

## **PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2020”** **RELAZIONE FINALE**

**N. identificativo progetto: IZS LT 11/20 RC**

**Progetto presentato da:**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE**

**LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”**

**Area tematica:** Sanità animale

**Titolo del progetto:** Fagoterapia come Alternativa agli Antibiotici (ATA) nel controllo delle malattie infettive animali: sviluppo di procedure operative per specifiche patologie in modelli di allevamento in Italia

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

**Responsabile Scientifico:** Maria Teresa Scicluna

## SINTESI

### ***Titolo***

Fagoterapia come Alternativa agli Antibiotici (ATA) nel controllo delle malattie infettive animali: sviluppo di procedure operative per specifiche patologie in modelli di allevamento in Italia.

Parole chiave: a) fagoterapia; b) batteriofagi; c) protocolli operativi fagoterapia; d) *Paenibacillus larvae*; e) *Escherichia coli*

### **Testo**

I batteriofagi (o fagi) sono parassiti obbligati dei batteri, ospiti all'interno dei quali possono anche completare il proprio ciclo biologico causandone la morte (ciclo litico). Questa caratteristica, unitamente allo spiccato tropismo e selettività nei confronti delle specie microbiologiche, rende i fagi particolarmente interessanti come strumento alternativo sia alla terapia antibiotica, sia all'uso di disinfettanti ad azione chimica. Negli IIZZSS, lo studio della fagoterapia come strumento a sostegno della zootecnia è ancora abbastanza inesplorato e confinato ad ambiti applicativi piuttosto circoscritti. La presente proposta intende quindi fornire un contributo per l'ulteriore sviluppo di questo settore, individuando a tale proposito due infezioni, il cui impatto nel mondo della produzione zootecnica determina pesanti conseguenze in termini ecologici, sanitari ed economici: la Peste Americana (provocata dal batterio sporigeno *Paenibacillus larvae*) in apicoltura e la mastite sostenuta da *Escherichia coli* nell'allevamento delle bovine da latte. Il comune denominatore per queste due patologie è la limitata efficacia dei trattamenti antibiotici oggi a disposizione.

In questa Ricerca Corrente sono stati isolati batteriofagi specifici sia per *Paenibacillus larvae* che per gli *Escherichia coli* mastitogeni e sono stati sviluppati tutti i test di laboratorio necessari per la caratterizzazione dei fagi. Sono stati evidenziati anche tutti i criteri di base necessari per la creazione dei cocktail di batteriofagi. Infine, sono stati effettuati due eventi formativi per spiegare l'uso terapeutico e preventivo in campo dei batteriofagi in particolare nel caso del trattamento delle infezioni da *Paenibacillus larvae*.

### **SUMMARY**

Key words: a) Phagotherapy; b) Bacteriophages; c) Phagotherapy operative protocols; d) *Paenibacillus larvae*; e) *Escherichia coli*

### **Testo in inglese**

Bacteriophages (or phages) are compulsory parasites of bacteria, hosts where they can also complete their biological cycle to the death of the bacteria (lytic cycle). This makes phages particularly interesting as an alternative tool to antibiotic therapy and the use of chemical-acting disinfectants, and a plus is their marked tropism and selectivity toward microbiological species. In the IIZZSS, the study of phage therapy as a tool to support animal husbandry is still quite unexplored and confined to limited areas of application. Therefore, this proposal intends to bring a contribution to the further development of this field. More in detail it aims to identify phages against two infections which impact in the world of livestock production determines heavy consequences in ecological, sanitary and economic terms: the American Plague (caused by the sporigenous bacterium *Paenibacillus larvae*) in beekeeping and mastitis provoked by *Escherichia coli* in dairy cattle breeding. The common denominator for these two diseases is the limited efficacy of antibiotic treatments available today.

In this Current Research, bacteriophages specific for *Paenibacillus larvae* and for mastitogenic *Escherichia coli* were isolated, and all laboratory tests necessary for phage characterization were

developed. All the basic criteria necessary for the creation of bacteriophage cocktails were also highlighted. Finally, two training events were conducted to explain the therapeutic and preventive use in the field of bacteriophages particularly in the case of treating *Paenibacillus larvae* infections.

## INTRODUZIONE

In Italia dal 2017 è in vigore un Piano di Controllo per il contrasto alla diffusione del fenomeno dell'antibiotico resistenza (Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza – PNCAR - 2017-2020), incentrato sull'approccio “One Health” per conciliare ed integrare le esigenze di salute dell'uomo, degli animali e dell'ambiente. Effettivamente, i livelli di resistenza agli antibiotici in Italia, tra i più alti d'Europa, richiedono l'adozione di politiche coordinate per rafforzare la sorveglianza epidemiologica e promuovere un uso più consapevole degli antibiotici sul territorio. In questo senso, e tenuto conto che oltre il 50% del consumo degli antibiotici dipende, a livello globale, dal settore zootecnico, il Piano prevede, anche per gli IIZZSS, un importante ruolo relativamente allo studio della diffusione dei marker genetici di resistenza microbica, così come per l'individuazione e la sperimentazione di soluzioni alternative all'uso degli antibiotici. Riguardo a quest'ultimo punto, già da tempo la ricerca ha avviato degli studi legati all'impiego di anticorpi, di probiotici, di peptidi antimicrobici e, in determinati e specifici casi, del trapianto del microbioma. Una soluzione che probabilmente più di altre riscuote un particolare interesse è tuttavia collegata all'uso terapeutico e possibilmente preventivo di un particolare gruppo di virus, i batteriofagi, per un approccio conosciuto come “fagoterapia”.

Quindi, il principale obiettivo a lungo termine ottenuto nella ricerca corrente è stato quello di rilevare ed isolare batteriofagi in grado di lisare in vitro i ceppi di *Paenibacillus larvae* collezionati presso il laboratorio di Apicoltura, produzione e patologie delle api, Universidad Nacional de La Plata (Argentina ed i ceppi mastitogeni di *Escherichia coli* collezionati presso la UOS Igiene della Produzione del Latte. Per ottenere la collezione dei batteriofagi specifici per *Paenibacillus larvae* e gli *Escherichia coli* mastitogeni è stato necessario procedere con diversi passaggi sperimentali:

- a) individuare e raccogliere le matrici più appropriate per l'isolamento dei fagi;
- b) sviluppare i protocolli per l'isolamento dei fagi;
- c) sviluppo di protocolli per l'amplificazione dei fagi ed il loro mantenimento;
- d) sviluppare i protocolli per il controllo dell'attività litica dei fagi sui batteri target;
- e) sviluppare i protocolli per la produzione di cocktail di batteriofagi specifici per il *Paenibacillus larvae* ed *Escherichia coli*.

Sono stati studiati i criteri fondamentali per la produzione di cocktail di batteriofagi e, nel caso dei fagi specifici per *Paenibacillus larvae*, sono stati effettuati tutti i test necessari per la creazione di un cocktail costituito da tre batteriofagi (Mosaico, Liscio, Rugoso) isolati dagli addomi delle api.

Questo cocktail può essere in futuro arricchito dai batteriofagi specifici per *Paenibacillus larvae* ricevuti dal CIDEFI- Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. Inoltre, sono stati effettuati due incontri scientifici per informare le associazioni degli apicoltori sul potenziale terapeutico e sulla profilassi che si ottiene nel trattamento in campo delle infezioni da *Penibacillus larvae* mediante i batteriofagi specifici per tale batterio. In dettaglio gli incontri scientifici sono stati: a) evento Formattivo “Aggiornamenti in Apicoltura”, Lezione “I batteriofagi nella lotta alla Peste Americana”, 10 febbraio 2023 organizzato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana “M. Aleandri” con il patrocinio ASL Viterbo, SVETAP (Società Scientifica per l'Apicoltura), APITUSCIA, Regione Lazio, presso la Rocca dei Papi, Montefiascone (VT); b) evento Formattivo “Aggiornamenti in apicoltura”,