuto legnoso, o per disseminazione di spore, rilasciate dai *corpi fruttiferi*. Le spore, che si posano sulla superficie del legno, con umidità superiore al 20% germinano e danno luogo alla formazione del micelio, dopodiché le ife si diffondono sia in superficie che in profondità, con conseguente degradazione dello stesso.

Il fenomeno della degradazione assume diversi contorni, dando luogo essenzialmente a quattro tipi di lesioni, chiamate "**marciumi"**.

Tipo di lesione	Agente eziologico	Aspetto fisico
Marciume (o carie) **molle** (*soft rot*)		I miceti demoliscono i glucidi, che vengono utilizzati come fonte di energia. La lignina viene liberata dalle altre componenti e si trasforma in una massa scura e amorfa. Il legno subisce una leggera diminuzione di peso. Specie prevalenti: ***Chaetomium, Alternaria, Xylaria***
Marciume **bruno** (*brown rot*)		I funghi della carie bruna attaccano con rapidità molto elevata i polisaccaridi e quindi la cellulosa e l'emicellulosa del legno, che tende ad assumere un colore bruno ed inizia a rompersi secondo superfici perpendicolari fra loro (da cui anche il nome di carie "a cubetti"). Specie prevalenti: **Basidiomiceti**

Tipo di lesione	Agente eziologico	Aspetto fisico
Marciume **bianco** (*white rot*)		I funghi della carie bianca attaccano simultaneamente tutti i costituenti del legno, che si presenta di colore più chiaro rispetto al normale, perde di peso e tende a separarsi in masse di aspetto fibroso. La struttura si conserva fin tanto che resistono le fibre di cellulosa. Specie prevalenti: **Ascomiceti, Basidiomiceti (*Fomes*, *Clavaria*, *Collybia*)**
Marciume **secco**		È descritto anche un quarto tipo di marciume, definito "*secco*", attribuito alla colonizzazione da *Serpula (Merulus) lacrymans*. Questa specie di ascomicete è stata per la prima volta descritta col nome di *Boletus lacrymans* da Franz Xavier von Wülfen nel 1781 e fa diventare il legno di colore bruno-rosso.

MALATTIE DA VIRUS



I ***Fitovirus*** (se ne conoscono oggi circa 700) possiedono una catena singola o doppia di DNA o di RNA e sono diversi dai virus zoopatogeni perché:

- hanno spesso (ma non sempre) forma tubolare
- entrano passivamente nelle cellule delle piante
- usano proteine particolari per passare da cellula a cellula
- codificano poche proteine (da 4 a 12)
- il loro genoma è diviso in particelle dalle forme caratteristiche (icosaedro, bastoncino, tubulare, ecc.).

Come tutti i virus non hanno un'organizzazione cellulare e il loro *habitat* è dentro il citoplasma o il nucleo delle cellule dell'ospite, dove codificano proteine destinate alla sintesi di nuove molecole di acido nucleico. Ne esistono una ventina di famiglie con più di 50 generi. Portano spesso il nome della pianta parassitata o un sintomo caratteristico della malattia (ad esempio, mosaico del tabacco).

Ciascun virus ha un modo di trasmissione prevalente:

- diretta, quando una pianta infetta sfrega contro una sana, aprendo microferite che aprono un passaggio.
- Indiretta, nelle operazione di coltivazione (ad esempio, innesti, talee). In questi casi sono responsabili le mani e gli attrezzi infetti, ma anche sementi e pollini.

Esistono poi i cosiddetti "*vettori biotici*" (insetti, nematodi, acari) che albergano il virus che si moltiplica nell'intestino e lo trasmettono mediante punture multiple su foglie e fiori.

Nelle cellule della pianta il virus contatta i ribosomi e sintetizza una catena complementare del suo RNA con l'intervento dell'enzima polimerasi. Il virus passa poi ad altre cellule lungo i plasmodesmi (canali di intercomunicazione fra cellule contigue). I sintomi più comuni sono:

- Le piante possono mostrare sintomi acuti e severi subito dopo l'infezione che possono portare a morte di rami giovani o dell'intera pianta
- Se l'ospite sopravvive all'infezione puo' mostrare sintomi cronici che possono essere recuperati
- In altri casi questo stato cronico porta a deperimento la pianta intera
- I tipi di sintomi piu' comunemente registrati nelle infezioni virali sono I mosaici o le macchie anulari (**mosaics and ring spots**)
- I **mosaici** sono caratterizzati da aree verde-pallido, gialle o bianche intervallate con aree normali su foglie, fiori e frutti
- I **ring spots** sono caratterizzati dalla comparsa di anelli clorotici o necrotici sulle foglie e qualche volta su fusto e frutti

I sintomi delle virosi sulle foglie si vedono meglio d'estate, mentre sui fiori si apprezzano meglio in primavera. Nelle foto: lesioni a **mosaico** (in alto) e ***ring spot*** (in basso). (da slideplayer.it)

Per la possibilità di moltiplicazione nei trapianti, i *Fitovirus* sono l'incubo dei vivaisti. Per colpa degli insetti vettori, invece, sono una minaccia incombente sulle coltivazioni di piante da frutto.

Il **Virus del mosaico del tabacco** è l'agente eziologico della malattia che colpisce la **barbabietola da zucchero, il cetriolo, il *mais*, la patata, il pisello, il pomodoro** e il **tabacco**. È un virus altamente infettivo che si trasmette per contatto senza il concorso di vettori.

La malattia si manifesta con la formazione di macchie di colore giallo o verde sulle foglie della pianta. Si presentano spesso anche deformazione o increspamento della foglia.

È stato il primo virus ad essere osservato dall'uomo nel 1892 dallo scienziato russo **Dimitrij Ivanovskij**, botanico e biologo russo. Nel 1898 il virus fu studiato dal botanico olandese Martinus Willelm Beijerinck. Di recente, il virus del mosaico del tabacco (TMV) è diventato un problema in colture come *Petunia, Nicotiana* e *Impatiens*.

Le virosi più facilmente individuabili sono quelle che si sviluppano "a mosaico", cioè con decolorazioni delle foglie che presentano macchie gialle (ricordano un mosaico e che a volte possono trasformarsi in vere e proprie bollicine).

Lesioni a mosaico su fogliame della **rapa** e del **cavolo** *(da Cauliflower Mosaic Virus)*

Altre virosi possono portare a nanismo e blocco della crescita della pianta, deformazioni dei frutti, limitazione della capacità riproduttiva. Spesso compaiono striature di colore scuro sui frutti. Virus estremamente dannosi sono: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellows mosaic virus* (ZYMV) *Watermelon mosaic virus* (WMV), il **mosaico comune del fagiolo** (BCMV), del **sedano** (CEMV) e della **rapa** (CaMV). Le piante da frutto sono le più a rischio di virosi. Un tipo di virus diffuso anche in Italia è il *Sharka* (o *Plum Pox Virus*, PPV) dal nome bulgaro (= vaiolo) che interessa **pesco**, **albicocco, susino** e **ciliegio** con zonature anulari dei frutti, infossatura della polpa dalla consistenza stopposa.

Contro la *Sharka* non esistono interventi curativi e la lotta chimica contro gli afidi che lo trasmettono è scarsamente efficace.

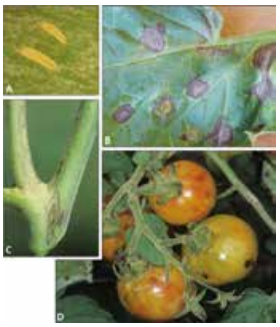
In numerose coltivazioni di cavolo cinese - *Brassica rapa L.*, ssp. *Pekinensis* - dell'Emilia-Romagna e delle Marche è stato riscontrato il virus del mosaico giallo della rapa, meglio conosciuto come TYMV (da *Turnip yellow mosaic virus*) appartenente alla famiglia *Timoviridiae*. La trasmissione del TYMV è provocata da numerosi coleotteri curculionidi e crisomelidi, ma di recente è stata accertata anche la trasmissione per seme.

La **fragola** è interessata da **una ventina di specie virali** appartenenti a 14 generi, di cui una decina segnalate anche in Italia, tra cui il virus del mosaico del melo (*Apple Mosaic Virus*, ApMV), il virus del mosaico dell'*Arabis* (*Arabis Mosaic Virus*, ArMV), il virus della maculatura anulare latente della fragola (*Strawbwerry Latent Ring Spot Virus*, SLRV), il virus della maculatura anulare nera del pomodoro (*Tomato Black Ring Virus*, TBRV) e il virus della necrosi del tabacco (*Tobacco Necrosis Virus*, TNV).

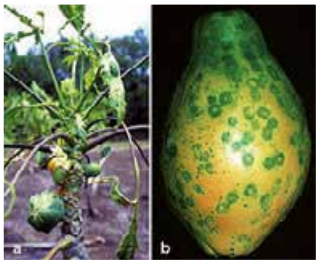
Esistono anche altri virus delle fragole che possono danneggiare la produzione: il virus dell'arricciamento (*Strawberry Crinkle Virus*, SCV), il virus dell'ingiallimento del bordo (*Strawberry Mild Yellow Edge Virus*, SMYEV), il virus della maculatura (*Strawberry Mottle Virus*, SMoV), il virus della scolorazione perinervale (*Strawberry Vein Banding Virus*, SVBV), il virus associato alla pallidosi (*Strawberry Pallidosis Associated Virus*, SPaV) e il virus associato alla maculatura clorotica (*Strawberry Chlorotic Fleck Associated Virus*, StCFaV). Vengono trasmessi da **insetti** (aleurodidi, afidi) o da **nematodi**.

Il **virus Y della patata**, detto anche PVY (*Potato Virus Y*), è uno dei virus mondiali più importanti in assoluto da un punto di vista economico. Al di là dei classici ceppi PVY^{O} e PVY^{N}, negli ultimi trent'anni sono emerse delle nuove forme ricombinanti. In Europa troviamo soprattutto due nuovi ceppi, il PVY^{NTN} e il $PVY^{N}W$. Influisce sulla qualità del prodotto, causando delle necrosi anulari sulla superficie del tubero. Colpisce anche il **pomodoro**.

Migliaia di piante di pomodoro vengono parassitate dal TSWV (*Tomato Spotted Wild Virus*). Le cui particelle sono trasportate da insetti (tripidi) che acquisiscono il virus durante lo stadio larvale, mantenendolo per tutta la vita. Le piante infettate mostrano arricciamenti e chiazze rossastre sulle foglie (B) oppure lesioni ai rami (C) con macchie rosse sui frutti (D).



Il ***Citrus Tristeza Virus*** *è un Closterovirus*, originario del sud-est asiatico, diffuso in tutto il mondo provocando epidemie molto gravi in Brasile, Venezuela e Argentina. I sintomi della malattia (trasmessa anche da insetti del genere *Toxoptera*) sono butterature del legno, giallume delle foglie, nanismo dei frutti, deperimento delle piante innestate su arancio amaro (arancio dolce, mandarino, pompelmo). Attacca di preferenza le arance rosse (Tarocco, Moro, Sanguinella).

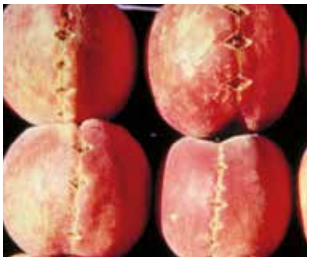


PAPAYA RINGSPOT VIRUS - Identificato del 1949 e classificato nei *Potyvirus*. Non esistono trattamenti per il contenimento dell'infezione trasmessa da afidi. Attacca caricacee, cucurbitacee e chenopodiacee. Le piante giovani muoiono, quelle adulte sopravvivono, ma non producono frutti o, se li producono, sono di aspetto non commerciabile.

I **virus che infettano la vite** sono più di cinquanta, ma solo alcuni sono agenti di malattie. Fra le virosi più importanti si trovano l'arricciamento, l'accartocciamento fogliare (AF) e il complesso del legno riccio. Per l'arricciamento, è noto l'agente eziologico GFLV (*Grapevine Fan Leaf Virus*). L'infezione da GFLV può essere differenziata da ArMV (un altro virus che dà gli stessi sintomi) con un *test* ELISA. Questi virus vengono trasmessi in seguito ad innesto da piante contaminate o trasmessi dai nematodi del suolo (*Xiphinema index* per il GFLV e *Xiphinema diversicaudatum* per l'ArMV). Per nutrirsi, questi pungono le radici della vite con il loro stiletto boccale. Purtroppo non si conoscono metodi efficaci per il controllo diretto di questi patogeni e pertanto le virosi della vite vengono considerate malattie incurabili. Un'altra virosi importante per la vite è l'accartocciamento fogliare (AF) causata da virus appartenenti al genere *Ampelovirus*, Si tratta di virus filamentosi a localizzazione floematica, denominati *Grapevine Leaf Roll associated Virus* (GLRaV) i più diffusi dei quali sono GLRaV1 e GLRaV3, trasmessi in natura da insetti coccidi e pseudo-coccidi.

Fra gli altri virus che causano perdite economiche incidendo sulla raccolta di piante o parti di piante di valore alimentare si cita l'*African Cassava Mosaic Virus*, diffuso ormai in tutte le aree africane dove si coltiva la Manioca *(*Cassava in inglese*)*, il cui tubero fornisce una farina (*tapioca*) che sta alla base della dieta giornaliera (spesso unica fonte di nutrimento per assicurare la sopravvivenza) presso numerose popolazioni indigene. Anche in questo caso si hanno lesioni fogliari a mosaico e clorosi, che portano a forti riduzioni di sviluppo della pianta e alle conseguenti perdite di produzione. Un'altro virus, sempre a RNA ma dalle dimensioni molto piccole, è il *Brome Mosaic Virus*, che infetta sia il *Bromus inermis* (meglio conosciuto come *Poa*, un'erba infestante molto comune, nella foto) sia le Graminacee, tra cui, molto importante, la **soia**.

VIROIDI – Sono molecole di RNA a singolo filamento, una forma primordiale di vita sulla Terra. Hanno forma circolare e si duplicano nel nucleo delle cellule vegetali. La trasmissione avviene prevalentemente per ferite fogliari e la propagazione lungo i plasmodesmi. La pianta infetta mostra foglie arrotolate o decolorate e mancato sviluppo, visibile specie in estate. Tra le malattie, si citano quella del **tubero affusolato della patata** (*Potato Spindle Tuber*) e il **mosaico latente del pesco** (*Peach Latent Mosaic Virus, PLMV*). Questa malattia si presenta con necrosi sulle radici della pianta e decolorazione superficiale nei frutti, che interessa tutti i tipi di **pesche**, comprese le **Nettarine**.



Peach Latent Mosaic Viroid *Grapevine Speckle Viroid*

Due tipi di viroidi (*Hop stunt viroid*, HSVd e *Grapevine yellow speckle viroid-1*, GYSVd-1) sono stati diagnosticati sulla **vite,** con sintomi abbastanza comuni (ingiallimento fogliare, nanismo).

È possibile fare una classifica dei virus delle piante?

La "*top-ten" dei patogeni*, cioè una lista "dei primi dieci" agenti causa di malattie nelle piante, è un concetto in voga negli ultimi anni e i virus non fanno eccezione. Tuttavia, la sola lista disponibile dei virus ha più a che fare con aspetti storici e scientifici piuttosto che con l'impatto economico che essi esercitano sull'uomo e sugli animali (Rybicki, 2015).

The Top 10 list includes, in rank order, (1) Tobacco mosaic virus, (2) Tomato spotted wilt virus, (3) Tomato yellow leaf curl virus, (4) Cucumber mosaic virus, (5) Potato virus Y, (6) Cauliflower mosaic virus, (7) African cassava mosaic virus, (8) Plum pox virus o Sharka, (9) Brome mosaic virus and (10) Potato virus X (Scholthof *e Coll*., 2011).

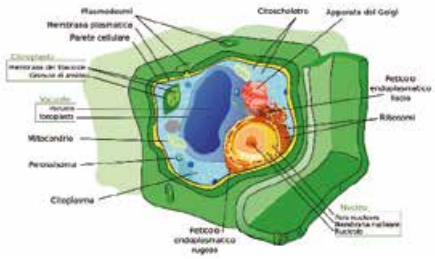
Come un patogeno colpisce una pianta

Utilizzando il contenuto delle sue cellule
Uccidendo l'ospite o interferendo con i suoi processi metabolici mediante enzimi, tossine ecc.
Indebolendo l'ospite sottraendogli continuamente dei nutrimenti
Interferendo con il trasporto di sali minerali e acqua

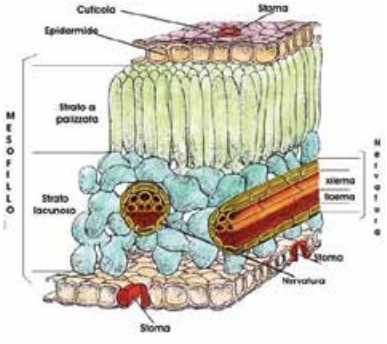
Le piante sanno difendersi dai patogeni?

Per natura le piante hanno strutture meccaniche di difesa contro l'attacco di microrganismi patogeni. Le foglie ed i fusti, ad esempio, possiedono i *tricomi* (specie di peli) e un strato di cere superficiali che ostacolano la colonizzazione.
Le radici (è stato dimostrato sulle barbabietole da zucchero) respingono l'attacco delle muffe grazie ad un "involucro" di batteri che agiscono da barriera difensiva. In più, i vegetali liberano sostanze volatili dalle superfici fogliari in caso di aggressione da parassiti e questo fenomeno viene percepito anche da piante circostanti, che entrano quindi in uno "stato di allarme".
Date le differenze tra piante a animali, fino a qualche anno fa si riteneva che i meccanismi di difesa fossero completamente diversi. Invece, come sta emergendo da studi recenti, sembra verosimile che un'evoluzione convergente fra i due regni abbia condotto a risposte simili verso i segnali lanciati da microrganismi patogeni.
Piante e mammiferi avrebbero un sistema di allarme costituito da proteine molto simili fra loro (chiamato *Map Kinase Signaling*) capace di "sentire" la presenza del nemico che si avvicina alla membrana delle cellule di superficie, trasmettendo di conseguenza un segnale al nucleo, che fa partire il sistema immunitario innato della pianta, gestito da:

- un insieme di recettori di riconoscimento transmembrana (PRRs) che rispondono agli "*slow evolving*" PAMP (*Pathogen-Microbe Associated Molecular Patterns*)
- un gruppo di proteine ricche dell'aminoacido leucina NB-LRR (*Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat*) prodotte dai geni *R*, in grado di riconoscere i siti effettori (chiamati PAMPS) dei patogeni (batteri, funghi, ecc). Queste proteine (codificate da un numero elevatissimo di geni, 600 nel riso) sono simili alle proteine animali del tipo CATERPILLAR/NOD/NLR.



Struttura di una cellula vegetale



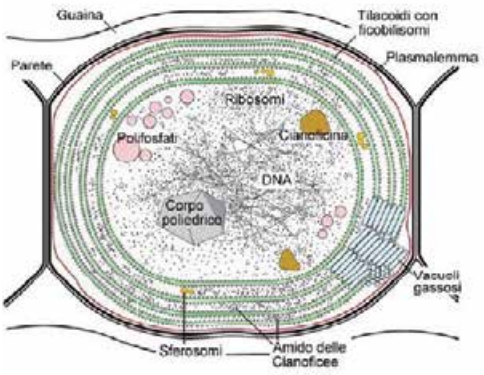
Struttura di una foglia

NON SONO PIANTE!

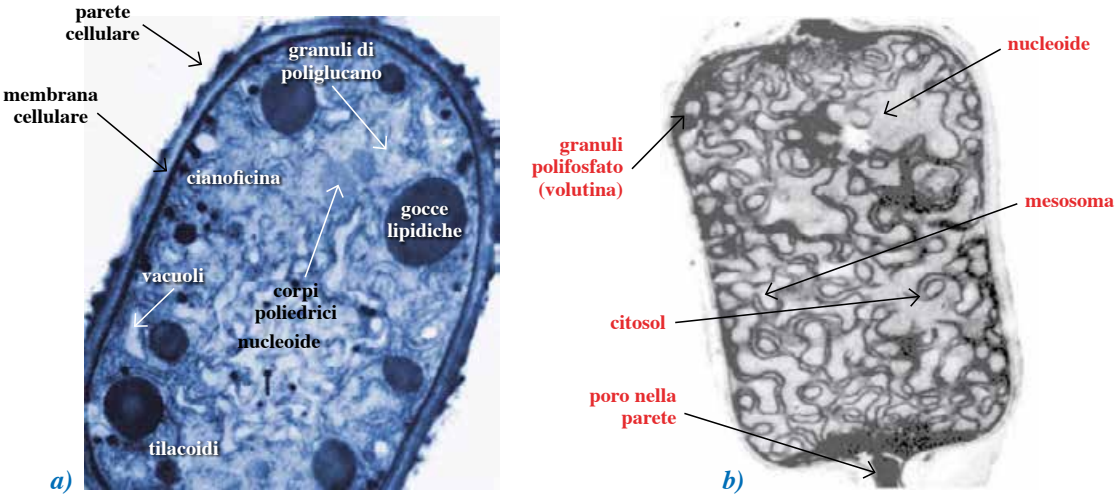
(SONIA FLAMINIA LAVAGNOLI)

I **cianobatteri** (in passato chiamati anche **alghe verdi-azzurre**) sono microrganismi distribuiti in tutto il pianeta che, rispetto ai batteri tradizionali, sono in grado di svolgere il processo fotosintetico sia in condizioni aerobiche che anaerobiche.. **Considerati tra i più antichi organismi fototrofici conosciuti, essi hanno influito notevolmente sull'evoluzione di piante ed animali sulla terra fin dai tempi preistorici, dato che a loro (e alle alghe in generale) si deve buona parte della produzione di ossigeno nell'aria e nel suolo, con assorbimento contemporaneo di anidride carbonica (Stewart *et al*., 2008).** Si presentano in forme diverse, da rotondeggianti a filamentose/ramificate (tipo *Anabaena*), con dimensioni variabili da 0,2 a 200 μm e sono uni- o pluricellulari (El Gamal, 2010; Churro *et al*., 20012). Oggi se ne conoscono più di 2000 specie, suddivise storicamente in cinque ordini, oggetto di ripetute e numerose modifiche. Tra le specie più ricorrenti si citano, ad esempio, *Arthrospira* (o *Spirulina*), *Nostoc*, *Anabaena*, *Schizotrix*, *Microcystis*, *Oscillatoria*. Alcuni generi sono tipicamente d'acqua dolce (*Microcystis*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*), altre colonizzano le acque di estuario (*Nodularia*, *Aphanizomenon*) e altre ancora sono presenti negli ecosistemi marini (*Lyngbya*, *Synechococcus*, *Trichodesmium*) (O'Neil *et al*., 2012).

I cianobatteri vivono in tutte le acque, anche in quelle termali (con temperatura fino a +80°C) e sono responsabili, verso la fine dell'estate, in particolari condizioni climatiche e ambientali, delle cosiddette "*fioriture*" o "*schiume*" sulla superficie. In mare formano sugli scogli estese colonie, che appaiono come una pellicola nerastra in corrispondenza del livello massimo di marea (Zanchett & Oliveira-Filho; 2013). Oltre ad essere parte integrante del *plancton*, primo anello della catena alimentare acquatica, contribuiscono alla formazione di strutture coralline, poiché hanno la proprietà di segregare calcio e magnesio (*stomatoliti*).



Possiedono una parete cellulare pluristratificata e spesso coperta da mucillagine (con funzioni di adesione, difesa e aggregazione in colonie), un citoplasma contenete ribosomi e corpi inclusi, un centro-plasma con DNA. Al loro interno possono avere vescicole di gas utili al galleggiamento e, attraverso la loro formazione, compressione ed espansione, sono in grado di controllare la loro posizione verticale all'interno della colonna d'acqua (Boaru *et al*., 2006; Ellwood & Marchetto, 2011). Si colorano in laboratorio come i batteri Gram-negativi (Churro *et al*., 2012). Si moltiplicano in diversi modi: scissione, mediante formazione di una parete trasversale nella cellula; frammentazione di catene di cellule (ormogoni) con liberazione di individui mobili; produzione di endospore, molto resistenti alle condizioni ambientali avverse. Alcune specie formano cellule speciali a parete ingrossata (acineti) che consentono la sopravvivenza in periodi sfavorevoli (secco, oscurità, gelo), per poi rompersi e liberare nuove cellule vegetative (Churro *et al*., 2012).



Cellula completa e cellule vegetative: acinete (a) ed eterocisti (b) di cianobatteri

La fotosintesi avviene a livello della membrana tilacoidea (come nelle alghe e nei vegetali in genere) e si basa sull'assorbimento dell'anidride carbonica, dalla quale il carbonio viene prelevato e convertito in sostanza organica con liberazione di energia. Questa reazione avviene nei cianobatteri soprattutto per opera di due pigmenti specifici simili alla clorofilla, la ficocianina (che dà il colore azzurro all'alga) e la ficoeritrina (colore rossastro), oltre ad altre sostanze con analoghe funzioni (alfa-clorofilla, beta-carotene, zeaxantina, ecc) (Churro *et al*., 2012).

I pigmenti tipici superano in efficienza la clorofilla stessa nel captare la luce, per cui i cianobatteri possono effettuare la fotosintesi anche in acque profonde o mosse (quindi meno trasparenti), con rese migliori durante le ore diurne. Inoltre questi pigmenti, raccogliendo efficacemente la luce a lunghezze d'onda raramente utilizzate da altre specie di fitoplancton, danno ai cianobatteri un vantaggio competitivo e una maggiore capacità di colonizzare ambienti diversi (Ellwood &Marchetto, 2011).

Molti cianobatteri sono inoltre capaci di fissare l'azoto atmosferico (N_2), trasformandolo in ammoniaca (NH_3) (ad esempio, *Anabaena* e *Nodularia*), accumulare il fosforo e catturare il ferro. Il fenomeno dell'azoto-fissazione avviene soprattutto di notte nelle eterocisti, grosse vescicole impermeabili all'ossigeno, del diametro di circa 1 cm, connesse con le cellule vegetative adiacenti.

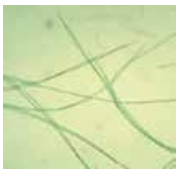
Quando la concentrazione dei nitrati è molto scarsa, certe cellule (le più grandi del filamento) si differenziano, interrompono la fotosintesi e continuano la fissazione dell'azoto prendendolo dai composti organici.

L'aumento della temperatura dell'acqua sopra i +20 °C favorisce i cianobatteri, che proliferano anche sopra i +25 °C, mentre, al contrario, diminuiscono di numero le alghe eucariote. La calma persistente, associata all'aumento della temperatura, favorisce la stratificazione dell'acqua, che diventa più calda in superficie e più fredda in profondità. I cianobatteri, producendo calore essi stessi per consumo di energia, in queste condizioni, formano bolle di gas, che aumenta il galleggiamento nello strato superficiale delle acque con assorbimento d'ossigeno.

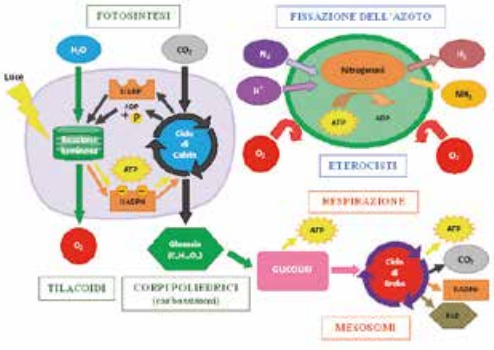
(Foto Enzo Zavanella)

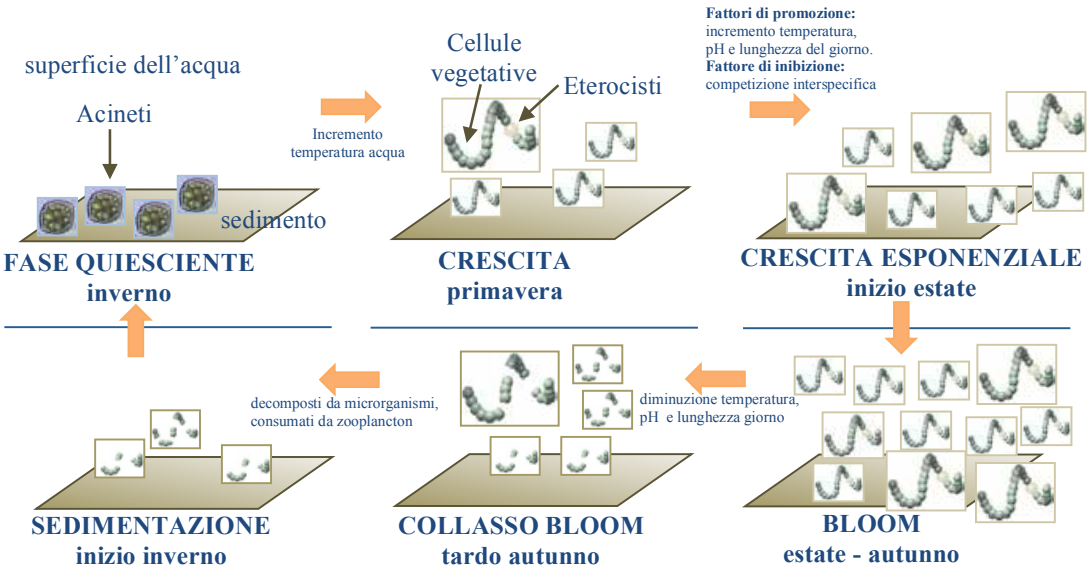
Alcune specie vivono in simbiosi con piante acquatiche (vascolari) e con licheni, ma non si può escludere che stabiliscano un rapporto simbiotico anche con organismi animali (Stipa *et al*., 2006). La loro espansione nelle acque dolci o salmastre è da sempre legata ad alterazioni dell'ecosistema ed è preannunciata dall'intorbidamento dell'acqua, cui fa seguito la morte di invertebrati e pesci per ipossia. I fattori ambientali che stanno alla base della "fioritura" (*bloom*) dei cianobatteri nelle acque sono: l'aumento di azoto e fosforo (verosimilmente da scarichi urbani, industriali ed agricoli); l'aumento della temperatura; la calma persistente in superficie; la stratificazione verticale (O'Neil *et al*., 2012; Paerl & Otten, 2013). Tutti i cianobatteri producono una grande varietà di tossine, tra cui le più temute sono le **cianotossine**, che hanno effetti negativi anche sui mammiferi, prevalentemente a livello dell'epatopancreas e dei sistemi digestivo, endocrino, dermico e nervoso.

Le specie che sono più frequentemente coinvolte nella produzione di **microcistine** appartengono ai generi *Microcystis, Dolichospermum* (*Anabaena*), *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc, Hapalosiphon, Phormidium*. *Nodularia spumigena* produce la tossina nodularina (Sivonen, 2008). Le **neurotossine** sono frequentemente prodotte da *Dolichospermum, Anabaena*, meno frequentemente da *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* (Sinoven & Jones, 1999; van Apeldoorn, 2007). *Cylindrospermopsis*, *Anabaena, Aphanizomenon, Raphidiopsis* e *Umezakia* producono ***cilindrospermopsine***, mentre alcune specie di *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Schizothrix* sono principalmente coinvolte nella produzione di **dermatotossine** (Bláha *et al*., 2009; Viaggiu *et al*., 2011). Ciascuna specie può produrre diversi tipi di tossine o diverse varianti dello stesso tipo di tossina, come pure ceppi tossigeni possono coesistere con ceppi non tossigeni della stessa specie (Zurawell *et al*., 2005; Bláha2009).



Immagini al microscopio di preparati a fresco (ingrandimento 300x) di:*Microcystis, Nostoc, Oscillatoria* (da sinistra a destra). Sotto: reazioni fisiologiche dei Cianobatteri

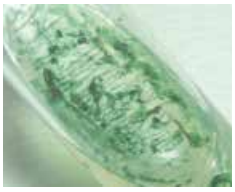


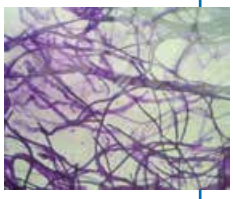


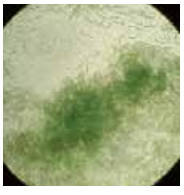
Ciclo vitale dei cianobatteri

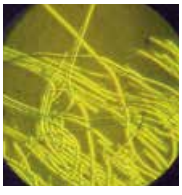
NOTA TECNICA

Le alghe in laboratorio non amano la luce diretta e temperature sopra i +30 °C. Cercano invece ossigeno e un'illuminazione artificiale moderata (ad esempio, di una luce bianca fredda da una lampada da 40 W) per 16 ore in media e 8 ore di buio. Per farle crescere occorre prelevare una piccola porzione di materiale dalla sabbia o dalle rocce costiere e trasferirla in un contenitore sterile. Da qui è possibile seminare dei frammenti su piastre o provette di terreni appositi, come il BG-11 Agar. L'incubazione a +22-25 °C per 2-7 giorni in termostato con illuminazione e una fonte d' umidità consentirà lo sviluppo di una coltura che si può esaminare mediante un preparato microscopico "a fresco" oppure previa colorazione con Gram o con Giemsa.









Dall'alto in basso e da sinistra a destra: • colture di cianobatteri (*Nostoc*) in provetta di terreno solido (*BG-11 Agar*); • striscio colorato con Gram di *Oscillatoria* (1.000x); • sviluppo in provette con terreno solido e liquido (*BG-11 Agar* e *Broth*); • sviluppo su piastre di terreno solido dopo 15 gg a +25°C; • aspetto della coltura in brodo a maggiore ingrandimento; • preparato di *Oscillatoria* esaminato al microscopio in luce fluorescente.

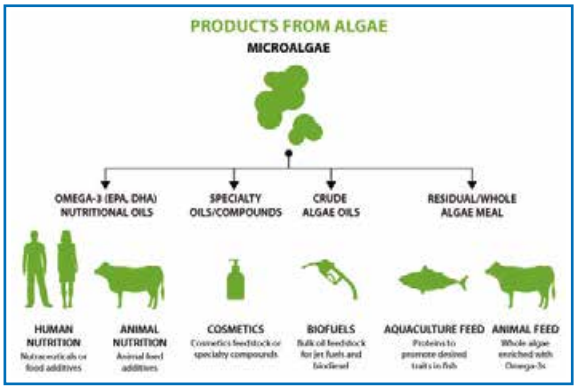
DALLE ALGHE SI RICAVA… PIÙ DI QUANTO CI SI IMMAGINA

Se le micro-alghe unicellulari sono le più interessanti, anche le altre (macro-alghe rosse, brune, verdi) non lo sono da meno. Le micro-alghe si avvicinano molto ai batteri. Infatti quelle "azzurre" vengono chiamate ***Cianobatteri***. Tutte, comunque, sono ricche di proteine, grassi insaturi a lunga catena (fino al 70% del peso secco), minerali (Ca, P, K), vitamine (A, C, gruppo B), iodio, oligoelementi.

La *Spirulina* (la micro-alga più conosciuta) era il cibo degli Aztechi. Altre microalghe, attaccate alle felci, venivano trasformate in **mangimi** mille anni fa nell' Asia sud-orientale o usate come fertilizzanti nel nord Europa.

Macro-alghe (*Wakame, Kombu, Dulse, Nori*) e micro-alghe concorrono oggi alla preparazione di piatti di provenienza orientale (*Porphyra tenera* nel *sushi*).

Vengono inoltre sfruttate in agricoltura come **concimi** (*Maerl)* oppure come biostimolanti fogliari.

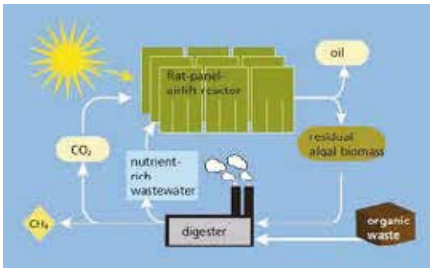


La **farmacologia** e la **cosmesi** (i famosi fanghi d'alga!) hanno fondato sulle alghe un campo di ricerca di prodotti alternativi ai tradizionali anti-infiammatori, anti-ossidanti e stimolanti del metabolismo generale (con le specie *Klamath, Chlorella,* ecc.).

Ma grandi aspettative sussistono nel settore delle energie rinnovabili per la produzione dalle alghe di **biocarburanti**. Questi microrganismi (ad esempio, le specie *Ulva*, *Laminaria*, *Macrocystis* e *Isochrysis*) hanno infatti una quantità di grasso duemila volte superiore a quello della colza, utilizzata normalmente per fabbricare il biodiesel. Il procedimento si basa sull'estrazione con etanolo dei trigliceridi dalla biomassa algale raccolta o coltivata ed essicata, seguita da reazione in raffineria con metanolo. Sorprendente è anche l'utilizzo delle alghe per altri scopi: ad esempio, in **edilizia** (pannelli isolanti) e nella fabbricazione della **carta *Shiro***® (Favini).

Veramente qualche volta le alghe non collaborano con l'uomo: ad esempio, quando colonizzano le carene delle imbarcazioni, producendo *biofilm* idrofobi a base di alginati (polisaccaridi) che consentono l'adesione su qualsiasi materiale di briozoi e celenterati di mare e di lago.

Raccolta di alghe sulle spiagge



Schema di produzione di biodiesel

Fabbricazione di biocarburanti

La *Spirulina* nei farmaci e negli integratori alimentari

La carta *Shiro*®

TRATTAMENTI DI ALCUNE MALATTIE

Malattia	Trattamento
Grafiosi dell'olmo	Al momento non esiste un trattamento per combatterla. Si consiglia di prestare cure colturali, evitare ristagni, togliere ed eliminare piante infette. Nei nuovi impianti scegliere ibridi resistenti alla grafiosi, combattere gli Scolitidi (piccoli insetti che entrano sotto la corteccia secca e malata e migrano portando le spore sulle piante)
Fusariosi del frumento e graminacee	Principi attivi per combatterla: Proclorax, Tebuconazolo, Tiofanate metile
Carbone dei cereali	Si combatte usando sementi trattate con la concia. Trattamento biologico con *Tricoderma* e *Micorrize*. Trattamento chimico con Triticonazolo, Fluxapyroxad e Fludioxanil
Alternaria su verdure e piante legnose	Proclorax, Azoxitrobin e Difenoconazolo
Ruggine su piante da frutto e piante ornamentali	Tetraconazolo, Tebuconazolo, Rame e Benzovindiflupyr
Peronospora della vite, patata e pomodoro	Trattamento biologico: rema e estratto tannino di castagno Trattamento chimico: Zoxamide, Fosetil alluminio, Ametoctradina, Cimoxanil, Dimetomorf, Metiram, Folpet, Mancozeb e Azoxistrobin
Malbianco della vite e ornamentali	Trattamento biologico: *Ampelomyces quisqualis*, bicarbonato di potassio e zolfo Trattamento chimico: Tebuconazolo, Tetraconazolo e Azoxistrobin
Botrite della vite	Trattamento biologico: *Bacillus amyloliquefaciens* Trattamemto chimico: Fenhexamid, Pyrimethanil, Ciprodinil+Fludioxanil
Monilia del melo e drupacee	Trattamento chimico: Ciprodinil+Fludioxanil, Fenexamid, Tebuconazolo

Vedi nota a pag. 290.

PATRIMONI DA PROTEGGERE

*La **villa veneta** è una tipologia di residenza fondata dal patriziato della Repubblica di Venezia e sviluppatasi nelle aree agricole dei Domini di Terraferma tra la fine del XV secolo e il XIX secolo. Le ville venete (per il 90 per cento di proprietà privata) **dal 1996 sono entrate a far parte del Patrimonio Mondiale dell' Unesco**. Rappresentano un complesso di beni culturali straordinario, ma problematico da curare e mantenere.*

Con la scoperta dell'America, **Venezia perde centralità sul dominio commerciale del Mediterraneo e si rivolge verso l'entroterra**. Acquista terreni, spesso li bonifica con un intelligente governo delle acque, costruisce strade, canali navigabili e abitazioni. Verso la metà del '500, molte famiglie patrizie veneziane (tra cui i Corner, i Barbaro, i Badoer, gli Emo, i Grimani, i Foscari) decidono di investire le ricchezze accumulate nei commerci con l'Oriente in proprietà immobiliari, dando vita a imprese agricole da amministrare direttamente. Da personalità colte e appassionate di filosofia e d'arte, trovano nell'architetto padovano *Andrea Palladio* (1508-1580) e nella sua scuola il loro interprete ideale. Nasceva così la Villa Veneta, una tipologia abitativa e produttiva assolutamente originale, che ebbe un grande successo poiché rispondeva nello stesso momento ad esigenze estetiche e funzionali.

La **Villa Barbaro** si trova a Masèr, nella zona del Montello e dei Colli Asolani che include le colline ad ovest del Piave, in provincia di Treviso, nel Veneto settentrionale ed è uno dei tesori più importanti del rinascimento veneziano. Sei sale sono affrescate da Paolo Veronese (1528-88). Oggi le uve per l'antica cantina sono coltivate secondo le regole della **lotta integrata contro i parassiti eco-compatibile.** I vigneti sono ad alta densità di impianto per consentire un basso carico di uva per pianta e un rapporto ideale di 1,2 metri quadrati di superficie fogliare per chilogrammo di uva prodotta. Le varietà tradizionali *Prosecco, Verduzzo, Manzoni Bianco, Chardonnay, Merlot, Cabernet* sono raccolte a mano e rigorosamente selezionate.

"Dall'una, e l'altra parte vi sono loggie, le quali nell'estremità hanno due colombare, e sotto quelle vi sono luoghi da fare i vini... e gli altri luoghi per l'uso della Villa"

Così Andrea Palladio nel 1570 descriveva ne "*I Quattro Libri dell'Architettura*" l'organizzazione della Villa.

Le ville sono l'emblema della riorganizzazione della potenza veneziana, l'avamposto della trasformazione del territorio. Accanto al corpo centrale, destinato all' abitazione del proprietario e impreziosito all'interno da decorazioni e affreschi, si trovano, come corpi laterali, le tipiche *barchesse*, le stalle, i locali di lavorazione e magazzinaggio dei prodotti agricoli, le abitazioni per i contadini. Molte volte la facciata è orientata spesso verso il corso d'acqua

prossimo alla villa (il Brenta, il Sile e i canali navigabili di collegamento con Venezia), in quanto il mezzo di trasporto preferito dai signori era l'imbarcazione. In seguito sono sorti i grandi giardini con alberi divenuti secolari, laghetti, grotte e ampi spazi verdi disseminati di sculture e opere d'arte, veri e propri musei a cielo aperto. Il tutto circondato sapientemente da una ricca vegetazione, dai *broli* (antichi orti con alberi da frutto) e più oltre dai campi coltivati in prevalenza a vigneto. Ancora oggi 121 Ville Venete sono eleganti ed efficienti aziende agricole, così com'erano state concepite nel '500, ed hanno conservato le sane tradizioni gastronomiche del territorio, recuperando gli antichi vitigni.

Un nobile bresciano, **Agostino Gallo** (1499-1570) ha scritto un capolavoro (*Le vinti giornate dell'agricoltura et de' piaceri della villa,* pubblicato nel 1572 a Venezia dal famoso tipografo-editore Aldo Manuzio) che ripropone in veste originalissima tutto lo scibile agronomico di quei tempi nel contesto delle ville venete e delle campagne padane. Vengono discussi (in forma dialogata) un po' tutti gli aspetti delle coltivazioni più adatte ai luoghi, inserendo per la prima volta il concetto di rotazione delle semine che comprendono le foraggere, il mais, il frumento. Si parla della concimazione, della scelta degli animali da allevare (con i gelsi il baco da seta), della preparazione dei formaggi, dei vini e, con l' apicoltura, del miele. **Vengono inoltre trattati i rimedi contro certe malattie.**

Queste immagini possono rendere l'idea dell' avvenuto connubio auspicato dal Petrarca (1304-1374, che di casa stava ad Arquà, 30 Km da Padova) tra bellezza estetica e piaceri della vita. Un obiettivo che i nobili della Serenissima raggiunsero in terraferma grazie alle colture della vite, dell' olivo, degli ortaggi che trasformavano nelle loro cantine e nelle *barchesse*. Uno stile di vita in parte ereditato da quello professato nei castelli medioevali e nelle grandi abbazie cistercensi, ma molto più aperto verso l'innovazione e la libertà.

Significato della lotta integrata eco-compatibile contro i parassiti

Si assiste ad un'evoluzione nell'uso dei prodotti chimici fitosanitari che tende progressivamente a ridurne il numero. La lotta biologica (che sta diventando sempre più importante) rappresenta un'ulteriore evoluzione della lotta integrata. Essa consiste nell'uso di antagonisti naturali per contenere le popolazioni degli organismi dannosi, sfruttando l'azione di organismi utili naturalmente presenti nelle colture o artificialmente allevati e distribuiti poi in campo (coccinelle ecc.). Per il controllo dei fitofagi si tatta dei prodotti fitosanitari seguenti:

- microbiologici (funghi, virus, batteri, protozoi, ecc) con formulati a base di *Bacillus thuringiensis* e più recentemente, con l'impiego di funghi entomo-parassiti (es. *Beauveria bassiana*);
- di origine naturale (estratti di nicotina, piretro);
- di uso tradizionale (composti a base di rame, oli minerali, zolfo, saponi, ecc.).

La lotta biologica viene praticata generalmente nel contesto più ampio dell'agricoltura biologica, nella quale tutti i processi produttivi (scelta delle specie e varietà, lavorazione dei terreni, rotazioni, concimazioni, ecc.) sono fatti secondo metodi eco-compatibili e naturali.

(da www.venetoagricolrura.org).

Si ringraziano i Colleghi Patologi del Di.S.A.A. (Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia - Università degli Studi - Via Celoria, 2 - 20133 Milano) per la revisione del capitolo.

APPENDICE

ALCUNE AVVERTENZE SULLA SICUREZZA IN LABORATORIO… DA OSSERVARE PRIMA DI "TOCCARE" I MICRORGANISMI

Sarebbe opportuno che ogni laboratorio preparasse una classifica dei propri rischi biologici, mettendo al livello più basso di pericolosità gli agenti eziologici che non danno normalmente malattia negli adulti, poi quelli che non costituiscono grave rischio (come i coli, le salmonelle, gli stafilococchi) e quindi i veri patogeni pericolosi, quelli che si trasmettono attraverso l'aria (brucelle, tubercolari, funghi dimorfi, virus influenzali, ecc) per i quali è obbligatorio l'uso di **cappe speciali di sicurezza con filtrazione dell'aria in uscita, meglio ancora se collocate in ambienti a pressione negativa.**

Esiste nelle disposizioni di legge (Decreto Legislativo n° 626/94) una classifica degli agenti biologici in relazione all'entità del rischio di infezione:

I. **Agente biologico di gruppo 1** = un agente che presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani.

II. **Agente biologico di gruppo 2** = un agente che può causare malattie in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghi nella comunità; sono di norma disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche.

III. **Agente biologico di gruppo 3** = un agente che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituire un serio rischio per i lavoratori. L'agente biologico può propagarsi nella comunità ma, di norma, sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche.

IV. **Agente biologico di gruppo 4** = un agente biologico che può provocare malattie gravi in soggetti umani, costituisce un serio rischio per i lavoratori e può presentare una elevata possibilità di propagazione nella comunità; non sono disponibili, di norma, efficaci misure profilattiche o terapeutiche.

L'incidenza di infezioni acquisite in laboratorio sarebbe, secondo una statistica elaborata negli USA da Sewell (2000), compresa fra l'uno e il cinque per mille e riguarderebbe il personale di ospedali e altre strutture pubbliche. Prima del 1980, gli incidenti erano dovuti a tifo, brucellosi, tubercolosi, epatite. Negli anni successivi, l'elenco delle malattie si è arricchito. Oltre a *Brucella*, compare *Francisella tularensis* (la cui presenza nel materiale patologico maneggiato si rivela solo dopo l'esito delle analisi), *Salmonella* e *Shigella* (trasmesse da campioni di feci), *Mycobacterium tuberculosis* (inalato per *aerosol* in fase di autopsia), virus B e C dell'epatite (toccando provette sporche di sangue) e HIV (in seguito a puntura accidentale con aghi infetti).

Senza dimenticare l'autoclave

Un notevole contributo alla sicurezza nei laboratori biologici è stato fornito dalla diffusione della plastica monouso. Tuttavia, non va sottovalutata l'importanza dell'autoclave, un apparecchio insostituibile sia nella preparazione dei terreni colturali che nella sterilizzazione della strumentazione riutilizzabile (vetreria, pinze, forbici, ecc) oltre che per la distruzione immediata di materiale infetto.

Nell'autoclave verticale (oppure orizzontale, nella foto) il vapore acqueo generato da una caldaia riempie la camera di sterilizzazione, dalla quale è stata espulsa l'aria. L'aumento di pressione consente al **vapore saturo** di raggiungere temperature elevate, ad esempio 121°C, corrispondenti circa a 1 atmosfera, condizioni ottimali per ottenere l'inattivazione dei microrganismi.

Strumenti importanti per la sicurezza

La **cappa a flusso laminare verticale** rappresenta una soluzione ottimale per effettuare semine e trapianti con minori probabilità di inquinamenti, garantendo, inoltre, la sicurezza dell'operatore. La cappa a flusso laminare verticale è particolarmente indicata nel caso che l'operatore non debba venire investito dall'aria della zona di lavoro, potenzialmente inquinata da sostanze pericolose (batteri, virus, allergeni, polveri). L'aria esce dal filtro assoluto HEPA e fluisce dall'alto verso il basso all'interno della cabina. È sterile (si dice in classe 100 perché deve contenere meno di 100 particelle sospese per m^3) e si muove a bassa velocità (circa 0,4 metri al secondo), per mantenere uno scorrimento laminare che eviti la formazione di vortici. Quest'aria viene poi aspirata, attraverso le feritoie poste sul piano di lavoro, da un motoventilatore e riciclata al 70%. Dal canale di ripresa, sempre in depressione, viene espulso, per azione di un secondo motoventilatore, il rimanente 30% di aria, previo passaggio su un secondo filtro assoluto. La massa d'aria eliminata viene rimpiazzata da nuova aria, che entra nella cappa attraverso la griglia posta sul bordo d'ingresso. Ciò produce, in corrispondenza del frontale aperto della cabina, un "effetto barriera", che impedisce la fuoruscita di eventuali contaminanti.

I guanti sterili monouso, abbinati ai contenitori per rifiuti sanitari pericolosi (tipo *Allpack*®) destinati all'inceneritore, sono semplici ma efficaci mezzi di prevenzione contro i rischi di contaminazione ambientale da agenti biologici.
La disponibilità di propipette dotate di puntali sterili monouso rappresenta un progresso notevole sul vecchio (e rischioso) uso di pipettare a bocca, sia dal punto di vista della sicurezza che della precisione.

Sempre secondo Sewell, la graduatoria delle vie d'infezione sarebbe la seguente:
1° ingestione (da schizzi e *aerosol*, ma anche dall'abitudine di mangiare o bere in laboratorio, 27% degli incidenti),
2° punture con aghi (25%),
3° tagli con arnesi affilati (16%),
4° contaminazione attraverso abrasioni cutanee provocate da sé (14%),
5° pipettamento a bocca (13%).

UN PO' DI RIPASSO DI CHIMICA PRIMA DI COMINCIARE…

Soluzioni e sospensioni

Definizioni

Soluzione: una miscela omogenea in cui una o più sostanze sono contenute in una fase liquida o solida o gassosa. Nella forma più comune (solido sciolto nel liquido), la porzione solida si chiama **soluto**, quella liquida **solvente**. Quando una soluzione è la partenza per preparare soluzioni di differente concentrazione, essa si chiama "**soluzione madre**".

Il **peso** in grammi di sostanza pura (= soluto) contenuti in 100 grammi di solvente puro in una soluzione all'**a**% si calcolano con la formula:

$$\text{grammi \%} = \frac{a \cdot 100}{100 - \mathbf{a}}$$

- ***Peso percento**: è la quantità in peso di sostanza sciolta in 100 parti in peso di soluzione.*
- ***Volume percento**: volume di sostanza pura contenuto in 100 volumi di soluzione.*
- ***Concentrazione molare o molarità** (M): numero di grammi-mole di sostanza sciolta in 1 litro di soluzione.*
- ***Normalità** (N): numero di grammo-equivalenti di sostanza sciolti in 1 litro di soluzione.*

In analisi volumetrica si usa esprimere il contenuto delle soluzioni titolate con la *normalità*.
Le soluzioni acide vengono determinate volumetricamente con basi o sali di acidi deboli (carbonico e borico), le soluzioni basiche invece con acidi. Nelle reazioni in analisi volumetrica, le sostanze partecipano con ugual numero di *grammo-equivalenti*.
Il mezzo *ossidante* è la sostanza che *acquista elettroni*, il mezzo *riducente* quello che *cede elettroni*.
Si usano soluzioni a contenuto noto di soluto (soluzioni titolate) contenenti una sostanza che agisce quantitativamente e rapidamente sulla soluzione in esame.
Il punto finale della reazione viene indicato da una terza sostanza (*indicatore*) a seconda che la reazione è acida o alcalina (tornasole, fenolftaleina, rosso di metile). Nelle titolazioni ove c'entra lo iodio, si usa la salda d'amido (si colora in azzurro). Usato molto è il permanganato (violetto, che si scolora).

Sospensione: è una miscela in cui un materiale finemente suddiviso è disperso in un altro materiale in modo tale da non sedimentare in tempo breve (questo avviene, ad esempio, nelle colture di batteri, sviluppati in un terreno liquido).

Esempio di una soluzione: la soluzione fisiologica, che contiene lo 0,85% di cloruro di sodio in acqua distillata o demineralizzata. Avendo già una soluzione di NaCl a titolo maggiore, si può ottenere la concentrazione desiderata applicando la formula:

$$X \text{ (quantità da prendere)} = \frac{\text{quantità desiderata x titolo desiderato}}{\text{titolo della soluzione data}}$$

Esempio: soluzione data di NaCl al 25%, sono da preparare 15 ml al 3% - Dalla formula:

$$\frac{15 \times 3}{25} = 1{,}8 \text{ (ml di soluzione data da portare a volume di 15 ml con acqua distillata)}$$

Come praparare diluizioni seriali: si usano frequentemente due serie di diluizioni, chiamate, rispettivamente, **in base 2** (cioè al raddoppio) e **in base 10** (o diluizioni decimali). Come orientamento generale, va tenuto presente che, aumentando le quantità di soluto e di solvente (ad esempio, 1 ml + 99 ml per ottenere la diluizione 1:100), si migliora la precisione.

Se si vuol calcolare la concentrazione di una sostanza in soluzione

• *Quale è la pesata necessaria (**X**) per preparare una certa quantità di soluzione **n** normale?*

$$\frac{\text{ml} \cdot \text{n}}{1000} = \frac{X}{\text{Peso equivalente sostanza}}$$

• *Con quanta (**x**) acqua bisogna diluire **g** di acido all'**a**% per ottenere acido al **b** %?*

La **x** si trova con la formula: $g \cdot a\ \% = (g + x) \cdot b\ \%$

• *Come si calcola la concentrazione molare (M) di una soluzione?*

*Grammi **g** di sale (peso molecolare del sale = **pM**) vengono sciolti in **ml** di acqua.*

Poiché un litro contiene g di sale $1000 \cdot g$, il numero di mole per litro (molarità) è:

$$\frac{1000 \cdot g}{\text{ml} \cdot \text{pM}}$$

ALCUNE SOLUZIONI USATE NEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA

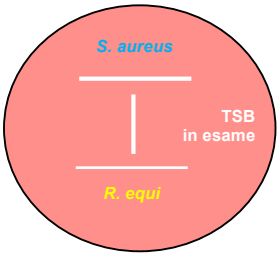
Acqua peptonata	***Phosphate Buffered Saline* (PBS)**	**Soluzione di Ringer ¼ concentrata**
Diluente di uso generale	*Diluente di uso generale*	*Diluente di uso generale*
Peptone 10 g, acqua distillata 1000 ml pH finale = 7,0 ± 0,2 Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti	Sodio cloruro 10 g, potassio cloruro 0,250 g, potassio fosfato monobasico 0,250 g, sodio fosfato bibasico biidrato 1,755 g, acqua distillata 1.000 ml pH finale = 7,4 ± 0,2 Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20 minuti	Una compressa in 500 ml di acqua distillata pH finale = 6,9 ± 0,1 Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Soluzione fisiologica 0,85% NaCl	**Soluzione fisiologica 1% peptonata**
Diluente di uso generale Acqua distillata 1000 ml, sodio cloruro 8,5 g Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti	*Idonea per la preparazione delle diluizioni nei conteggi batterici su alimenti* Acqua distillata 1000 ml, peptone 10 g, sodio cloruro 8,5 g Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

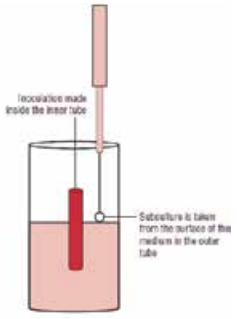
ESEMPIO DI IDENTIFICAZIONE DI UNA COLTURA BATTERICA GIÀ ISOLATA DI *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Le prove

- **Emolisi su agar sangue** - Trapiantare da TSB su una piastra di Agar sangue con l'ansa per strisciamento su mezza piastra e con l'ago per infissione sull'altra metà, in cinque punti.
- **Ramnosio-xilosio-nitrati-mobilità** - Trapiantare da TSA un'ansata in ciascun brodo e con l'ago all'interno del tubo di Craigie nella provetta per il *test* della mobilità.
- **Camp-*test*** - Dal TSB in esame, strisciare un'ansata su una piastra di Agar sangue, perpendicolarmente a *S. aureus* e *R. equi* secondo lo schema:



CAMP TEST



Mobilità in tubo di Craigie

Controlli

Per ciascun *test* (ramnosio, xilosio, nitrati, mobilità) incubare una provetta non seminata come controllo negativo. Per l'emolisi, seminare un controllo negativo utilizzando una brodocoltura di *L. innocua* per striscio ed infissione.

Incubare i terreni seminati assieme ai relativi controlli a +37 °C (a 20-25 °C la mobilità) per 48 ore.

Secondo giorno

Leggere le piastre di isolamento (Agar sangue, Oxford, terreno cromogeno), verificando lo sviluppo di colonie con caratteristiche riferibili a *Listeria*.

- **Emolisi su piastra *microtiter*** - In due pozzetti di una piastra *microtiter* introdurre 50 μl di brodocoltura del ceppo di *L. monocytogenes* precedentemente coltivato e aggiungere 100 μl di sospensione (in liquido di Alsever) di globuli rossi di pecora lavati allo 0,25%. Affiancare all'esame altri due pozzetti, come controllo negativo, contenenti brodo sterile e sospensione di globuli, usando le stesse quantità. Coprire con coperchio e incubare per 2 ore a +37°C. Leggere l'avvenuta emolisi osservando intorbidamento uniforme del pozzetto.
- **Gram** - Allestire da coltura isolata uno striscio da colorare con Gram e osservare al microscopio per la presenza di bastoncini Gram-positivi, corti, non sporulati.
- **Catalasi** - Aggiungere alle colture (su BHI Agar+0,6% estratto di lievito), 0,5 ml di reattivo catalasi (acqua ossigenata al 3%) e osservare per la produzione immediata di bolle di gas.
- **Nitrati** - Aggiungere alle provette per il *test* dei nitrati, 0,5 ml di ciascuno dei reattivi A e B. La reazione positiva è rivelata dalla comparsa immediata di colore rosso.
- ***Kit* biochimici miniaturizzati** - Leggere i risultati delle prove, dopo aver aggiunto gli eventuali reattivi, e confrontarli con il profilo biochimico identificativo di *L. monocytogenes*.
- **Agglutinazione rapida** - Saggiare la patina colturale da *slant* di TSA+0,6% estratto di lievito con i sieri diagnostici, mediante agglutinazione rapida su vetrino.

Tabella MPN

Si tratta di un metodo statistico di conteggio indiretto dei microrganismi, che vengono quantificati sulla base di una manifestazione visibile della crescita (sviluppo di torbidità, viraggio di un colore, etc.). La concentrazione dei microrganismi è ricavata da una elaborazione di dati positivi e negativi, ottenuti da una serie di inoculi del campione, opportunamente diluito, in terreni batteriologici liquidi (*nella foto, una provetta su tre mostra sviluppo di gas all'interno del terreno*)

Conteggio batterico con tecnica del Numero Più Probabile (MPN) calcolato con tre provette

Numero di tubi positivi			*MPN in g o ml 1 / 0,1*	*Numero di tubi positivi*			*MPN in g o ml 1 / 0,1*
g o ml 1 / 0,1	*g o ml 0,1 / 0,01*	*g o ml 0,01 / 0,001*		*g o ml 1 / 0,1*	*g o ml 0,1 / 0,01*	*g o ml 0,01 / 0,001*	
0	0	0	<0.3	2	2	1	2,8
0	0	1	0,3	3	3	0	2,9
0	1	0	0,3	3	0	0	2
0	2	0	0,6	3	0	1	4
1	0	0	0,4	3	0	2	6
1	0	1	0,7	3	1	0	4
1	1	0	0,7	3	1	1	7
1	1	1	1,1	3	1	2	12
1	2	0	1,1	3	2	0	9
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	3	0	1,6	3	2	2	21
2	0	0	0,9	3	2	3	29

Numero di tubi positivi			*MPN in*	*Numero di tubi positivi*			*MPN in*
g o ml 1 / 0,1	*g o ml 0,1 / 0,01*	*g o ml 0,01 / 0,001*	*g o ml 1 / 0,1*	*g o ml 1 / 0,1*	*g o ml 0,1 / 0,01*	*g o ml 0,01 / 0,001*	*g o ml 1 / 0,1*
2	0	1	1,4	3	3	0	20
2	1	0	1,5	3	3	1	50
2	1	1	2,0	3	3	2	110
2	2	0	2,1	3	3	3	>110

Esempio di calcolo

Numero di provette risultate positive, inizialmente seminate con:
- omogenato di partenza (contenente 1 grammo di materiale/ml): 2 su 3 seminate
- diluizione 10^{-1} (0,1 grammi/ml 1 su 3
- diluizione 10^{-2} (0,01 grammi/ml) 0 su 3

Confrontando sulla tabella dell'MPN, ai numeri **2 - 1 - 0** corrispondono 1,5 germi per grammo o ml di materiale.

In realtà il calcolo fatto col metodo MPN è soggetto ad una variabilità di risultati. Con il 95% di probabilità quel materiale conteneva da un minimo di 0,4 ad un massimo di 4,4 microrganismi per grammo o ml.

Torbidimetro di McFarland

La stima del contenuto di batteri in un mezzo liquido può essere fatta in diversi modi. In mancanza di uno spettrofotometro, esiste la possibilità di comparare il campione con una serie di provette contenenti una soluzione di solfato di bario a crescente concentrazione e quindi di crescente torbidità. McFarland ha considerato questa torbidità comparabile con concentrazioni *standard* di germi. Ovviamente, questo metodo (semplice da realizzare e di uso estemporaneo) difetta di precisione e può fornire solo indicazioni approssimative.

Si prepara miscelando in proporzioni variabili bario cloruro e acido solforico, in modo da ottenere soluzioni di bario solfato a differente torbidità.

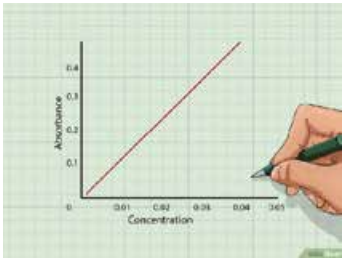
Preparazione e contenuto batterico del torbidimetro (o nefelometro) di McFarland

Tubo	*Bario cloruro soluzione acquosa 1% ml*	*Acido solforico soluzione acquosa 1% ml*	*Densità approssimativa dei batteri (in milioni/ml)*	*Densità ottica (D.O.) leggibile allo spettrofotometro a 625 nm con cuvetta da 1 cm*
0,5	0,05	9,95	>300*	0,08 - 0,1
1	0,1	9.9	300	0,16 - 0,2
2	0,2	9.8	600	0,32 - 0,4
3	0,3	9.7	900	0,48 - 0,6
4	0,4	9,6	1.200	0,64 - 0,8
5	0,5	9,5	1.500	0,8 - 1
6	0,6	9,4	1.800	
7	0,7	9,3	2.100	

Tubo	*Bario cloruro soluzione acquosa 1% ml*	*Acido solforico soluzione acquosa 1% ml*	*Densità approssimativa dei batteri (in milioni/ml)*	*Densità ottica (D.O.) leggibile allo spettrofotometro a 625 nm con cuvetta da 1 cm*
8	0,8	9,2	2.400	
9	0,9	9,1	2.700	
10	1,0	9,0	3.000	

*concentrazione *standard* del torbidimetro di McFarland 0,5 = approssimativamente fra 10^7 e 10^8 CFU/ml

Misurazione della densità ottica con spettrofotometro



È un metodo più accurato del precedente. Si calcola il contenuto in germi/ml di una sospensione batterica *standard* (ad esempio, di *Escherichia coli*) mediante un conteggio tradizionale su piastra. Da questa sospensione si allestiscono almeno tre diluizioni "in base 2", che vengono lette a 600 nm con uno spettrofotometro in cuvette da 1 cm. Le varie letture consentono di tracciare una curva dello *standard*, dove in ascissa si riportano le diluizioni (1:2 – 1:4 – 1:8 – ecc) e in ordinata le letture di densità ottica (DO). Conoscendo la concentrazione batterica della sospensione iniziale, sarà possibile affiancare alle letture DO il rispettivo numero di batteri/ml presunto. Per valutare la concentrazione batterica sconosciuta di un campione, si legge allo spettrofotometro la sua DO e il valore trovato deve essere trasferito sulla curva dello *standard*.

Ancora sul conteggio dei batteri…

Nella lettura di un conteggio batterico su piastra, si prende in considerazione la diluizione che abbia dato luogo alla crescita di colonie in numero compreso fra 30 e 300. Si calcola la carica batterica totale per unità di misura del campione in esame mediante l'espressione:

$$CBT / g\ (ml, cm^2) = \frac{C}{D_1 \times D_2 \times V}$$

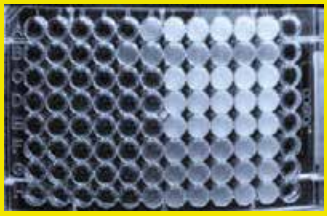
dove:
C = media numero colonie nelle due piastre
D_1 = diluizione introdotta nella preparazione dell'omogenato
D_2 = diluizione decimale dell'omogenato
V = volume dell'inoculo nelle piastre (1 ml)

Per calcolare l'intervallo fiduciale di un conteggio (∂), la norma ISO 7218 introduce la seguente formula:

$$\partial = \left[\frac{\sum C}{V\,(n_1 + 0{,}1\,n_2)} + \frac{1{,}92}{V\,(n_1 + 0{,}1\,n_2)} \pm \frac{1{,}96\sqrt{\sum C}}{V\,(n_1 + 0{,}1\,n_2)}\right] \times \frac{1}{d}$$

dove si devono inserire i seguenti dati:
$\sum C$ = se sono state seminate due piastre per diluizione, contare le colonie di due diluizioni contigue (purché leggibili) e fare la somma sulle quattro piastre
V = volume d'inoculo per ogni piastra
n_1 = numero di piastre seminate con la prima diluizione (2 piastre)
n_2 = numero di piastre seminate con la seconda diluizione (2 piastre)
d = diluizione con cui è stata seminata la prima piastra presa in considerazione

Come si esegue un conteggio in micrometodo



Questa tecnica è stata introdotta da Kramer nel 1977 ed è una delle più valide. È necessario avere una cappa a flusso laminare, una provetta con 5 ml di soluzione diluente sterile di Ringer 1/4 concentrata, una piastra "*microtiter*" sterile con fondo a V completa di coperchio, una micro-pipetta a volume variabile 0-20 μl, una micropipetta a volume variabile 0-200 μl, puntali sterili monouso, alcune piastre Petri di terreno PCA, un termostato a +37 °C.

Diluzioni - Si distribuiscono 180 μl di diluente in tanti pozzetti della piastra "*microtiter*" quante sono le diluizioni desiderate, usando la micropipetta 0-200 μl. Generalmente, sono sufficienti da 4 a 6 diluizioni decimali.
Dall'omogenato del campione da esaminare si trasferiscono 20 μl nel primo pozzetto e così via, usando la micropipetta 0-20 μl e cambiando ogni volta il puntale, dopo alcune miscelazioni fatte con la micropipetta da 0-200μl.

Semina - Da ciascuna diluizione si trasferiscono, con la micropipetta 0-20 μl, in doppio, 20 μl su un settore di terreno *Plate Count Agar* (PCA) entro una piastra Petri diametro 9 cm (divisa in due con una linea tracciata diametralmente col pennarello sul retro). Ciascuna piastra può accogliere due diluizioni.

Lettura - Si sceglie la diluizione che presenta non più di 20 colonie, che vengono contate contro una sorgente luminosa e segnate sul retro della piastra. Il calcolo della quantità di germi presenti nel campione si fa applicando la formula precedentemente riportata.

ESEMPIO DI UN PROTOCOLLO D'ANALISI SIEROLOGICA DI LABORATORIO: LA TECNICA DI FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO (FDC)

- sieri in esame da inattivare in bagnomaria a +56°C per 30'
- mcl 75 di **diluente Veronal** in tutti i pozzetti di una piastra *microtiter*
- mcl 50 dei **sieri in esame** in ciascun pozzetto della fila A
- pipetta multicanale: miscelazione e passaggio di 50 mcl dalla fila A alla G
- aggiunta per pozzetto: 25 mcl di **complemento** (siero di cavia) + 25 mcl di **antigene noto** (esclusa fila A) + 25 mcl di diluente Veronal
- agitazione e incubazione in termostato a +37°C per 30'
- mcl 50 di **sistema emolitico** (globuli rossi di cavia ed emolisina)
- agitazione e incubazione in termostato a +37°C per 30'
- centrifugare la piastra a 1000 rpm per 10' e mantenerla una notte a +4°C
- Lettura: il titolo di un siero corrisponde alla prima diluizione con il 50% di emolisi. Le diluizioni dei sieri sono al raddoppio (1/2 –1/4 - 1/8 ecc)

NOTA – Se si stabilisce corrispondenza fra un siero e l'antigene, il complemento viene legato e **non c'è emolisi** (= ***test* positivo**). Siero, antigene e sistema emolitico possono avere un potere anticomplementare (PAC) e compromettere il *test*, per cui vanno allestiti dei controlli nella fila H.

SELEZIONE DI METODI ISO PER MICROBIOLOGIA

Anno	Numero	Oggetto
1998	10678	Stafilococchi patogeni nelle acque
1998	11731	Conteggio *Legionella*
2000	6579-1 -2	Ricerca *Salmonella*
2000	6887	Preparazione dei campioni, diluizioni
2000	10850	Conteggio *Escherichia coli* con MPN
2001	6222	Conteggio colonie microrganismi
2001	16649-2	Conteggio *E. coli* beta-glucuronidasi+
2003	7899-2	Conteggio Enterococchi
2003	10674	Ricerca *Yersinia enterocolitica*
2003	16654	Ricerca *E. coli* O157
2004	6888	Conteggio stafilococchi coagulasi+
2004	18593	Campionamento superfici
2004	21567	Ricerca *Shigella*
2005	7932	Conteggio *Bacillus cereus* presunto
2005	7937	Conteggio *Clostridium perfringens*
2005	11290-1-2	Ricerca e conta di *Listeria monocytogenes*
2006	10272	Ricerca *Campylobacter*
2006	19036	Incertezza della misura in determinazioni quantitative
2007	7218	Guida per le analisi microbiologiche
2008	16266	Ricerca e conta di *Pseudomonas aeruginosa*
2008	21527-1-2	Conteggio lieviti e muffe nelle acque
2010	21528	Ricerca *Enterobacteraceae*
2011	16140	Metodi alternativi
2013	4833-1 -2	Conteggio microrganismi a +30°C
2014	11133	Preparazione terreni colturali
2017	9308-1	Conteggio *Escherichia coli* e coliformi

ANCORA SU STERILIZZAZIONE, DISINFEZIONE, ANTISEPSI

La ***sterilizzazione*** consiste nell'uso di procedure fisiche o di sostanze chimiche che distruggono i microbi, comprese le spore batteriche.

La ***disinfezione*** è un procedimento simile alla sterilizzazione, ma "parziale", in quanto possono sopravvivere alcune specie batteriche (come i micobatteri), virus e spore.

L'***antisepsi*** consiste nell' applicazione di agenti chimici sulla cute per inibire o eliminare i microbi. Non ha effetto sulle spore.

Principali metodi di sterilizzazione

Sterilizzanti fisici	Vapore sotto pressione	Autoclave (121°C per 15' o intervalli maggiori)	Qualsiasi materiale termoresistente
	Calore secco	Stufa a secco (160°C per 2 ore o altre combinazioni)	Vetreria da laboratorio, reagenti in polvere
	Filtrazione	Fibre vegetali (filtri Seitz®) Acetato/nitrato di cellulosa (0,22 – 0.45 µm (filtri Millipore®) Polimeri (filtri HEPA®)	Liquidi Fluidi in generale Aria
	Radiazioni	Raggi UV (esposizione variabile a 254 nm)	Materie plastiche, superfici di lavoro
	Radiazioni ionizzanti	Microonde (radiazioni gamma)	Alimenti
Gas		Ossido di etilene (450-1200 mg/l a 29-65°C per 2-5 ore) Biossido di cloro (0,2 ppm)	Strumenti da laboratorio, materie plastiche Acque
		Vapori di formaldeide (2-5% a 60-80°C)	Ambienti, oggetti delicati
		Gas plasma	Gomma, plastica
Sostanze chimiche		Glutaraldeide (2%)	Strumenti chirurgici

Alcuni tipi di disinfettanti

Calore	75-100°C per 30'	Alto potere	Utensili cucina
Liquidi	Glutaraldeide 2%		Strumenti chirurgici
	Perossido d'idrogeno (3-25%)		Materie plastiche, protesi
	Formaldeide (3-8%)		Alloggi per animali
	Biossido di cloro		Ambienti, acque
	Composti clorurati (100-1.000 ppm di cloro libero/l)		Pavimenti, acque
	Alcool etilico (70%), isopropilico (70-95%)	Potere intermedio	Superfici, apparecchi
	Composti fenolici (0,4-5%)		Strumenti chirurgici
	Composti iodofori (50-100 ppm di iodio attivo/l)		
	Composti dell' ammonio quaternario (0,4-1,6%)	Potere basso	Superfici di lavoro

Comuni antisettici

Alcool etilico e isopropilico (70-90%) – Iodofori (1-2% di iodio disponibile) – Clorexidina (0,4%) – Paraclorometaxilenolo (0,5-3,75%) – Tensioattivi (cloruro di benzalconio 0,1-0,2%).

ALCUNE INFORMAZIONI SU MALATTIE DA BATTERI E VIRUS NEI PESCI…

Malattia batterica	Specie colpite e trasmissione	Sintomi e lesioni	Note
FORUNCOLOSI (*forunculosis*) *Aeromonas salmonicida* (Gram-negativo)	Salmone, trota, salmerino, luccio, merluzzo, carpa, tinca, pesce rosso, pesce gatto. Pesci di tutte le età. Da soggetti infetti, acque, mangime, trasporti.	Emorragie agli organi interni e splenomegalia (forma acuta). Foruncoli scuri sulla cute di dorso e fianchi che spesso si ulcerano (forma cronica).	Associata ad alte temperature, bassi livelli di ossigeno ed eccessiva densità.
MALATTIA BATTERICA RENALE (*kidney disease*) *Renibacterium salmoninarum* (Gram-negativo)	Salmone, salmerino, trota, temolo. Colpiti stadi giovanili e pre-riproduttivi. Da acqua infetta da feci di pesci malati o portatori, uova.	Sintomi aspecifici (letargia, rigonfiamento, melanosi, decolorazioni, anemia). Granulomi interni, emorragie, reni ingrossati e necrotici.	Favorita da *stress*, manipolazioni, passaggio da acqua salata a dolce
MALATTIA DELLA BOCCA ROSSA (*redmouth disease*) *Yersinia ruckeri* (Gram-negativo)	Trota, salmone, anguilla, temolo, rombo. Da pesci infetti.	Forma acuta (arrossamento diffuso della bocca, anemia delle branchie, emorragie alle pinne). Emorragie nei visceri, milza e rene ingrossati e congesti, enterite catarrale-emorragica.	Mortalità elevata. La malattia non dipende dalla temperatura dell'acqua.
Malattia virale	**Specie colpite e trasmissione**	**Sintomi e lesioni**	**Note**
SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE (VHS) *Rhabdovirus* (RNA virus)	Trota, salmerino, luccio, coregone, aringa, merluzzo. Colpite tutte le età ma soprattutto gli avannotti. Alta mortalità. Da portatori, acque infette.	Forma acuta, cronica, nervosa. Melanosi, letargia, esoftalmo, atassia natatoria, emorragie, anemia, reni pallidi e ingrossati.	La malattia si manifesta in inverno (T< 15°C) e scompare in estate. Malattia denunciabile (Dec. Lgs 148/2008).
NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA (IHN) *Rhabdovirus* (RNA virus)	Trota, luccio, rombo, coregone, salmone, salmerino. Soprattutto pesci fino a due anni. Mortalità avannotti 80%. Da portatori, acque infette, sospetta verticale.	Anoressia, letargia, talvolta iperattività, melanosi, anemia, addome disteso, filamenti fecali biancastri, emorragie interne. Forma cronica negli adulti.	La malattia si manifesta in primavera e autunno (T=10°C). Malattia denunciabile (Dec. Lgs 148/2008).
ANEMIA INFETTIVA DEL SALMONE (ISA) *Orthomyxovirus* (RNA virus)	Salmone, trota. Colpisce ogni età (non avannotti), soprattutto quando vivono in acque marine. Da portatori, acque infette da muco e feci.	Stato anemico branchiale, letargia, nuoto circolare, esoftalmo, ascite. Emorragie ai visceri, alla cute e negli occhi.	Malattia denunciabile (Dec. Lgs 148/2008).
ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE (ERV) *Betanodavirus* (RNA virus)	Branzino, orata, passera, rombo, platessa, perciformi d'acqua dolce. Da portatori asintomatici, acque infette, uova.	Mortalità improvvisa nei giovani, salti fuori acqua, negli adulti letargia, cheratite, erosioni cutanee. Iperinsufflazione della vescica natatoria.	Detta anche Nodavirosi.
NECROSI PANCREATICA INFETTIVA (IPN) *Birnavirus* (RNA virus)	Trota, luccio, salmone, rombo in allevamento. Da portatori asintomatici, acque infette, reti, uova.	Alta mortalità nei giovani, melanosi, addome rigonfio, letargia, ectasia gastrica, muco biancastro. Emorragie interne, necrosi pancreas.	Gli *stress* (ambiente non idoneo, sovraffollamento, cattiva conduzione) sono fattori scatenanti.
NECROSI EMATOPOIETICA EPIZOOTICA (EHN) *Iridovirus* (DNA virus)	Persico, trota, pesce gatto, pesce siluro e altri d'acqua dolce. Tutte le età. Alta mortalità novellame. Da soggetti portatori, acque infette, attrezzature.	Sintomi aspecifici (letargia, anomalie del nuoto, rigonfiamento addominale, melanosi). Ulcere cutanee, emorragie interne.	La malattia si manifesta in estate (T=12-18°C). Malattia esotica (Dec. Lgs 148/2008).

NOTA - Nella tabella sono elencate solo alcune malattie più frequenti in Italia. Numerose altre forme dipendono da virus e batteri tra cui, ad esempio, si citano *Pseudomonas fluorescens* (*haemorragic septicemia*), *Haemophilus piscium* (*ulcer disease*), *Pasteurella piscicida* (*white perch disease*), *Vibrio anguillarum* (*vibriosis*), *Chondrococcus columnaris* (*columnaris disease*), *Myxobacteria* (*gill disease*). **Maggiori notizie si possono trovare nei testi specializzati, tra cui: Ghittino P., Piscicoltura e ittiopatologia, Ed. Rivista di Zootecnia, Milano, 1970** e **Peli A., Scagliarini L., Lotta alle malattie dei pesci, IZS Abruzzo e Molise, 2008.**

BIBLIOGRAFIA

Cap. 1 – Generalità

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams-Wilkins, Baltimora, USA, 1984

Carter G.R., Diagnostic procedures in veterinary microbiology, 2nd ed., Thomas Publ., Springfield, Illinois, USA,1975

Cruickshank R., Medical Microbiology, Livingstone ed., London, 1965

Davis D.B. *e Coll*., Trattato di microbiologia, Piccin, Padova, 1981

Javetz *e Coll*., Microbiologia medica, 21a. ed., Piccin, Padova, 2001

Murray P.R. *e Coll*., Microbiologia, seconda edizione italiana, EdiSES, Napoli, 2002

Wilson G.S. *e Coll*., Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, vol. 1, 5th ed., Williams-Wilkins, Baltimora, USA, 1964

Cap. 2 – Uomo

Abu-Elteen K.H. and Hamad M.A. (2012). Changing Epidemiology of Classical and Emerging Human Fungal Infections: A Review. Jordan J. Biolog. Sci.; 5 (4): 215–230.

Ashbee H.R., Evans E.G.V., Viviani M.A. *et al*. (2008). Histoplasmosis in Europe: Report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. Medical Mycology; 46: 57-65.

Bennett J.W. (2010). An Overview of the Genus Aspergillus. In: Aspergillus molecular Biology and Genomics. M. Machida and K. Gomi (eds.), Caister Academic Press, Norfolk, UK; pp. 1-17.

Boekhout T., Guého-Kellermann E *et al*. (2010). *Malassezia* and the Skin. DOI: 10.1007/978-3-642-03616-3

Bradsher R.W. (2014). The endemic mimic: Blastomycosis an illness often misdiagnosed. Transactions Am. Clin. Climatol. Ass.; 125: 188-203.

Chakrabarti A., Bonifaz A., Gutierrez-Galhardo M.C. *et al*. (2015). Global epidemiology of sporotrichosis. Medical Mycology; 53: 3-14. doi: 10.1093/mmy/myu062

Colombo A.L., Padovan A.C.B., Chaves G.M. (2011). Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. Clin. Microbiol. Rev.; 24 (4): 682–700. doi:10.1128/CMR.00003-11

Douglas A.P., Chen S.C.-A., Slavin M.A. (2016). Emerging infections caused by non-Aspergillus filamentous fungi. Clinical Microbiology and Infection 22 (2016) 670-680. http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.011

El-Shabrawi M.H.F., Arnaout H., Madkour L., Kamal N.M. (2014). Entomophthoromycosis: a challenging emerging disease. Mycoses; 57 (Suppl. 3): 132-137.

Hayette M.P.and Sacheli R. (2015). Dermatophytosis, Trends in Epidemiology and Diagnostic Approach. Curr. Fungal Infect. Rep. DOI 10.1007/s12281-015-0231-4

Kawila R., Chaiwarith R., Supparatpinyo K. (2013). Clinical and laboratory characteristics of penicilliosis marneffei among patients with and without HIV infection in Northern Thailand: a retrospective study. BMC Infec. Dis.; 13: 464.

Jadhav V.J. and Pal M. (2013). Human and domestic animal infections caused by Candida albicans. J. Mycopathol. Res.;51 (2): 243-249.

Lamoth F., Costa S.F., Alexander B.D. (2019). Epidemiology of fungal infections: what, where and when. In: Antifungal therapy. Ghannoum M.A. and Perfect G.R. (Eds.); CRC Press NY.
Lorenzetti Bocca A., Corrêa Amaral A., Melo Teixeira M. *et al*. (2013). Paracoccidioidomycosis: ecoepidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. Future Microbiol.: 8 (9): 1177-1191.
Martinez R. (2017). New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. J. Fungi; 3: 1-13. doi:10.3390/jof3010001
May R.C., Stone N.R.H., Wiesner D.L. (2016). Cryptococcus: from environmental saprophyte to global pathogen. Nat. Rev. Microbiol.; 14 (2): 106-117. doi:10.1038/nrmicro.2015.6.
McBride J.A., Gauthier G.M., Klein B.S. (2017). Clinical manifestations and treatment of blastomycosis. Clin. Chest. Med.; 38 (3): 435--449. doi:10.1016/j.ccm.2017.04.006.
Mondello F. (2008). Funghi patogeni per l'uomo: generalità e prospettive. Istituto Superiore di Sanità - Roma. (Rapporti ISTISAN 08/10).
Pal M. and Dave P. (2017). Sporotrichosis: An Infectious Emerging Mycosis of Zoonotic Potential. Annals of Biological Sciences; 5 (1): 1-4.
Pal M. and Mahendra R. (2014). Pythiosis: An Emerging Oomycetic Disease of Humans and Animals. International Journal of Livestock Research; 4 (6). DOI 10.5455/ijlr.20140929104047
Pal M., Shimelis S., Rao P.V.R., Samajpati, Manna A.K. (2016). Rhinosporidiosis: An enigmatic pseudofungal disease of humans and animals. J. Mycopathol. Res.; 54 (1) : 49-54.
Pal M. and Kumar Pati P. (2018). Coccidioidomycosis: A Highly Infectious Airborne Mycosis of Public Health Concern. CPQ Microbiology; 1 (6): 01-05.
Revankar S.G. and Sutton D.A. (2010). Melanized Fungi in Human Disease. Clinical Microbiol. Rev.; 23 (4): 884-928.
Seyedmousavi S., Guillot J., Tolooe A., Verweij P.E., de Hoog G.S. (2015). Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. Clin. Microbiol. Infect.; 21: 416–425. http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.031
Seyedmousavi S., de M.G. Bosco S., de Hoog S., Ebel F. et al. (2018). Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. Medical Mycology; 56: S165–S187. doi: 10.1093/mmy/myx104
Shaikh N., Hussain K.A., Petraitiene R., Schuetz A.N., Walsh T.J. (2016). Entomophthoramycosis: a neglected tropical mycosis. Clinical Microbiology and Infection; 22: 688-694.
Sharma V., Kumawat T.K., Sharma A. (2015). Dermatophytes: Diagnosis of dermatophytosis and its treatment. African J. Microbiol. Res.; 9 (19): 1286-1293. DOI: 10.5897/AJMR2015.7374
Stockamp N.W. and Thompson G.R. (2016). Coccidioidomycosis. Infect. Dis. Clin. N. Am.; 30: 229-246.
Theelen B., Cafarchia C., Gaitanis G. *et al*. (2018). *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. Medical Mycology; 56: S10–S25. doi: 10.1093/mmy/myx134
Tiwari R., Karthik K., Dhama K., Shabbir M.Z., Khurana S.K. (2015). Rhinosporidiosis: a riddled disease of man and animals. Adv. Anim. Vet. Sci.; 3 (2s): 54-63. http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.54.63
Velegraki A., Cafarchia C., Gaitanis G., Iatta R., Boekhout T. (2015). *Malassezia* Infections in Humans and Animals: Pathophysiology, Detection, and Treatment. PLoS Pathog.; 11 (1): e1004523. doi:10.1371/journal.ppat.1004523
Waness A., Al Dawsari G., Al Jahdali H. (2009). The Rise of an Oppurtunistic Infection called "Invasive Zygomycosis". J. Glob. Infect. Dis.; 1 (2): 131–138. doi: 10.4103/0974777X.56256

White T.C., Findley K., Dawson T.L. *et al*. (2014). Fungi on the Skin: Dermatophytes and Malassezia. Downloaded from http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/
Wirth F., Goldani L.Z. (2012). Epidemiology of Rhodotorula: An Emerging Pathogen. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases; article ID 465717. doi:10.1155/2012/465717
Wong S.Y.N. and Wong K.F. (2011). Penicillium marneffei Infection in AIDS. Pathology Research International; 2011: ID 764293. doi:10.4061/2011/76429

Cap. 3 – Animali (Batteri)

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams-Wilkins, Baltimora, USA, 1984
Biberstein E.L. e Coll., Review of vetrinary microbiology, Blockwell Sci. Publ., Boston, USA, 1990
Bisping W. e Coll., Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals, Parey, Berlin, 1988
Buxton A. e Coll., Animal Microbiology, vol. 1, Blackwell Sci. Publ., Oxford, England, 1977
Carter G.R., Diagnostic procedures in veterinary microbiology, 2nd ed.,Thomas Publ.,Spring field,Illinois,USA,1975
Cottral G.E., Manual of standardized methods for veterinary microbiology, Cornell Univ. Press, Ithaca, USA, 1978
Edwards P. R. e Coll., Identification of Enterobacteriaceae, 3rd ed., Burgess, New York, USA, 1972
Fedida M. e Coll., Les prelevements inutilisables en pathologie bovine infectieuse, Rec. Med. Vet., 1983, 159, 873
Gillespie J.H. e Coll., Malattie infettive degli animali domestici, Grasso, Bologna, 1984
Meynell G.G. e Coll., Theory and practice in experimental bacteriology, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1970
Merck Veterinary Manual, 9th Edition, Editor:Cynthia M. Kahn, M.A. Published by Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ, USA 2008

Cap. 3 – Animali (Miceti)

Agnetti F., Moretta I., Danesi P. *et al*. (2012). *Rhodotorula glutinis* e sospetta dermatosi in un cane - Suspect of *Rhodotorula glutinis* dermatoses in a dog. Webzine Sanità Pubblica Veterinaria; 72. http://spvet.it/ ISSN 1592-1581
Antoniassi N.A.B., Juffo J.D., Santos A.S. *et al*. (2013). *Geotrichum candidum* as a possible cause of bovine abortion. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation; 25 (6): 795-797. DOI: 10.1177/1040638713508284
Aronstein K.A. and Murray K.D. (2010). Chalkbrood disease in honey bees. J. Invertebrate Path.; 103: S20–S29.
Borel N., Frey C.F., Gottstein B., Hilbe M. *et al*. (2014). Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe, The Veterinary Journal (2014), doi: 10.1016/j.tvjl.2014.03.015
Boys C.A., Rowland S.J., Gabor M. *et al*. (2012). Emergence of Epizootic Ulcerative Syndrome in Native Fish of the Murray-Darling River System, Australia: Hosts, Distribution and Possible Vectors. PLoS ONE; 7 (4): e35568
Cabañes F.J. (2014). *Malassezia* Yeasts: How Many Species Infect Humans and Animals? PLoS Pathog.; 10 (2): e1003892. doi:10.1371/journal.ppat.1003892
Cafarchia C., Figueredo L.A., Otranto D. (2013). Fungal diseases of horses. Veterinary Microbiology ;167: 215–234.
Carpana E. e Lodesani M. (2014). Patologia e avversità dell'alveare. Springer, Milano.

Rodrigues de Farias M., Zeni Condas L.A., Garcia Ribeiro M. *et al*. (2010). Paracoccidioidomycosis in a Dog: Case Report of Generalized Lymphadenomegaly. Mycopathologia. DOI 10.1007/s11046-011-9412-z

Dhama K., Chakraborty S., Verma A.K., Tiwari R. *et al*. (2013). Fungal/Mycotic Diseases of Poultry-diagnosis, Treatment and Control: A Review. Pakistan Journal of Biological Sciences; 16 (23): 1626-1640.

de Hoog G.S, Vicente V.A., Najafzadeh M.J. *et al*. (2011). Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. Persoonia; 27: 46–72. http://dx.doi.org/10.3767/003158511X614258

Elad D. and Segal E. (2018). Diagnostic Aspects of Veterinary and Human Aspergillosis. Front. Microbiol; 9:1303.

ESCCAP (2015). Linee guida ESCCAP per il trattamento ed il controllo dei parassiti degli animali da compagnia.

http://www.parassitologia.unina.it/wp-content/themes/para/mappe/Parassiti21.pdf

ESCCAP (2017). Control of Parasites and Fungal Infections in Small Pet Mammals. Guideline 07 First Edition

https://www.esccap.org/guidelines/

ESCCAP (2018). Superficial Mycoses in Dogs and Cats. Guideline 02 Third Edition.

https://www.esccap.org/uploads/docs/lpy2484b_0765_ESCCAP_Guideline_GL2_v2.pdf

Girma G., Abebaw M., Zemene M. *et al*. (2016). A Review on Aspergillosis in Poultry. J. Vet. Sci. Technol.; 7: 382.

Gremião I.D.F., Menezes R.C., Schubach T.M.P. (2015). Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. Medical Mycology; 53: 15-21. doi: 10.1093/mmy/myu061

Glockling S.L., Marshall W.L. *et al*. (2014). 9 The ecological and economic importance of zoosporic Mesomycetozoea (Dermocystida) parasites of freshwater fish. In: *Freshwater Fungi and Fungus-Like Organisms*, 203-232.

Gozlan R.E., Marshall W.L., Lilje O. *et al*. (2014). Current ecological under standing of fungal-like pathogens of fish: what lies beneath? Frontiers in Microbiology. doi: 10.3389/fmicb.2014.00062

Hershberger P.K. (2012) 3.2.18 Ichthyophonus Disease (Ichthyophoniasis) – 1

https://units.fisheries.org/fhs/wp-content/uploads/sites/30/2017/08/3.2.18-Ichthyophonus-2014.pdf

Iqbal Z. and Saleemi S. (2013). Isolation of pathogenic fungi from a freshwater commercial fish, *catla catla* (Hamliton). Sci.Int (Lahore): 25 (4): 851-855.

Ibrahim, K.S. Isolation and pathological study of branchiomycosis from the commercial pond of common carp (*Cyprinus carpio)* fish, in Governorate of Duhok/Iraq. The Iraqi Journal of Veterinary Medicine; 35 (1): 1-9.

IICES (2016) Infection with Exophiala salmonis. ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. Leaflet No. 42. 5 pp

Jadhav V.J. and Pal M. (2013). Human and domestic animal infections caused by Candida albicans. J. Mycopathol. Res.;51 (2): 243-249.

Jussila J., Makkonen J., Vainikka A., Kortet R., Kokko H. (2014). Crayfish plague dilemma: how to be a courteous killer? Boreal Environment Research; 19: 235–244.

Kamilya D. and Baruah A. (2014). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish: history and current status of understanding. Rev. Fish. Biol. Fisheries; 24: 369-380. DOI 10.1007/s11160-013-9335-5

Khalil R.H., Saad T.T., Abo Selema T.A.M., Abdel-Latif H.M.R. (2015). *Branchiomyces Demigrans* Infection in Farm-Reared Common Carp (*Cyprinus Carpio L.*) and Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) at Different Localities in Egypt, With Special Emphasis

to the Role of Environmental Stress Factors. *International Journal of Innovative Studies in Aquatic Biology and Fisheries;* 1 (1): 15-23.
Leishangthem G.D., Singh N:D:, Brar R.S., Banga H.S. (2015). Aspergillosis in Avian Species: A Review. J. Poultry Sci. Technol.; 3 (1): 1-14.
Lloret A., Hartmann K., Pennisi M.G. et al. (2013a). Systemic mycoses in cats: blastomycosis, histoplasmosis and coccidioidomycosis: ABCD guidelines on prevention and management. Journal of Feline Medicine and Surgery; 15: 624-627. DOI: 10.1177/1098612X13489226
Lloret A., Hartmann K., Pennisi M.G. *et al*. (2013b). Rare opportunistic mycoses in cats: phaeohyphomycosis and hyalohyphomycosis: ABCD guidelines on prevention and management. Journal of Feline Medicine and Surgery; 15: 628-630. DOI: 10.1177/1098612X13489227
Lopes L.Q.S., Quatrin P.M., De Souza M.E., De Almeida Vaucher R., Vianna Santos R.C. (2015) Fungal Infections In Honey Bees. Fungal Genom. Biol.; 4: 118. doi:10.4172/2165-8056.1000118
Meyers T., Burton T., Bentz C., Starkey N. (2018). Common disease of wild and cultured fishes in Alaska. The Alaska Department of Fish and Game. USA.
Moretta I., Veronesi F., Lepri E. *et al*. (2010). Micosi delle tasche gutturali da *Aspergillus fumigatus* in un cavallo deceduto per edema polmonare acuto. Ippologia; 2: 11-17.
Moretti A., Moretta I., Agnetti F. *et al*. (2013). L'aborto ad eziologia micotica nella specie bovina. Large Animal Review; 19: 155-161.
Moriello K.A., Coyner K., Paterson S., Mignon B. (2017). Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. Vet. Dermatol.; 28: 266–e68. DOI: 10.1111/vde.12440
Mrugała A. (2016). The crayfish plague pathogen Aphanomyces astaci in its introduced ranges: vectors, introduction pathways, genetic variation and host-pathogen interactions. Ph.D. Thesis 2016. Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Ecology. Study programme: Ecology.
Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. (2017). Infezioni fungine e simil-fungine ad eziologia insolita o incerta. In: Microbiologia Medica 8 ed.; Edra LSWR.
Nogueira Brilhante R.S., Vago Bittencourt P., Chaves Lima R.A. *et al*. (2016). Coccidioidomycosis and Histoplasmosis in Equines: An Overview to Support the Accurate Diagnosis. Journal of Equine Veterinary Science; 40: 62–73.
Pal M., Sejra S., Sejra A., Tesfaye S. (2013). Geotrichosis - An Opportunistic Mycosis of Humans And Animals. Intern. J. Livestock Res.; 3 (2): 38-43.
Pal M. (2015). Growing Role of Fungi in Mycotic Abortion of Domestic Animal. J. Bacteriol. Mycol.; 2 (1): 1009.
Pal M. and Mahendra R. (2014). Pythiosis: An Emerging Oomycetic Disease of Humans and Animals. International Journal of Livestock Research; 4 (6). DOI 10.5455/ijlr.20140929104047
Pal M., Shimelis S., Rao P.V.R., Samajpati, Manna A.K. (2016). Rhinosporidiosis : An enigmatic pseudofungal disease of humans and animals. J. Mycopathol. Res.; 54 (1) : 49-54.
Pal M. and Dave P. (2017). *Sporotrichosis*: An Infectious Emerging Mycosis of Zoonotic Potential. Annals of Biological Sciences; 5 (1): 1-4. http://abiosci.com/archive.html
Pennisi M.G., Hartmann K., Lloret A. *et al*. (2013). Cryptococcosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. Journal of Feline Medicine and Surgery; 15: 611–618. http://jfm.sagepub.com/content/15/7/611
Refai M.K., Marouf S., Abuelala N., Sayed El-Ahl R.H. (2016a). Monograph on Fungal Diseases of Fish. Parte 1 e 2. A guide for postgraduate students. https://www.academia.edu/21679188/
Refai M.K., Moshref B., El-Shafei H., Elhelw R. (2016b). Monograph on Bovine Mycoses and Mycotoxicoses. A guide for postgraduate students. https://www.academia.edu/21679188/

Refai M.K., El-Yazeed H.A., Hassan A., El-Hariri M. (2016c). Monograph On Equine Mycoses and Mycotoxicoses. A guide for postgraduate students. https://www.academia.edu/22412078/
Refai M.K., Elbatrawi A., Osman G., Hassan A. (2016d). Monograph on Avian Mycoses & Mycotoxicoses. A guide for postgraduate students. https://www.academia.edu/21679188/
Refai M.K., El-Yazeed H.A., Abdel-Haleem M., HassanA., El-Hariri M. (2016e). Monograph On Fungal Diseases of Cats and Dogs. A guide for postgraduate students. https://www.academia.edu/21679188/
Refai M.K., El-NaggarA.L., El-Mokhtar N.M. (2017). Monograph On Fungal Diseases of sheep and goats. A guide for postgraduate students in developing countries. https://www.academia.edu/32819397
Renschler J.S. and Wheat L.J. (2018). Review of Coccidioidomycosis in Animals. MiraVista – Veterinary Diagnostic. Updated: 02/2018
Roberts R.J. (2012). The Mycology of Teleosts. In: Fish Pathology. Wiley-Blackwell, USA; 9: 383-401.
Sana S., Hardouin E.A., Gozlan R.E., Ercan D. *et al*. (2017). Origin and invasion of the emerging infectious pathogen Sphaerothecum destruens. Emerging Microbes & Infections; 6: e76. doi:10.1038/emi.2017.64
Scantlebury C and Reed K. (2009). Epizootic lymphangitis. In: Infectious Diseases of the Horse; T.S. Mair & R. E. Hutchinson (Eds); Published by EVJ.
Schwartze V.U. and Jacobsen I.D. (2014). Mucormycoses caused by *Lichtheimia* species. Mycoses; 57 (Suppl. 3): 73-78. doi:10.1111/myc.12239
Seyedmousavi S., Guillot J., de Hoog G.S. (2013). Phaeohyphomycoses, Emerging Opportunistic Diseases in Animals. Clinical Microbiology Reviews; 26 (1): 19-35. doi:10.1128/CMR.00065-12
Seyedmousavi S., Guillot J., Tolooe A., Verweij P.E., de Hoog G.S. (2015a). Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. Clin. Microbiol. Infect.; 21: 416–425. http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.031
Seyedmousavi S., Guillot J., Arné P.*et al*. (2015b). Aspergillus and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. Medical Mycology; 53: 765–797. doi: 10.1093/mmy/myv067
Seyedmousavi S., de M.G. Bosco S., de Hoog S., Ebel F. *et al*. (2018). Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. Medical Mycology; 56: S165–S187. doi: 10.1093/mmy/myx104
Sharman M.J. and Mansfield C. S. (2012). Sinonasal aspergillosis in dogs: a review. Journal of Small Animal Practice; 53: 434–444. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2012.01245.x
Souto E.P.F., Maia L.A. *et al*. (2016). Pythiosis in the Nasal Cavity of Horses. J. Comp. Path.; 155: 126-129.
Svoboda J., Mrugała A., Kozubikova-Balcarova E., Petrusek A. (2016). Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen Aphanomyces astaci: a review. Journal of Fish Diseases. doi:10.1111/jfd.12472
Tampieri M.P. (2004). Micologia Veterinaria. Uni.Nova, Parma.
Theelen B., Cafarchia C., Gaitanis G. *et al*. (2018). *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. Medical Mycology; 56: S10–S25. doi: 10.1093/mmy/myx134
Tiwari R., Karthik K., Dhama K., Shabbir M.Z., Khurana S.K. (2015). Rhinosporidiosis: a riddled disease of man and animals. Adv. Anim. Vet. Sci.; 3 (2s): 54-63. http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.54.63
D.G., Cruz R.A.S., De Paula D.A.J. *et al*. (2013). Pathology of Nasal Infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in Sheep. J. Comp. Path.; 149: 137-145.

Velegraki A., Cafarchia C., Gaitanis G., Iatta R., Boekhout T. (2015*). Malassezia* Infections in Humans and Animals: Pathophysiology, Detection, and Treatment. PLoS Pathog.; 11 (1): e1004523. doi:10.1371/journal.ppat.1004523
Werner A. and Norton F. (2011). Blastomycosi. Compend. Contin. Educ. Vet.; 33: E1-E5.
Wirth F., Goldani L.Z. (2012). Epidemiology of Rhodotorula : An Emerging Pathogen. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases; article ID 465717. doi:10.1155/2012/465717

Cap. 3 - Animali (Virus)

Balows A. *e Coll*., Manual of Clinical Microbiology, 5th ed., ASM, Washington, USA, 1991
Baumgart J., Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittelntechnologie, Fleischwirtsch., 1996, *76*, 124
Blackburn C., Rapid and alternative methods for the detection of Salmonellas in foods, J. appl. Bact., 1993, *75*, 199
Buttiaux A. - Fraser G., Animal Microbiology, Blackwell Sci. Publ., Oxford, England, 1977
Candlisch A.A.G. *e Coll*., Immuno-detection of *Salmonella* in foods, Food Agric. Immunol., 1993, *1*, 61
Cano R.J. *e Coll*., Fluorescent detection - Polymerase Chain Reaction (FD - PCR) assay on microwell plates as a screening test for Salmonellas in foods, J. appl. Bact., 1993, *75*, 247
Cappellato M. *e Coll*., Elementi di microbiologia medica, Cedam, Padova, 1967
Carter G.R., Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology, 2nd ed., Thomas Publ., Springfield, USA, 1975
Castro D. *e Coll*., Development and application of a new scheme of phages for typing and differentiating *Salmonella* strains from different sources, J. Clin. Micr., 1992, *30*, 1418
Catsaras M. *e Coll*., Recherche des *Salmonella* par immunofluorescence, Ann. Rech. Vet., 1972, *3*, 665
Cevenini R., Microbiologia clinica, Piccin, Padova, 2002
Chain V.S. *e Coll*. J. Food Protect., 1991, *54,* 208
Chan S. *e Coll*., Comparative study of colorimetric DNA Hybridization Method and conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods, J. AOAC, 1990, *73*, 419
Cherry W.B. *e Coll*., Fluorescent antibody techniques in diagnostic bacteriology, Bacteriol. Rev., 1965, *29*, 222
Cottral G.G., Manual of Standardized Methods foe Veterinary Microbiology, Cornell Univ. Press, Ithaca, USA, 1978
Cruickshank R., Medical Microbiology, Livingstone, London, 1965
D'Aoust J., Performance of the microplate BacTrace ELISA technique for detection of foodborne *Salmonella*, J. Food Protect., 1990, *53*, 841
Delfino G. *e Coll*., Biologia e medicina, Zanichelli, Bologna, 1995
Ellis E.M. *e Coll*., A direct fluorescent antibody technique for the examination of animal by-products, foods and feeds for *Salmonellae*, Proc. U.S. Livestock San. A., 1968, 72, 553
Fach P. *e Coll*., Evaluation of a Polymerase Chain Reaction - based test for detecting *Salmonella* spp. in food samples : Probelia *Salmonella* spp., J. Food Protect., 1999, *62*, 1387
Feng P., Commercial Assay Systems for detecting foodborne *Salmonella* : a rewiew, J. Food Protect., 1992, *55*, 927
Feng P., Development and impact of rapid methods for detection of foodborne pathogens, in: P. Doyle *e Coll*., Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers, 2nd ed., ASM, Washington, USA, 2001
Fung D. *e Coll*., Microtiter methods for the evaluation of viable cells in bacterial cultures, Appl. Micr., 1968, *16*, 1036

Gibbs E. M. *e Coll*., Identification Methods for microbiologists, Academic Press, New York, 1966
Javetz, Melnick, Adelberg's, Microbiologia medica, Piccin, Padova, 2001
La Placa M., Principi di microbiologia medica, Esculapio, Bologna, 1985
Lennette E.H. *e Coll*., Manual of Clinical Microbiology, 2nd ed., ASM, Washington, USA, 1974
Lsen J.E. *e Coll*., Int. J. Food Micr., 1995, *28*,1
Mac Faddin J. F., Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed., Williams-Wilkins, Baltimora, USA, 1984
Meynell E., The significance of bacteriophage in bacterial classification. A review, J. gen. Micr., 1964, *36*, 461
Murray P.R. *e Coll*., Microbiologia, 2°. ed. italiana, EdiSES, Napoli, 2003
Neviani E., Ind. Alim., 1993, *32*,1206
Pasquinelli F., Diagnostica e tecniche di laboratorio, 2° vol., Rosini ed., Firenze, 1981
Pelczar M.J. *e Coll*., Microbiology, Mc Graw Publ. Co., New Delhi, India, 1978
Pignato S. *e Coll*., Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonella* in foods, Appl. Env. Micr., 1995, *61*, 1996
Pless P. *e Coll*., Rapid detection of *Salmonellae* by means of a new impedance-splitting-method, J. Food Protect., 1994, *57*, 369
Poli G. *e Coll*., Microbiologia medica, UTET, Torino, 2000
Robbins e Cotran, Le basi patologiche delle malattie infettive, Elsevier, edizione italiana, Bologna, 2006
Siliprandi N. *e Coll*., Biochimica medica, Piccin, Padova, 1998
Simonetti N. *e Coll*., Elementi di tecniche microbiologiche, EMSI, Roma, 2001
Smith P.J. *e Coll*., Reproducibility of electrical conductance assay results for the detection of *Salmonella*, Letters Appl. Micr., 1991, *12*, 78
Topley-Wilson, Bacterial Infections, vol. III, 9th ed., Arnold, London, 1998
Von Poucke L., *Salmonella* -TEK, a rapid screening method for *Salmonella* species in food, Appl. Environm. Micr., 1990, *56*, 924
Wilson G.S. *e Coll*., *Topley and Wilson's* Principles of Bacteriology andImmunity,vol. 1, 5th ed., Williams-Wilkins, Baltimora, USA, 1964

Zoonosi virali negli animali da compagnia

Ashraf U., Ye J., Ruan X. *et al*. (2015). Usutu Virus: An Emerging Flavivirus in Europe. Viruses; 7: 219-238.
Bonthius D.J. (2012). Lymphocytic choriomeningitis virus: An under-recognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. Semin. Pediatr. Neurol.; 19(3): 89-95. doi:10.1016/j.spen.2012.02.002
Boseret G., Losson B., Mainil J.G. *et al*. (2013). Zoonoses in pet birds: review and perspectives. Vet. Res.; 44:36.
Chomel B.B. (2014). Emerging and Re-Emerging Zoonoses of Dogs and Cats. Animals; 4: 434-445.
Doceul V., Bagdassarian E., Demange A., Pavio N. (2016). Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. Viruses; 8: 270. doi:10.3390/v8100270
EFSA and ECDC (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal 2018;16(12):5500, 262 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500

Jonsson C.B., Moraes Figueiredo L.T., Vapalahti O. (2010). A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. Clinical Microbiology Reviews; 23 (2): 412-441. doi:10.1128/CMR.00062-09
Keels S.J., Thompson K.M., Larson J.M., Blair J.E. (2009). Cleveland Clinic J. Med.; 74: 235-243.
Kumar B., Manuja A., Gulati B.R. *et al*. (2018). Zoonotic Viral Diseases of Equines and Their Impact on Human and Animal Health. The Open Virology Journal; 12: 80-98. DOI: 10.2174/1874357901812010080
Messenger A.M., Barnes A.N., Gray G.C. (2014). Reverse Zoonotic Disease Transmission (Zooanthroponosis): A Systematic Review of Seldom-Documented Human Biological Threats to Animals. PLoS ONE 9 (2): e89055.
Parrish C.R., Murcia P.R., Holmes E.C. (2014). Influenza Virus Reservoirs and Intermediate Hosts: Dogs, Horses, and New Possibilities for Influenza Virus Exposure of Humans. J. Virol.; 89: 2990-2994. doi:10.1128/JVI.03146-14.
Stefani E. (2011). Indagini sulla infezione da Borna virus in equini delle province autonome di Trento e Bolzano. Corso di laurea specialistica in Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Padova.
Tack D.M. and Reynolds M.G. (2011). Zoonotic Poxviruses Associated with Companion Animals. Animals; 1, 377-395. doi:10.3390/ani1040377

Cap. 4 – Alimenti

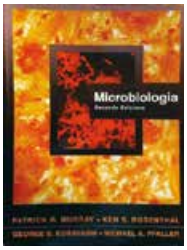
Althage R. *e Coll*., Sensitivität und spezifizität eines gesundentest auf *Listeria monocytogenes*, Arch. Lebens. 1992, *43*, 73-96
Benvenuti F. *e Coll*., Il rischio biologico: procedura applicativa per la valutazione del rischio e la pianificazione degli interventi di prevenzione e protezione, Biologi Italiani, 2002, 32, 49
Benvenuti F. *e Coll*., Linee guida per la valutazione del rischio, D. L.vo 626/94, fogli di informazione ISPELS, 1995
Bertoldi M. *e Coll*., Chimica e biochimica, EdiSes, Napoli, 2015
De Felip G., Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti, Tecniche Nuove, Milano, 2001
Fernandez-Garayzabal J.F. *e Coll*., Taxonomic note: a proposal for reviewing the interpretation of the CAMP reaction beetwen *Listeria monocytogenes* and *Rhodococcus equi*, Int. J. Syst. Bact. 1996, *46*, 832-834
Kramer J., Cantoni C., Alimenti. Microbiologia e Igiene, OEMF, Milano, 1994
Poli G., Cocuzza G., Nicoletti G., Mcrobiolgia Medica, UTET, Torino, 1993
Rondanelli E.G., Fabbi M., Marone P., Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari, Selecta Medica, Pavia, 2005
Rondanelli E.G., Vademecum di malattie infettive, Selecta Medica, Pavia, 2006
Sewell D. L., Laboratory-acquired infections, Clin. Microbiol. Newsl., 2000, 22, 73

Cap. 5 – Piante

Belli G., Elementi di patologia vegetale, Piccin, Padova, 2011
Buck J.W., Recent Trends in Microbiological Safety of Fruits and Vegetables, Plant Management Network, 2003.
De Moraes M. *e Coll*., *Salmonella* persistence in tomatoes requires a distinct set of metabolic functions identified by transposon insertion sequencing, Appl. Environm. Microbiol. 2017, *82*, 4100-4111

Guo X, Chen J, Brackett RE e Coll, Survival of *Salmonellae* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening,Appl. Environ. Microbiol. 2001, *67*, 4760-4
Guo X, van Iersel MW, Chen J e Coll., Evidence of association of *Salmonellae* with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution, Appl. Environ. Microbiol. 2002, *68,* 3639-43
Hartmann G. *e Coll*., Guida alle malattie elle piante e del bosco. Atlante illustrato, ORME ed., 2013
Matta A., Fondamenti di petologia vegetale, Pàtron, Bologna, 2017
Migheli Q., Fondamenti di patologia vegetale, Facoltà di Agraria, Università di Sassari, agrariafree.altervista.org
Rybicki E.P., A top ten list for economically important plant viruses, Arch. Virol. 2015, *160*, 17-20
Scholthof K.B. *e Coll*., Top 10 plant viruses in molecular plant pathology, Mol. Plant Pathol. 2011, *12*, 938-954
Waller P., Food Poisoning Journal, 2015

Non sono piante! – I Cianobatteri – di Sonia Flaminia Lavagnoli in: "Alle origini della vita: le alghe", Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia 2015, www.fondiz.it



Alcuni testi consigliati per maggiori informazioni su microbiologia /virologia umana, igiene degli alimenti e microbiologia/virologia/immunologia veterinaria:

- Murray P.R. *e Coll*., *Microbiologia*, EdiSes, Napoli, 2002
- Rondanelli E.G. *e Coll*., *Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari*, Selecta Medica, Pavia, 2005
- Poli G. *e Coll*., *Microbiologia e immunologia veterinaria*, UTET, Torino, 1996

NELLA STESSA COLLANA SONO STATI PUBBLICATI I SEGUENTI VOLUMI:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino

2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria

3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria

4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria

5 - 1981 La leucosi bovina enzootica

6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia

7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale

8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino

9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia

10 - 1983 Le infezioni da Escherichia coli degli animali

11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria

12 - 1984 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale

13 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo

14 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione

15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino

16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica

17 - 1986 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale

18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive

19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e marketing

20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986

21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino

22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie

23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa

24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili

25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino

26 - 1990 Riproduzione nella specie suina

27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano

28 - 1991 Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi

29 - 1991 La sindrome chetosica nel bovino

30 - 1991 Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni alpine per la profilassi delle mastiti

31 - 1991 Allevamento delle piccole specie

32 - 1992 Gestione e protezione del patrimonio faunistico

33 - 1992 Allevamento e malattie del visone

34 - 1993 Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del suino

35 - 1993 Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1ª conferenza nazionale

36 - 1993 Argomenti di patologia veterinaria

37 - 1994 Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche

38 - 1995 Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento

39 - 1995 Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica

40 - 1996 Principi e metodi di tossicologia in vitro

41 - 1996 Diagnostica istologica dei tumori degli animali

42 - 1998 Umanesimo ed animalismo

43 - 1998 Atti del Convegno scientifico sulle enteropatie del coniglio

44 - 1998 Lezioni di citologia diagnostica veterinaria

45 - 2000 Metodi di analisi microbiologica degli alimenti

46 - 2000 Animali, terapia dell'anima

47 - 2001 Quarantacinquesimo della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2000

48 - 2001 Atti III Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

49 - 2001 Tipizzare le salmonelle

50 - 2002 Atti della giornata di studio in cardiologia veterinaria

51 - 2002 La valutazione del benessere nella specie bovina

52 - 2003 La ipofertilità della bovina da latte

53 - 2003 Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento

54 - 2003 Proceedings of the 37th international congress of the ISAE

55 - 2004 Riproduzione e benessere in coniglicoltura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo

56 - 2004 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina

57 - 2004 Atti del XXVII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento

58 - 2005 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli

59 - 2005 IV Congresso Italiano di Storia della Medicina Veterinaria

60 - 2005 Atti del XXVIII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento

61 - 2006 Atlante di patologia cardiovascolare degli animali da reddito

62 - 2006 50° Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2005

63 - 2006 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia del coniglio

64 - 2006 Atti del XXIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento

65 - 2006 Proceedings of the 2nd International Equitation Science Symposium

66 - 2007 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli - II edizione

67 - 2007 Il benessere degli animali da reddito: quale e come valutarlo

68 - 2007 Proceedings of the 6th International Veterinary Behaviour Meeting

69 - 2007 Atti del XXX corso in Patologia Suina

70 - 2007 Microbi e alimenti

71 - 2008 V Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

72 - 2008 Proceedings of the 9th World Rabbit Congress

73 - 2008 Atti Corso Introduttivo alla Medicina non Convenzionale Veterinaria

74 - 2009 La biosicurezza in veterinaria

75 - 2009 Atlante di patologia suina I

76 - 2009 Escherichia Coli

77 - 2010 Attività di mediazione con l'asino

78 - 2010 Allevamento animale e riflessi ambientali

79 - 2010 Atlante di patologia suina II Prima Parte

80 - 2010 Atlante di patologia suina II Seconda Parte

81 - 2011 Esercitazioni di microbiologia

82 - 2011 Latte di asina

83 - 2011 Animali d'affezione

84 - 2011 La salvaguardia della biodiversità zootecnica

85 - 2011 Atti I Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

86 - 2011 Atti II Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

87 - 2011 Atlante di patologia suina III

88 - 2012 Atti delle Giornate di Coniglicoltura ASIC 2011

89 - 2012 Micobatteri atipici

90 - 2012 Esperienze di monitoraggio sanitario della fauna selvatica in Provincia di Brescia

91 - 2012 Atlante di patologia della fauna selvatica italiana

92 - 2013 Thermography: current status and advances in livestock animals and in veterinary medicine

93 - 2013 Medicina veterinaria (illustrato). Una lunga storia. Idee, personaggi, eventi

94 - 2014 La medicina veterinaria unitaria (1861-2011)

95 - 2014 Alimenti di origine animale e salute

96 - 2014 I microrganismi, i vegetali e l'uomo

97 - 2015 Alle origini della vita: le alghe

98 - 2015 Regimen Sanitatis Salerni

99 - 2015 Atti del VI Congresso Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

100 - 2015 Equus Frenatus. Morsi dalla Collezione Giannelli

101 - 2016 Lactose and gluten free: alimenti del domani?

102 - 2017 I modelli animali spontanei per lo studio della fisiologia e patologia dell'uomo

103 - 2017 Atti del VII Congresso Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

104 - 2017 Progetto legno: biodeterioramento e salute

105 - 2017 Il coniglio: storia ed evoluzione dell'allevamento in Italia e in Europa

106 - 2018 Riabilitazione equestre: relazione e progettualità

107 - 2018 Leggiamo insieme. Storie di sanità fra cronaca e scienza

108 - 2018 The Military Veterinary Services of the Fighting Nations in World War One. Historical congress

109 - 2019 Non erano nel menù. Storie di cibo e altro

110 - 2019 250 anni dalla Fondazione della Scuola di Veterinaria di Torino

Finito di stampare da

litos

Litos S.r.l. - Gianico (Bs)
www.litos.srl

nel mese di novembre 2019

ISBN 978-88-97562-25-2