



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



Ministero della Salute

Prevenzione e trattamento di patologie batteriche delle specie ittiche marine allevate: approccio a strategie innovative per modelli di allevamento nazionali

RC LT 0318

Responsabile scientifico: Teresa Bossù



Caratteristiche del progetto

Durata del progetto (espressa in mesi): 36

- **Area tematica: Sanità animale**
- **Responsabile scientifico del progetto:** Teresa Bossù
- Qualifica: Dirigente Veterinario
- Telefono 06/79099428 Fax 06/79099428
- E-mail: teresa.bossu@izslt.it
- **4. Elenco delle Unità operative impegnate nel progetto:**
- a) U.O.: 1 (IZSLT) Responsabile U.O.: **Teresa Bossù**
- b) U.O.: 2 (IZSLT) Responsabile U.O.: **Francesca Susini**
- c) U.O.: 3 (IZSLT) Responsabile U.O.: **Gabriella Perfetti**
- d) U.O.: 4 (IZSLT) Responsabile U.O.: **Raniero Lorenzetti**
- e) U.O.: 5 EMS Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) Responsabile U.O.: **Amedeo Manfrin**



L'acquacoltura è un importante settore zootecnico in Italia, comprendente sia pesci d'acqua dolce che d'acqua marina. Inoltre, è una fondamentale fonte di risorse proteiche per l'umanità.

Sfida: controllo delle patologie ittiche con un utilizzo oculato e limitato di antibiotici, PER PREVENIRE il fenomeno dell'antibioticoresistenza

Doppio approccio:

- investigare la possibilità di sviluppare dei trattamenti a base di batteriofagi (terapia fagica)
- vaccino autologo contro la vibriosi (responsabile di ingenti perdite nell'allevamento in mare)

Risultati

- l'isolamento di due batteriofagi lisanti due specie del genere *Aeromonas*, batterio rilevante nell'ambito dell'allevamento dei pesci di acqua dolce
- sviluppo di un vaccino autologo, autorizzato e utilizzabile in allevamento



Perchè produrre vaccini (e perchè non farlo)

I vaccini rimangono tra gli strumenti più adeguati per contrastare e controllare le patologie da un punto di vista

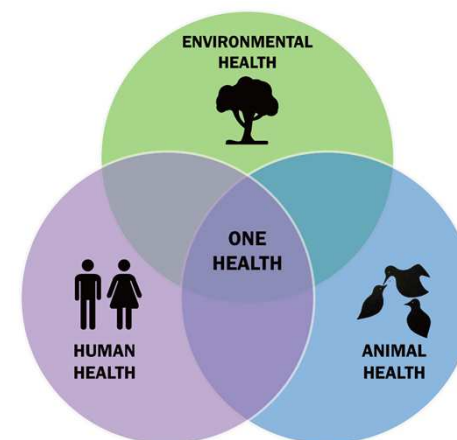
- economico
- ambientale
- Etico

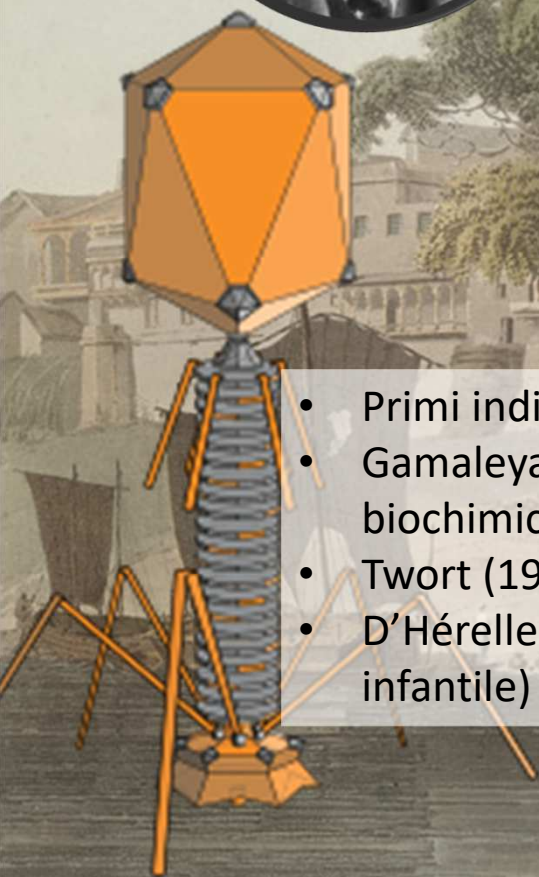
MA

i pesci hanno un sistema immunitario acquisito più primitivo e meno efficiente, rendendo più difficoltoso lo sviluppo di vaccini efficaci

i costi legati alla sperimentazione e alla registrazione di un vaccino possono scoraggiare le case farmaceutiche dal registrarne di nuovi

SOLUZIONE  : vaccini autologhi





- Primi indizi: Frankland? Su Tamigi(1895), UK; Hankin su Gange e Juma (1896)
- Gamaleya (Russia): primi ipotesi di costituenti sub-batterici inibenti. Reazioni biochimiche?
- Twort (1915): placca di lisi trasferibile su Staphylococcus. Forse un virus?
- D'Hérelle (1917): invenzione del termine batteriofago, primi utilizzi clinici (dissenteria infantile) e veterinari (tifo nei polli)

Nelle Repubbliche Socialiste Sovietiche



- Il batteriologo georgiano Eliava incontra d'Herelle e viene conquistato dai suoi risultati (1918-34). Costruzione del centro di batteriologia di Tbilisi.
- Mel'nyk utilizza i fagi nelle province del Donbass (vs Shigella).
- Utilizzo della fagoterapia nell'invasione della Finlandia (1939-40). Si rafforza l'idea che i fagi siano virus (ipotesi purtroppo osteggiata da Lysenko...) e sui campi di battaglia di Stalingrado e Leningrado.
- L'utilizzo della fagoterapia permane ancora oggi, con l'Eliava Institute ancora come centro di riferimento.



I batteriofagi nei paesi occidentali

- «Dream team» in Pasadena: Ellis (fisico-chimico), Delbruck (fisico), Luria (biologo), Hershey (batteriologo). Gli sforzi si concentrano sui fagi T1-T7 vs *E. coli*.
- Lwoff e Gutmann dimostrano nel 1950 la differenza tra fagi litici e lisogeni.
- Impiego dei fagi lambda sulla regolazione genica di *E. coli* (Jacob e Monod, Nobel 1965).
- Prime osservazioni dell'azioni delle endonucleasi.
- La scoperta dei fagi con RNA influisce sulle intuizioni di Crick sul ruolo dell'RNA.
- L'impiego delle penicilline e degli successivi antimicrobici fa perdere ogni interesse sulla terapia fagica...



Il contesto odierno

The One Health Triad



- Nel 2017 il consumo globale in acquacoltura di antimicrobici è stato calcolato di 10.259 tonnellate, ed è previsto aumentare del 33% per il 2030.
- il 96% di *Vibrio harvey* e *Vibrio alginolyticus* ha mostrato resistenze multiple agli antibiotici (Scarano et al. 2014)
- Possibili conseguenze: potrebbero alterare i meccanismi ecologici del ciclo di nitrati, influenzare la biodiversità, modificare il sequestro di carbonio e ridurre l'accesso all'acqua potabile.
- Batteri patogeni, non patogeni e opportunisti possono albergare geni di antibiotico-resistenza che possono essere trasmessi ad altri batteri patogeni: è il caso, per esempio di *Shewanella algae* e *Vibrio* spp., (Zago et al., 2020).

La fagoterapia in acquacoltura (1/2)

- I batteriofagi sono estremamente specifici verso il loro ospite -> grande vantaggio di non interferire sul microbioma del paziente -> diagnosi eziologica quanto più specifica , fagi autologhi o cocktail di fagi.
- il mezzo acquatico è particolarmente efficace nella diffusione dei virioni fagici
- In grado di raggiungere gli organi interni dei pesci attraverso le branchie, come dimostra il loro rilevamento nei tessuti renali di animali in un bagno contenente sospensione fagica. La ridotta capacità dei pesci di sviluppare immunità acquisita rallenta l'espressione di anticorpi vs fagi

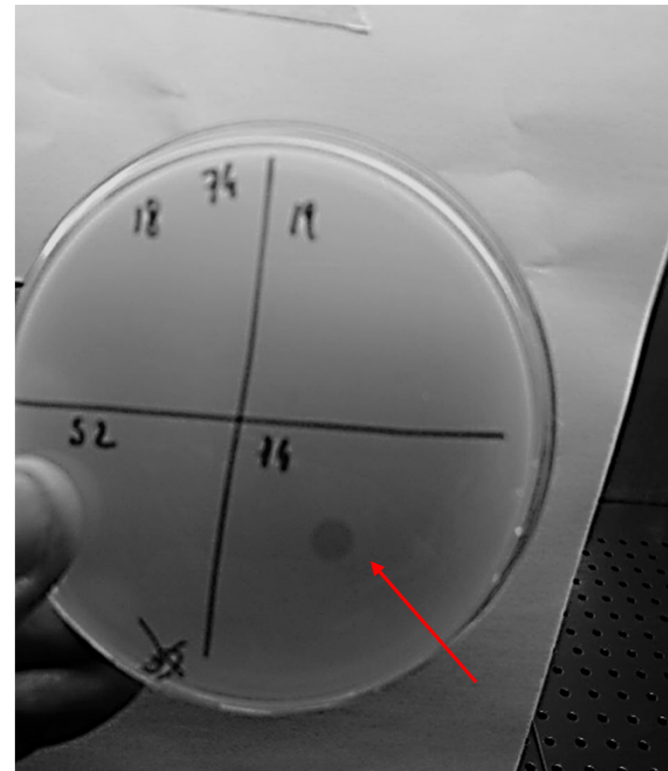
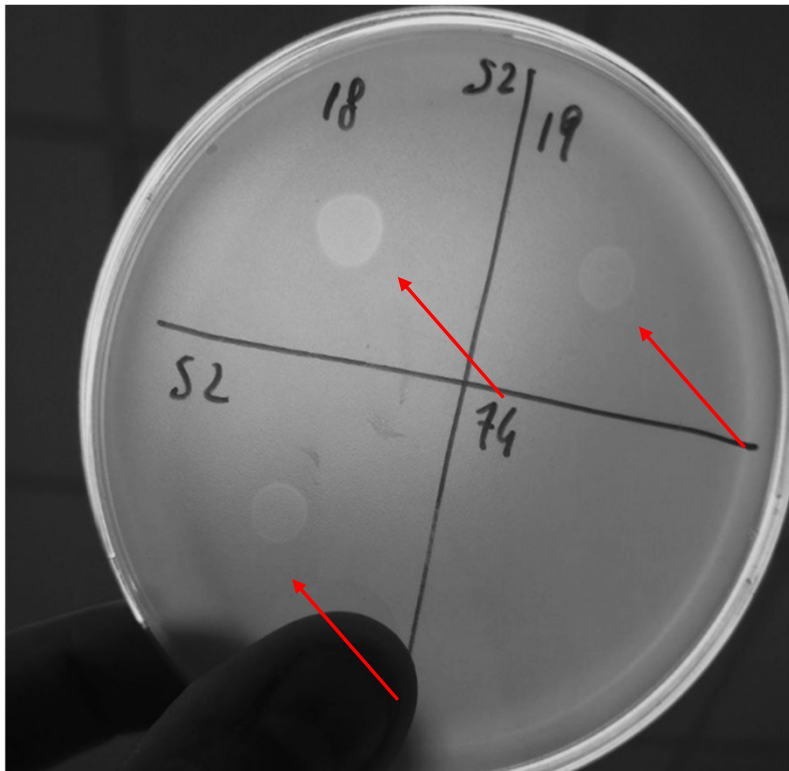


La fagoterapia in acquacoltura (2/2)

Specie/matrice	Batterio patogeno	Modalità di somministrazione	Risultato
Larve gambero gigante indopacifico	Vibrio harvey	immersione	Riduzione della mortalità
Larve gambero gigante indopacifico	Vibrio harvey	immersione	Riduzione della mortalità
Larve gambero gigante indopacifico	Vibrio harvey	immersione	Riduzione della mortalità
Abalone	Vibrio harvey	immersione	Riduzione della mortalità
Mazzancolla tropicale	Vibrio parahemolyticus	per os e immersione	Azione profilattica
Larve mazzancolla tropicale	Vibrio parahemolyticus	immersione	Riduzione della mortalità
Naupli di Artemia franciscana	Vibrio parahemolyticus	immersione	Azione profilattica
Carne di ostrica	Vibrio parahemolyticus	applicazione superficiale	Riduzione della concentrazione batterica
Ostrica (O. plicatula)	Vibrio parahemolyticus		Riduzione della concentrazione batterica
Oloturia (Apostichopus japonicus)	Vibrio alginolyticus	immersione	Riduzione della mortalità
Artemia salina	Vibrio spp.	immersione	Diminuzione della carica batterica
Salmone atlantico	Vibrio anguillarum	immersione	Riduzione della mortalità
Larve di merluzzo nordico e rombo	Vibrio anguillarum	immersione delle uova	Riduzione e ritardo della mortalità
Zebrafish	Vibrio anguillarum	immersione	Riduzione della mortalità
Oloturia (Apostichopus japonicus)	Vibrio splendidus	per os	Riduzione della mortalità
Oloturia (Apostichopus japonicus)	Vibrio cyclitrophicus	immersione o iniezione	Riduzione della mortalità
Salmerino di fonte	Aeromonas salmonicida	immersione	Riduzione della mortalità
Salmone atlantico e trota arcobaleno	Aeromonas salmonicida	iniezione, per os e per immersione	Velocità di mortalità più lenta, ma mortalità del 100%
Pescegatto africano (Clarias gariepinus)	Pseudomonas aeruginosa	applicazione locale sulle lesioni	Riduzione delle lesioni
Ayu Plecoglossus altivelis	Pseudomonas plecoglossicida	per os	Riduzione della mortalità
Trota arcobaleno e zebrafish	Flavobacterium columnare	immersione	Riduzione della mortalità
Anguilla europea	Aeromonas hydrophila e Pseudomonas fluorescens	per os (BAFADOR®)	Stimolazione dell'immunità cellulare e umorale e riduzione della mortalità
Trota arcobaleno	Aeromonas hydrophila e Pseudomonas fluorescens	per os (BAFADOR®)	Stimolazione dell'immunità aspecifica e riduzione della mortalità
Sogliola atlantica	Aeromonas salmonicida	immersione	Nessuna mortalità riportata, ridotta carica batterica

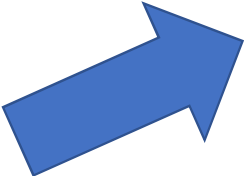
(Kowalska et al.)

Ricerca di batteriofagi contro *Aeromonas* spp.



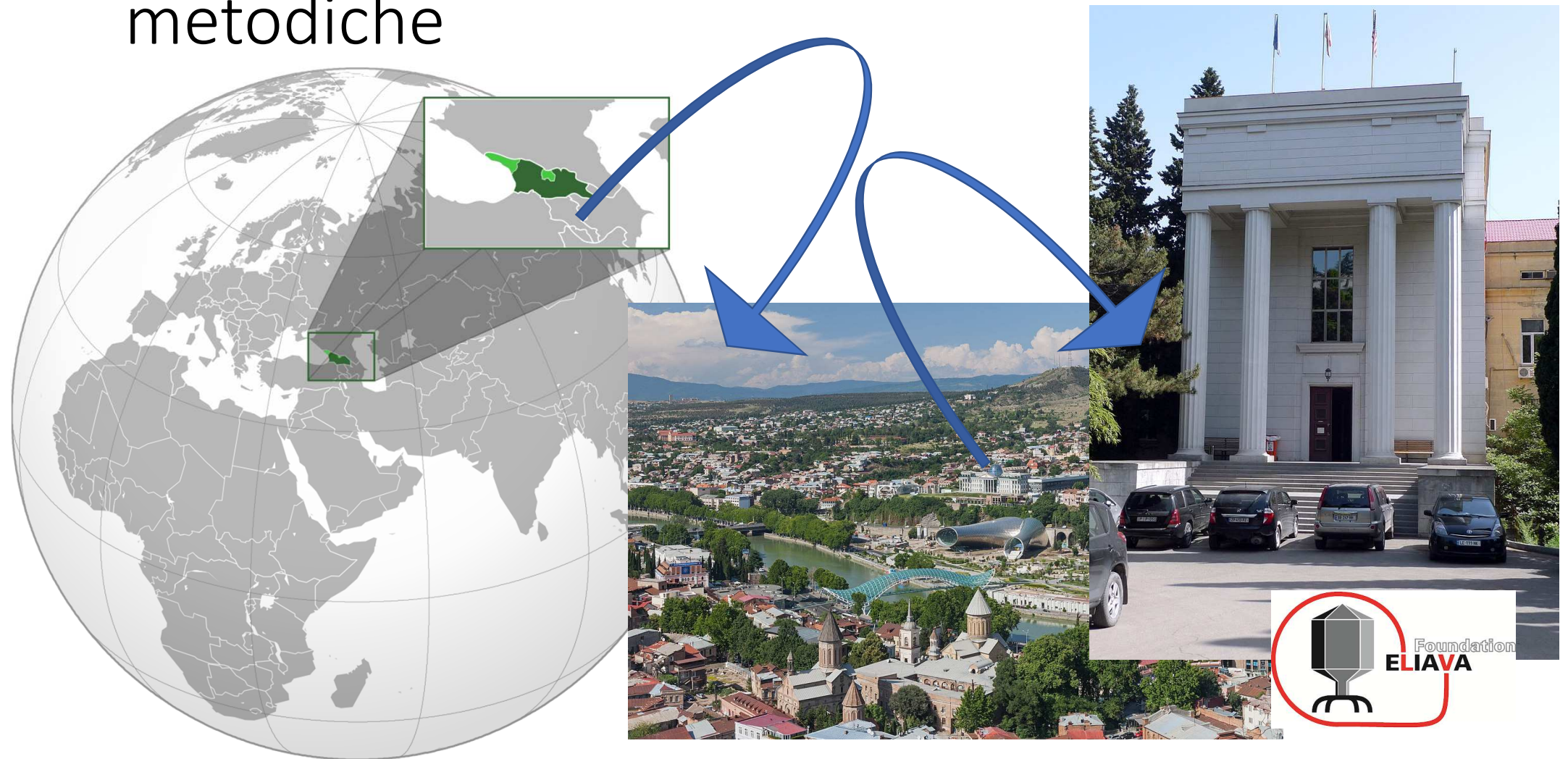
I step: riorganizzazione e arricchimento della ceppoteca per i batteri responsabili di patologie ittiche

149 ceppi,
di cui



<i>Vibrio harveyi</i>	20
<i>Vibrio alginolyticus</i>	20
<i>Lactococcus garviae</i>	8
<i>Aeromonas sobria</i>	7
<i>Aeromonas veronii</i>	7
<i>E. coli</i>	7
<i>Vibrio anguillarum</i>	5
<i>Photobacterium damselaepiscicida</i>	5

Il step: preparazione protocolli e acquisizione metodiche

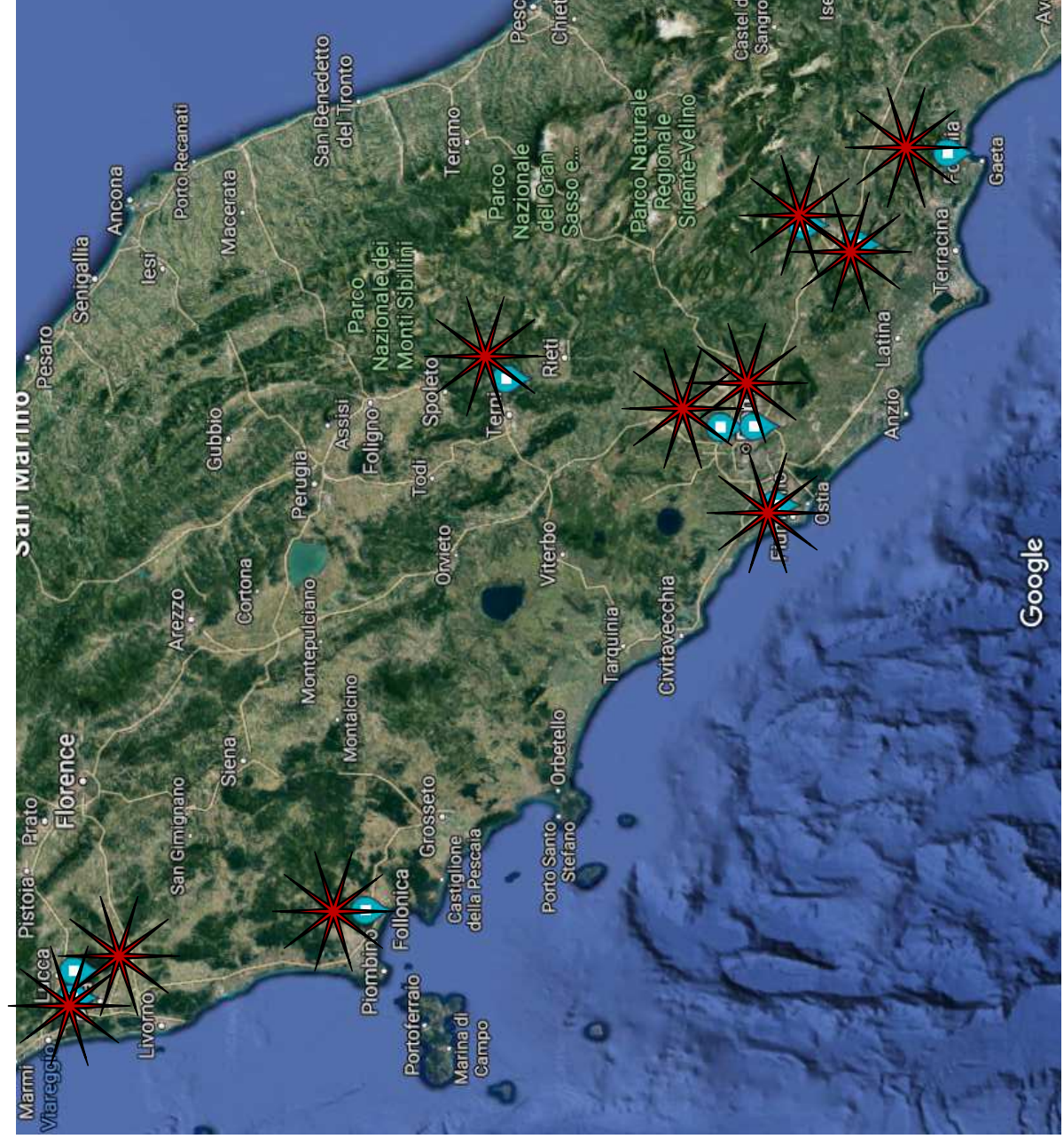


Materiali e metodi: trattamento campioni ambientali

Numerosi campioni ambientali:

- acque di scarico dell'IZSLT,
- le acque di scarico del Centro Carni di Roma dove l'Istituto presta servizio nei confronti della ricerca di Trichinella
- vasche dell'acquario pubblico della Certosa di Pisa (PI),
- canale di scolo in prossimità della sede di Pisa,
- allevamenti di trotilcoltura Erede Rossi in località Monti sul Velino (RI),
- gabbie di orata e spigola dell'allevamento di orate e spigola di Gruppo Del Pesce nel Golfo di Gaeta (LT) e presso le gabbie di Ittica Golfo di Follonica (GR),
- fiume Amaseno (FR),
- acquario privato del borsista di ricerca della sede di Roma di IZSLT
- in un ruscello in località Madonna della Neve (Frosinone).

Molteplici prove di laboratorio sono state approntate con i nominati campioni ambientali per poter affinare le metodiche, con cadenza bisettimanale, sia nei riguardi di batteri patogeni per i pesci di acqua marina che di acqua dolce, spesso avanzando per prove e per errori. **Nella relazione vengono riportate le metodiche che sono state utilizzate con successo nell'isolamento di batteriofagi efficaci contro due specie di *Aeromonas*, specificamente *A. sobria* e *A. veronii*.**



Arricchimento

- Dalla ceppoteca dell'IZSLT sono stati prelevati 4 ceppi di *A. spp* da cryobank corrispondenti a: 1 ceppo di *A. veronii* duplicato due volte (numero cryobank 18 e 19); 1 ceppo di *A. veronii* prelevato da un diverso caso clinico (52), 1 ceppo di *A. sobria* (74) e incubati durante la notte in BHI (+ NaCl 2g⁻¹, CaCl₂ 5 mM). Le sospensioni sono state fatte crescere durante la notte alla temperatura di 25°C.



ogni provetta di ogni serie è stata arricchita con un diverso ceppo batterico, in modo da incrociare i 3 campioni con i 4 ceppi (A18, A19, A52, A74; B18, B19...).

il campione arricchito è stato costituito con: 18 ml di campione preparato, 2 ml di BHI 10X, CaCl_2 5mM e MgCl_2 2mM, 50 μl di sospensione batterica durante la notte.

Le provette sono state lasciate durante la notte alla temperatura di 25°C.

Il giorno seguente le provette sono state centrifugate a 5000G per 20 minuti a 4°C, dopodiché il surnatante è stato filtrato con filtri idrofili da siringa con maglia di 0,45 μm .

Da ogni provetta è stato prelevato 1,5 ml di surnatante e trasferito in provette Eppendorf sterili da 2 ml.

Il surnatante è stato purificato con 2 lavaggi di cloroformio al 10% e al 5% del volume con agitazione manuale, recuperando il surnatante entrambe le volte con refrigerazione (30 minuti a 4°C) seguito da ultracentrifugazione a 9000 g per 10 minuti. Il purificato è stato trasferito in Eppendorf da 2 ml e conservato a 4°C.



Ad ogni passaggio relativo
alla crescita batterica/fagica:
attesa overnight

Risultato atteso:
sospensione ricca di fagi

Materiali e metodi: spot test

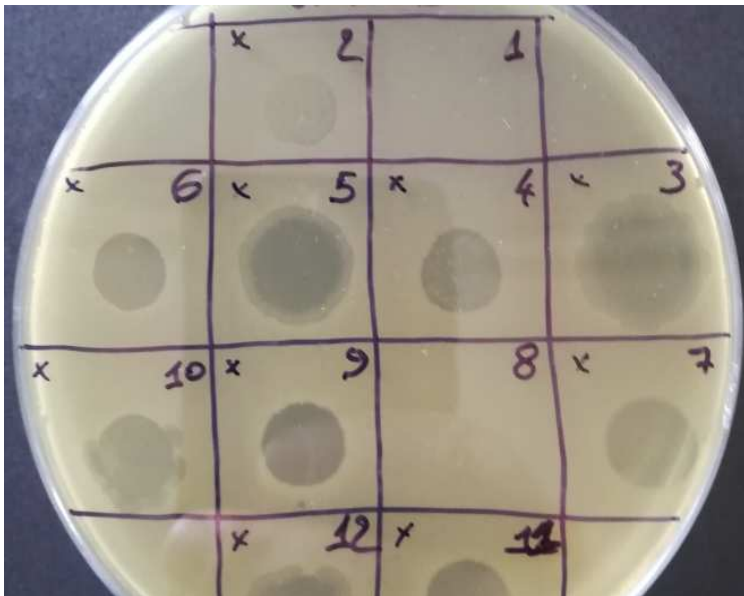
La sospensione viene testata per verificare la presenza di fagi su un doppio strato agar arricchito con il ceppo batterico di riferimento



Piastra doppio strato : Il primo strato è stato ottenuto versando Luria-Bertani Agar lasciata ad asciugare sotto cappa fino a completo indurimento dell'agar. I

l secondo strato con una percentuale di agar dello 0,5% invece che dell'1,5. 4 ml di LBA soft sono stati uniti a 0,5 ml di sospensione e versati.

Quando l'agar si è solidificato, sono state versate 100 µl di sospensione di campione.



Se si è
fortunati:

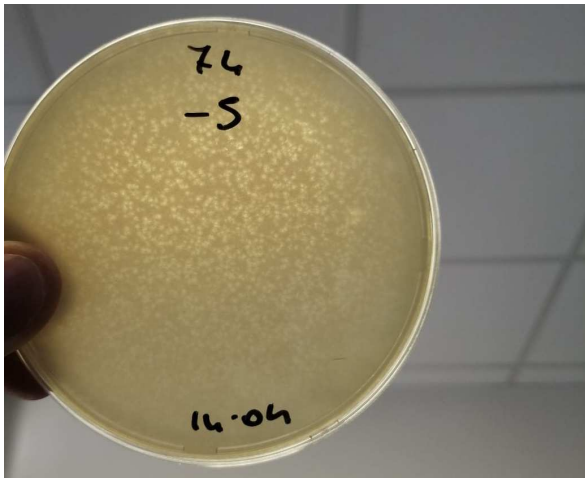
Recupero delle placche di lisi

ogni placca ottenuta è stata posizionata in una Eppendorf con l'aggiunta di 0,5 ml di PBS + 5mM $MgCl_2$. La sospensione è stata quindi ultracentrifugata e il surnatante trasferito in una diversa Eppendorf con l'aggiunta di cloroformio per il 5% del volume totale.

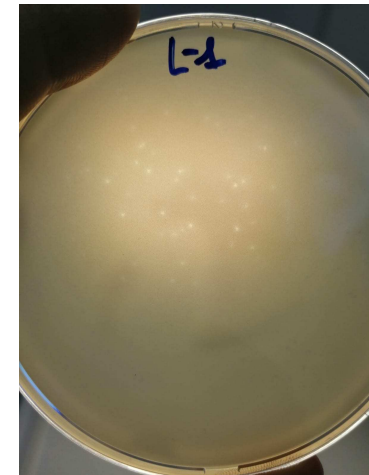
Le placche di lisi sono state poi reinoculate su piastre doppio strato per verificare la riproducibilità della placca (e dimostrare quindi la capacità di replicazione del fattore inibente la crescita batterica).

Materiali e metodi: Produzione in purezza della linea virale (clone fagico)

- Per ogni placca una serie da 12 provette contenenti 900 μ l di brodo Luria Bertani arricchito di CaCl_2 5mM e MgCl_2 2mM, marcate da 10^{-1} a 10^{-12}
- Diluizione 1/10 tra le provette. Da ogni diluizione (partendo da 10^{-5}) si prelevano 100 μ l di sospensione fagica da unire a 100 μ l di sosp. batterica. Dopo 30 minuti, si versa il soft agar nella provetta e si versa il tutto su uno strato di agar solido.
- Dopo 24 e 48 ore si verifica la presenza di placche di lisi disseminate. Dove esse sono ben distinte e non confluiscono è possibile prelevare placche di fagi in purezza.



Non sempre le diluizioni portano ad un decremento prevedibile di fagi. Affinità con la plastica del puntale?



Risultati



famiglia *Podoviridae*

I batteri sono stati osservati con microscopio elettronico a trasmissione in colorazione negativa utilizzando il metodo della goccia e dell'ultracentrifugazione.

Il brodo contenente i virus è stato centrifugato a 25.000 x g per 1h a 4° C; per il lavaggio in ammonio acetato, il pellet è stato sospeso in 4 ml e sottoposto nuovamente alla stessa procedura; in seguito, il pellet è stato risospeso in 1 ml di H₂O grado reagente.

Per il metodo della goccia sono stati prelevati 50 µl di campione e su ognuno degli stessi è stata adagiata una griglia per 20 minuti a temperatura ambiente.

Sui campioni è stata effettuata una colorazione negativa con colorante NaPT 2%. I campioni sono stati osservati al Microscopio Elettronico a Trasmissione (Philips EM 208; 80 kV - 28.000 X) La procedura descritta è stata pubblicata (Marozzi S et al., 2014).



Produzione vaccino autologo

- Focolai: Agosto 2018 in spigola e orata, 2019 in concomitanza con *P. piscicida* sub. *piscicida*, durante il 2020 in spigola (Toscana)
- *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*
- Conferma: PCR, MALDI-TOF (IZSVe)



- Autorizzazione ministeriale, nulla osta strutturale e procedurale ISS
- Crescita batteri in TSBvac+2%NaCl
- Biofermentatore Minifors Standard
- Controllo di purezza e identificazione
- **Inattivazione del vaccino:** sospensione in formaldeide al 35%-38%-40% in quantitativo tale da ottenere una concentrazione finale del 4‰, così da rispettare la norma relativa alla massima concentrazione di formaldeide accettabile nel vaccino finito (5‰).
- Controllo della concentrazione batterica del vaccino (lettura spettrofotometro in McFarland Standard)

Controllo di innocuità

in tre prove: sterilità (Siena), LAL test (IZSLER), tossicità anormale (IZSVe)

- Sterilità: incubazione in BHI, TSA, brood Thiol
- LAL test: reazione di coagulazione di lisato di amebociti di *Limulus polyphemus*
- Tossicità anormale: via intraperitoneale 0.2 ml di vaccino ad almeno 50 orate e/o spigole/branzini di peso superiore a 10 g e per immersione in altri 50 soggetti di peso inferiore
- Sterilità del prodotto finito



POS SPS 013 INT/1



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle regioni Lazio e Toscana
Sezione di Siena

VACCINO STABULOGENO CONTRO LA
VIBRIOSI DELLE SPECIE ITTICHE
MARINE, BRANZINO/SPIGOLA E ORATA

USO VETERINARIO

Agitare prima dell'uso - Conservare a 4-8° C - Dopo l'uso trattare come rifiuto speciale (D.L.vo 05/02/97 n.22)

Numero lotto

Preparazione

Scadenza





Ringraziamenti
particolari alla Dr.ssa
Giusy Cardeti e la Dr.ssa
Antonella Cersini per il
supporto microscopico,
al personale tecnico
composto da laboratorio
Sonia Amati, Giuseppina
Migliore e Maurizio Zini,
l'UOC di Ricerca e
Innovazione per il
supporto