

Protothecosi

Come valutare il pericolo

Un esempio di valutazione HACCP del pericolo di mastite da *Prototheca* spp.

di *Adriano Sarale e Luca Midulla*

Medici Veterinari, Laboratorio Agrilab Centallo (CN)

Un approccio moderno alla valutazione del rischio globale di filiera, nell'ambito dei prodotti di origine animale, non può non partire dalla produzione primaria. Per questo, assume un valore importante un patogeno poco conosciuto, spesso non cercato, ma difficile da debellare, come l'alga *Prototheca*, agente mastitico presente nella filiera del latte

Il laboratorio Agrilab di Centallo (CN) si occupa di analisi microbiologiche e chimiche dal 1978, operando nel settore degli alimenti ad uso umano e zootecnico ed affiancando al servizio analitico l'attività di consulenza rivolta a tutta la filiera produttiva e distributiva agroalimentare. Il team è composto da medici veterinari operanti sia in laboratorio che in campo, microbiologi, chimici, agronomi e tecnologi alimentari, che of-

frono, oltre a questi servizi, anche l'assistenza agli allevatori per quanto riguarda le mastiti ed il miglioramento della qualità del latte.

Negli ultimi anni, si è fortemente affermata un'intensa attività di ricerca, che ha permesso di migliorare l'assistenza offerta agli allevamenti e di approfondire alcune tematiche riguardanti i patogeni che causano mastiti, fra cui spicca l'alga *Prototheca*, isolata per la prima volta nel 1880 da Zopf e Kuhn e classificata ufficialmente da West nel 1916.

Lerche, nel 1952, scoprì che l'alga in questione, nei bovini, era responsabile di alterazioni alla mammella e, qualche anno più tardi, anche la medicina umana segnalò patologie cutanee e gastroenteriche fra le persone, sostenute dal medesimo agente eziologico.

Dopo ben 130 anni, l'argomento *Prototheca* resta ancora un tema molto delicato e la mastite bovina da essa causata serpeggia tra i nostri allevamenti, senza avere ancora un volto ben definito e molto spesso senza che si sappia bene se e come affrontarla.

Definizione dell'agente patogeno

L'infezione, a livello mondiale, può considerarsi ubiquitaria e il Sud America, a causa del suo clima caldo-umido, è sempre stato considerato co-

me zona a maggior rischio, sebbene, negli ultimi anni, siano stati segnalati casi di mastite da *Prototheca* in molti altri Paesi con climi, sulla carta, meno adatti al suo proliferare.

Fino ad oggi, in molte aree d'Italia, ma anche a livello mondiale, molti hanno considerato quest'alga come un agente occasionale, spesso senza neppure tentarne la ricerca, con il risultato che le percentuali di positività oggi disponibili sono da ritenere sottostimate e con un conseguente ridotto livello di attenzione, sia negli allevamenti e sia nella filiera del latte.

Nell'arco degli ultimi tre anni, i casi di mastite da *Prototheca* in Piemonte si sono trasformati da "leggende accademiche" a problemi di primaria importanza per gli allevamenti, proprio in seguito ad una forte campagna di sensibilizzazione, rivolta sia ai colleghi veterinari che agli allevatori. Il risultato è stato quello di stimolare una nuova consapevolezza ed una maggiore attenzione verso quest'alga, che le prove di campo hanno dimostrato essere caratterizzata da un impatto tutt'altro che marginale, rispetto a quello di altri patogeni ben più conosciuti e famosi.

Da una iniziale quasi completa noncuranza per il problema, in un secondo momento si è passati a ricerche specifiche solamente in occasione di mastiti croniche apparentemente irrisolvibili, mentre oggi in Piemonte il controllo è capillare e la ricerca della *Prototheca* viene posta sullo stesso piano di importanza delle mastiti contagiose provocate da *Stafilococchi coagulasi positivi* o da *Streptococcus agalactiae*.

Protothecosi nel mondo

La Protothecosi è definita come un'infezione opportunistica causata dall'alga (*Prototheca zopfii* e *Prototheca wickerhamii*) ai danni di animali, ma anche di persone (P.E. Lagneau *et al.*). L'infezione può manifestarsi principalmente a livello cutaneo, ma sono descritti anche casi di bursiti e gastro-enteriti.

La zoonosi, che fu descritta per la prima volta in Sierra Leone nel 1930 e localizzata a livello cutaneo, è considerata rara anche se Sudman, nel 1974, e successivamente in tempi più recenti Di Persio e Kremery, la ritengono una patologia emergente.

La *P. wickerhamii* è considerata responsabile del 95% delle zoonosi attribuite all'alga, mentre solo il 5% sono causate dalla ben più comune agente di mastiti in Italia: *P. zopfii*. Nel 1992, Matsuda and Matsumoto riportarono 50 casi, mentre 76 sono descritti da Ravisse *et al.* (P.E. Lagneau *et al.*).

Fagundes ed Oliveira (Brasile 2004) espressero preoccupazione per il consumo umano del latte e dei suoi derivati. Santos e Fonseca, nel 2007, dissero che il latte può essere contaminato già a livello della mammella bovina, ma anche a livello di *tank* per contaminazioni ambientali. L'enterite causata da *P. zopfii* fu descritta per la prima volta in Brasile da Costa *et al.* nel 1998, in un uomo che consumò formaggio a latte crudo.

Manifestazione delle lesioni

L'infezione cutanea si presenta sottoforma di papule rosee al punto di penetrazione dell'alga, fino ad arrivare a forme ulcerative. I casi riportati sono riconducibili a *P. wickerhamii* e le persone colpite descritte risultano essere quelle categorie più esposte al rischio di manipolare acqua contaminata (per esempio pescatori di fiume, risicoltori, lavapiatti).

La forma articolare, riconducibile principalmente a bursite olecranica, è legata a contaminazioni post-operatorie. Le gastroenteriti, infine, sono causate da ingestione di *Prototheca*, o accidentale o con alimenti crudi. In tutte e tre le forme vi è una caratteristica comune: tutte le persone affette da tale zoonosi erano persone immunodeficienti o malate di cancro.

Non sono tuttavia descritti casi di trasmissione (Lass-Flörl *et al.*, 2007) da un soggetto all'altro (nei bovini invece sì, attraverso la mungitura delle vacche). La diagnosi è molto affidabile, le terapie invece al momento non offrono molti margini di risoluzione.

Principi di analisi HACCP

L'attività di indagine svolta da Agrilab è stata effettuata su oltre 600 allevamenti, casualmente pervenuti per espletare le normali prassi di analisi e di controllo.

Il latte in esame corrisponde a circa 8.000 quintali prodotti al giorno, per un totale di quasi 30.000 capi, e l'area interessata riguarda tutto il Piemonte, con un occhio di riguardo verso le province di Cuneo e Torino, caratterizzate da un maggior numero di aziende, sebbene sia ragionevole ritenere che l'andamento del problema sia analogo anche in altre zone d'Italia.

Dovendo quindi attuare un'analisi dei pericoli di tipo HACCP sul patogeno *Prototheca*, la prima considerazione è che tale patogeno deve essere cautelativamente considerato come ubiquitario a livello geografico e senza una predisposizione statisticamente dimostrabile verso una tipologia di allevamento anziché un'altra.

Le stalle del gruppo analizzato rappresentano infatti uno spaccato numericamente variegato della realtà zootecnica piemontese, rientrando in esso sia stalle piccole e di più antica conduzione, dove si possono trovare anche solo 15 capi in lattazione a posta fissa, sia impianti recenti e basati sulle tecniche progettuali più moderne, in cui si arriva a oltrepassare le 150 vacche in lattazione, con punte di 400 (vedi Figura).

Le razze colpite influiscono poco sulla quantificazione del rischio, essendo presenti negli allevamenti seguiti bovine frisone, piemontesi, pezzate rosse, brune alpine e *jersey*.

Nel 2011, quando in Agrilab si è deciso di iniziare l'indagine sulla *Prototheca*, il limite di allarme utilizzato per avviare delle azioni correttive era rappresentato dall'evidenza di vacche risultanti refrattarie alle comuni terapie. Solamente in quei casi venivano effettuate prove, risultando l'anamnesi storica erroneamente confortante, a

causa della scarsità dei dati pertinenti all'area geografica.

Successivamente, si è ritenuto di aprire nelle varie stalle delle azioni preventive basate su un approccio frontale del problema, non più considerando i singoli casi refrattari alle terapie, ma partendo direttamente dal latte di massa. Questo approccio si è dimostrato sul campo immediatamente semplice, rapido, economico ed altamente specifico, al punto da permettere l'individuazione di un solo capo positivo nell'intera mandria, senza però tralasciare la necessità di monitorare tutta la stalla e senza trascurare alcuna bovina, come invece poteva capitare con un campionamento random.

La percentuale di vacche positive all'interno dei singoli allevamenti si aggira intorno al 10% circa dei soggetti presenti, dovendo registrare casi di infezioni molto limitate (1 o 2 capi solamente) e viceversa casi più preoccupanti con il 25-30% dei capi positivi.

Diagnosi di laboratorio

Prototheca isolation medium (PIM) è il terreno selettivo utilizzato dall'Agrilab. Le colonie di *Prototheca* crescono dopo 48-72 ore di incubazione a 37 °C ed appaiono di colore bianco-crema con una struttura "a cavolfiore" molto caratteristica, la superficie rugosa ed i margini appena frastagliati.

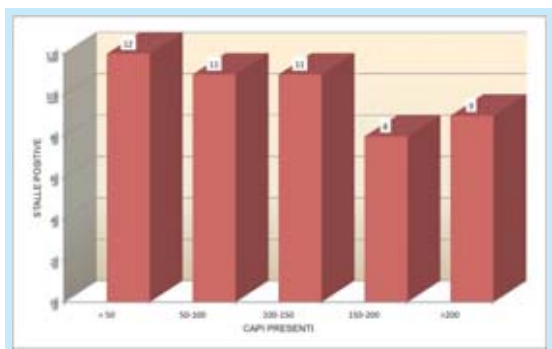
Al microscopio ottico le alghe possono mostrarsi di forma circolare, ovale o a mattonella; la teca è molto pronunciata (da qui proviene il nome) ed all'interno è possibile notare una sorta di granulazione che corrisponde alle endospore, dalle quali origineranno le cellule figlie.

Con una certa frequenza si osservano cellule in replicazione ed altre ormai al termine di questa fase.

Misure di controllo e limiti critici

Il referto delle analisi non desta nell'allevatore particolari sorprese, dal momento in cui le vacche riscontrate positive presentano, nella maggior parte dei casi, caratteristiche piuttosto evidenti.

Figura 1



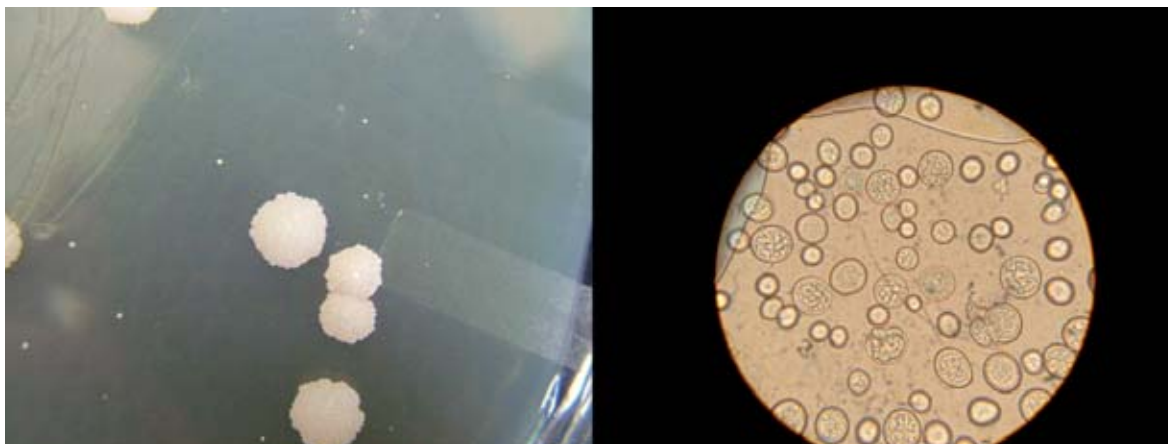


Foto 1 - Colonie di *Prototheca* e le stesse alghe viste al microscopio ottico nelle loro caratteristiche forme circolari ed ovalari (foto Agrilab – L. Midulla).

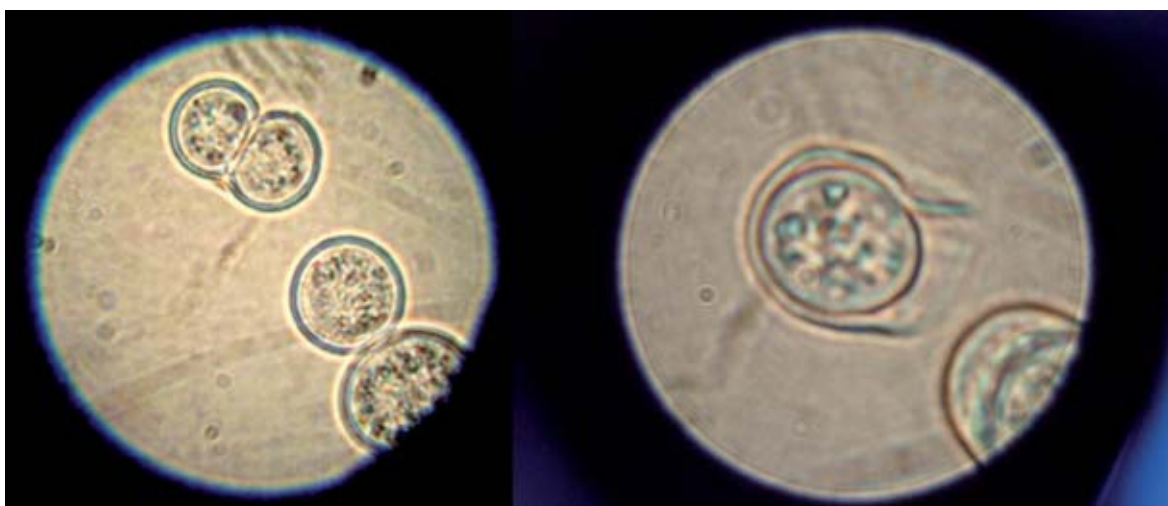


Foto 2 - Cellule di *Prototheca* osservate al microscopio ottico, ordinate in base alle loro fasi di sviluppo. La prima in fase di replicazione, la seconda con la teca già aperta (foto Agrilab – L. Midulla).



Foto 3 - Vacche con mastite cronica da *Prototheca* e quarto/i atrofici (foto Agrilab – L. Midulla).



Foto 4 - Latte normale a sinistra, latte mastitico da *Prototheca* acquoso sulla destra (foto Agrilab – L. Midulla).

Tali sintomi rendono più facilmente comprensibile ed accettabile il risultato del laboratorio, generando una situazione spesso opposta a quanto si riscontra per esempio in caso di positività di *Stafilococco coagulasi* positivo.

Gli elementi comunemente distintivi ed utilizzabili indubbiamente come indicatori di allarme sono rappresentati da un numero di cellule somatiche spesso elevato, mastite in corso, frequentemente recidiva e refrattaria ad una terapia, che spesso si mostra come responsabile addirittura di un peggioramento del quadro clinico in atto, ed infine da uno o più quarti "misteriosamente" atrofizzati.

La metodologia utilizzata da Agrilab parte ormai obbligatoriamente da una suddivisione delle attività, ripartite fra lavoro in laboratorio e lavoro in campo, al fine di approfondire ogni singolo caso riscontrato su piastra e verificarlo subito in sala di mungitura, per comprendere adeguatamente l'andamento della patologia.

Quando il latte risulta alterato si presenta di aspetto chiaro, acquoso e tale caratteristica spesso richiama visivamente l'attenzione dell'allevatore.

A seguito di una visita clinica, invece, può essere constatata, tramite esame palpatorio, fibrosi del tessuto e presenza di noduli sul quarto colpito, che, cronicizzando, subisce l'atrofia e si retrae progressivamente, assumendo l'aspetto definito a "borsa di tabacco", sicuramente altro fattore patognomiconico.

La sezione di Piacenza dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia ha effettuato l'identificazione nel 20% delle aziende positive e nella quasi totalità dei casi l'esito ha identificato *Prototheca zopfii* genotipo II, in perfetta tendenza con il resto d'Italia e del mondo. Un solo caso, invece, ha riguardato la *P. blaschkeae* nel 2014.

Azioni correttive in una stalla positiva per *Prototheca*

Come anticipato in precedenza, lo screening inizia da un campione prelevato dal tank di stoccaggio. La scelta di Agrilab è stata quella di indagare ogni singola azienda con il preciso obiettivo di fare prevenzione, sia per limitare le quantità di

latte da escludere dal conferimento e sia per ridurre i costi delle terapie da mettere in atto.

Infatti, in un'ottica di approccio globale preventivo, spesso una stalla considerata "sana", dal punto di vista della conta cellulare, può celare infezioni latenti che probabilmente non hanno ancora inciso in maniera significativa sul tank, ma che tuttavia sono in grado nel tempo di contagiare gli altri capi presenti.

Per questo motivo, una volta riscontrata la positività nel latte del tank, si procede al controllo delle singole vacche in lattazione e, da questo momento in poi, verranno prelevati campioni su ciascuna manza o vacca che partorirà.

Un occhio di riguardo va posto anche a livello ambientale, ma la priorità resta la gestione del patogeno, da considerarsi alla stregua di qualsiasi altro agente contagioso.

È stata rilevata una buona velocità di risoluzione in tutte le stalle con basse percentuali di infezione (< 5%), dove il controllo nel tank risultava negativo già a seguito dell'eliminazione delle poche vacche infette o al massimo a distanza di pochi mesi.

Nelle stalle, invece, con molte vacche positive, occorre adottare tutti i sistemi possibili per fermare il contagio, oltre ad esigere condizioni igieniche ragionevoli in stalla, ma soprattutto in sala di mungitura.

Ricadute sulla filiera del latte

Il controllo delle mastiti da *Prototheca* in stalla è fondamentale, affinché non ci siano perdite in termini di qualità del latte e di diminuzione delle produzioni, dovute ad un incremento delle cellule somatiche, della carica batterica totale e dell'importante eliminazione ambientale di alghe.

Fattore ovviamente non trascurabile è il risparmio nell'utilizzo di antibiotici, per evitare quanto è già frequentemente capitato in passato e cioè che, non venendo ricercato *Prototheca*, le vacche venissero curate in modo errato ad ogni manifestazione di mastite.

Sono state stimate spese nell'ordine di migliaia di euro/stalla, per terapie completamente inutili, non dettate da una precedente diagnosi precisa e puntuale e caratterizzate dal paradosso secondo cui l'antibiotico andava ad agire sui batteri presenti in

mammella, lasciando così più margine d'azione all'attività dell'alga, a sua volta in grado di peggiorare ulteriormente il quadro mastitico, confermando la tesi già sostenuta da K. L. Anderson.

Sperimentazioni dell'AgriLab in campo alimentare

AgriLab si è anche posto il problema di quali potessero essere le ricadute pratiche per la filiera lattiero-casearia, considerando il fatto che il sistema HACCP è considerato di fatto il metodo di riferimento non solo degli Operatori del Settore Alimentare (OSA) dediti alla produzione dell'alimento, ma anche di tutto il settore primario, di cui le stalle sono un importante elemento.

Sono quindi stati presi in considerazione tre contesti pratici e specifici del settore lattiero-caseario, preparando tre esperimenti di studio rappresentativi delle produzioni a latte pastorizzato, di quelle a latte crudo e della vendita di latte mediante apparati automatici di distribuzione.

Il primo esperimento ha riguardato il latte pastorizzato ed è consistito nella realizzazione di un campione test composto da latte di massa proveniente da una stalla con 60 vacche ed una positività per *Prototheca* pari a 1.200 UFC/ml.

Il campione è stato sottoposto ad un ciclo di pastorizzazione industriale, alla temperatura di 72 °C per 15 secondi, dopo di che è stata ripetuta l'analisi, che ha fornito un riscontro inferiore a 10 UFC/ml.

Si può quindi dire che i comuni processi di pastorizzazione possono essere considerati, a oggi, adeguati alla sanificazione del latte e i prodotti che da essi derivano si possono ritenere sicuri per il consumatore.

La seconda prova ha invece riguardato un latte crudo contaminato con *Prototheca* in misura di 1.800 UFC/ml, che è stato impiegato per caseificare un formaggio test, conservato poi in frigorifero alla temperatura di +4 °C.

Su questo formaggio sono state effettuate analisi in sequenza dopo 1, 3 e 7 giorni dalla caseificazione, trascorsi i quali il formaggio è stato messo a stagionare ad una temperatura di +20 °C per altri 13 giorni.

In questa situazione (lavorazione a latte crudo) i risultati analitici sono stati i seguenti:

- latte (tempo 0): 1.800 UFC/ml
- formaggio (1 g): 6.000 UFC/g
- formaggio (3 gg): 3.500 UFC/g
- formaggio (7 gg): 3.300 (UFC/g)
- formaggio (20 gg): 12.000 (UFC/g)

Come si vede, nei primi 7 giorni, la conservazione in frigorifero contiene la moltiplicazione di *Prototheca*, mentre il periodo successivo a temperatura ambiente favorisce molto la moltiplicazione dell'alga.

È stata anche sperimentata la pastorizzazione sullo stesso latte contaminato ed il risultato è stato confortante in quanto sia il processo termico di 72 °C per 15 secondi, sia quello di 65 °C per 30 minuti hanno fatto sì che *Prototheca* prima presente fosse in seguito assente. L'esperimento si discosta dai risultati riportati, invece, da una prova molto simile tentata nel 1999 in Brasile da Melville *et al.*, nel quale la pastorizzazione mise in risalto un numero significativo di ceppi di alghe termoresistenti; alla luce di tali risultati, gli autori sottolinearono come le mastiti da *Prototheca* potessero rappresentare un rischio per la salute pubblica e per questo motivo era fondamentale applicare una strategia di eradicazione e prevenzione a livello degli allevamenti bovini. Marquez *et al.*, sempre in Brasile, condussero anch'essi delle sperimentazioni su *P. blaschkeae*, pastorizzando il latte alle temperature di 70, 75 e 90 °C e dimostrarono solamente una riduzione del numero di alghe, mentre solo ad ebollizione vi era la scomparsa totale di quest'ultima.

Per quanto riguarda la terza prova, tenendo conto della facilità ad accedere al latte crudo ed alla sua utilizzazione come tal quale ad uso domestico, essa è consistita nella preparazione di uno yogurt, mediante una yogurtiera di quelle che comunemente si trovano nelle case, a partire da 10 ml di latte positivo per *Prototheca* (1.500 UFC/ml), mescolato con 90 ml di latte preventivamente portato ad ebollizione e con 20 ml di *starter* per yogurt, negativo per *Prototheca*.

La miscela al tempo 0 presentava quindi 170 UFC/ml colonie dell'alga ed è stata incubata a 37 °C per 8 ore, con campionamenti a una cadenza di circa 45 minuti l'uno dall'altro.

Le letture in questo caso sono state le seguenti:

- T0: 170 UFC/ml
- T1: 200 UFC/ml
- T3: 30 UFC/ml
- T4: 180 UFC/ml
- T5: 210 UFC/ml
- T6: 170 UFC/ml

Si può notare come il numero di colonie sia costante a partire dalla quota presente nel latte e dopo il processo tecnologico che porta allo yogurt. Conservandolo in frigorifero per 6 giorni, non cambia assolutamente nulla a livello numerico.

Probabilmente la presenza di lattobacilli ed il pH di 4,5 ha fatto sì che la moltiplicazione di *Prototheca* fosse inibita, a differenza invece del formaggio a latte crudo, dove si registrava un aumento delle colonie.

In quest'ultimo capo, il pH era maggiore dello yogurt e probabilmente la mancanza concorrenziale dei lattobacilli ha fatto sì che la proliferazione non fosse ostacolata.

Non vi sono al momento dati più numerosi e approfonditi sul comportamento dell'alga partendo da cariche iniziali più elevate o utilizzando temperature differenti.

Conclusioni

Dalle sperimentazioni effettuate in Agrilab, è emerso come il consumo di latte crudo e dei suoi derivati possa creare un pericolo per il consumatore quando il numero di colonie di *Prototheca* aumentano in caso di mancanza di rispetto della catena del freddo o di caseificazione artigianale. Tuttavia, un alimento come lo yogurt, che potenzialmente, attraverso l'incubazione a 37 °C, poteva rappresentare un pericolo per chi lo producesse a livello domestico, non ha riportato alcuna crescita rispetto alle fasi iniziali. Agrilab si discosta, infine, dai dati riportati dalla bibliografia dove vengono descritte resistenze alla pastorizzazione; le sperimentazioni e la prova a livello industriale, infatti, hanno dimostrato come i ceppi di *P. zopfii* e *P. blaschkeae* fossero termolabili, scongiurando quindi i rischi legati al latte pastorizzato, almeno per quanto riguarda *Prototheca* testata.

La bibliografia scientifica internazionale disponi-

bile sulle manifestazioni cliniche della protothecosi umana dimostrano come al momento sia difficile giudicare se vi sia e quanto grande possa essere l'impatto di questo patogeno animale sull'uomo, almeno per quanto riguarda i prodotti derivanti da latte crudo, essendo considerata in genere abbastanza buona la resistenza dei soggetti adulti e in buono stato di salute, in caso di contatto alimentare.

Negli allevamenti, invece, l'importanza di *Prototheca* è molto rilevante e gli effetti collaterali dannosi per la salute umana derivanti da un uso immotivato di antibiotici o dalla possibile permanenza di residui vietati nel latte e nei formaggi rendono ampiamente ragione della crescente attenzione che la zootecnia sta prestando a quest'alga.

Se consideriamo anche il rilevante danno economico per gli allevamenti colpiti, allora pare opportuno smettere di sottovalutare il problema e, nell'ottica di un'applicazione ampia e utile dell'HACCP nella produzione primaria, inserirlo a pieno diritto fra i pericoli di cui prevenire l'insorgenza.

Bibliografia

- C. Lass-Flörl e A. Mayr (2007), *Human Protothecosis*, Clin. Microbiol. Rev., 20(2):230, doi: 10.1128/CMR.00032-06.
- G. Cammi, M. Merenda, F. Garilli, M. Ricchi, C. Garbarino, N. Arrigoni, G.L. Belletti, *Indagine sulla presenza di Prototheca spp. nel latte crudo erogato tramite distributori automatici: aspetti di Sanità pubblica*, A.I.V.I online, giugno 2011, vol. 1, n. 0.
- N. Salcedo Inoa, S. Cabrera Castillo, *Prototheca wickerhamii*. *Informe de un caso ungueal*, Investigaciones en Micologia, aprile 2014.
- C. Mejia-Otero, S. Singh, L. Arias Urdaneta, C. Sesin, A. Chakrabarti, N. Mae Miller, C. Tuda, *A rare case of Prototheca algaemia in a patient with systemic lupus erythematosus and recent belimumab infusion*, Hindawi Publishing Corporation Case, Reports in Immunology, Vol. 2012, Article ID 754901, 4 pages, doi:10.1155/2012/754901.
- S. Marques *et al.*, *Temperature sensibility of Prototheca blaschkeae strains isolated from bovine mastitic milk*, Protothecosis P.E. Lagneau.