



10 Febbraio 2023 Montefiascone (VT): Aggiornamenti in apicoltura

“I Batteriofagi nella lotta alla peste americana ”

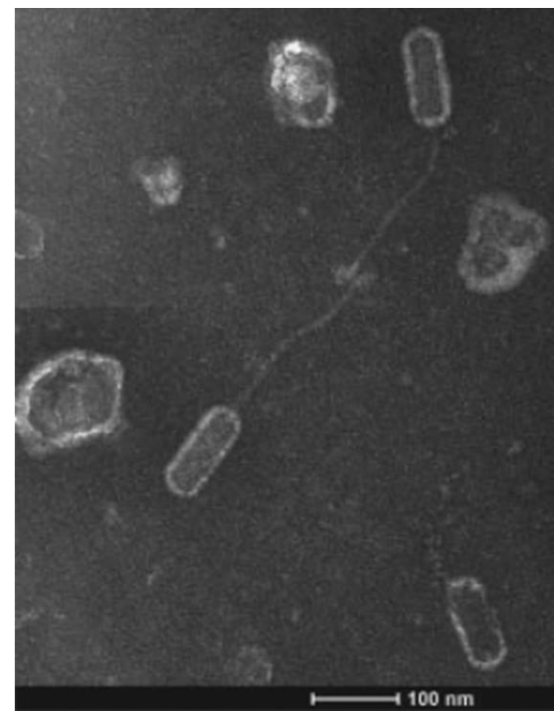
Antonella Cersini
U.O.C. Virologia

Gruppo di lavoro U.O.C. Virologia: MARIA TERESA SCICLUNA, MAURIZIO ZINI, GABRIELE PIETRELLA, ELEONORA LETI MAGGIO
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DEL LAZIO E DELLA TOSCANA “M. ALEANDRI”



Cenni storici

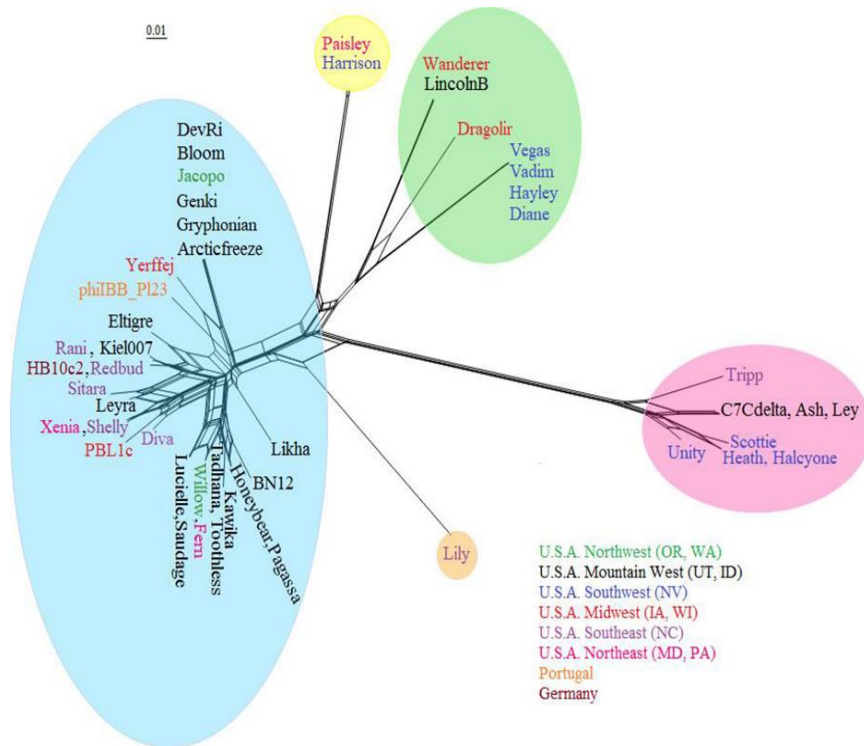
- Il primo fago specifico per *P. larvae* è stato isolato nel 1950 in Russia (Smirnova Ni 1953, Istituto Veterinario Leningrado)
- In seguito al trattamento della Peste Americana con gli antibiotici, le ricerche sui batteriofagi sono state abbandonate fino agli anni 2000 quando sono comparsi i ceppi antibiotico-resistenti.
- Al 2018, dai dati bibliografici, sono stati isolati e caratterizzati geneticamente 48 fagi (Yost DG Chang et al, Microbial Resour Announc 2018)
- E' attuale l'interesse sull'isolamento dei fagi specifici per *P. larvae* e sulla caratterizzazione dei peptidi antimicrobici (O. Elhag et al. PLOS one 2017) con lo scopo di ridurre l'uso degli antibiotici.



Yost DG et al, *Bacteriophage* 2016



Sistematica



Albero filogenetico delle 48 sequenze di batteriofagi caratterizzati raggruppati in base alla condivisione di contenuto genetico. Huson DH et al., *Mol Biol Evol* 2006

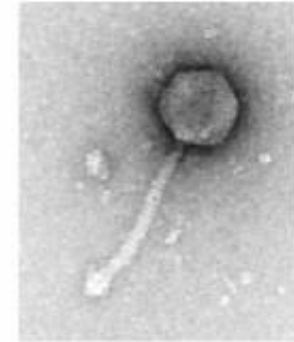
4 cluster:

- **Fern** → comprende 30 fagi dei 48 noti, identità di sequenza nucleotidica del 60%
- **Harrison** → raggruppa 2 fagi, identità di sequenza nucleotidica del 99%
- **Vegas** → comprende 7 fagi, identità di sequenza nucleotidica del 30%
- **Halcyone** → contiene 8 fagi, particolarmente distante dagli altri cluster (identità di sequenza nucleotidica del 30%)
- **Lily** → Non forma un cluster in quanto singola sequenza con un'identità del 50%



Morfologia

- Ordine *Caudovirales*, famiglia *Siphoviridae* che comprende 9 generi
- Batteriofagi costituiti da:
 - Una testa dotata di simmetria icosaedrica, costituita da 72 capsomeri e avente diametro compreso tra 60nm e 80nm
 - Una coda filamentosa, flessibile, ma non contrattile, dotata di fibre terminali e subterminali; dimensioni estremamente variabili a seconda della specie in lunghezza (65nm-570nm) ed in larghezza (7nm-10nm)



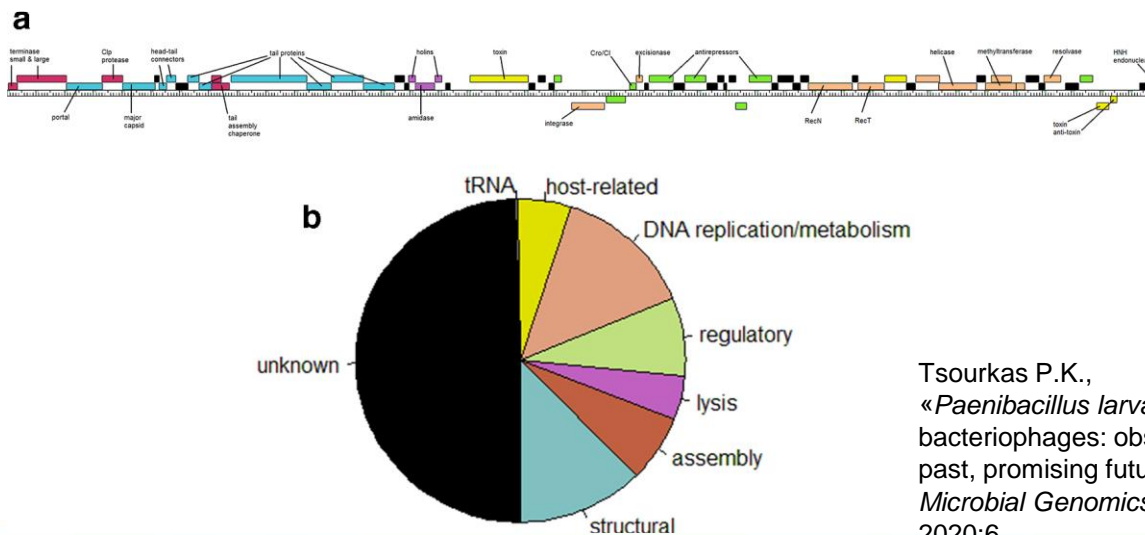
Siphovirus

Rees C. et al (2012) "The Use of Phage for Detection, Antibiotic Sensitivity Testing and Enumeration" ResearchGate



Genoma

- Genoma *Siphoviridae*: un'unica molecola di DNA lineare a doppio filamento, di ~48Kb che codifica per 70 geni
- Le proteine, codificate dai 70 geni, sono raggruppate in 7 categorie in base alle loro funzioni:
 - 1) Strutturali (subunità grande e piccola della terminasi; proteine del capsid; proteine della coda)
 - 2) Assemblaggio del virione
 - 3) Lisi della cellula batterica (recettore; Clp proteasi; N-acetylmuramyl-L-alanina amidasi; due holine)
 - 4) Regolatorie
 - 5) Replicazione del DNA/ metabolismo (integrasi; excisionasi; antirepressore o Cro/CI; helicasi)
 - 6) Funzioni ospite-correlate (tossine batteriche; sistema tossina-antitossina)
 - 7) tRNA (essenziali per la sintesi delle proteine fagiche)

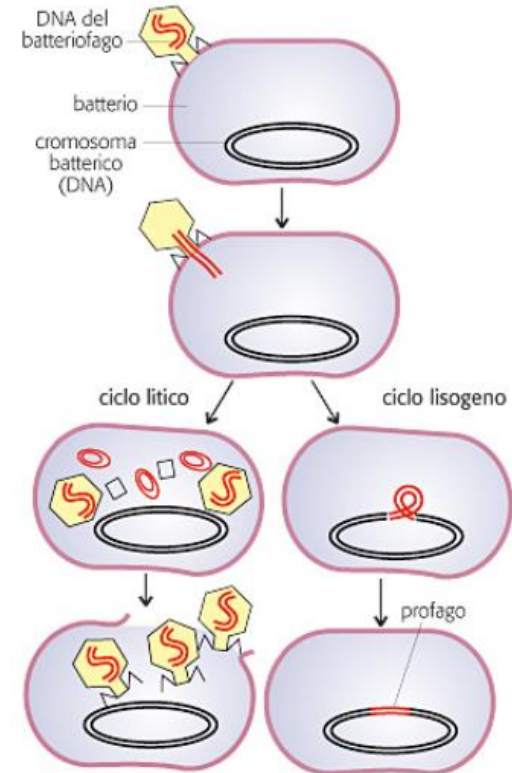


Tsourkas P.K.,
«*Paenibacillus larvae*
bacteriophages: obscure
past, promising future»
Microbial Genomics
2020;6



Ciclo lisogeno

- I *Siphoviridae* sono fagi temperati e danno origine ad un ciclo lisogeno: DNA genomico del batteriofago viene integrato in siti specifici del cromosoma batterico
- I batteriofagi integrati vengono chiamati profagi: possono rimanere latenti per molte divisioni cellulari prima di iniziare un ciclo litico in cui la cellula batterica viene distrutta
- In natura, i profagi fuoriescono spontaneamente dal cromosoma ospite circa 1:10000 divisioni cellulari, innescando un ciclo litico

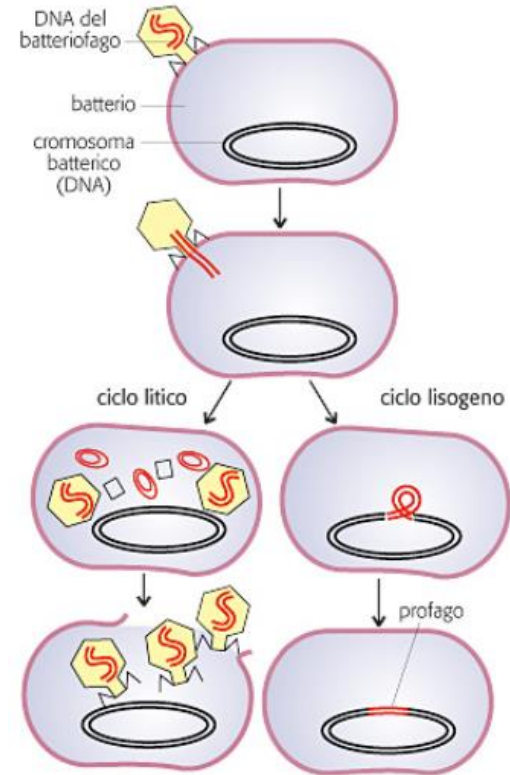


http://www.pstevanato.com/uploads/9/8/8/4/98844270/23__virus.pdf



Ciclo litico

- Il ciclo litico nei *Siphoviridae* può verificarsi in due modalità:
 - 1) I batteriofagi si agganciano alla cellula ospite *P. larvae* tramite le fibre della coda e attraverso questa stessa il DNA viene iniettato nel citoplasma del batterio ed inizia a replicarsi
 - 2) Il profago viene exciso dal genoma del batterio ed il DNA virale inizia a replicarsi
- Come conseguenza, si ottiene la sintesi delle proteine virali, l'assemblaggio delle particelle virali e lisi della cellula ospite *P. larvae*



http://www.pstevanato.com/uploads/9/8/8/4/98844270/23__virus.pdf



Meccanismi di lisi

- I principali meccanismi con cui i batteriofagi specifici per *P. larvae* lisano le cellule batteriche ospiti si basano sulla cassetta holyna/lysina che determina la sintesi delle seguenti proteine:

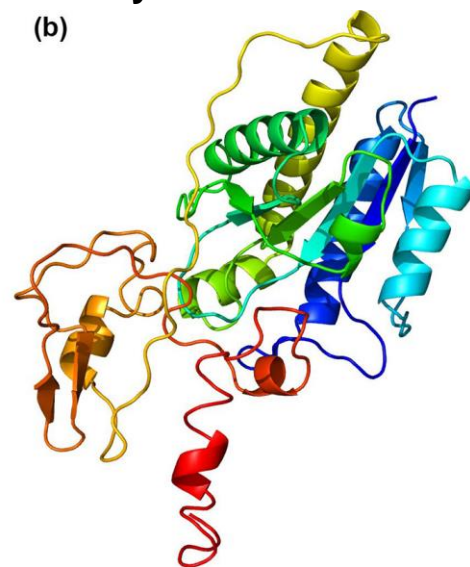
- Holina, una proteina idrofobica che buca lo strato lipidico di *P. larvae*
- N-acetylmuramyl-L-alanina, un enzima che taglia i peptidoglicani della parete di *P. larvae*
- Amidasi, un enzima che nel 2015 è stato impiegato in studi «in vivo» su larve infettate con *P. larvae* dimostrandone un notevole tasso di sopravvivenza

Struttura della N. acetylmuramyl-L-alanina

(a)



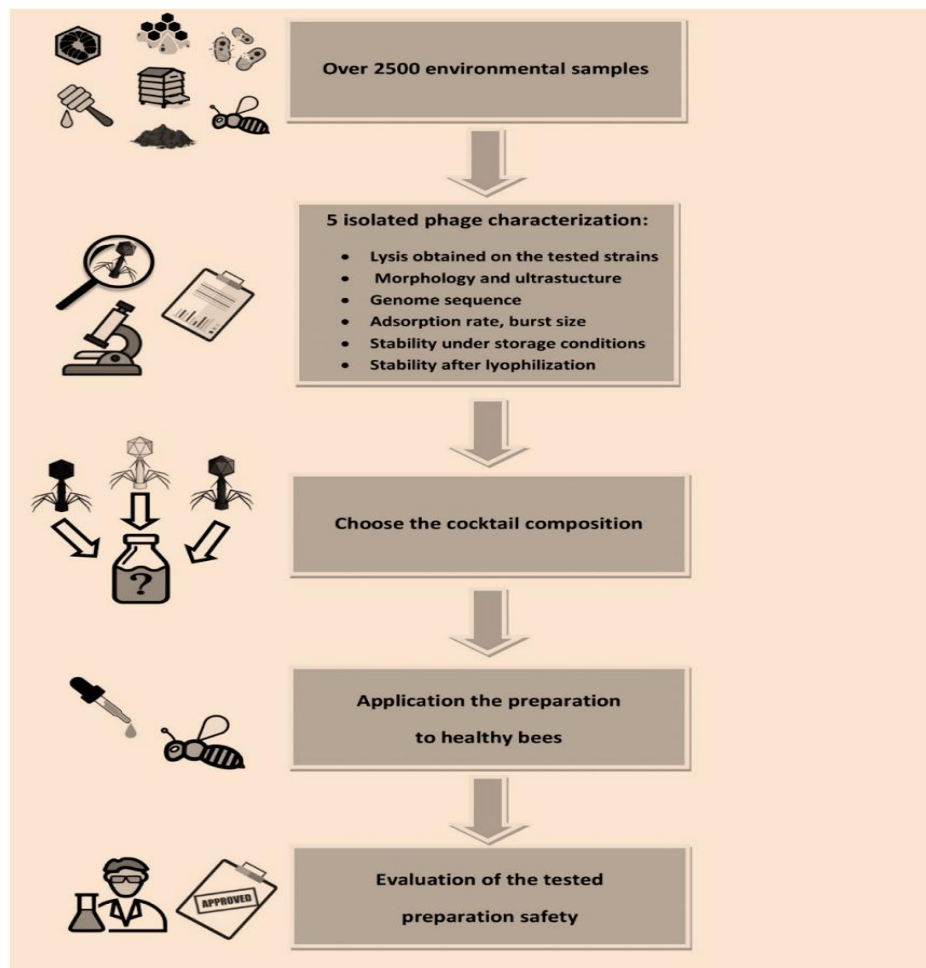
(b)



Tsourkas P.K., «*Paenibacillus larvae* bacteriophages: obscure past, promising future»
Microbial Genomics 2020;6



Sviluppo del cocktail fagico progettato per il trattamento delle api in campo



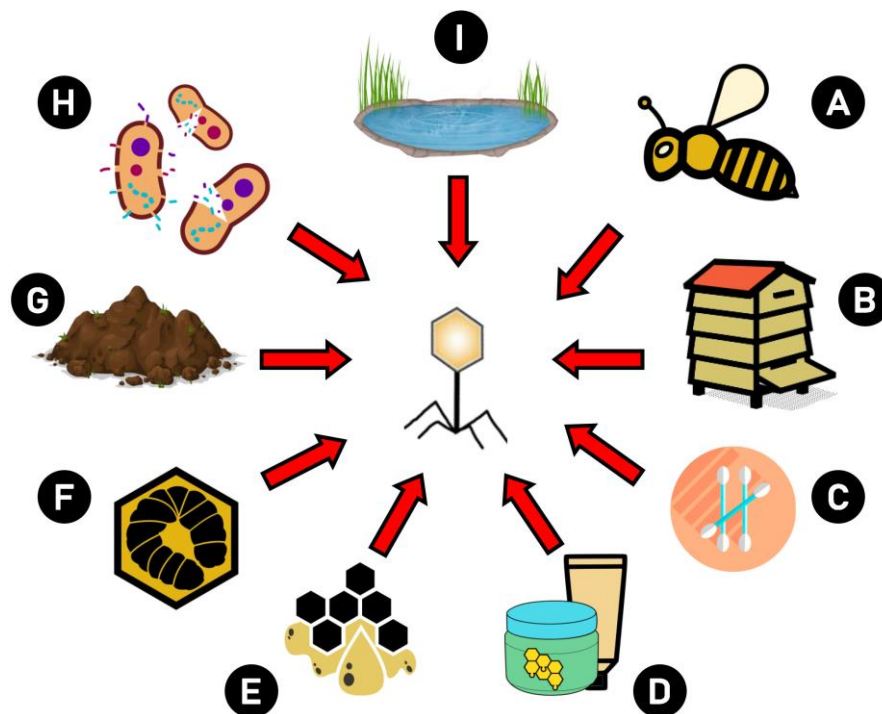
Comporta diverse fasi di lavoro

Jończyk-Matysiak et al "Isolation and Characterization of Phages Active against *Paenibacillus* larvae Causing American Foulbrood in Honeybees in Poland" Viruses 2021

1° Fase: Isolamento dei fagi specifici per *P. larvae*

Matrici da cui è possibile isolare i fagi:

- Api, larve
- Detriti fondo arnia
- Cera, miele
- Tamponi da telaino
- Suolo
- Acqua da abbeverata
- Cosmetici che contengono prodotti delle api
- Batteri lisogenici



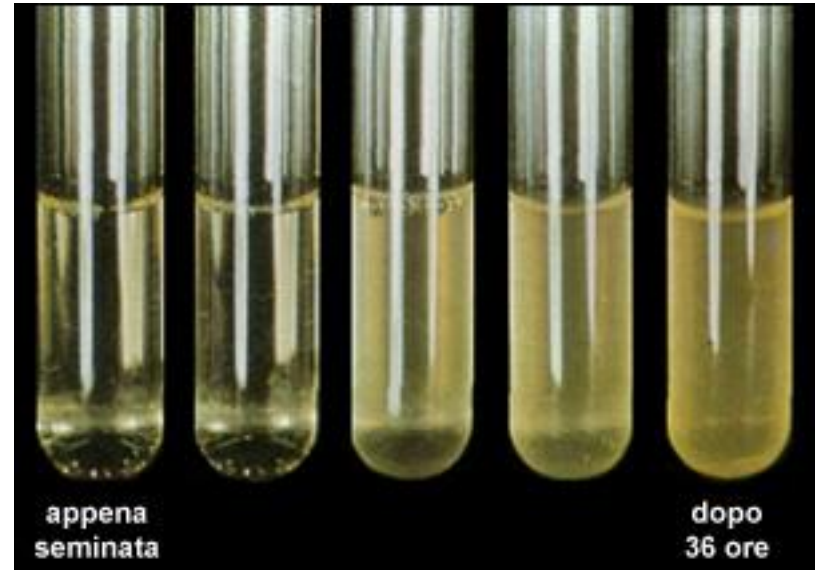
Jończyk-Matysiak et al "Phages in Therapy and Prophylaxis of American Foulbrood – Recent Implications From Practical Applications" Frontiers in Microbiology 2020



Tecniche di isolamento dei fagi specifici per *P. larvae* (1)

Una volta selezionate le matrici, i passaggi per l'isolamento da batteriofagi implicano:

- a) La scelta e la coltivazione dei ceppi di *P. larvae* sui quali effettuare l'isolamento. E' consigliato utilizzare non soltanto ceppi ATCC, ma anche ceppi di campo ERIC I ed ERIC II.
- b) Pre-trattamento delle matrici e arricchimento dei batteriofagi in co-coltura con i ceppi di *P. larvae* selezionati in terreno MYPGPbroth

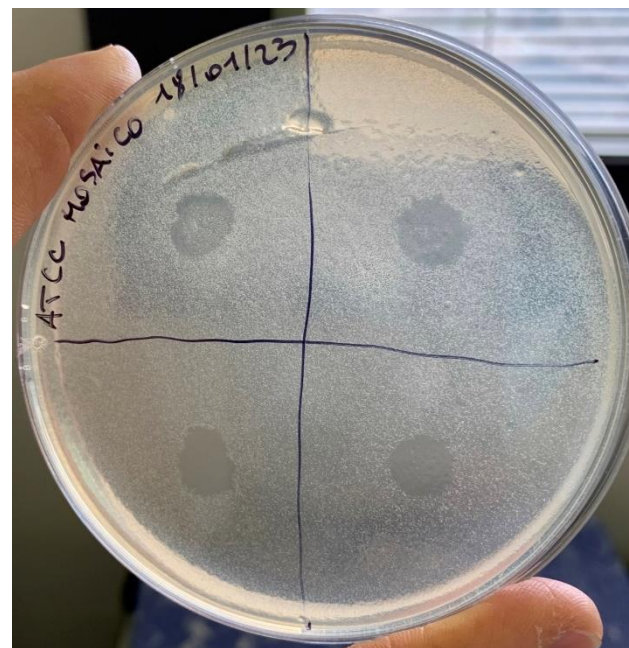


<https://it.cheapbest2022.ru/content?c=terreni%20di%20coltura%20batterici&id=6>



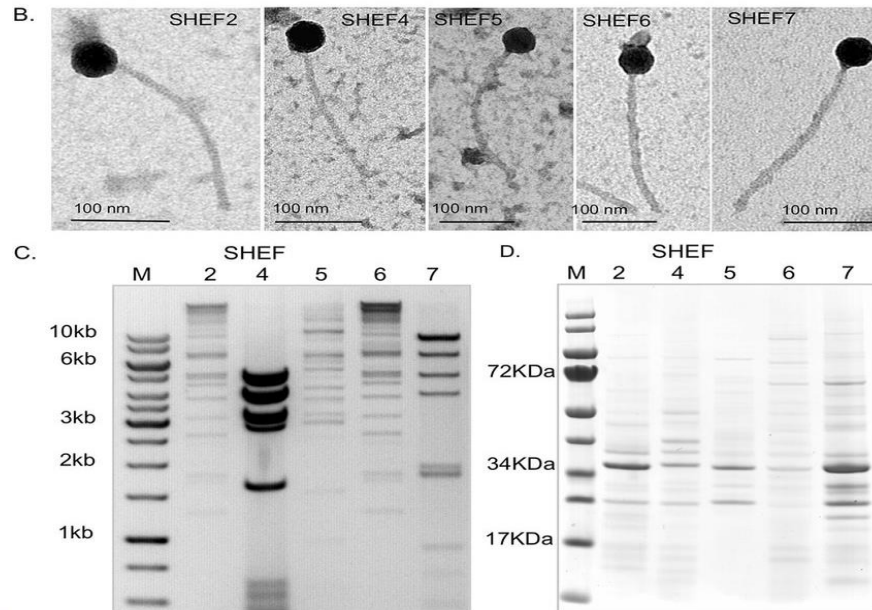
Tecniche di isolamento e amplificazione dei fagi specifici per *P. larvae* (2)

- c) Test di lisi in vitro, SPOT TEST, in MYPGP agar/MYPGP soft-agar
- d) Amplificazione delle singole linee fagiche mediante diluizione in MYPGP agar/MYPGP soft-agar



Caratterizzazione dei fagi specifici per *P. larvae*

- e) Caratterizzazione morfologica mediante microscopia elettronica (metodo ultracentrifugazione e metodo della goccia)
- f) Caratterizzazione genetica che permette di avere «un'impronta genetica» del batteriofago ed escludere di aver selezionato dei doppioni. La caratterizzazione genetica può essere effettuata sul DNA genomico mediante l'analisi Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)



Test in vitro per valutare la funzionalità dei fagi specifici per *P. larvae*

- g) Valori di adsorbimento dei batteriofagi ai ceppi di *P. larvae*. Il valore ottimale di adsorbimento si ottiene quando, in 10 minuti, il 99% dei batteriofagi è stato adsorbito dalle cellule batteriche ospiti
- h) Stabilità dei fagi nelle condizioni di conservazione (Jończyk-Matysiak et al., Viruses 2021). Dai dati riportati in letteratura, la stabilità dei fagi è mantenuta fino ad 8 mesi a 4°C e sotto forma di soluzione al 50% di saccarosio. La concentrazione dei fagi: compresa tra 10^3 - 10^5 PFU/ml, considerando che il rapporto ottimale tra batteri e fagi è di 1:100 o di 1:1000



Somministrazione in campo dei batteriofagi specifici per ***P. larvae***

- Sotto forma di soluzione al 50% di saccarosio e deve contenere da un minimo di 3 ad un massimo di 5 fagi diversi (cocktail).
- La somministrazione in campo del cocktail di fagi porta ad un effetto protettivo e di profilassi; non altera il microbiota delle larve e delle api
- Va tenuto presente che il Royal Jelly inattiva i fagi a causa del suo pH acido (pH=5)



Applicazione in campo dei fagi specifici per *P. larvae* e delle endolisine

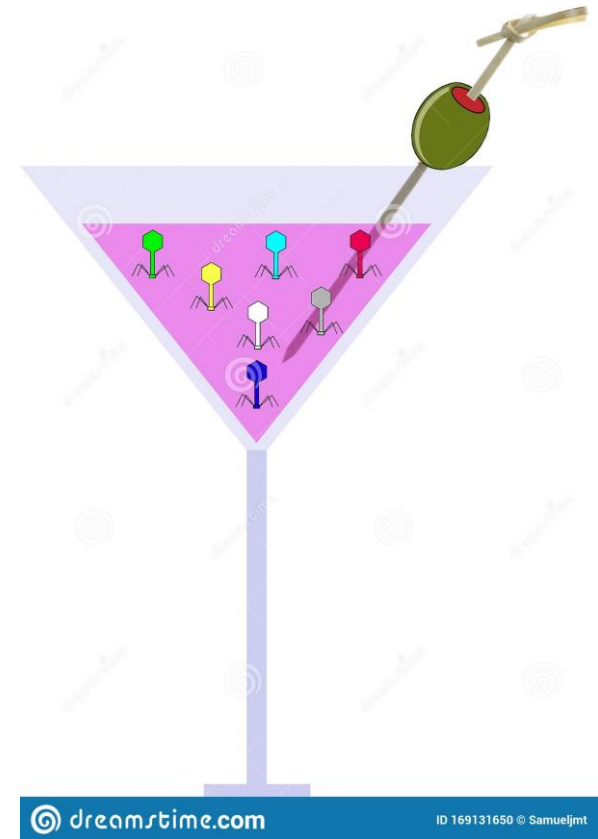
TABLE 2 | Application of *P. larvae* phage or endolysin in bees.

Applied phages or endolysin	Source of phages	Mode of treatment	Results and recommendations	References
HB10c2 phage	Isolated from environment (the glue-like liquid of a beehive)	Infection during feeding. Bees fed with spores of <i>P. larvae</i> strain ERIC I DSM 7030 or ERIC II DSM 2530 at a concentration of 500 cfu/larva, phage was applied at a concentration of 50,000 pfu/larva	Phage did not cause bee mortality and did not disturb gut microbiota composition. However, phage therapy was not efficient in AFB treatment in infected larvae	Beims et al. (2015)
F, WA XIII phages	Phages isolated from <i>P. larvae</i> strain 2231	Infection during feeding. Larvae were infected with 1000 spores. Single phage (10^5 – 10^7 pfu/ml) or phages in cocktail (10^7 pfu/ml) were administered at day 0 or day 1.	Administered phages did not adversely affect survival of larvae. Phages applied before <i>P. larvae</i> NRRLB-3650 infection decreased larval mortality; the authors recommend prophylactic use of phage therapy against AFB	Ghorbani-Nezami et al. (2015)
PlyPa1A lysin	Isolated from <i>P. larvae</i> phage Xenia.	Larvae were infected with <i>P. larvae</i> B-3650 spores (1000 spores/larvae) with food were simultaneously treated with lysin at a concentration of 16 µg/ml.	The enzyme was active mainly against genotypes ERIC I. Do not disturb gut microbiota Larvae infected with spores and treated with single dose of the endolysin were rescued in 75%, which indicate the therapeutic potential .	Le Blanc et al. (2015)
Cocktail consisted of 7 phages: Xenia, Halcyone, Willow, Fern, Vadim, Harrison and Hayley	Phages isolated from: Xenia-infected hive, Halcyone-propolis, Willow-soil, Fern from wild strain 2231, Vadim- lipbalm, Harrison - soil Hayley- soil	Increasing amounts of food containing cocktail. Application within 7 days. Phage cocktail with a titer of 1.8×10^6 pfu/ml was applied before or after infection with spores.	Experiments indicated that prophylactic administration of a phage cocktail resulted in a higher survival of larvae than when applied as a treatment.	Yost et al. (2016)
Phage cocktail consisted of three phages (1, 5, 9)	Not known	Phage application with feeding. Phage cocktail applied to uninfected hives, hives in a mock-treated control group with a titer of 10^6 pfu/ml. After 2 weeks, 4 of the 5 hives in the control group were infected with AFB, while the five phage-treated hives remained healthy.	Phages did not cause deaths of healthy bees. The tested phages did not disturb the gut microbiota even after an overdose application and cocktail application, as observed in case of antibiotic application. Protective and therapeutic effects were observed in this study.	Brady et al. (2017)
PlyPI23 lysin	Isolated from genome of phage phiIBB_PI23	Enzyme provided to larvae with feeding (diet containing 2.0 µM of enzyme).	The enzyme is safe and non-toxic for larvae which were observed during 5 days. It did not affect larvae development.	Oliveira et al. (2015)



Ricerca corrente IZS11/20

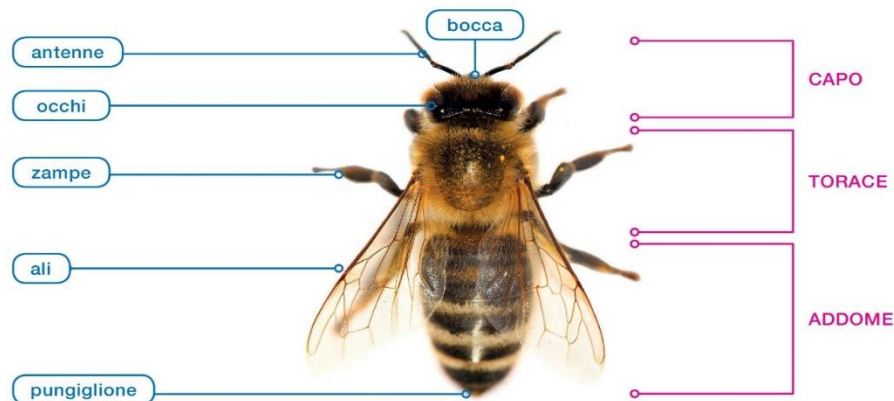
- Attualmente, presso l'IZSLT, è in corso la IZS11/20 RC «Fagoterapia come alternativa agli antibiotici (ATA) nel controllo delle malattie infettive animali: sviluppo di procedure operative per specifiche patologie in modelli di allevamento in Italia»
- Scopo della ricerca: sviluppo di cocktail di batteriofagi per sperimentazione *in vitro* mirata al trattamento della Peste Americana nelle api (*P. larvae*) e delle mastiti bovine dovute a *E. coli*



Campionamento matrici

Le matrici campionate:

- Miele da favo (n. 15)
 - Fiori di campo (n. 1)
 - Acqua di abbeverata (n1 campione)
 - Terra (n. 10 campioni)
 - Api (n. 6)
- Matrice migliore da cui sono stati isolati i batteriofagi: addomi di api.



https://digimparoprimaria.capitello.it/app/books/CPAC90_2613616B/html/16



Trattamento delle matrici (messa a punto dei protocolli per il recupero dei batteriofagi)

- MATRICI SOLIDE o SEMI-SOLIDE (terra, fiori, favo da miele, miele, detriti fondo arnia) e MATRICI LIQUIDE (acqua di abbeverata, omogenati di addomi)
- Per tutte le tipologie di matrici si procede:
 - a) Idratazione/solubilizzazione del campione per 12 ore, a 37°C ed al 5% di CO₂
 - b) Centrifugazione a 3500 x g per 30 minuti in modo tale da abbattere il particolato e la gran parte della carica batterica
 - c) Recupero del surnatante e sua filtrazione con filtro da 0,45μ per eliminare ulteriormente i batteri
- IL FILTRATO VIENE POI ESAMINATO PER LA PRESENZA/ASSENZA DEI BATTERIOFAGI



SPOT TEST SU DOPPIO STRATO (test per verificare la presenza di fagi litici nel campione arricchito)

- La presenza/assenza dei fagi litici viene rilevata mediante la tecnica dello SPOT TEST SU DOPPIO STRATO
- Nella pratica, sulla superficie delle piastre MYPGP agar vengono versati 4ml del terreno MYPGP soft agar contenente 300µl della coltura del ceppo ospite di *P. larvae* in fase stazionaria (1Mc Farland assorbanza) + 20µl di acido pipemidico (stock 4000µg/ml) + 40µl di acido nalidixico (stock 3000µg/ml) + 80µl (concentrazione finale 0,02M) di $MgCl_2$ (1M) alla temperatura di 50°C
- Lasciare solidificare il terreno MYPGP soft agar, depositare 5µl di ciascun campione e lasciare adsorbire
- Incubare sia per 24 ore che per 48 ore per valutare la comparsa sia precoce che tardiva delle placche di lisi

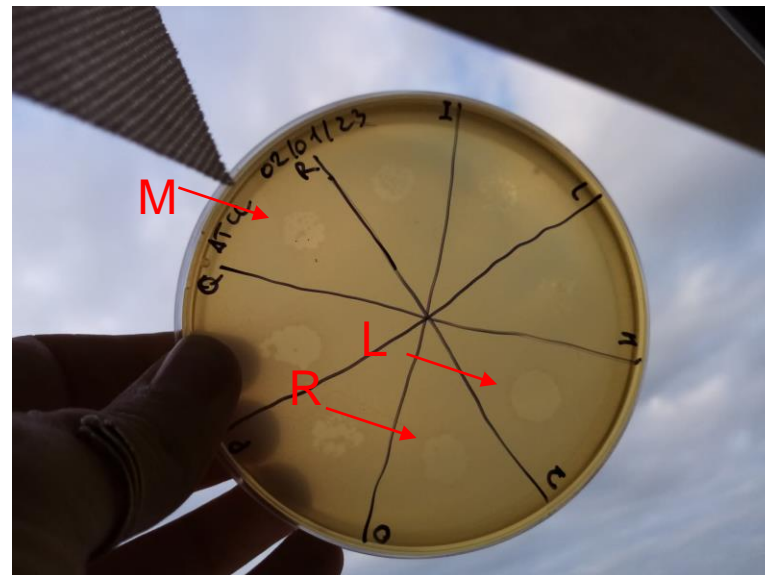


Ceppi di *P. larvae* utilizzati per la verifica della presenza dei batteriofagi

- I ceppi di *P. larvae* di partenza utilizzati per valutare la presenza/assenza dei fagi sono: il ceppo ATCC 9545 ed un ceppo di campo ERIC II
- Utilizzando come matrici gli addomi delle api, attualmente, abbiamo verificato e annotato tre tipologie di placche di lisi su questi ceppi di *P. larvae* sopra riportati:

- Placca liscia
- Placca rugosa
- Placca mosaico

Che corrispondono a 3 differenti batteriofagi



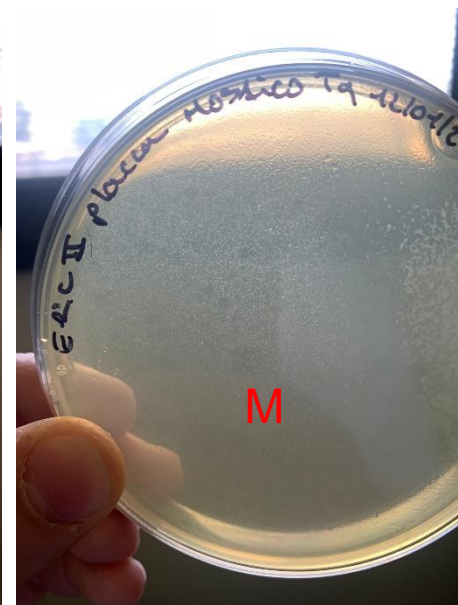
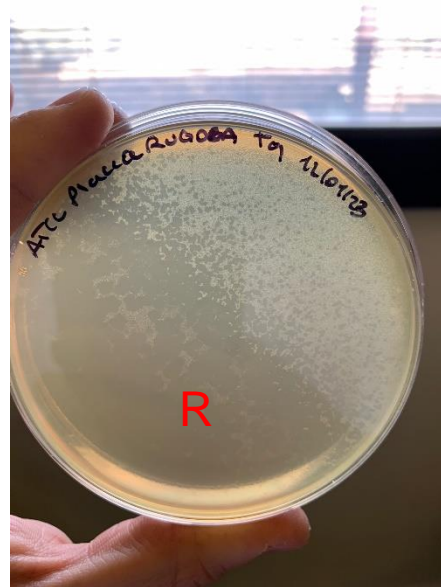
Recupero batteriofagi dalle placche di lisi e loro clonaggio

- Per recuperare le tre tipologie di placche di lisi (liscia, rugosa, mosaico) vengono versati dalle singole piastre dello SPOT TEST 5ml di diluente sterile per fagi (Buffer A costituito da NaCl, $MgCl_2$, Tris-HCl, gelatina), incubate per 24 ore a 4°C
- Da ogni piastra dello SPOT TEST così trattate, si recupera la sospensione fagi+batteri e si centrifuga a 12.000 rpm per 10 minuti. Si filtra con filtro da 0,22µ per eliminare i batteri
- Le fasi successive prevedono il clonaggio, ovvero l'ottenimento di una coltura di fagi monoclonale



Clonaggio dei fagi liscio, rugoso, mosaico

- Per ciascun batteriofago (liscio, rugoso, mosaico) recuperato si va in diluizione seriale fino a 10^{-3} e si procede con doppio strato in soft agar utilizzando gli stessi ospiti di origine (ATCC 9545 ed il ceppo di campo ERIC II) dai quali sono state recuperate le placche di lisi.
- N.B.: nel clonaggio, quando viene preparato il soft agar, sia il ceppo ospite che il batteriofago (liscio, o rugoso, o mosaico) vengono messi insieme.



Stavolta le placche di lisi sono notevolmente più piccole, perché “presumibilmente” derivanti da un singolo fago, ma questo passaggio dovrebbe essere condotto per due volte per avere la certezza di una coltura pura.



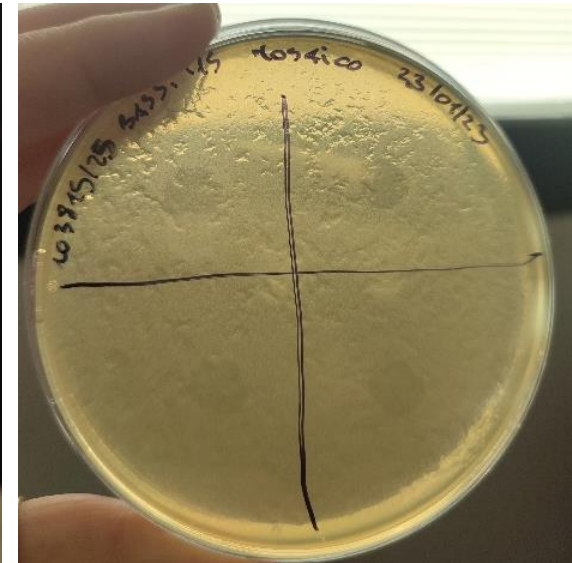
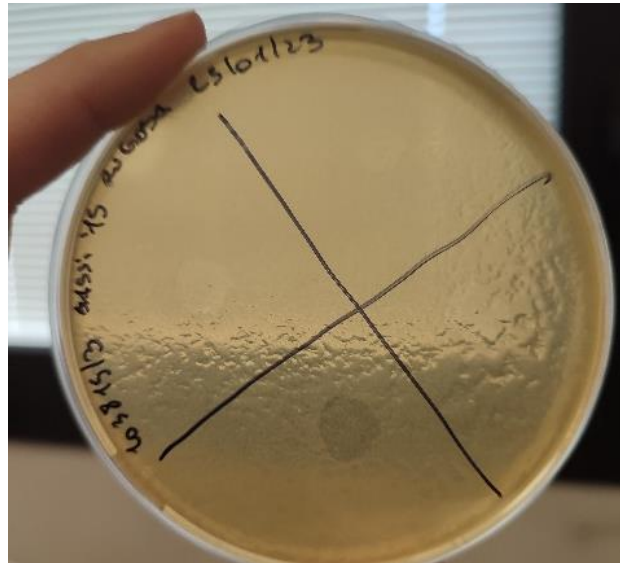
Caratterizzazione: spettro d'ospite (1)

- È necessario valutare lo spettro d'ospite di ciascun fago che va in collezione, perché questa caratteristica sarà poi fondamentale nella scelta e nella messa a punto di cocktail di fagi per i trattamenti
- Uno spettro d'ospite ampio è sicuramente preferibile, ma un fago con uno spettro d'ospite ristretto può comunque essere importante













Caratterizzazione: spettro d'ospite (2)

- Attualmente abbiamo:
 - Testato 37 ceppi P. larvae di campo su 78 isolati forniti dal Laboratorio di Apicoltura
 - 7 ceppi di P. larvae di campo sono risultati fin'ora sensibili ai 3 tipi di fagi ad oggi rilevati (liscio, rugoso, mosaico)



Caratterizzazione: studio della morfologia mediante microscopia elettronica (metodo ultracentrifugazione e metodo della goccia)

Shape	Order or family	Nucleic acid, particulars, size	Member	Number*
	Caudovirales	dsDNA (L), no envelope		
	Myoviridae	Tail contractile	T4	1312
	Siphoviridae	Tail long, noncontractile	λ	3262
	Podoviridae	Tail short	T7	771
	Microviridae	ssDNA (C), 27 nm, 12 knoblike capsomers	φ X174	38
	Corticoviridae	dsDNA (C), complex capsid, lipids, 63 nm	PM2	3?
	Tectiviridae	dsDNA (L), inner lipid vesicle, pseudo-tail, 60 nm	PRD1	19
	Leviviridae	ssRNA (L), 23 nm, like poliovirus	MS2	38
	Cystoviridae	dsRNA (L), segmented, lipidic envelope, 70–80 nm	φ 6	3
	Inoviridae	ssDNA (C), filaments or rods, 85–1950 x 7 nm	φd	66
	Plasmaviridae	dsDNA (C), lipidic envelope, no capsid, 80 nm	MM2	5

* From reference 1. C, circular; L, linear.





Ringraziamenti:

- Produzione e patologia delle api e centro di collaborazione OIE in Apicoltura: *Giovanni Formato, Marcella Milito, Marco Pietropaoli, Camilla Di Ruggiero*
- Innovazione e tecnologie biomediche: *Raniero Lorenzetti*
- CIDEFI-Unidad de biotecnologia Universidad de la Plata Argentina: Prof.ssa *Adriana Monica Alippi*

