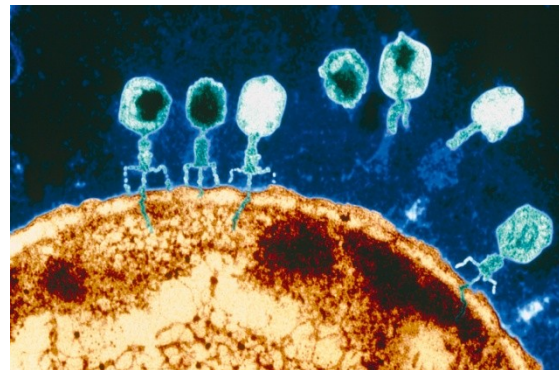




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Batteriofagi attivi nei confronti di *Yersinia ruckeri*



Selene Marozzi
Istituto Zooprofilattico
del Lazio e della Toscana, *M.
Aleandri*.
DO Controllo Alimenti,
selene.marozzi@izslt.it



I batteriofagi



*La grande
purificazione
nelle acque
del fiume
Gange*

- Ernest Hankin nel 1896: le acque del fiume Gange e dello Jumna (India), hanno un potere antibatterico nei confronti di *Vibrio cholerae*;
- L'ingestione delle acque preveniva le epidemie di colera.
- Egli ipotizzò che un **entità piccola in grado di attraversare i filtri di porcellana e stabile al calore, fosse, responsabile di questo fenomeno** (Sulakvelidze, Alavidze, & Morris, 2001).



Aprile 1915: l'Italia entra in guerra (I° conflitto mondiale)



- Nel 1915 Frederick Twort e Felix D'Herelle, descrivono entità*** in grado di **distruggere cellule batteriche**. Felix D'Herelle chiama queste entità

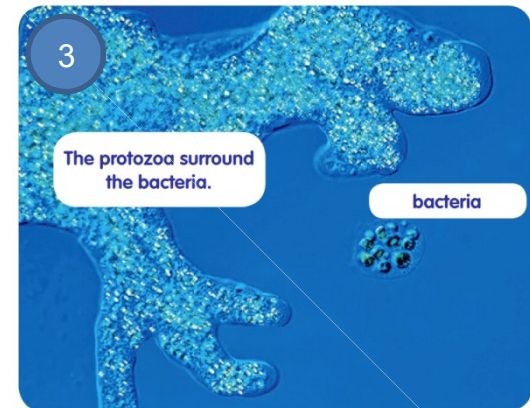
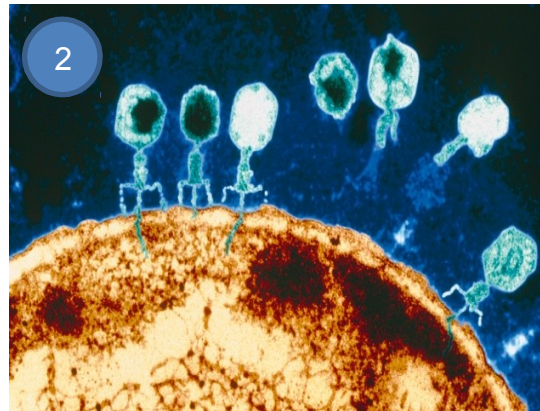
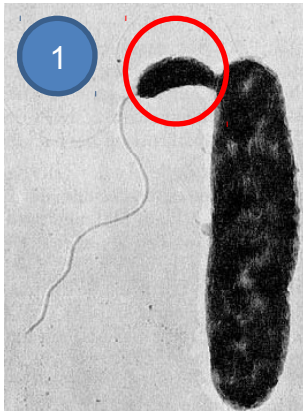
Batteriofagi

***1931



I killers di batteri:

1. Batteri (Bdellovibrio, Vampirococcus, Myxococcus...)
2. Virus (Batteriofagi)
3. protisti eucarioti (protozoi)





- I batteriofagi sono **VIRUS**
- Sono predatori di batteri (eubatteri) ed Archeobatteri
- Rappresentano il gruppo più numeroso di virus



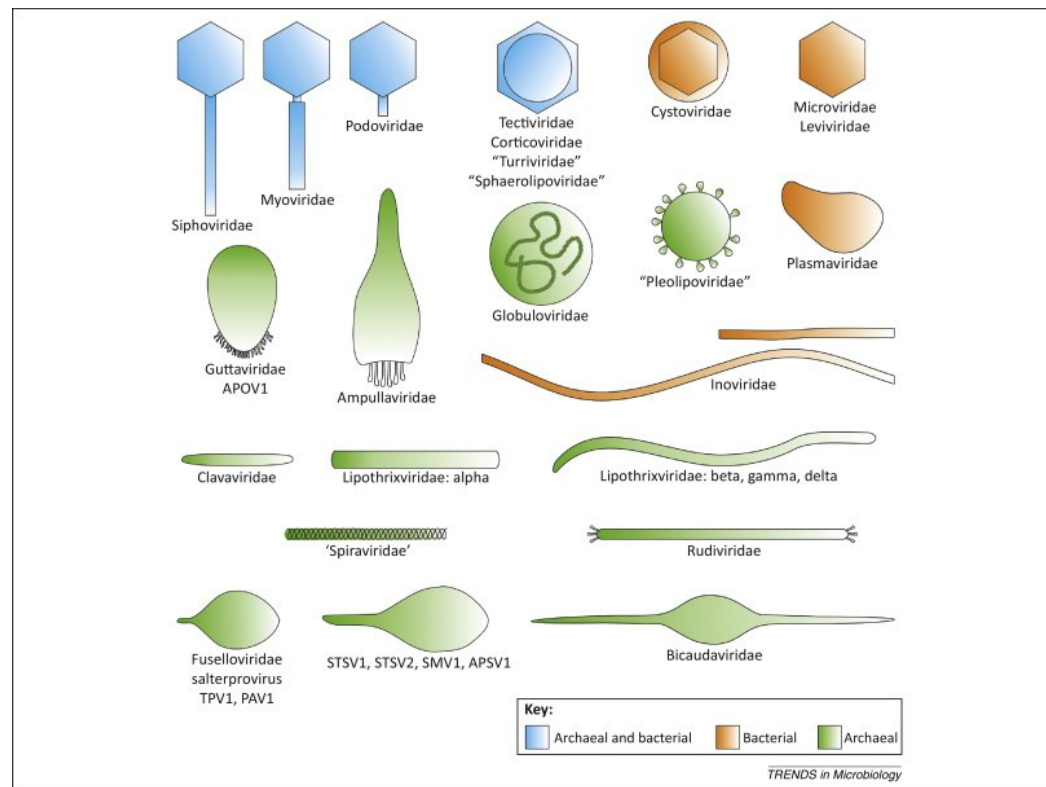
Spolveriamo la memoria
(se è necessario....):

- ✓ i virus non sono cellule
- ✓ non eseguono funzioni metaboliche e non sono in grado di riprodursi autonomamente
- ✓ sono parassiti intracellulari obbligati
- ✓ Ospiti: possono essere animali, vegetali, funghi, protisti o **procarioti**
- ✓ All'esterno delle cellule ospiti, i virus si presentano sotto forma di particelle singole, definite virioni
- ✓ Un virione è formato da un acido nucleico (DNA o RNA) avvolto da un capsido, un rivestimento costituito da una o più proteine. A volte ha un envelope (rivestimento esterno di natura lipidica a struttura bilaminare)



Come sono?

Virus a DNA (singolo o doppio filamento) o RNA (singolo o doppio filamento) incapsulati in un “involucro” proteico (capside). Si riconoscono 14 famiglie ufficiali e 5 potenziali. La maggior parte (96%) dei batteriofagi è provvisto di coda; altri tipi sono “cubici”, filamentosi, o pleomorfi (meno del 4%).



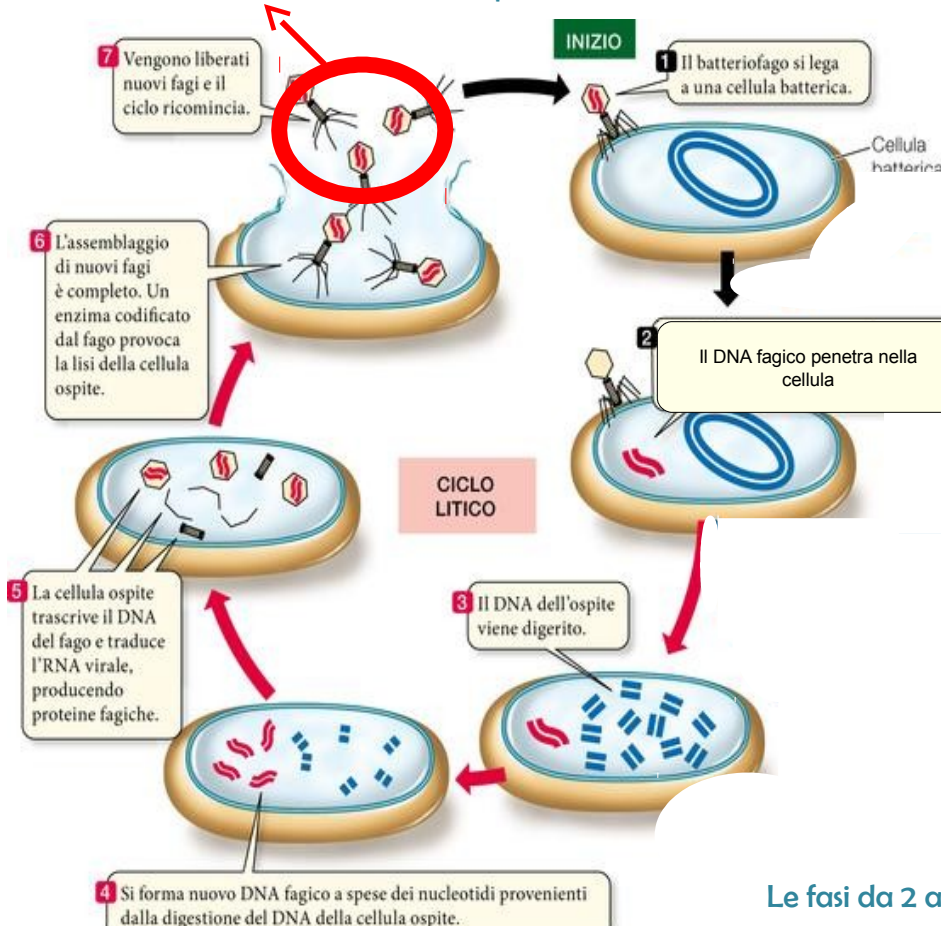
[illegible]

Il DNA fagico **di** integra nel cromosoma batterico trasformandosi in profago non infettivo



Il ciclo litico (fago litico o virulento):

Burst size: numero di virioni per cellula infettata



1) **Assorbimento:** il fago riconosce recettori specifici sul batterio. Solitamente I recettori sono:

- a) del primo tipo ovvero recettori somatici
- b) del secondo tipo ovvero appendici batteriche (.... *tipizzazione batterica con fagi*....)

2) **Penetrazione** del DNA o RNA virale (il capsido rimane sempre fuori)

3) viene bloccata la sintesi di macromolecole da parte del procarote; alcuni fagi determinano la **FRAMMENTAZIONE** del DNA batterico grazie alla presenza di endonucleasi (materia prima per virus)

4) **Replicazione del materiale genetico**

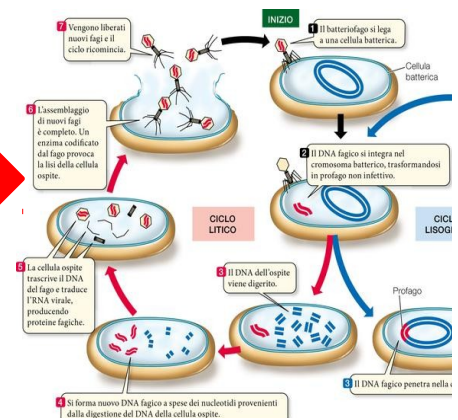
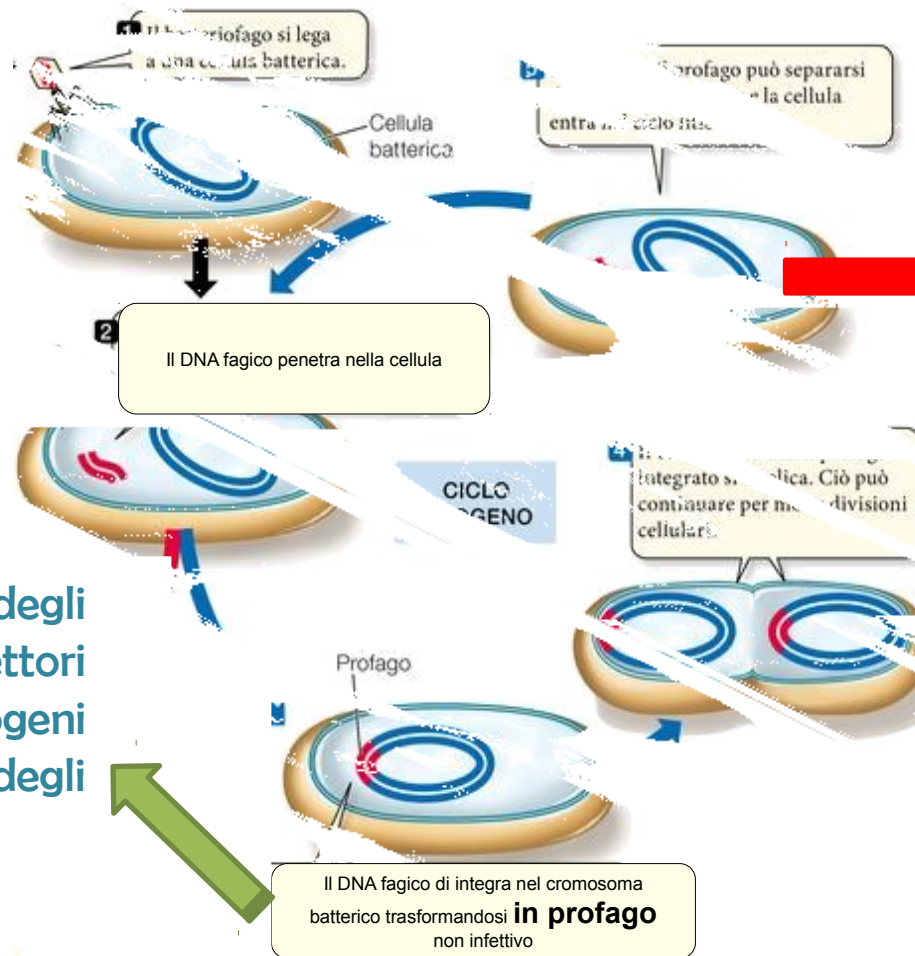
5-6-7) **assemblaggio** (trasduzione generalizzata***), **maturazione** (complesso fenomeno di cambiamento di conformazione delle molecole proteiche a cascata) e **liberazione** (alcuni fagi producono lisozima o endolisina)

*****trasduzione generalizzata : alcuni frammenti di DNA del batterio possono finire nel capsido delle nuove particelle fagiche in assemblamento.

Le fasi da 2 a 5 vengono chiamate dell'eclissi virale



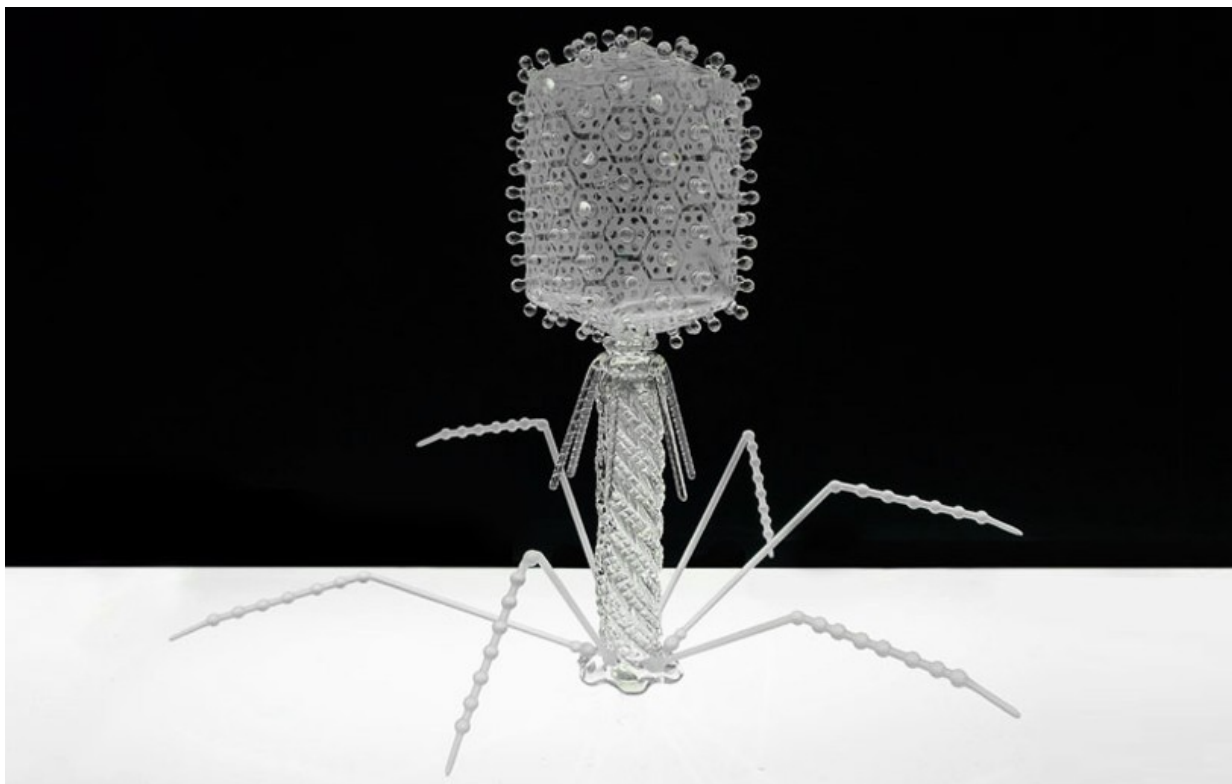
Il ciclo lisogeno (fago temperato):



I profagi sono degli importanti vettori di fattori patogeni (es STX 1 e 2 degli STEC)

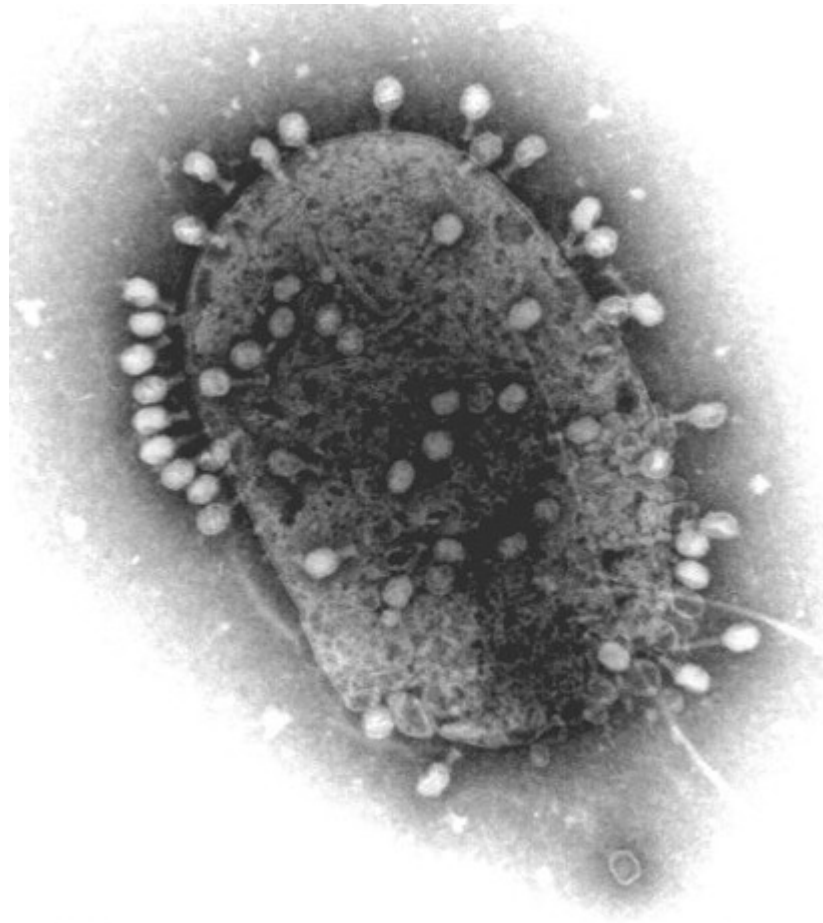


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



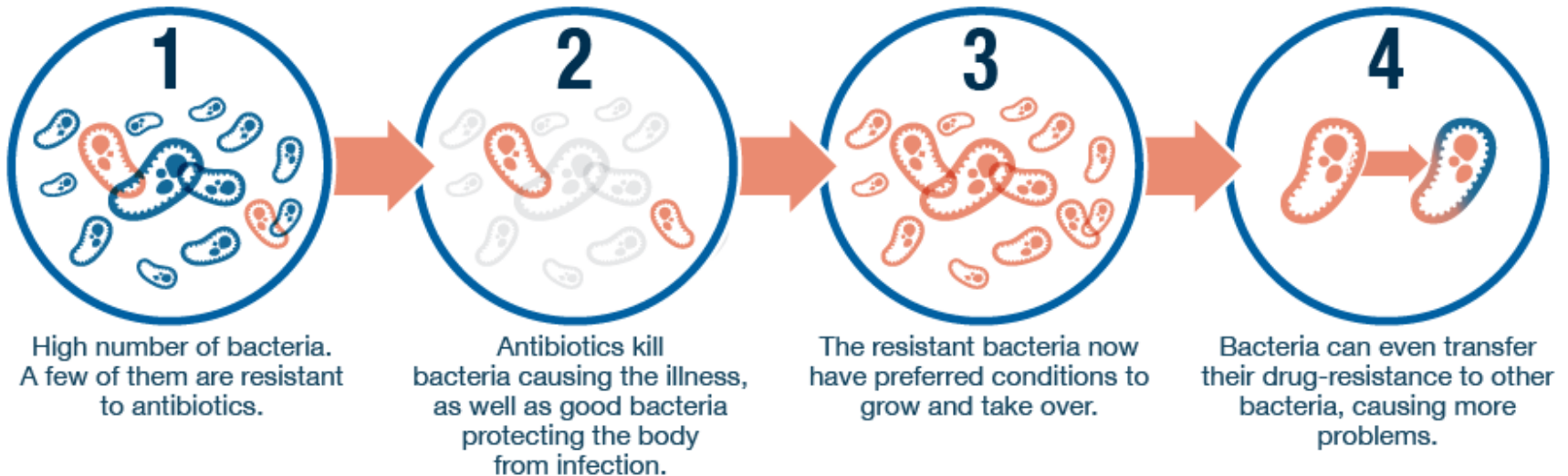
Copyright: CIMC



.....Considerazioni.....

L'antibioticoresistenza

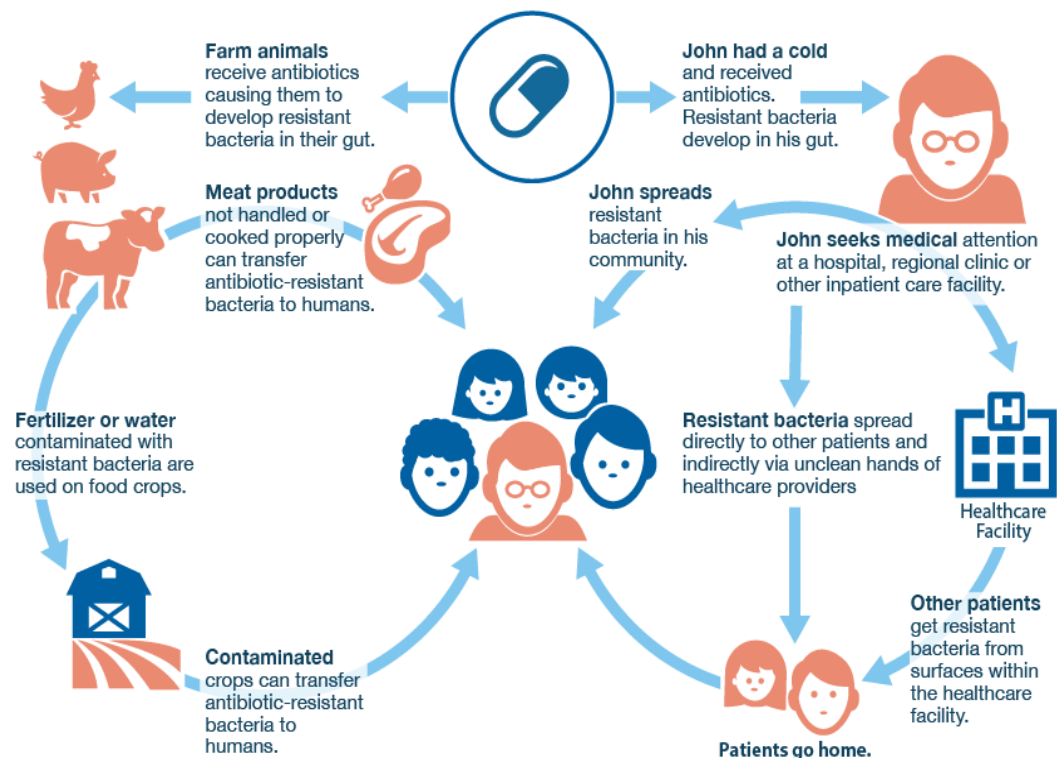
How does antibiotic resistance occur?





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

How can antibiotic resistance spread?



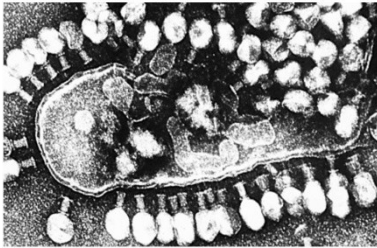
Simply using antibiotics creates resistance. These drugs should only be used to treat bacterial infections

EPIDEMIA DI ANTIBIOTICORESISTENZA?!

Ad Aprile 2015 ha avuto grande scalpore mediatico il rapporto del Cabinet Office del governo britannico contenuto nell'ultimo National Risk Register of Civil Emergencies secondo il quale l'antibioticoresistenza potrebbe colpire, da qui a 20 anni, **200mila cittadini** del Regno Unito **causandone la morte di almeno 80mila**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



I batteriofagi come agenti antibatterici

fagi per scopi terapeutici a partire dai primi anni dalla loro scoperta.

primi test in campo veterinario: D'Herelle nel 1919, utilizzò fagi nella terapia del **tifo aviare** e della **disenteria da Shigella, dei conigli**.

In seguito, avendo sperimentato dei successi terapeutici consistenti , utilizzo i fagi nella terapia delle **disenterie bacillari umane**

D'Herelle per dimostrare l'innocuità dei virus isolati li utilizzò, anche, sui propri familiari e colleghi .

D'Herelle ideò la formulazione e commercializzò cinque preparati attivi nei confronti di altrettante malattie batteriche.(Bacté-coli-phage, Bacté-rhino-phage, Bacté-intesti-phage, Bacté-pyo-phage, and Bacté-staphy-phage) commercializzati da quella che diventerà in seguito la L'Oréal



Negli Stati Uniti, alcuni anni dopo, vennero commercializzate delle formulazioni contenenti fagi. Tuttavia, alcuni **effetti controversi** ed il **diffondersi degli antibiotici** causarono il progressivo abbandono di questa terapia in occidente.



➤ Nella preparazione dei farmaci contenenti fagi per eliminare i batteri necessari alla loro moltiplicazione si utilizzava la filtrazione per cui permanevano nel filtrato **eso ed endo tossine**

➤ Per la conservazione si utilizzavano i **composti del mercurio inorganico** (tossicità)

➤ Nel 1929 A. Fleming scopre la **pennicillina** (premio Nobel per la Medicina nel 1945), il primo antibiotico (i batteriofagi vennero scoperti solo 14 anni prima, nel 1915.....)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Nei Paesi dell'est Europa e dell' ex Unione Sovietica, al contrario, invece, hanno continuato ad essere utilizzati in campo medico

D'Herelle è considerato uno dei padri fondatori dell'Istituto Eliava di Tbilisi in Georgia (<http://www.eliava-institute.org/>) che si occupa, tra l'altro, di Terapia fagica





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

➤ Il presente



A little bit of viral spray
keeps the bacteria away



U.S. Food and Drug Administration
Protecting and Promoting *Your* Health

**FDA Approval of Listeria-specific
Bacteriophage Preparation on
Ready-to-Eat (RTE) Meat and Poultry
Products**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



The EFSA Journal (2009) 1076, 1-26



SCIENTIFIC OPINION

The use and mode of action of bacteriophages in food production¹

Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards

(Question No EFSA-Q-2008-400)

Endorsed by the BIOHAZ Panel for public consultation 22 January 2009

Public consultation 30 January – 6 March 2009²

Adopted on 22 April 2009



EFSA Journal 2012;10(3):2615

“Listex™ P100 (...) should not present human toxicological problems but..... the data were not adequate ...” In sostanza sono necessari maggiori studi per l'approvazione



SCIENTIFIC OPINION

Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for the removal of *Listeria monocytogenes* surface contamination of raw fish¹

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)^{2,3}

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



PHAGE THERAPY CENTER™

Bacteriophage Therapy for Patients Across the Globe

About Our Company

Phage Therapy

Clinics

Become a Patient

News

Links

Patient

Physicians



**YES, WE TREAT
MRSA**

and numerous other difficult
antibiotic-resistant pathogens

Phage Therapy Center provides an effective treatment solution for patients who have bacterial infections that are difficult / non-healing, chronic, drug-resistant or do not otherwise respond to conventional antibiotic therapies.

Phage therapy is used broadly in Georgia, which has been the global center of phage expertise for over 80 years. We are the longest operating and most experienced clinic of its kind in Georgia, now entering our tenth year of operation with a success rate exceeding 95%.

Phage Therapy Center and our affiliates have developed novel technologies, methodologies and protocols for treatment of patients with very long term chronic infections. We specialize in treatment of chronic UTI, chronic prostatitis, chronic sinusitis and non-healing wounds. We apply a holistic, integrative approach to treatment of chronic patients. Not only is the infection cleared but also the general health is significantly improved.

We welcome all new patients with acne, bronchitis, bronchiectasis, cystic fibrosis, lung infections, colitis, skin infections, intestinal infections, dysbiosis -- most types of bacterial infections. Please feel free to send us your questions -- our staff are always ready to respond. We look forward to receiving you as our patient!

CLINICS

Phage Therapy Center, Tbilisi Georgia is now accepting patients with chronic, difficult, antibiotic-resistant bacterial infections that do not respond to conventional antibiotic therapies.

Click "Become a Patient" to register as our patient and begin your treatment program.

[MORE >](#)

PHAGE THERAPY CENTER, LTD ~ 4 D. ARAKISHVILI LANE ~ 0179 TBILISI, REPUBLIC OF GEORGIA

Tel: (995 32) 291-6757

MAILBOX@PHAGETHERAPYCENTER.COM

Copyright © Phage Therapy Center, 2000-2013 All Rights Reserved.

[Privacy Policy](#) | [Legal Notices](#)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

➤ Le nuove applicazioni

Bacteriophage

Volume 5, Issue 3, 2015



Review-Invited

**Antimicrobial bacteriophage-derived proteins
and therapeutic applications**

DOI: 10.1080/21597081.2015.1062590

Dwayne R. Roach^{a*} & David M. Donovan^b
e1062590

[Publishing models and article dates explained](#)

Received: 28 Apr 2015

Accepted: 11 Jun 2015

Accepted author version posted online: 23 Jun 2015

MINIREVIEW

Bacteriophage Endolysins as a Novel Class of Antibacterial Agents

JAN BORYSOWSKI,^{*,1} BEATA WEBER-DĄBROWSKA,[†] AND ANDRZEJ GÓRSKI^{*,†}

**Department of Clinical Immunology, Institute of Transplantology, The Medical University of Warsaw,
Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland; and [†]Laboratory of Bacteriophages, Institute of
Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Rudolfa Weigla 12, 53-114
Wrocław, Poland*



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

.....Considerazioni.....

➤ **Le applicazioni in acquacoltura: Il problema degli antimicrobici nel settore ittico**

CONSULTATIONS AND WORKSHOPS

Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance

Report of a Joint FAO/OIE/WHO
Expert Consultation on Antimicrobial Use in
Aquaculture and Antimicrobial Resistance

Seoul, Republic of Korea, 13–16 June 2006



World Health
Organization

Issued by the World Health Organization in collaboration
with the Food and Agriculture Organization of the United Nations
and the World Organisation for Animal Health

DEPARTMENT OF FOOD SAFETY, ZOOSES AND FOODBORNE DISEASES
WORLD HEALTH ORGANIZATION
GENEVA, SWITZERLAND

La resistenza antimicrobica derivante dall'uso di antimicrobici nel settore dell'acquacoltura presenta un rischio per la salute pubblica a causa di uno:

- Sviluppo di resistenza acquisita nei batteri in ambienti acquatici che possono infettare gli esseri umani (diffusione diretta)
- Sviluppo di resistenza acquisita in batteri presenti nell'ambiente acquatico. Questi microrganismi possono agire come serbatoio di geni di resistenza ed essere diffusi e trasferiti ad agenti patogeni umani (diffusione indiretta)



L'impiego di batteriofagi nella cura delle patologie batteriche dei pesci è stato oggetto di una nuova attenzione da parte della comunità scientifica (Park and Nakai, 2003; Nakai et al., 2002; Nakai et al., 1999).

- Phage therapy of **Lactococcus garvieae** infection (yellowtail)
- Phage therapy of **Pseudomonas plecoglossicida** infection (Plecoglossus altivelis)



➤ LA RICERCA DI BATTERIOFAGI ATTIVI NEI CONFRONTI DI *YERSINIA RUCKERI*

Un lavoro di ricerca iniziato nel 2014 (SIPI 2014, EAFP 2015).....

IZS Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

ISOLAMENTO DI BATTERIOFAGI ATTIVI NEI CONFRONTI DI *YERSINIA RUCKERI*

S. Marozzi, S. Colonna, F. Di Giambardino, F. Biondi, S. Amici, A. N. Sili, G. Migliore, S. Stiblini, M. Zini, G. Conati, T. Boech

INTRODUZIONE

Soggetti tra il 1992 ed il 1993 da presenza di *Yersinia ruckeri* e della *Yersinia* e descritti come enterici in grado di colonizzare cellule batteriche. I batteri sono stati isolati dai tessuti e dagli escrementi di trote e carpi (Carpas) (1992). La recente comparsa di resistenza multi-farmacica in diversi microrganismi patogeni in medicina umana ha portato ad un rinnovato interesse per la terapia. Inoltre, l'impiego di batteriologici nella cura delle patologie batteriche dei pesci è stato oggetto di una nuova attenzione da parte della comunità scientifica (Fiori et al. 2000; Ianni et al. 2002; Ianni et al. 2003).

MATERIALI, METODI E RISULTATI

Cinque differenti campioni di acqua di allevamento sono stati prelevati in un punto di cattura ed in 4 di scarico appartenenti rispettivamente a 3 vivai in cui erano allevate delle trote (*Salmo trutta*) e ad uno in cui erano coltivate delle carpi (*Cyprinus carpio*). Il carico dell'acqua era il massimo per le 4 vivai. I campioni sono stati sottoposti all'analisi batteriologica, per mezzo di un metodo descritto in (Fiori et al. 2000). I campioni sono stati sottoposti a colture su agar (100% CaCl₂) e su agar (100% CaCl₂) con l'aggiunta di un antibiotico (ampicillina) con lo scopo di selezionare i batteri resistenti all'ampicillina. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con il metodo descritto in (Fiori et al. 2000). I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con il metodo descritto in (Fiori et al. 2000).

SCREENING

Le placche sono state purificate mediante 3 successive diluizioni in acqua sterile di 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. Le placche sono state purificate mediante 3 successive diluizioni in acqua sterile di 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. Le placche sono state purificate mediante 3 successive diluizioni in acqua sterile di 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³.

TITOLAZIONE

Le placche sono state purificate mediante 3 successive diluizioni in acqua sterile di 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. Le placche sono state purificate mediante 3 successive diluizioni in acqua sterile di 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³.

MICROSCOPIA ELETTRONICA

Le placche sono state purificate mediante 3 successive diluizioni in acqua sterile di 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. Le placche sono state purificate mediante 3 successive diluizioni in acqua sterile di 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³.

CONSIDERAZIONI

I batteriologici isolati sono appartenuti tutti allo stesso morfotipo, ovvero quelli descritti di circa 100 nm, a bacilli e provvisti di una breve coda. Le caratteristiche osservate permettono di attribuire i fagi isolati alla famiglia Podoviridae. Un prelievo su acqua effettuata ad Olivenza ed Aniene nel 1992 aveva isolato 4 differenti batteriologici attivi nei confronti di *Y. ruckeri* tra i quali alcuni morfologicamente simili a quelli identificati nel presente lavoro. Successive indagini sulla stabilità e sulla spettro di azione dei fagi isolati in relazione ai differenti ceppi di *Y. ruckeri* ed alla specificità sono necessarie per definire e valutare il possibile impiego in caso di efficacia in vivo.

IZS Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES ACTIVE AGAINST *YERSINIA RUCKERI*

S. Marozzi, F. Di Giambardino, G. Migliore, S. Colonna, S. Stiblini, G. Conati, T. Boech

Bacteriophages are viruses of bacteria and archaea. The infection by a lytic phage results in the lysis of the bacterial cell and release of a new phage progeny. This work was carried out in order to isolate bacteriophages active against *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease (ERM).

METHODS

Five samples of water were taken from three raceways in which trout (*Salmo trutta*) and carp (*Cyprinus carpio*) were being cultured. Samples were filtered with 0.22 µm filter and then inoculated in double-strength Luria Bertani Broth containing 2mM CaCl₂ with an overnight culture of *Yersinia ruckeri* strain isolated from fish (*Cyprinus carpio*). Subsequently, the supernatant of each sample was placed into two test tubes. One of this was added with chloroform (1:100) and stored at 4°C while the second was used to test the phage activity against *Yersinia ruckeri* with two spot test methods using Luria Bertani agar, Luria Bertani soft agar and Luria Bertani Broth containing 10mM CaCl₂. Two samples were positive and therefore the supernatants with chloroform (1:100) were tested to determine the infectious phage particles using the Double Agar Overlay Plaque Assay. Plates were incubated at 30°C for 24 h. Subsequently 4 phages were purified by removing a well isolated plaque and plating it using the Double Agar Overlay Plaque Assay. In order to ensure a single phage-strain population the purification procedure were repeated for three times. The phages were then characterized using negative staining transmission electron microscopy (EM). Finally their effectiveness against 5 other strains of *Yersinia ruckeri* and 5 strains of *Yersinia enterocolitica* was tested.

RESULTS AND CONCLUSIONS

Bacteriophages active against *Yersinia ruckeri* were detected in two of the five tested samples (40%). The numbers of the infectious phage particles were respectively 2.4x10⁶ UFP / ml and 2.0x10⁷ UFP / ml. The 4 purified plaque showed the same morphology and were characterized by EM as tailed phages belonging to the order Caudovirales, family Podoviridae. At least all the phages were effective against 2 strains of *Yersinia enterocolitica* and 3 strains of *Yersinia ruckeri*. Other tests will be performed to evaluate the host range and stability of phages.

17th International conference on Diseases of Fish and Shellfish, Las Palmas September 7-11, 2011



UNA BREVE PARENTESI:

APERTA PARENTESI.....

(*Yersinia ruckeri*???)

il genere *Yersinia* comprende microrganismi Gram negativi, di forma bastoncellare, anaerobi facoltativi inclusi nella famiglia Enterobacteriaceae.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Yersinia ruckeri è **l'agente eziologico:** della Bocca Rossa, una importante malattia a carattere setticemico di molte specie di salmonidi tra cui la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)

Gli ospiti:



SALMONIDI: trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)

ma anche altre specie animali: topo muschiato (*Ondatra zibethicus*), gheppio (*Falco* spp.), gabbiani (*Laridae*), tartarughe (*Cheloniidae*) ed esseri umani



Segni clinici

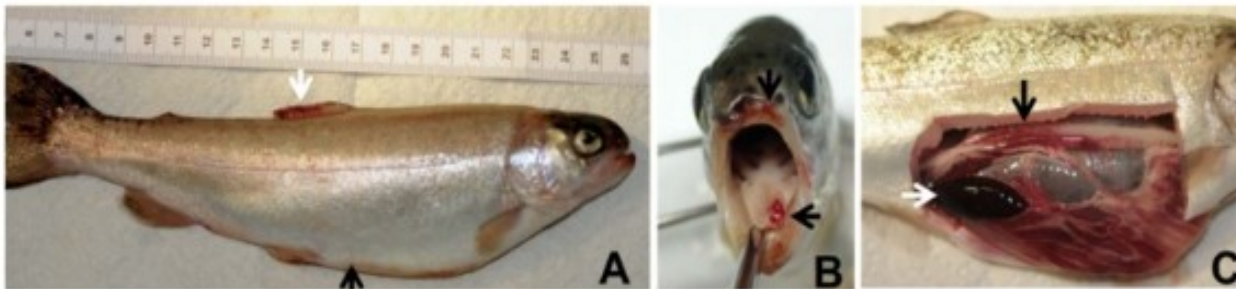


Figure 1 Rainbow trout showing clinical signs of enteric redmouth disease. **A:** darkening of the skin, enlarged abdominal valley (black arrow), and hemorrhages in the dorsal fin (white arrow). **B:** hemorrhages in and around the mouth (arrows). **C:** enlarged and black spleen (white arrow), and reddened intestine (black arrow).

Kumar et al. Veterinary Research (2015) 46:103

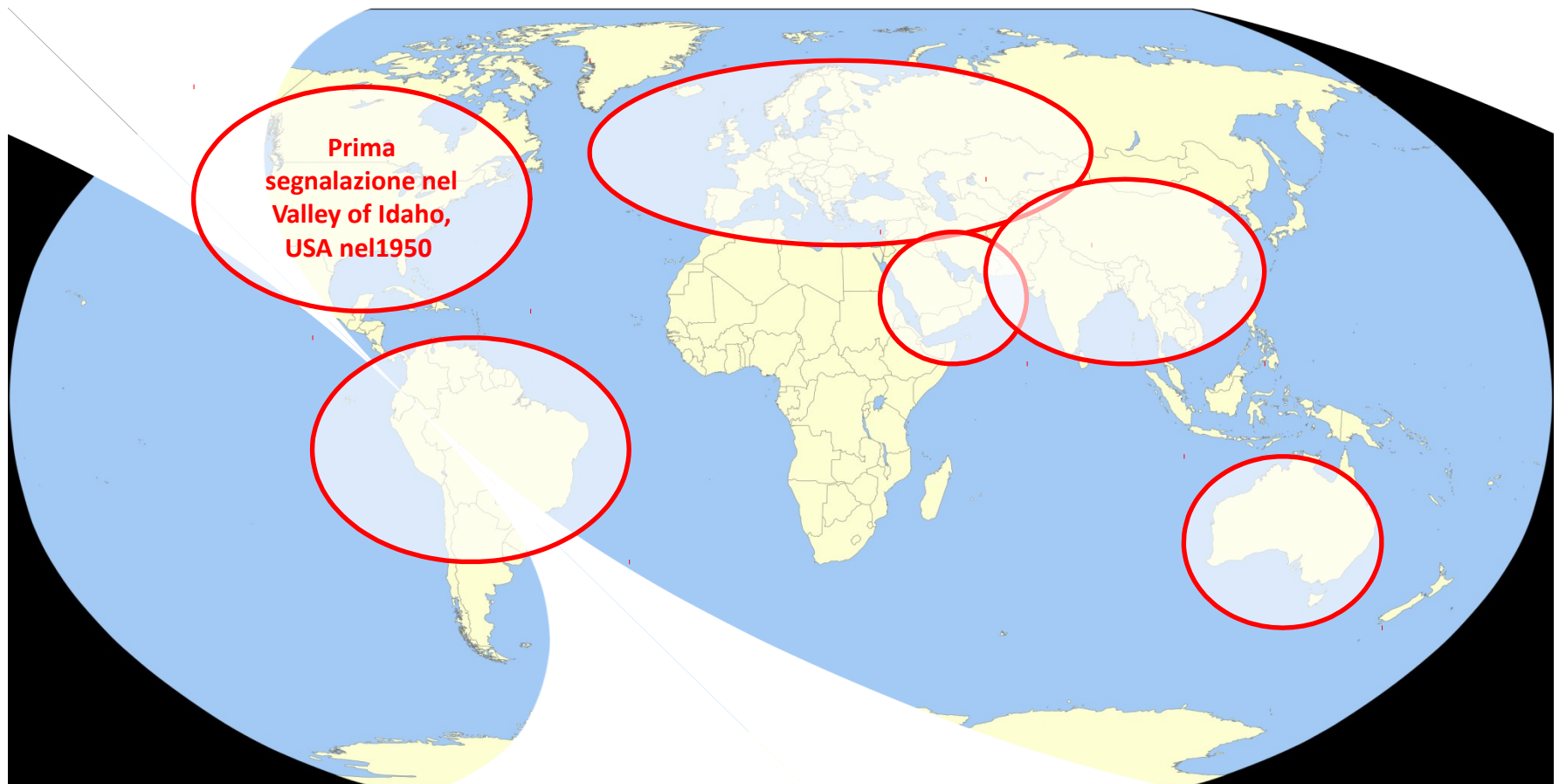




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Distribuzione

USA, Canada, Europa, America del sud, Medio oriente, Cina, India ed Australia





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

- **Terapia:** amoxicillina, acido ossolinico, ossitetraciclina, sulfadiazina in combinazione con trimetoprim e più recentemente, florfenicolo
- **Profilassi:** vaccinazione monovalente con cellule inattivate di *Y. ruckeri* sierotipo O1 biotipo 1 per via orale, immersione, iniezione)

CHIUSA PARENTESI.....





TORNANDO AL PROGETTO...

SIAMO NEL 2013 ED INIZIANO I PRIMI TEST (...)

➤ NEL 2014: 5 campioni di acqua di allevamento sono stati prelevati in un punto di carico ed in 4 di scarico appartenenti rispettivamente a 3 vasche in cui erano detenute delle trote (*Salmo trutta*) e ad una in cui erano custodite delle carpe (*Cyprinus carpio*). Il carico dell'acqua era il medesimo per le 4 vasche

➤ I campioni sono stati centrifugati a $10,000 \times g$ per 10 min ed il supernatante conservato a $4^\circ C$ con cloroformio (rapporto 1:100)

La scelta

Messa a punto
di un
protocollo

Quali
batteri???

Quali
terreni???

Quali
metodiche
???



Quali batteri???

TEST SUI CAMPIONI DI ACQUA UTILIZZANDO MICRORGANISMI
PATOGENI ISOALTI IN LOCO ED ALTRI CRIOCONSERVATI NELLA
CEPPOTECA DEL LABORATORIO DI ITTIOPATOLOGIA OVVERO:

- *AEROMONAS SOBRIA* (ISOLATO DA CAVEDANO NEL 2011)
- *AEROMONAS VERONII* (ISOLATO DA CARPA NEL 2013...IN LOCO)
- *YERSINIA RUCKERII* (ISOLATO DA CARPA NEL 2009)



Quali terreni???

- IL **GRUPPO 1** O GRUPPO “LURIA BERTANI” (LURIA BERTANI, LURIA BERTANI BROTH, LURIA BERTANI SOFT AGAR, LURIA BERTANI BRODO DOPPIA CONCENTRAZIONE)
- IL **GRUPPO 2**: NA, SOFT AGAR, BHI, BHI DOPPIA CONCENTRAZIONE

Caci₂



Quali metodiche???

➤ **ENRICHMENT TECHNIQUES** ➤ TERRENI GRUPPO 1
➤ TERRENI GRUPPO 2

➤ **SCREENING:**
1.SPOT TEST TIPO 1 ➤ TERRENI GRUPPO 1
➤ TERRENI GRUPPO 2

2.SPOT TEST TIPO 2 ➤ TERRENI GRUPPO 1
➤ TERRENI GRUPPO 2

➤ **TEST DI CONFERMA/CONTA:**

1.TIPO 1 ➤ TERRENI GRUPPO 1
➤ TERRENI GRUPPO 2

2.TIPO 2 ➤ TERRENI GRUPPO 1
➤ TERRENI GRUPPO 2





FACCIAMO DUE CONTI:

**5 CAMPIONI X 3 CEPPI=15 SUBCAMPIONI
CIASCUNO DEI SUBCAMPIONI è STATO
SOTTOPOSTO AI 2 TEST DI SCREENING CON I 2 GRUPPI DI
TERRENO I POSITIVI (+ LE DILUIZIONI) SONO STATI
SOTTOPOSTI AI TEST DI CONFERMA/CONTA (SEMPRE CON I 2
GRUPPI DI TERRENI).....**

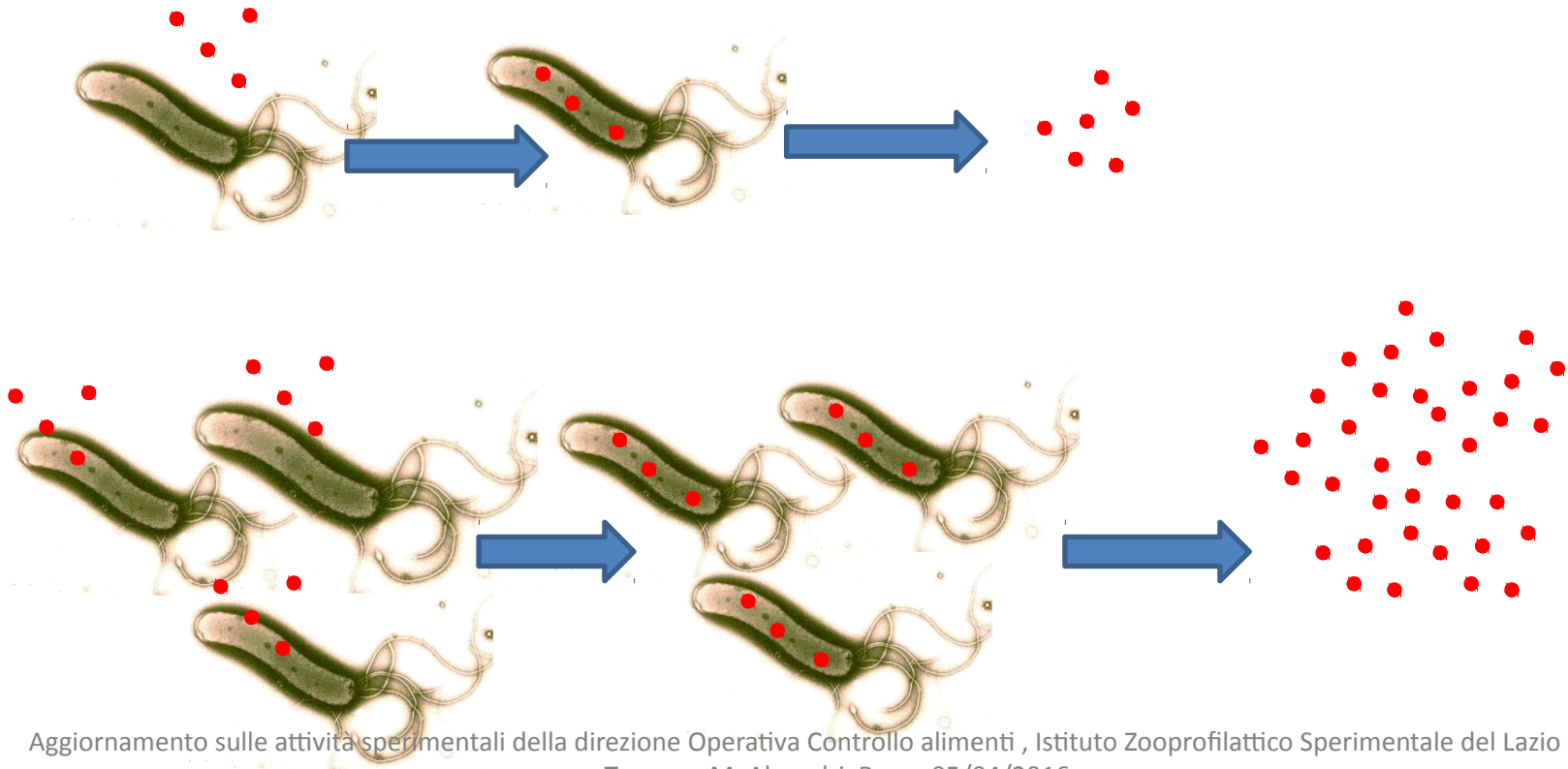




**Quali
metodiche???**

➤ ENRICHMENT TECHNIQUES

Con brodo doppia concentrazione: ha lo scopo di aumentare la crescita microbica e quindi, di conseguenza, la carica virale





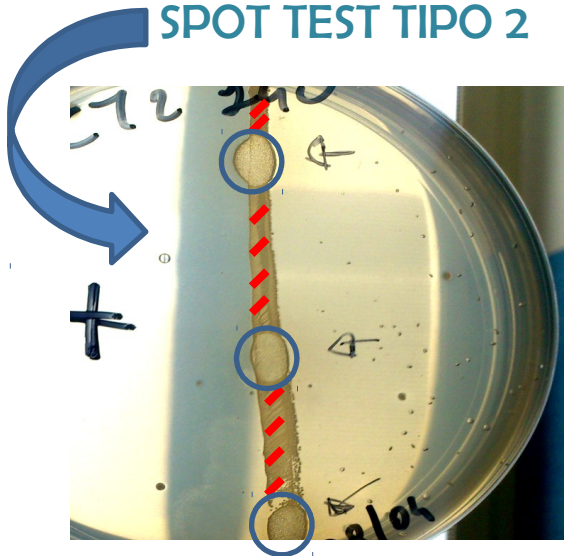
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

**Quali
metodiche???**

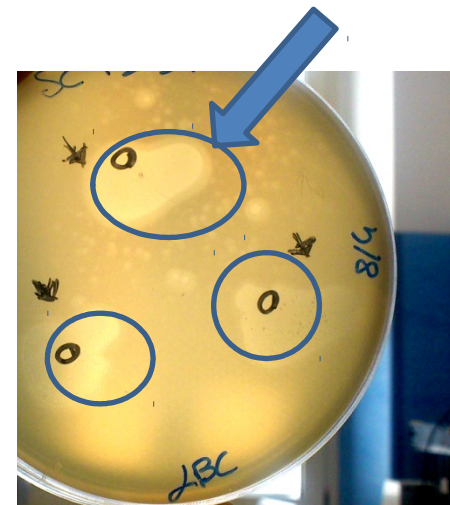
➤ **SCREENING:**

Dato qualitativo presenza/assenza

SPOT TEST TIPO 2



SPOT TEST TIPO 1



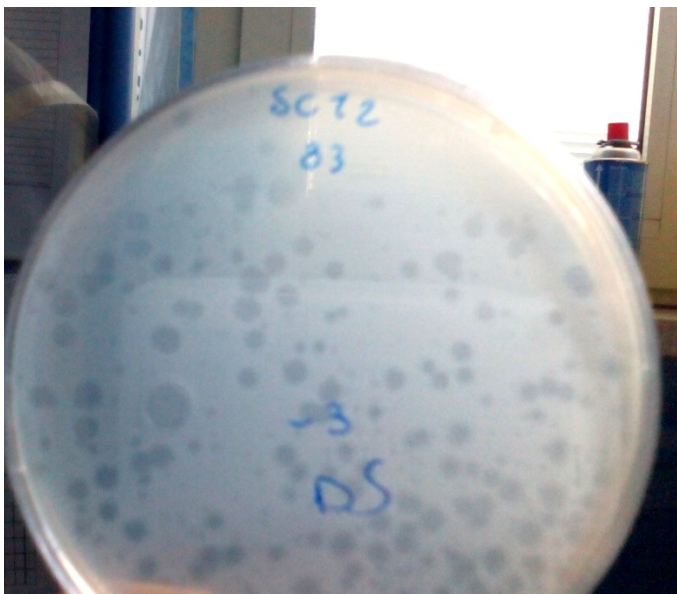


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**Quali
metodiche???**

➤ **CONFERMA E CONTA:**

**SEMINA IN DOPPIO STRATO DI AGAR E METODO DELLA
GOCCIA**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

➤ I RISULTATI:

DUE dei **CAMPIONI** provenienti dall'acqua di scarico di altrettante vasche di allevamento delle trote sono risultati **positivi ad entrambi i metodi di screening** per fagi attivi nei confronti di ***YERSINIA RUCKERI***.

I due metodi sono risultati ugualmente efficaci tuttavia lo spot test tipo 1 è apparso più adatto alla lavorazione di un numero elevato di campioni (rapidità e semplicità di esecuzione)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

I test di conferma/conta utilizzando il metodo della goccia e la semina in doppio strato di agar hanno dato esito positivo. Tuttavia i campioni saggiati con il **METODO DELLA GOCCIA** sono risultati **INCONTABILI** per la sovrapposizione delle placche di lisi

Il **METODO IN DOPPIO STRATO DI AGAR** ha permesso di quantificare con il gruppo 2 dei terreni in un campione **$2,4 \times 10^8$ ufp/ml** e nell'altro **$2,0 \times 10^7$ ufp/ml**.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

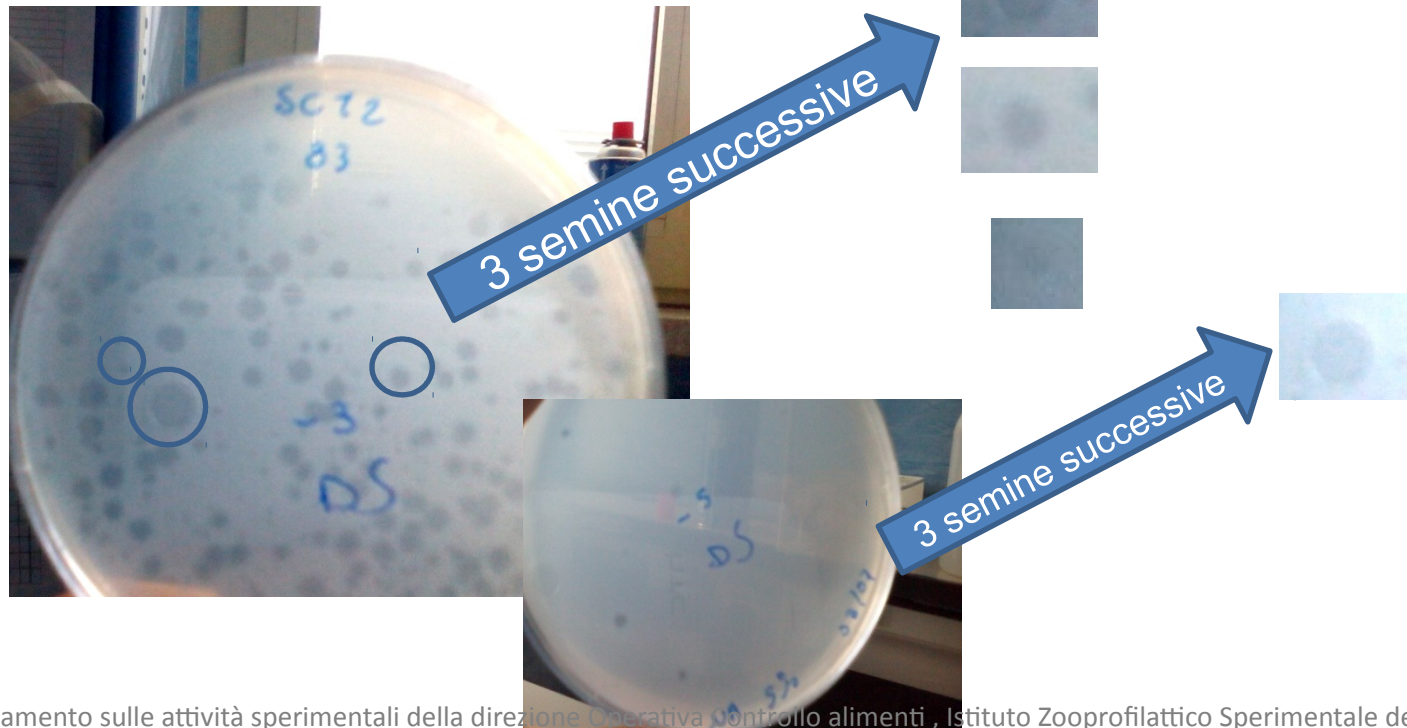
Sebbene i campioni abbiano dato lo stesso risultato qualitativo il **gruppo di terreni 1 (“Luria Bertani”)** è **risultato migliore per l’osservazione delle placche** e pertanto nelle fasi successive è stato utilizzato da solo



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

LA PURIFICAZIONE:

I campioni presentavano **placche di morfologia differente ascrivibili a 3 tipologie**. Sono state selezionate **4 placche** e **purificate mediante 3 successive semine in doppio strato di agar**



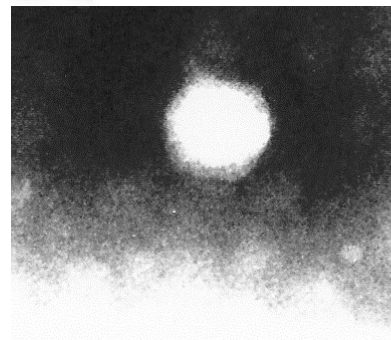
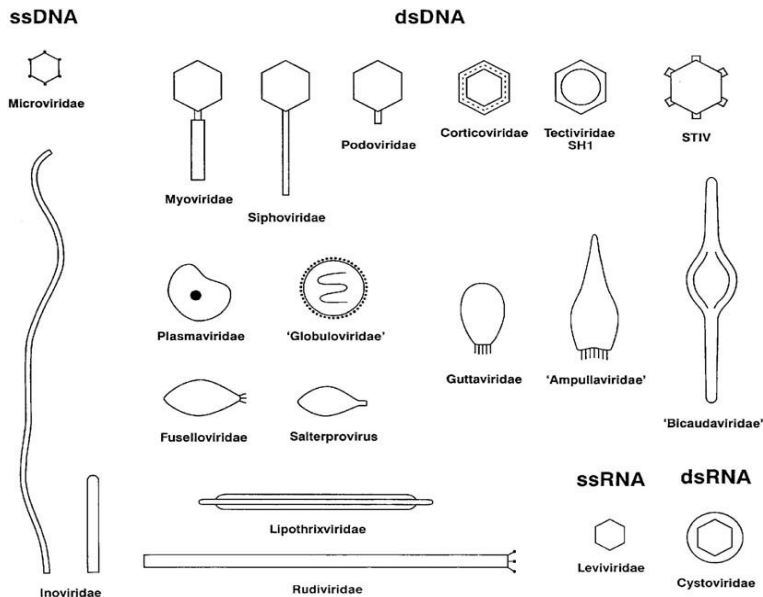


➤ STUDIO DELLA MORFOLOGIA:

Le 4 placche sono state esaminate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), utilizzando due differenti metodologie ovvero il metodo della goccia e dell'ultracentrifugazione



I batteriofagi isolati, sono apparsi tutti della stessa morfologia e provvisti di coda.





➤ STUDIO DELLO SPETTRO D'OSPITE

Attività nei confronti della stessa specie e dello stesso genere :

1. 4 ceppi di *Yersinia ruckeri*

**2. 5 ceppi di *Yersinia enterocolitica* (2 sierotipi
Non tipizzati, O9, O8, O5)**



Mi ospiti???



Risultati:

➤ Allo screening : falsi positivi

➤ Positività per 2 ceppi di *Yersinia enterocolitica*

➤ positività per un altro ceppo di *Yersinia ruckeri* (totale 2 ceppi di *Y. ruckeri*)





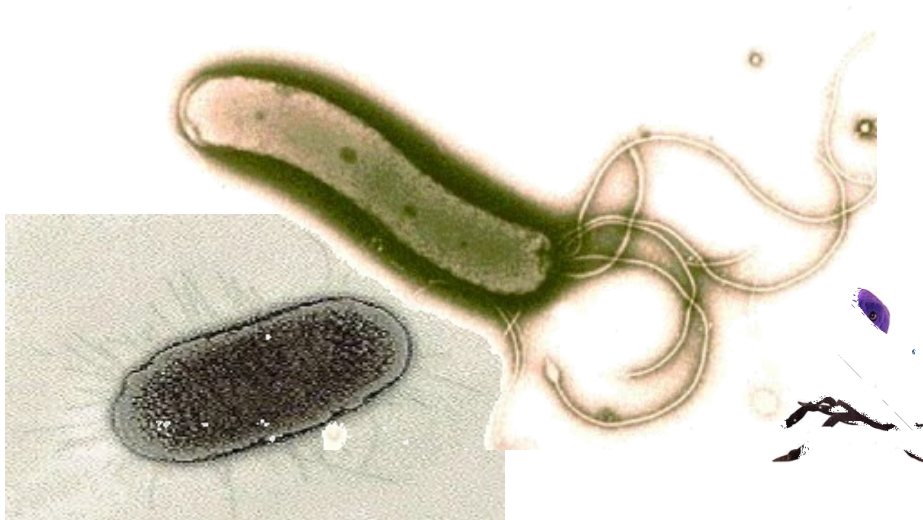
attività nei confronti di generi diversi:

2 ceppi di *Pseudomonas fluorescens*

2 ceppi di *Lactococcus garviae*

2 ceppi di *Vibrio parahaemolyticus*

2 ceppi di *Vibrio alginolyticus*



E voi mi
ospitate???



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Nessuno dei ceppi testati è risultato infettabile dai fagi isolati





Concludendo:

- Screening : di facile esecuzione ma**falsi positivi**
- **Visualizzazione delle placche migliore con gruppo 1 dei terreni**
- Positività per 2 ceppi di *Yersinia enterocolitica*
- Positività per 2 ceppi di *Yersinia ruckeri*



Il passato prossimo:

Eseguiti altri test per identificare batteriofagi attivi nei confronti di *Listeria monocytogenes* su acqua proveniente da un'industria alimentare e tamponi di superficie (stabilimento positivo per *L. monocytogenes*) ma esito negativo



Il futuro:

Verificare la stabilità dei fagi isolati

**....la ricerca continua (RICERCA
CORRENTE ANNO PESCI
ORNAMENTALI)...**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**Un ringraziamento al
personale tecnico
coinvolto nel progetto**

....





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Thank you for your attention!

